

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA
POSGRADO EN INGENIERIA BIOMEDICA

**ESTUDIO DE DAÑO ISQUEMICO INTESTINAL
POR MEDICION DE ACTIVIDAD DE LACTATO
DESHIDROGENASA
COMPARADA CON HISTOLOGIA**

RAUL LEONARDO NARVAEZ SANCHEZ

COMUNICACION DE RESULTADOS
PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

ASESOR
EMILIO SACRISTAN ROCK

AGOSTO, 2001

**ESTUDIO DE DAÑO ISQUEMICO INTESTINAL POR MEDICION DE ACTIVIDAD
DE LACTATO DESHIDROGENASA COMPARADA CON HISTOLOGIA**

**COMUNICACION DE RESULTADOS
PRESENTADA POR
RAUL LEONARDO NARVAEZ SANCHEZ**

**PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)**

Sinodales:

Dra. Cleva Villanueva Lopez
Escuela Militar de Graduados de Sanidad

Dr. Ramón Gonzalez Camarena
Laboratorio de Fisiología Cardiopulmonar
UAM – Iztapalapa

Dr. Emilio Sacristán Rock
Laboratorio de Instrumentación Biomédica
UAM – Iztapalapa

Indice

1. Resumen	1
2. Reconocimientos	3
3. Introducción	4
4. Antecedentes	6
4.1. Aspecto médico	6
4.1.1. Enfoques terapéuticos en isquemia intestinal y choque	9
4.2. Aspecto técnico	10
4.2.1. Métodos de diagnóstico directo	10
4.2.1.1. Espectrometría de Impedancia Gastrointestinal	10
4.2.1.2. Imagenología y Espectrometría por Resonancia Magnética en Isquemia	12
4.2.1.2.1. Imagenología por Difusión	13
4.2.1.2.2. Imagenología ponderada en T1 y T2	14
4.2.1.3. Tonometría Gástrica	16
4.2.1.3.1. Asociación de tonometría a determinaciones de lactato en sangre	16
4.2.2. Otros métodos de diagnóstico de isquemia intestinal, y relacionados	16
4.2.2.1. Cateterización de la arteria pulmonar	16
4.2.2.2. Tomografía computarizada	17
4.2.2.3. Otras mediciones químicas	17
4.2.2.4. Miscelánea	17
4.2.3. Determinación de actividad de LDH	18
4.2.4. Histopatología y escalas usadas para medir daño isquémico	21
4.3. Hipótesis	21
5. Métodos	23
5.1. Animales	23
5.2. Procedimiento	23

5.3. Estadística	25
6. Resultados	27
7. Discusión	53
8. Conclusiones	57
8.1. Recomendaciones para trabajos futuros	57
9. Apéndice: Publicaciones previas	59
10. Referencias	60

ESTUDIO DE DAÑO ISQUEMICO INTESTINAL POR MEDICION DE ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA COMPARADA CON HISTOLOGIA

1. Resumen

Como parte de un grupo de estudios que pretende caracterizar el daño causado por la isquemia y la reperfusión en la mucosa intestinal, hemos evaluado la prueba espectrofotométrica de reducción de sales de tetrazolio (yodo-nitro-tetrazolio clorhidrato, INT) para determinar la actividad de la hormona Lactato Deshidrogenasa (LDH), y a través de ello, conocer el nivel de daño isquémico intestinal inducido. El INT es reducido como consecuencia indirecta de la acción de la LDH hasta producir formazán, y este proceso puede ser medido con un espectrofotómetro. Usamos un modelo de isquemia intestinal por oclusión arterial en la rata, para comparar la actividad LDH con una graduación histológica estándar por microscopía de luz. Se usaron cinco grupos. En tres de ellos se indujo isquemia en la pared del íleon por periodos de 1, 2 y 3 horas seguidas de igual tiempo de reperfusión. Los otros dos grupos fueron, uno de 6 horas de sólo isquemia, y uno de 6 horas de control. Cada hora una biopsia de íleon fue preparada para la medición de la actividad de LDH, y otra para la graduación histológica a ciegas. Este estudio aplica la medición de actividad de LDH en tejidos completos, específicamente en la pared del íleon, agrega reperfusión, e intenta caracterizar daño isquémico intestinal llevando los animales hasta seis horas de isquemia haciendo este tipo de medición bioquímica.

La actividad de la LDH se encontró significativamente valiosa para distinguir biopsias con menor tiempo de isquemia de biopsias con mayor tiempo de isquemia. No se logra demostrar asociación entre los hallazgos histológicos y los hallazgos de actividad de la LDH. Se discute que ninguno de los dos métodos, solos o combinados, es ideal para monitoreo de daño isquémico, ya que exige la

extracción de tejido, y un procesamiento de varias horas para obtener resultados altamente variables. Es necesario continuar en la búsqueda de métodos no invasivos para la detección temprana de la isquemia gastrointestinal, que permitan además el monitoreo de su tratamiento.

2. Reconocimientos

El presente trabajo se realizó con la asesoría del doctor Emilio Sacristán Rock, profesor investigador titular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), en México DF.

La parte experimental fue llevada a cabo por el ingeniero y maestro en ciencias César González Díaz y por el médico cirujano Raúl Narváez Sánchez, ambos alumnos del posgrado en ciencias de la UAM-I. En lo quirúrgico se contó con el apoyo de la doctora en farmacología Cleva Villanueva López, en las instalaciones y con el apoyo material y técnico del Laboratorio de Farmacología de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de México DF.

El estudio histológico fue realizado por el patólogo Pedro Rodríguez Jurado, de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de México DF.

Esta investigación fue parcialmente apoyada, en lo económico, por Inovamedica S.A. de C.V.

El autor agradece a estas y todas las otras personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

Raúl Narváez Sanchez

3. Introducción

La falla multisistémica, también llamada falla orgánica múltiple, es la principal causa de muerte en salas de cuidados intensivos. La mucosa intestinal viene siendo cada vez más reconocida como fundamental en el proceso de descompensación y choque, porque la isquemia en ella cambia el papel de la mucosa de limitador a promotor de la falla multisistémica. "La isquemia mesentérica aguda puede resultar de émbolos, trombosis arterial y venosa, o vasoconstricción secundaria a bajo flujo. Las tasas de mortalidad reportadas en los últimos 15 años permanecen tan altas como estaban hace más de 70 años, y promedian 71%, con un rango de 59%-93%. El diagnóstico antes del infarto intestinal es el factor más importante para mejorar tan pobres resultados"¹. Es determinante para el diagnóstico, guía de terapia y pronóstico, identificar no la sola presencia de isquemia sino cuantificar el daño ocasionado, y la consecuente viabilidad del tejido afectado.

La mucosa acumula productos tóxicos durante la isquemia, que luego son activados y/o barridos hacia otros órganos cuando se reinfunde volumen al tejido. Esto es lo que se llama daño por reperfusión. El daño por reperfusión obliga al médico a conocer bien el estado de la mucosa antes de tomar acciones terapéuticas, so pena de profundizar el estado de choque.

Con estos antecedentes, el Laboratorio de Instrumentación Biomédica de la UAM-I, bajo la dirección del doctor Emilio Sacristán Rock, inició una línea de investigación en diagnóstico y monitoreo de daño isquémico intestinal. El proyecto central de esta línea aborda la utilidad de las mediciones complejas de impedancia en la mucosa intestinal para dicho diagnóstico, y para guía de terapia del choque. Para complementar la caracterización del daño isquémico en la pared del íleon, y con el objeto de contribuir a la calibración del espectrómetro de impedancia intestinal, el presente estudio busca evaluar una técnica bioquímica, comparada a una técnica histológica, para diagnóstico del daño isquémico. De manera colateral este estudio busca mejorar la caracterización del modelo quirúrgico de oclusión de la arteria mesentérica superior en el animal de experimentación.

La técnica bioquímica a que nos referimos es la cuantificación de actividad de la enzima LDH, medida por el cambio de absorbancia que presenta un sobrenadante hasta ahora usado sólo en cultivos celulares. Este estudio ha aplicado la medición de actividad de LDH en tejidos completos, agrega reperfusión, y busca caracterizar daño isquémico intestinal llevando los animales hasta seis horas de isquemia, haciendo este tipo de medición bioquímica. Algunos autores² han usado ya este método pero con otras sales de tetrazolio, sin causar reperfusión, y sólo llevando procedimientos hasta dos horas. Nuestro interés en llevar hasta seis horas los experimentos se basa en otros estudios³, en que se ha determinado progresión del daño por tal tiempo, en el modelo de isquemia oclusiva.

Otros proyectos del Laboratorio de Instrumentación buscan complementar la caracterización del daño isquémico intestinal involucrando la microscopía por resonancia magnética. Por ese motivo hemos usado para este trabajo la clasificación patológica propuesta por Chiu⁴ en 1970, varias veces citada en estudios que usan dicha técnica de imagenología.

4. Antecedentes

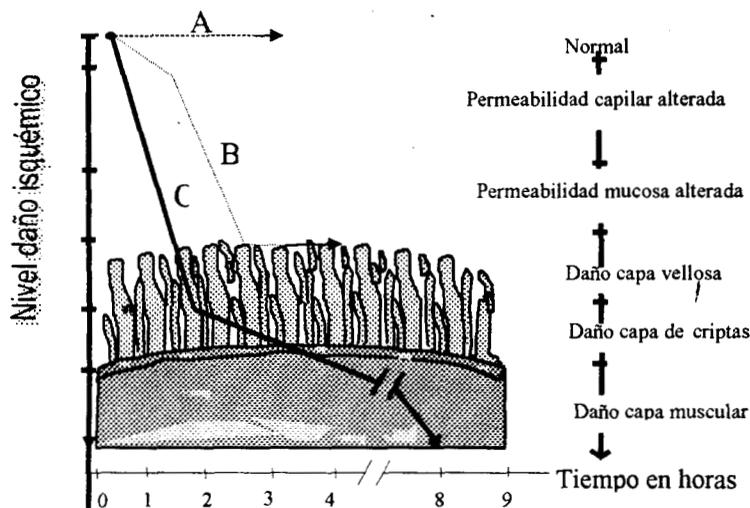
Isquemia es suministro de oxígeno a los tejidos sostenidamente inferior a la demanda energética de éstos, y puede desencadenar una reacción sistémica crítica llamada estado de choque. La isquemia en la mucosa gastrointestinal ocurre en más de 56% de los pacientes en cuidados intensivos⁵, y la mortalidad asociada a ella permanece alta –entre el 70 y el 90%- en gran parte debido a la pobre especificidad de los métodos diagnósticos hoy utilizados, y a la tardía alerta que estos pueden dar⁶. Un estudio multicéntrico en Argentina, coordinado por Gutiérrez⁷ demostró reducción significativa en la mortalidad de pacientes de terapia intensiva al usar un protocolo agresivo de resucitación guiado por el pHi de la mucosa gástrica, evidenciando el valor de monitorear los tejidos viscerales en estos pacientes. Sin embargo, en un subgrupo de pacientes con isquemia ya presente al ser admitidos (y por tanto un nivel de daño no determinado en la mucosa) el protocolo de resucitación aceleró la muerte. Esto hace evidente que para una terapia efectiva y bien coordinada en el tiempo, es de gran importancia conocer el nivel de daño isquémico gastrointestinal de forma continua y sencilla, a un costo razonable.

Nuestro laboratorio ha desarrollado un sistema basado en espectrometría de impedancia, sencillo y de costo razonable, que mediante una sonda nasogástrica da información crítica continua en tiempo real sobre la integridad funcional de la mucosa. Así, nuestro grupo es el único en el Mundo trabajando en este problema con impedancia mucosa y enfocado en la cuantificación del daño isquémico. En un trabajo previo⁸, con el modelo de choque hemorrágico en conejos, encontramos diferencias de impedancia intestinal entre animales sanos e hipovolémicos. Con el modelo de infarto intestinal en ratas y vinculando al estudio la histología hemos pretendido evidenciar cambios más profundos para caracterizar el daño isquémico en la mucosa.

4.1. Aspecto médico:

La isquemia intestinal puede ser causada por 1) estrangulamiento intestinal, 2) cualquier tipo de estado de choque, dígame hemorrágico, séptico, cardiogénico,

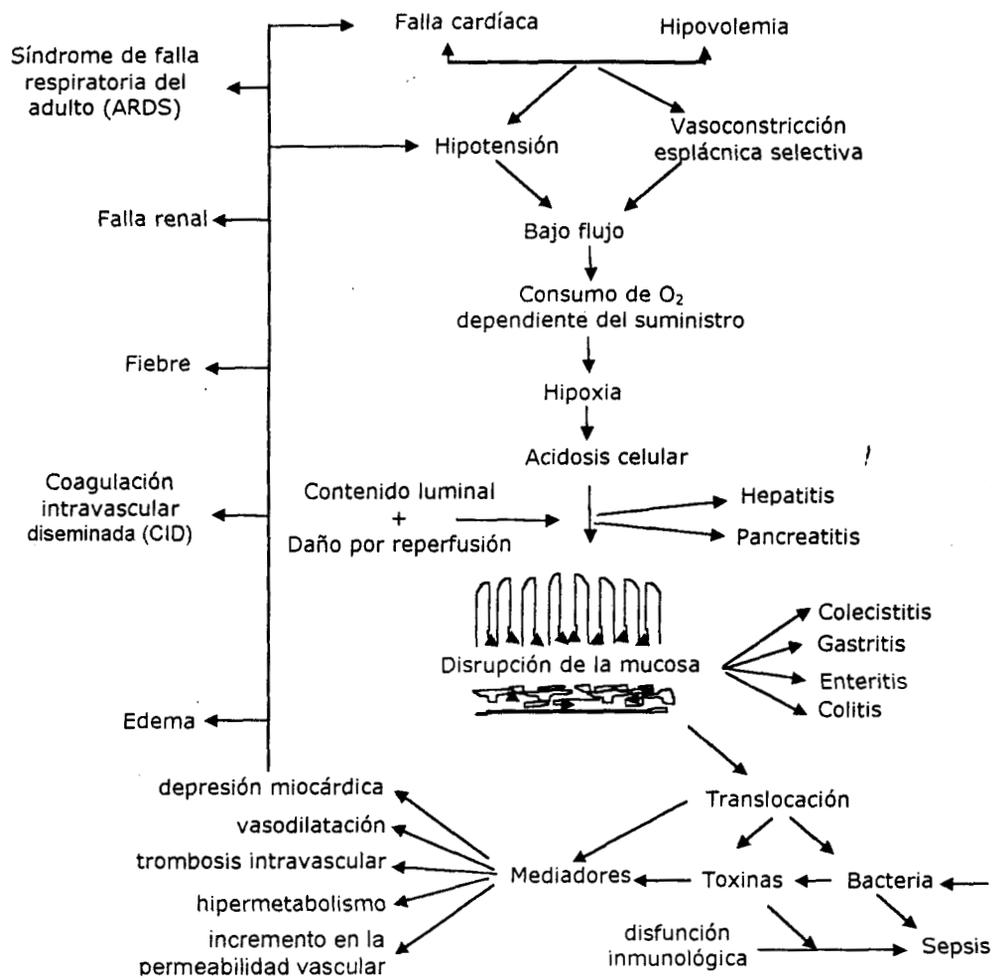
neurogénico, etc., 3) embolia grasa debida a una fractura, gaseosa debida a buceo o mal procedimiento quirúrgico, o sanguínea debida a trombos por arritmia cardiaca o aterosclerosis, 4) sobredistensión intestinal, u ocupación con una sustancia que supere la presión de perfusión de la pared, e incluso 5) consumo de fármacos como vasopresores o anticonceptivos orales⁹, y posibilita una reacción sistémica crítica llamada estado de choque, mediante un reflejo simpático vasoconstrictor que redistribuye el volumen hacia órganos vitales con sacrificio de superficies extensas¹⁰, de las cuales la primera es la mucosa intestinal¹¹. Durante su primera etapa el choque se llama compensado, y puede la reacción vegetativa enmascararlo a variables hemodinámicas como pulso, presión sanguínea, pH y gases arteriales. La gráfica 1 muestra la evolución del daño isquémico por oclusión vascular respecto al tiempo.



Gráfica 1. El grado de daño isquémico a la pared intestinal graficado contra la duración de la isquemia. Adaptado de Haglund³.

La gráfica 1 está basada en el artículo de Haglund³, que revisa y compara varios estudios previos en animales. En A de la gráfica 1 no hay oclusión vascular. En B hay una oclusión parcial de la arteria mesentérica superior, y el daño isquémico alcanza las puntas de las vellosidades. En C hay una oclusión total, y el daño isquémico a las tres horas alcanza las criptas (punto de producción de nuevas células para la vellosidad), y después a la capa muscular lisa intestinal. En sepsis la isquemia se debe a que la demanda metabólica de la mucosa

supera la oferta de oxígeno de la sangre, con resultado igual. Sea por restricción de flujo, por sangrado o por sepsis, el tejido isquémico cae en metabolismo anaeróbico, que lo lleva a acumulación de CO₂ y ácido láctico. Además, como el aporte sanguíneo al intestino viene desde su adventicia, la mucosa queda como última capa de la circulación mesentérica, por lo que la isquemia en esta mucosa puede ser detectada mucho antes de que se haga evidente el choque con otra medición. En etapas avanzadas del choque, el cuerpo ya no puede compensar las insuficiencias locales, terminando en falla multisistémica y muerte¹² siendo la principal causa de deceso en salas de terapia intensiva¹³.



Gráfica 2. Patogénesis de la falla multisistémica. Papel fundamental de la mucosa intestinal durante la isquemia. Adaptado de Marston, op cit¹¹.

El daño isquémico permite liberación de sustancias tóxicas y se pierde la función de barrera, con paso de bacterias o sus productos a la circulación. La gráfica 2 muestra la patogénesis de la falla multisistémica, y el papel inicialmente limitador, pero luego promotor, de tal proceso por parte de la mucosa.

La traslocación a la circulación linfática y portal, y a la cavidad peritoneal, de bacterias enteras o productos de ellas como lipopolisacáridos o peptidoglicanos tiene enorme actividad proinflamatoria local y sistémica^{14,15}. La mucosa se autodigiere y ulcera, alcanzando el daño irreversible. La probabilidad de falla multisistémica está directamente relacionada con este daño isquémico.

4.1.1. Enfoques terapéuticos en isquemia intestinal y choque:

Parte del diagnóstico y pronóstico del paciente en peligro de choque se basa en escalas, de las cuales la más aplicada hoy en unidades de terapia intensiva del Mundo es la Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) versión II o versión III, si bien dudosamente un solo sistema pueda ser validado en todos los tipos de poblaciones debido a la gran variación en características clínicas y de pacientes entre Unidades de Cuidado Intensivo¹⁶.

El tratamiento de estos pacientes incluye una amplia gama de medidas preventivas y correctivas enfocadas a limitar o revertir el daño isquémico de la mucosa. Cuando este daño es aún leve, es importante limitar la isquemia con medidas de resucitación hemodinámica agresiva⁷, vasodilatadores para aumentar la perfusión local (por ejemplo promotores de NO), oxigenación intraluminal¹⁷, y/o reducción de las necesidades de O₂ eliminando focos de infección o enfriando el tejido. La auto-digestión de la pared intestinal puede ser prevenida reduciendo el pH luminal y removiendo o inhibiendo proteasas. Si el daño isquémico ha llegado a cierto nivel es importante prevenir daño adicional con eliminadores farmacológicos de radicales libres y/o limitando la reperfusión¹¹ por ejemplo con inhibidores de síntesis de NO. Reciente evidencia soporta que la sobreproducción de NO en el endotelio y músculo liso vascular es el mecanismo clave por el que los productos bacterianos inducen el choque séptico. A pesar de su valor para recuperar la presión arterial^{18,19} aún no es fuerte la evidencia de que disminuyan la mortalidad, también en los modelos

animales. Incluso un estudio de inhibición no selectiva de la sintasa de NO en pacientes con choque séptico fue recientemente terminado debido a excesiva mortalidad en el grupo de tratamiento²⁰. Así los inhibidores de NO se han venido usando entre las últimas alternativas, pero cabe pensar si los hallazgos mixtos en los estudios obedecen a baja efectividad del medicamento, o a que es administrado en un momento inadecuado porque no se tiene un monitoreo continuo del daño de la mucosa, o porque este sea insuficiente.

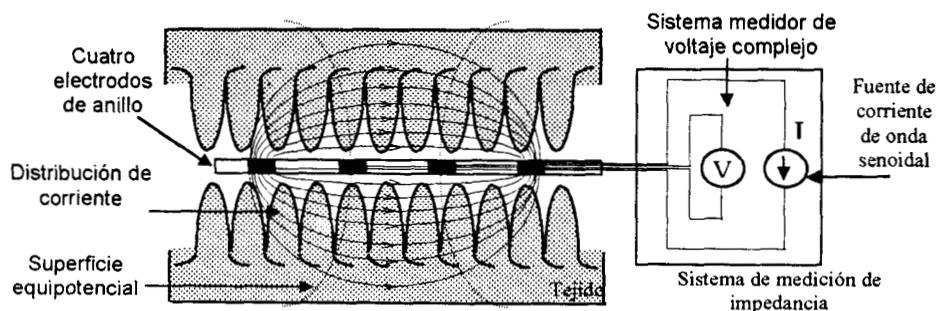
4.2. Aspecto técnico:

Se han explorado muchos métodos para valorar directa o indirectamente la isquemia intestinal, la mayoría con resultados de interés pero con pobre viabilidad para usar como monitores clínicos. Se presenta una crítica de los más difundidos.

4.2.1. Métodos de diagnóstico directo:

4.2.1.1. Espectrometría de Impedancia Gastrointestinal:

La EI ha sido usada ya por varios investigadores para detectar isquemia de otros tejidos²¹, pero sólo nosotros la hemos usado en mucosa *in situ*. Algunos^{22,23} han propuesto el uso de mediciones de impedancia para monitoreo de perfusión tisular con un sistema a una sola frecuencia y en tejidos superficiales para cirugía reconstructiva. Kun²⁴ estudió y modeló el comportamiento eléctrico de tejidos en espectros de frecuencias y desarrolló un sistema sobre el que basamos nuestro prototipo.



Gráfica 3. Sistema de cuatro electrodos para la medición de la impedancia compleja del tejido. La fuente de corriente produce una corriente de excitación senoidal constante en el tejido a través de los dos electrodos exteriores. Las mediciones complejas de voltaje se realizan mediante los dos electrodos interiores.

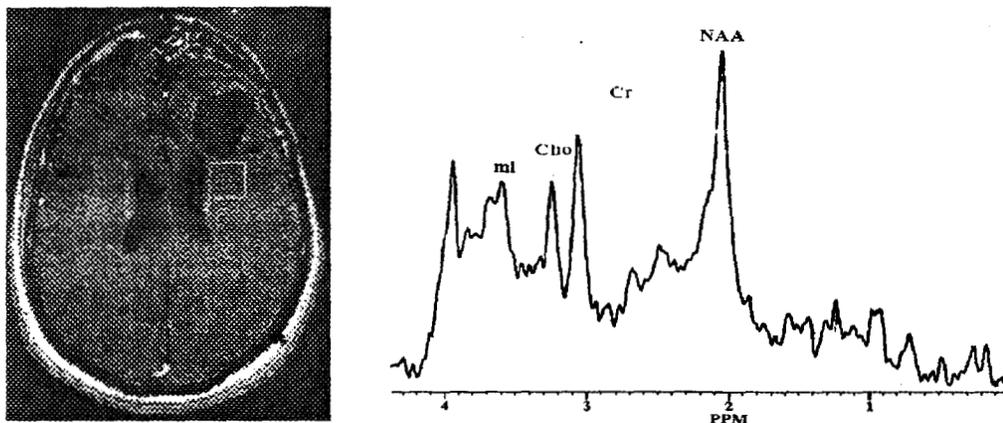
Usamos cuatro electrodos en una sonda nasogástrica. El proximal y el distal son conectados a una fuente de corriente constante y los dos electrodos interiores miden el potencial generado por la corriente en el tejido (gráfica 3). Las células funcionan como pequeños condensadores en serie donde las membranas actúan como aislantes, y la impedancia es calculada como la proporción entre el voltaje medido y la corriente inyectada. No se trata de realizar una medición absoluta de impedancia sino mediciones relativas a diferentes frecuencias, pues la impedancia puede variar con eventos como la posición de la sonda, la composición del contenido gástrico, la orientación de los vasos sanguíneos al proporcionar un conductor de baja resistencia para corriente eléctrica a lo largo del vaso, las variaciones de volúmenes sanguíneo, extracelular e intracelular, la permeabilidad iónica de las membranas y la osmolaridad de los fluidos.

Othman²⁵ diseñó y construyó un espectrómetro de impedancia prototipo que mide impedancia compleja tisular a frecuencias arbitrarias, compuesto de dos partes principales, la de instrumentación que mide la impedancia, y la de control, basada en una computadora que controla la operación del instrumento, la recolección de datos y el almacenamiento y análisis de éstos. Emplea una corriente de excitación de 10 mA y el rango efectivo de frecuencia va de 0.05 a 300 KHz. Este primer instrumento fue evaluado *in vivo* en un estudio piloto por Othman, González, Narváez y Sacristán²⁶, y funcionó de manera aceptable. Al momento se está buscando una nueva generación del prototipo basada en una PC portátil y con respuesta en frecuencia hasta 1 MHz.

La impedancia de entrada del sistema de medición de voltaje es varios órdenes de magnitud mayor que la impedancia tisular y que aquella de la interfase electrodo – mucosa, y así la corriente inyectada pasa a través del tejido y sólo una proporción despreciable pasa a través de los electrodos interiores sin cambiar la distribución de corriente entre las células. El voltaje de la interfase electrodo - mucosa para los electrodos interiores es casi constante, y la impedancia total representa la impedancia tisular únicamente.

4.2.1.2. Imagenología y Espectrometría por Resonancia Magnética en Isquemia (IERM):

Como la isquemia está relacionada con fenómenos bioquímicos básicos, la IERM permite estudiarla al usar intensidades de campo superiores a 1.5 Tesla para problemas como la isquemia cerebral²⁷, el cáncer²⁸ y una variedad de desordenes metabólicos²⁹. Su inmenso defecto ha sido, es y seguirá siendo por mucho tiempo el elevadísimo costo de equipos, software y operación en general, además del tamaño del equipo y la dificultad que supone desconectar a un paciente crítico para llevarlo a un estudio de resonancia. Dicho de otra manera, la IERM actualmente no es viable para monitorear pacientes críticos, aunque puede ser de gran utilidad para validar experimentalmente el funcionamiento de otros métodos como la espectrometría de impedancia intestinal.



Gráfica 4: Una imagen y su espectro asociado, adquiridos usando IERM

El fósforo (^{31}P) es uno de los elementos que más se ha trabajado ya que virtualmente todas las células derivan su energía del adenosín trifosfato, y puede verse en otros compuestos como la fosfocreatina y los fosfatos inorgánicos^{30,31}. Además la concentración intracelular precisa de iones hidrógeno (pH) puede medirse usando la frecuencia de la señal de fosfato inorgánico en el espectro del ^{31}P . Las imágenes contrastadas mejoran el cociente señal – ruido, usando técnicas sensibles a flujo. Otros elementos importantes son el ^{13}C para metabolismo intermediario³², posiblemente enriquecido con sustratos etiquetados como la glucosa para medir ciclo de Krebs³³, el ^1H por su

sensibilidad protónica absoluta, aunque sus señales provenientes de agua y lípidos se enciman con las frecuencias de resonancia dificultando sacar información, y el ^{23}Na para mediciones de sodio intra y extracelular (con disprosio para resaltar, aunque este agente es tóxico y no se usa clínicamente). Los campos de alta intensidad mejoran el cociente señal a ruido y permiten ver frecuencias que por su naturaleza tienen magnitudes pequeñas, posibilitando una evaluación más acertada de cambios entre eventos patológicos y variaciones normales ínter individuos, a la vez de generar imágenes microscópicas para determinar progresión de daño en la propia vellosidad intestinal.

A continuación se presenta una explicación somera de las técnicas más utilizadas para imagenología RM como herramienta de estudio de la isquemia intestinal.

4.2.1.2.1. Imagenología por Difusión: Durante la isquemia, la reducción de oxígeno induce falla energética en la célula, bloqueando los canales Na-K. Así, el incremento de sodio intracelular produce acumulación de agua intracelular movilizadora desde el espacio extracelular. Este proceso es llamado edema citotóxico. Es una posible explicación a la reducción en la movilidad del agua vista como reducción de la difusibilidad en imagenología por difusión en el cerebro. Así, incluso 30 minutos luego del inicio de los síntomas neurológicos, imagenología por difusión puede revelar el área lesionada³⁴.

Para cuantificar, es necesario determinar el grado de ponderación en difusión de la secuencia. Este grado de ponderación es conocido como el 'factor b', que caracteriza la sensibilidad de la secuencia, como el TE caracteriza el grado de ponderación en T2 de una secuencia espín eco. b es dado por

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 [\Delta - (\delta/3)]$$

donde γ es la constante giromagnética; G y δ son la amplitud y duración del pulso del gradiente, respectivamente; y Δ es la separación entre los pulsos del gradiente. Se toman por lo menos dos imágenes con diferente b para estimar un coeficiente de difusión aparente (ADC). Se llama aparente porque es información compleja, resultado de diversos movimientos moleculares. Casi

cualquier secuencia MR puede ser diseñada para medir difusión, pero la más usada es la Bipolar, llamada de Stejskal-Tanner. Esta tiene dos pulsos de gradiente que la sensibilizan al movimiento, el primero entre los pulsos de 90 y 180°, y el segundo entre el pulso de 180° y el eco. El primero desfasa los espines y el segundo los refasa. Si uno de los espines ha cambiado de posición entre la aplicación del primer y el segundo pulsos, ese espín recibirá una intensidad de campo diferente y, por ello, no alcanzará una fase exacta con los otros. Mientras menos espines sean refasados, menor será la amplitud de la señal espín eco. Dicha atenuación permite medir el coeficiente aparente.

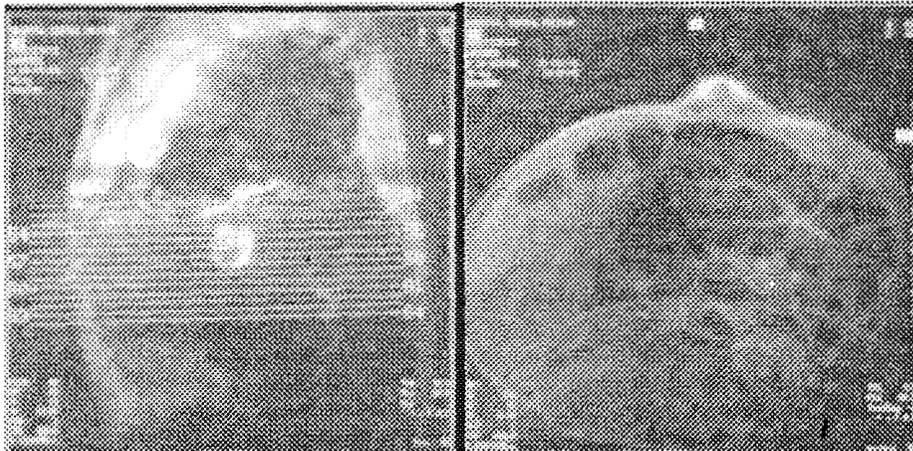
Hay dos maneras básicas de obtener y desplegar información de difusión³⁴⁻³⁶. Una es la ponderación por difusión, DWI, en que una sola imagen es obtenida. En esta no se tiene una curva de atenuación de la señal para cada voxel. La otra forma es el mapa ADC, que se obtiene por series de imágenes, cada una a diferente valor b. Se produce una curva de atenuación de la señal, y el ADC es calculado a partir de esa curva. Repetido el proceso para toda la imagen, un valor ADC se puede asignar a cada voxel para producir un mapa calculado en que el color, o la escala de grises de cada voxel corresponde a ese particular valor de ADC.

4.2.1.2.2. Imagenología ponderada en T1 y T2: Los tiempos de relajación T1 (longitudinal, spin-lattice), y T2 (transversal, spin-spin) pueden afectar una imagen³⁷. T2 es acortado cuando los protones se intercambian entre diferentes ambientes químicos o se difunden entre regiones de diferente susceptibilidad. Grandes moléculas como proteínas y polisacáridos, acortan los tiempos de relajación a un mayor grado, de manera que variaciones en la concentraciones de esas moléculas afectarán las tasas de relajación. Teorizamos que la disrupción de macromoléculas durante la isquemia y la reperfusión afectarían (posiblemente alargando) los tiempos de relajación de la pared intestinal. Estudios en isquemia cerebral han hallado cambios en T2 ocho horas luego de

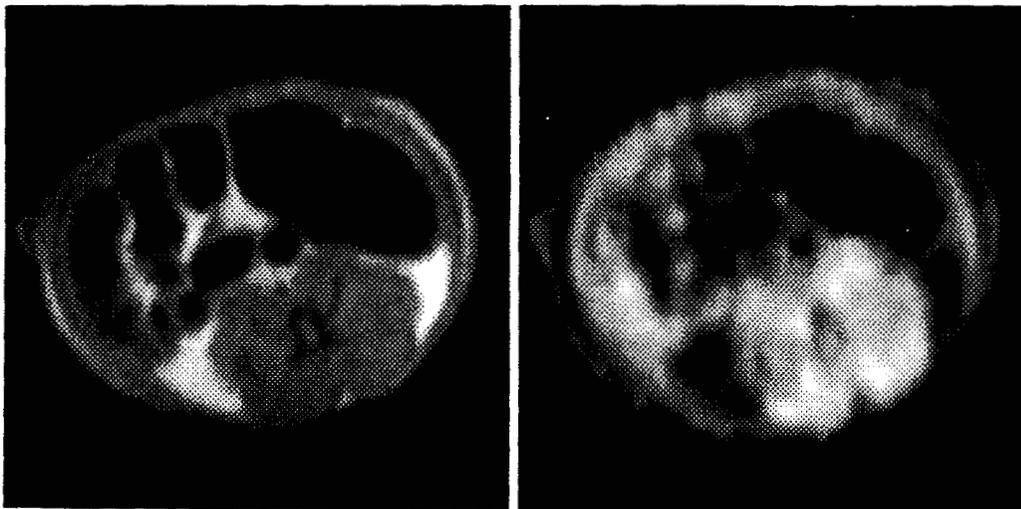
iniciada la injuria. Más datos sobre isquemia, en particular intestinal, estudiada mediante IERM pueden encontrarse también en las referencias 38 a 50*.

* El autor de este estudio ha propuesto como trabajo doctoral el uso de IERM para validar técnicas más prácticas y baratas que se podrían llegar a usar en clínica (como la espectrometría de impedancia). Algo de ese trabajo se hizo en la Universidad de Freiburg, Alemania, con la tutoría del Profesor Jürgen Hennig, entre enero y junio de 2001.

Ya en un primer intento por usar la imagenología por RM para estudiar la isquemia intestinal, nuestro grupo en México había llevado un cerdo con la Arteria Mesentérica Superior (AMS) pinzada a un equipo Siemens de 1.5 T. No se realizó ningún procesamiento posterior a las imágenes. No se observó diferencia antes y después del pinzamiento, más allá de dilatación, por aire, de las asas intestinales. Se anexan un par de estas imágenes.



Gráfica 5: Imágenes de resonancia magnética durante un estudio de isquemia intestinal en el cerdo.



Gráfica 6: Una imagen ponderada en difusión, y su mapa ADC, en abdomen de rata.

En Freiburg, con un equipo de 2 T y usando gradientes de 30 mT/m, se estudiaron cuatro ratas, obteniendo imágenes ponderadas en T1, T2 y en difusión. Dicho estudio está en evolución, por lo que no existen resultados aun. La gráfica 6 presenta un par de imágenes adquiridas durante dicho estudio.

4.2.1.3. Tonometría Gástrica:

El único método que ha demostrado su valor diagnóstico y pronóstico en pacientes críticos y ha encontrado uso clínico regular es la medición indirecta del pH intramucoso (pHi), por tonometría gástrica o colónica^{5,51-53} Este método fue desarrollado por Fiddian-Green usando una sonda intestinal cuya punta lleva un globo de silicona permeable a gases, que una vez localizado en el estómago o en el colon se llena con solución salina o gas. La presión parcial de CO₂ dentro del tonómetro se equilibra por difusión con la de la mucosa. Luego la muestra de solución salina es analizada en un gasómetro junto con una muestra de sangre arterial. El pHi se calcula usando la ecuación de Henderson-Hasselbach, y si está abajo de 7.3 indica isquemia en la mucosa. Como todo método en vía de difusión mundial, la tonometría tiene oponentes, y aunque goza de importancia clínica, es aun incompleta⁵⁴⁻⁵⁶.

4.2.1.3.1. Asociación de tonometría a determinaciones de lactato en sangre: Friedman⁵⁷ observó que tanto las concentraciones de lactato como el pH intramucoso (pHi) representan confiables indicadores pronósticos en la sepsis severa, y que su combinación mejora la aproximación pronóstica en estos pacientes. Determinó que ambas variables son mejores indicadores pronósticos que las derivadas del oxígeno y que el PCO₂ intramural parece ser una variable más específica que el pHi para parcialmente reflejar la acidosis metabólica sistémica. Concluye que las determinaciones combinadas de lactato sanguíneo y de pHi o PCO₂ intramural pueden ayudar en la determinación del pronóstico en la sepsis severa, coincidiendo con Liao⁵⁸ pero discrepando con Murray⁵⁹.

4.2.2. Otros métodos de diagnóstico de isquemia intestinal, y relacionados:

4.2.2.1. Cateterización de la arteria pulmonar: aunque las variables hemodinámicas no son siempre los mejores índices de perfusión tisular⁶⁰ este método permite medir frecuencia cardíaca, presiones sistólica y diastólica cardíacas y de arteria pulmonar, gasto cardíaco y el análisis de ondas de presión, de lo que se pueden derivar diversos cálculos hemodinámicos, pero su uso es especializado, y posibilita importantes complicaciones como infección,

neumotórax, infartos pulmonares, arritmias, flebitis en la entrada, etc.⁶¹ debido a que llega desde la periferia hasta la propia arteria pulmonar, pasando por las cavidades cardíacas.

4.2.2.2. Tomografía computarizada: Catalano⁶ encuentra que la CT es más rápida y específica que los otros medios radiológicos. Balthazar⁶² presenta sobre 100 pacientes con isquemia intestinal estudiados con CT 72 verdaderos negativos, 19 verdaderos positivos, cinco falsos positivos y cuatro falsos negativos, arrojando una sensibilidad de 83%, especificidad 93%, confiabilidad 91%, valor predictivo positivo 79%, y valor predictivo negativo 95%, pero hubo necesidad de laparotomía exploratoria cuando difería el hallazgo equívoco de la CT y el estado de progresivo deterioro del paciente. Por su parte Bartnicke⁶³ visualiza lesiones murales, serosas o mesentéricas que apenas son evaluadas indirectamente por los rayos X simples o baritados, pero concluye que el estudio de la isquemia intestinal por CT sigue siendo pobremente específico, coincidiendo con otros autores^{64,65}.

4.2.2.3. Otras mediciones químicas: Una de las más sensibles es la medición del lactato sanguíneo, de mayor valor si se hace a un tiempo con tonometría. Schlichting⁶⁶ midió la endotelina por radioinmunoensayo, observando un significativo incremento de esta en plasma carotídeo, linfa y fluido ascítico, incluso dentro del grupo control, recién terminada la oclusión vascular mesentérica. En el plasma portal se eleva en los grupos de prueba y no en el control, pero es más costoso determinar endotelina que lactato. El péptido natriurético atrial y la vasopresina se han medido, pero su determinación es también costosa⁶⁷.

4.2.2.4. Miscelánea: Algunos medios se enfocan a la medición de flujo arterial, como la magnetometría intestinal⁶⁸⁻⁷⁰ que mide exclusivamente la disminución del flujo sanguíneo intestinal. Sus autores aseguran que como no involucra radiación, la magnetometría puede ser usada en niños y gestantes. La

flujometría por láser-Doppler⁷¹⁻⁷² mide isquemia intestinal en adultos y neonatos humanos conscientes. Los autores concluyen que el láser Doppler es confiable para medir áreas de isquemia máxima, pero que se deben hacer esfuerzos por disminuir artefactos como el movimiento. Quienes han intentado con sonografía Doppler color⁷³ encuentran que evidencia lesiones de pared compatibles con isquemia, pero esto significa que la isquemia ya fue suficiente para erosionar el tejido, además de que no toda erosión es debida a isquemia.

Se ha probado también la oximetría de pulso intestinal⁷⁴ con discretos resultados. En cuanto a la laparoscopia diagnóstica⁷⁵ se observa como complicación relacionada al procedimiento bradicardia y presiones ventilatorias elevadas en vías respiratorias. Otro grupo con este procedimiento encuentra que aunque disminuye la estancia hospitalaria, la laparoscopia tiene que ser acompañada de laparotomía en la mitad de los casos, usualmente debido a múltiples bandas postoperatorias causantes de la isquemia. Es además un procedimiento difícil y altamente especializado de diagnóstico y tratamiento⁷⁶.

Semmlow con electromiografía intestinal⁷⁷ dice que es más confiable la EMG que las medidas basadas en flujo sanguíneo o evaluación visual, aunque reconoce que debe mejorar muchos parámetros de su aparato para darlo al uso clínico. Vale anotar que mide la actividad eléctrica muscular, luego no determina directamente el estado de la mucosa, o debe esperar que el daño sea lo suficientemente severo como para alterar la bioquímica de las capas musculares lisas.

Otros métodos más son análisis de perfusión tisular con marcadores radioactivos, mediciones de composición gaseosa (electrodos de aguja de PO₂, PCO₂, y pH), imagenología por angioscopia microvascular, y espectrofotometría por laparoscopia⁷⁸, todos con resultados alentadores pero aún con muy pobre difusión.

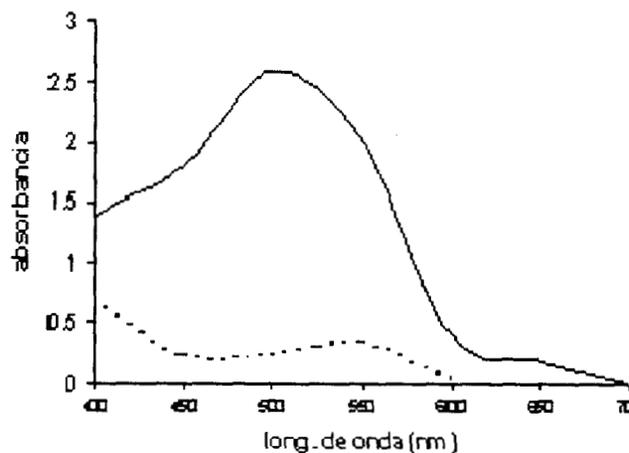
4.2.3. Determinación de actividad de LDH⁷⁹:

En las mediciones de la bioquímica tisular, que interesan más a este trabajo, la muerte celular es clásicamente determinada por tres métodos. El primero consta

de medir algún producto celular que tenga capacidad de cambiar una tinción como el trypan blue o la nigrosina. Luego las células muertas son discriminadas de las viables por conteo diferencial con microscopía de luz o de fluorescencia. Las desventajas de este método son que no permite usar muestras grandes y que puede no contar células completamente lisadas, llevando a una subestimación de la actividad lítica.

Otro método se basa en liberación de isótopos radiactivos como el ^{51}Cr de células previamente marcadas. La principal desventaja de este método es la alta posibilidad de liberación espontánea de marcadores aunque la célula esté sana. Otras desventajas son el involucrar radiación, con lo que ello implica de riesgo y de papeleo acerca de disposición de desechos al concluir las pruebas.

El tercer método se basa en medir la actividad enzimática citoplasmática liberada a un sobrenadante por células lesionadas. La actividad enzimática en el sobrenadante se correlaciona bien con la proporción de células lisadas⁷⁹⁻⁸⁰ y la absorbancia medida cerca de los 500 nm es muy diferente entre el formazán y el INT, según puede observarse en la gráfica 7.



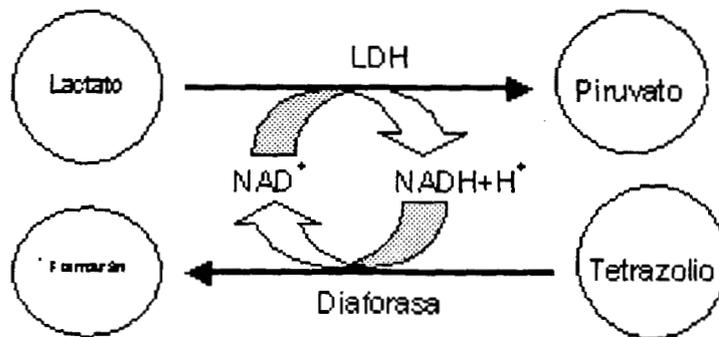
Gráfica 7: Espectro de absorbancia de la solución usada para los experimentos. La línea continua corresponde al formazán, y la punteada al tetrazolio-INT- (gráfica cortesía de Boehringer Mannheim)

Se han descrito pruebas enzimáticas para cuantificar daño celular para fosfatasa ácida y alcalina⁸⁰, glutamato-oxalacetato transaminasa y otras⁸¹, pero

su uso es limitado por la pequeña cantidad de esas enzimas en muchas células, y por lo complicado de su determinación. En contraste, la LDH es más estable, y está presente en toda célula. La medición de su actividad suele usarse en cultivos celulares para cuantificación de actividad citotóxica de células *asesinas*, anticuerpos o compuestos medioambientales.

La función de la LDH es como sigue: Dentro del metabolismo intermediario de los carbohidratos, la glucólisis es una de las vías fundamentales. En un tejido metabólicamente activo que se encuentre en anaerobiosis, el glucógeno es consumido y en su lugar aparecen el lactato y el piruvato como productos principales. En condiciones aeróbicas, el lactato no se acumula y el piruvato es oxidado ulteriormente hasta CO_2 y agua. En condiciones anaerobias, la LDH cataliza la transformación de piruvato en lactato, como parte de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof.

La medición de actividad de la LDH liberada desde el citosol de las células dañadas a un sobrenadante, se basa en una prueba enzimática (gráfica 8). En el primer paso un NAD^+ es reducido a un $\text{NADH} + \text{H}^+$ por la conversión, catalizada por la LDH, de lactato a piruvato. Esta última conversión activa un catalizador, la diaforasa, que transfiere H^+ del $\text{NADH} + \text{H}^+$ al INT (de color amarillo), transformándolo en sal de formazán (rojo).



Gráfica 8: En el primer paso, la LDH liberada reduce el NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ por oxidación del lactato a piruvato. En la segunda reacción, 2 H son transferidos del $\text{NADH} + \text{H}^+$ a la sal de tetrazolio por el catalizador diaforasa, produciendo formazán.

El incremento de células muertas o con su membrana dañada trae un aumento de la actividad de la LDH en el sobrenadante. Este incremento en la actividad enzimática se correlaciona directamente con la cantidad de formazán producido

durante un determinado periodo de tiempo. Por tanto, el cambio espectrofotométrico es proporcional al número de células lisadas^{79,82}. Comparada con la medición de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr, la reducción de INT ha mostrado una confiabilidad similar⁷⁹.

4.2.4. Histopatología y escalas usadas para medir daño isquémico:

La histopatología es un conjunto de técnicas que mide con coloraciones o con reacciones el estado de un tejido extraído del cuerpo. Los colorantes más usados son la hematoxilina y la eosina, de los cuales las diversas células toman diferentes proporciones. A partir de ello a esas células se les llama eosinófilas si toman especialmente la eosina, ó neutrófilas ó basófilas si toman la parte neutra o básica del colorante, respectivamente. Existen muchos otros colorantes que complementan, sin reemplazar, la información que da la HyE. De estos, los más usados son azul de toluidina o de metileno, Giemsa, tetróxido de osmio, PAS, carmín de Best, lipofucsina, aceto-orceína, plata, floxina-safranina, azan, y otros algo más especializados como el tricrómico de Mallory y el de Masson, y mezclas de Verhoeff, Weigert, Wright, Van Gieson, etc.

Para microscopía óptica de rutina el tejido es puesto primero en un fijador para preservar la estructura y prepararlo a futuros tratamientos. Luego es colocado en una sustancia dura como la parafina para hacer los cortes de grosor adecuado (usualmente 10 µm) con el micrótopo. Luego los cortes se colocan en laminillas con un adhesivo como la albúmina, y se colorean luego de disolver la parafina y rehidratar el tejido.

La clasificación de Chiu⁴, que se presenta en la sección de métodos de esta tesis, unificó en 1970 varias propuestas de graduación de lesión isquémica. Posteriormente, autores que han estudiado el daño isquémico usando resonancia magnética continúan citando esta clasificación⁴⁰.

4.3. Hipótesis

Con base en los antecedentes presentados, partimos de las hipótesis de que la actividad de la LDH, reflejada en la reducción de INT, aumentará a medida que

aumente el daño tisular por la isquemia. Asimismo, que dichos cambios se harán más evidentes con la reperfusión.

Según estas hipótesis, en un grupo control no debería haber cambios de la actividad LDH, o deben ser mínimos comparados con los de unos grupos experimentales. El estudio paralelo de muestras histológicas permitirá una comparación del nivel de daño estructural con el bioquímico, y ambas pruebas permitirán contribuir a la caracterización del daño isquémico en la mucosa intestinal.

5. Métodos

5.1. Animales: Buscando comprobar experimentalmente las hipótesis señaladas, se tomaron 20 ratas Wistar machos sanos, pesando entre 270 y 390 g cada uno, y se dividieron en cinco grupos, a saber:

Grupo 0: Control, n=5.

Grupo 1: Isquemia por 6 horas, n=7.

Grupo 2: Una hora de isquemia seguida por una de reperfusión, n=2.

Grupo 3: Dos horas de isquemia seguidas por dos de reperfusión, n=2.

Grupo 4: Tres horas de isquemia seguidas por tres de reperfusión, n=4.

Se tomaron más individuos para los tiempos más largos buscando obtener un mayor número de datos en niveles de daño mayores. Esto porque los niveles de daño menores habrían de ser registrados en todos los grupos, ya que todos los animales pasarían por un tiempo cero, y así sucesivamente.

Los animales fueron tratados en todo momento según prácticas estándar de ética.

5.2. Procedimiento: 12 horas antes del procedimiento se retiró la comida sólida a los animales, pero se les permitió continuar bebiendo agua. Fueron anestesiados con pentobarbital sódico 40 µg/Kg intraperitoneal, y mantenimiento a necesidad por la misma vía. Por incisión abdominal mediana se expuso la arteria mesentérica superior (AMS) en todos los grupos. En el grupo control se hizo la cirugía completa hasta la exposición de la AMS, que se dejó sin pinzar, y luego toma de muestras hasta la eutanasia. En el 1 se indujo isquemia por pinzamiento de la AMS durante 6 horas. En los grupos 2, 3 y 4 se indujo la reperfusión luego de la isquemia, retirando la pinza de la arteria. Al final del procedimiento los animales fueron sacrificados.

La toma de muestras consistió en extraer dos biopsias de la pared del íleon distal con una tijera fina y pinzas atraumáticas. Fue realizada siempre por el mismo investigador, y se inició tan pronto el animal entraba en plano anestésico, sin dejar tiempo de estabilización. Los tiempos se distribuyeron asignando como minuto cero al momento de extracción del primer par de muestras. A partir del minuto cero se continuó tomando un nuevo par de muestras cada 60 minutos. El

peso de las biopsias se mantuvo cercano a 0.02 gramos. Una de las muestras se colocó, previo lavado con solución salina normal, dentro de un tubo Falcon que contenía 2 ml de líquido con INT (Citotoxicity Detection Kit. Boehringer Mannheim). Luego de una hora de tener la muestra suspendida en ese medio, se realizó centrifugación a 250 g para extraer las células, se agregó ácido clorhídrico para detener la actividad enzimática, y se tomó el sobrenadante para determinar en él la actividad de LDH midiendo la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro convencional (Biotec Instruments, modelo EL311).

La otra biopsia se colocó directamente en formol al 10% para posterior fijación, coloración con hematoxilina-eosina y estudio histológico. La histología fue revisada por un mismo patólogo que no estaba informado de la correspondencia entre muestras con los grupos y tiempos. Dicho patólogo emitió una calificación de la biopsia con base en los parámetros de la referencia [4]. Dichos parámetros son:

Grado 0: mucosa normal.

Grado 1: desarrollo de espacios subepiteliales en las puntas de las vellosidades, y congestión capilar.

Grado 2: aumento del espacio subepitelial y moderado despegamiento del epitelio de la *lamina propria*.

Grado 3: Despegamiento epitelial masivo que abarca los lados de las vellosidades, y denudamiento de las puntas.

Grado 4: Puntas denudadas, vasodilatación capilar, hiper celularidad de la *lamina propria*.

Grado 5: Digestión y desintegración de la *lamina propria*, hemorragia y ulceración.

Los criterios para la graduación histológica (espacios subepiteliales, congestión, despegamiento epitelial, denudación de las vellosidades, hiper celularidad, hemorragia y ulceración) fueron calificados de 0 a 3, para determinar el peso que cada uno de ellos tiene en la clasificación. Luego, se emitió el concepto del grado.

Los resultados se fueron organizando en Excel con base en la secuencia de muestras. Se hicieron columnas correspondientes a número de rata, grupo, tiempo en minutos al que corresponde cada muestra, peso del tubo con sobrenadante sin adicionar el tejido, peso del tubo con sobrenadante luego de adicionar el tejido, peso del tejido en gramos, absorbancia que presentó el sobrenadante en tres mediciones, promedio de estas tres mediciones, multiplicación por cuatro de este promedio (debido a que se diluyó cuatro veces), absorbancia promedio del medio sin tejido, diferencia entre la absorbancia antes y después de la adición del tejido, y tasa de actividad de la LDH por gramo de tejido. En cuanto a la parte histológica del estudio, la principal columna de Excel fue para grado, y luego otras para los criterios de dicha graduación, a saber, hiper celularidad, congestión, espacios subepiteliales, despegamiento de la lámina propia, denudamiento de las vellosidades, despegamiento del epitelio, y una última columna para hemorragia, ulceración u otras observaciones.

5.3. Estadística: Con el apoyo del programa Systat, se realizó una estadística inicial descriptiva, y luego estudio de ANOVA de una vía con el tiempo como variable independiente, y al cambio de absorbancia (actividad LDH) como variable dependiente, para cada grupo. Luego se hizo una normalización de la tasa (actividad de la LDH por gramo de tejido intestinal) para cada rata en cada grupo, teniendo el tiempo como variable independiente. Posteriormente se hicieron gráficas de las nombradas estadísticas, y del grado histológico encontrado con respecto al tiempo.

Luego se hizo un agrupamiento de datos bajo dos nuevas variables. Una de estas se llamó "Perfusión", y se le asignó un valor de 0 cuando la perfusión en el intestino estaba ausente, y de 1 cuando la perfusión estaba presente. La otra variable de agrupamiento se llamó "Tiempo de isquemia", y se le asignó un valor de 0 cuando la biopsia fue extraída de un intestino cuya AMS estaba pinzada por menos de 60 minutos; un valor de 1 cuando la AMS estaba pinzada por un tiempo entre 60 y 120 minutos; y un valor de 2 cuando el tiempo de pinzamiento superó los 120 minutos.

Se hizo una regresión lineal entre el tiempo de isquemia y la actividad de la LDH, y luego una correlación de Pearson entre la actividad de la LDH y cada parámetro histológico, para determinar el "peso" de dichos criterios en la calificación de grado histológico.

Al final se hace un estudio de ANOVA de una vía entre el grado histológico y el "Tiempo de isquemia", y entre el grado histológico y el tiempo, para todos los grupos.

6. Resultados

Se obtuvieron 102 muestras de tejido para el estudio de actividad de la LDH, y 72 muestras para histología. Se presenta una estadística descriptiva, numérica, de hallazgos de actividad LDH y de grado histológico, por grupo y por tiempo.

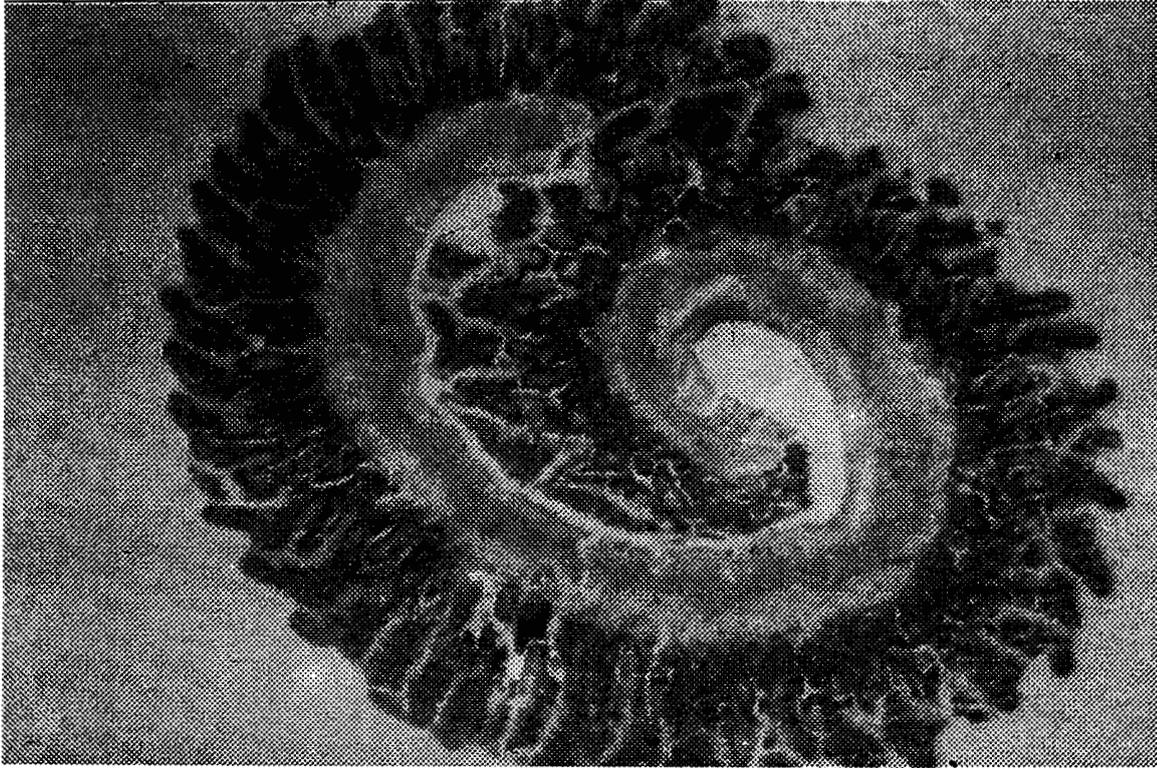
Tabla 1: Actividad LDH por grupo y por tiempo. (Número de casos)Media±error estándar de la media (=SD/sqrt n)

Tiempo	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0	(5)299.886±216.9	(7)197.323±273.1	(2)269.311±254.4	(2)74.374±25.2	(4)117.021±59.4
60	(5)241.327±70	(7)304.865±107.2	(2)424.99±375.6	(2)240.059±162.1	(4)456.746±156.2
120	(4)81.285±219.1	(7)810.141±350.2	(2)194.244±148	(2)201.49±133.3	(4)1317.51±873.9
180	(4)123.004±97	(5)693.233±132.4		(2)109.422±74.1	(4)347.802±152.2
240	(3)275.335±180.6	(4)558.297±277.8		(2)268.462±180.1	(4)361.797±122.8
300	(2)-198.95±246.7	(3)94.337±699.3			(3)271.172±131.7
360	(2)-25.166±54.6	(2)2996.94±2169.7			(3)226.576±85.9

Tabla 2: Grado histológico por grupo y por tiempo. (Número de casos)Media±error estándar de la media (=SD/sqrt n)

Tiempo	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0	(5)2.8±0.6	(5)1.8±0.6	(2)2.5±1.5	(1)1	(2)1.5±0.5
60	(4)1.75±1.1	(4)2.75±0.5	(1)4	(2)1.5±0.5	(2)3.5±1.1
120	(4)1.25±0.6	(4)4±0	(1)2	(2)1.5±1.5	(2)3±0
180	(4)1±0.4	(3)3±1.15		(2)2±0.99	(2)2.5±1.5
240	(3)1.333±0.33	(2)3.5±0.5		(2)2.5±1.5	(2)5±0
300	(2)2±0.99	(2)3.5±1.5			(2)2.5±2.5
360	(2)2±0.99	(1)2			(2)3.5±0.5

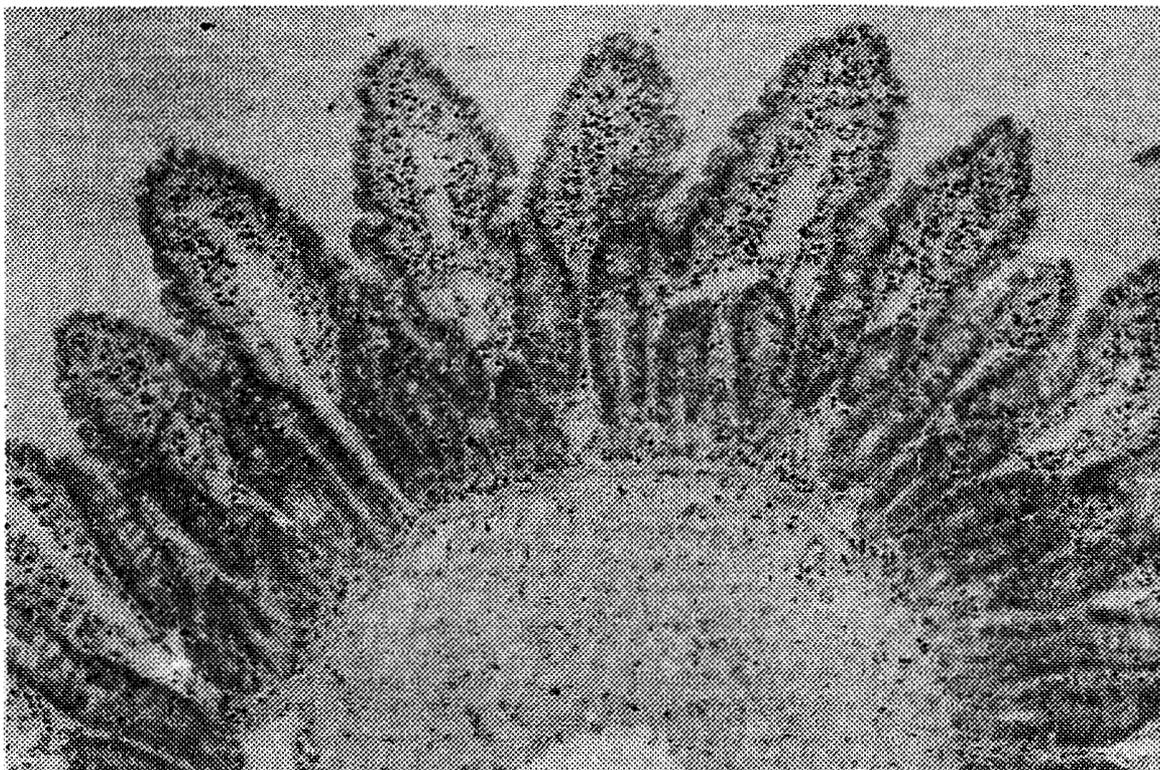
En las tablas 1 y 2 se observan más datos de los grupos 0, 1 y 4, y de los tiempos iniciales de lesión isquémica. Los errores estándar más grandes se encuentran en el grupo 1 tiempo 360, aunque todas las desviaciones observadas son altas. Estos valores son graficados en las figuras 9 a 13, que se incluyen luego de presentar los cortes histológicos obtenidos del íleon de rata, representativos de cada grado histológico.



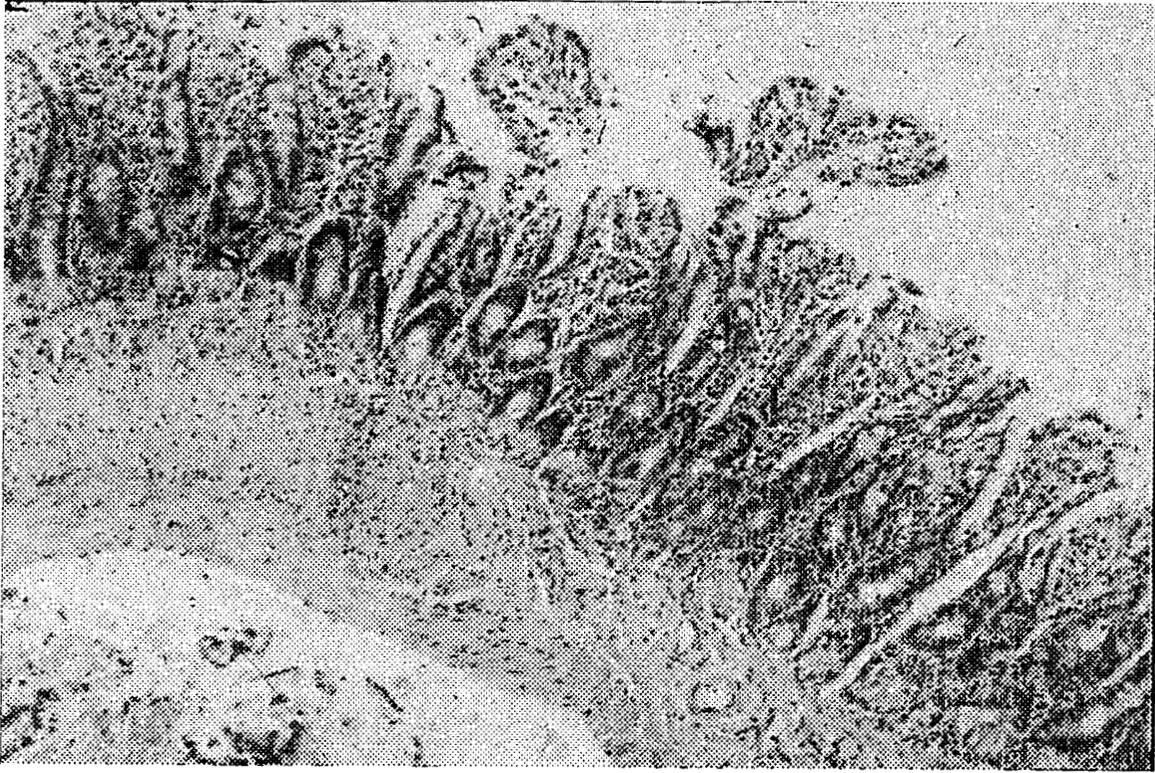
Micrografía 1: Corte de íleon de rata. Grado 0: Mucosa normal. Coloración hematoxilina eosina. 10X.



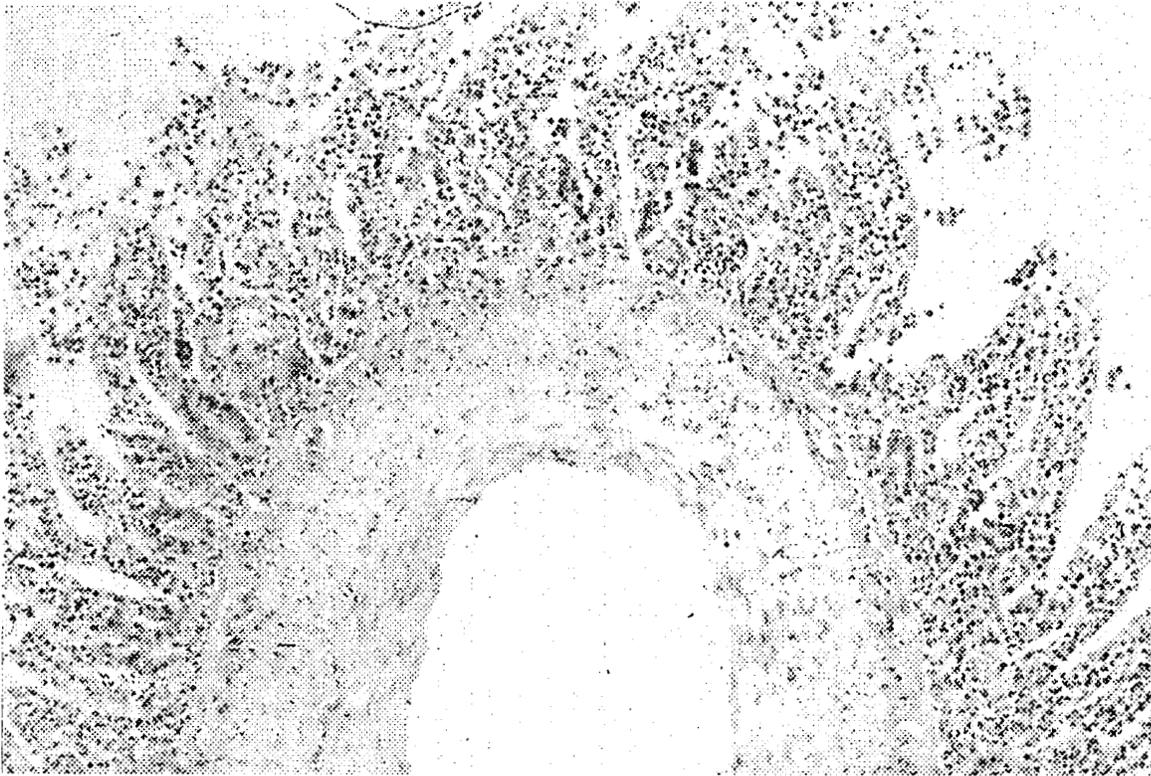
Micrografia 2, ileon de rata. Grado 1: Desarrollo de espacios subepiteliales en las puntas de las vellosidades y congestión capilar. Coloración hematoxilina eosina. 10X.



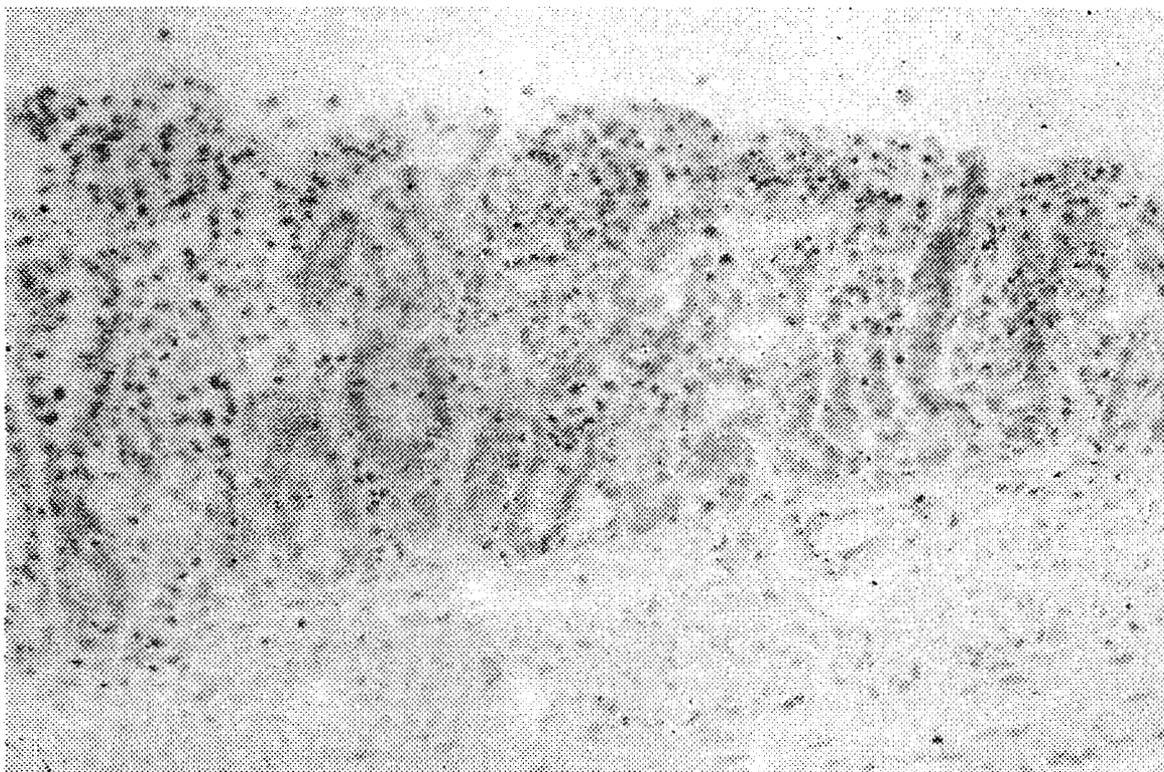
Micrografia 3, íleon de rata. Grado 2: Aumento del espacio subepitelial y moderado despegamiento del epitelio de la lamina propia. Coloración hematoxilina eosina. 10X.



Micrografia 4, ileon de rata. Grado 3: Despegamiento epitelial masivo que abarca los lados de las vellosidades, y denudamiento de las puntas. Coloración hematoxilina eosina. 10X.



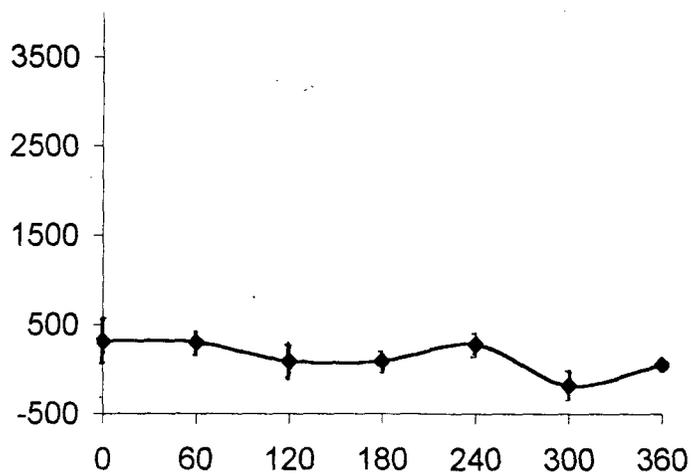
Micrografía 5, íleon de rata. Grado 4: Puntas denudadas, vasodilatación capilar, hiper celularidad de la lamina propia. Coloración hematoxilina eosina. 10X.



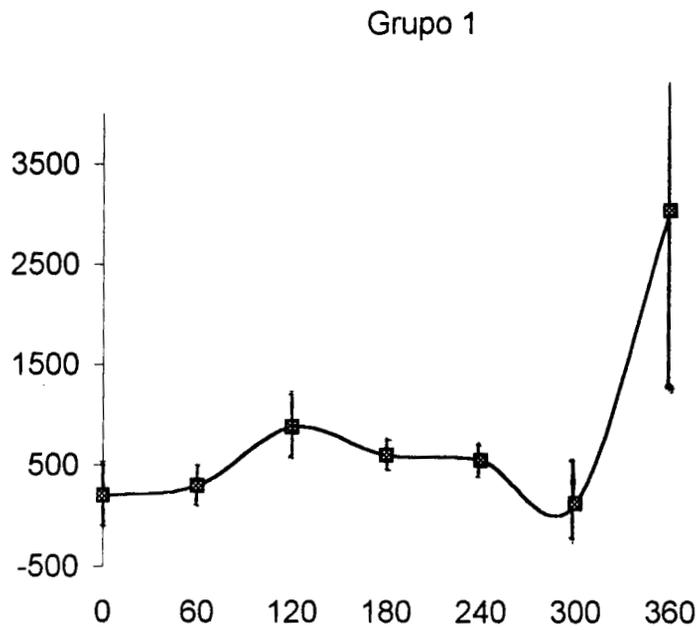
Micrografía 6, íleon de rata. Grado 5: Digestión y desintegración de la lamina propia. Hemorragia y ulceración. Coloración hematoxilina eosina. 10X.

En las gráficas 9 a 13 se presenta el valor medio de absorbancia (consecuencia de la actividad LDH) con sus desviaciones estándar, para cada grupo. Se observa variación de los valores iniciales alrededor de 200 en todos los grupos con excepción del grupo 3. Se observa que los valores de absorbancia no presentan muy grandes variaciones entre grupos, con la sola excepción de los grupos 1 y 4. Se observa también tendencia a la disminución de la actividad de LDH en el grupo control, y alguna tendencia al aumento en los demás grupos.

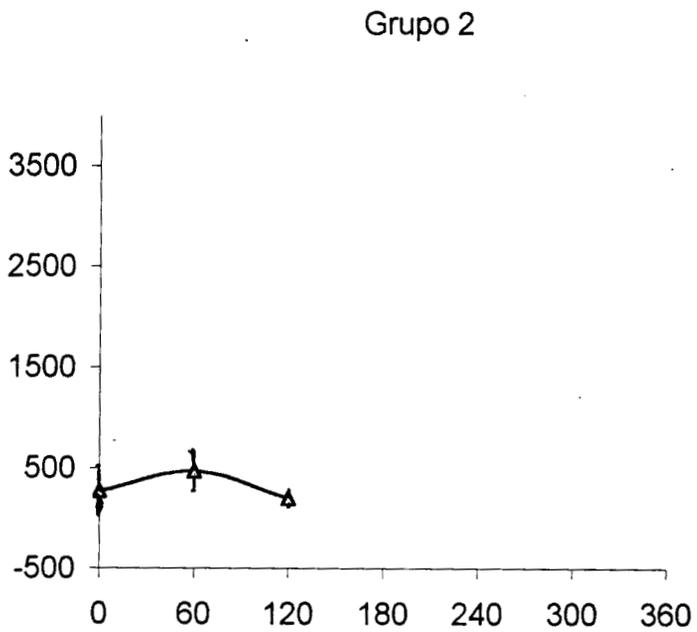
Grupo 0



Gráfica 9: Cambio en absorbancia (actividad LDH) contra Tiempo en Grupo 0. Se adiciona el error estándar de la media.

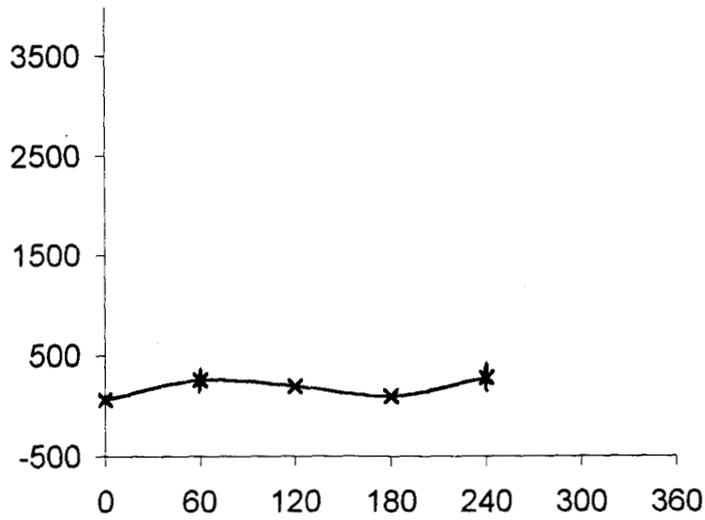


Gráfica 10: Cambio en absorbancia (actividad LDH) contra Tiempo en Grupo 1.
Se adiciona el error estándar de la media.



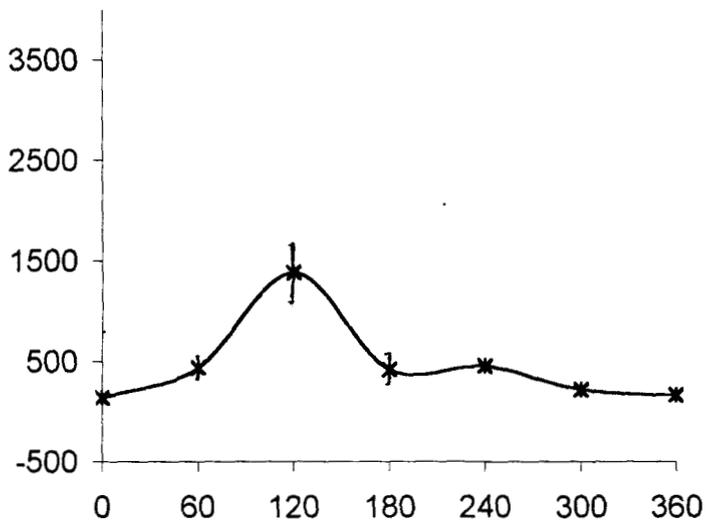
Gráfica 11: Cambio en absorbancia (actividad LDH) contra Tiempo en Grupo 2.
Se adiciona el error estándar de la media.

Grupo 3

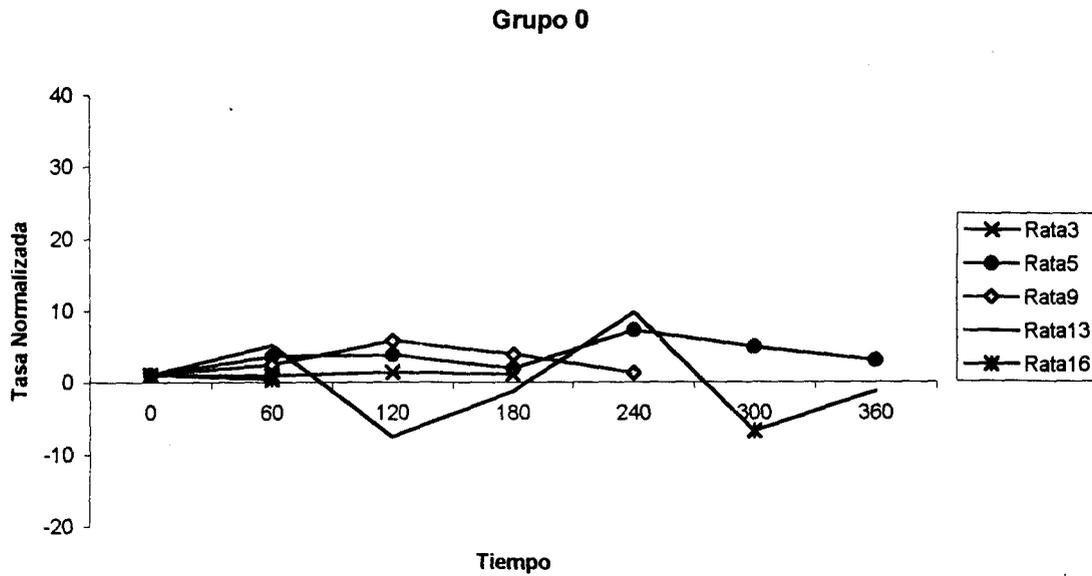


Gráfica 12: Cambio en absorbancia (actividad LDH) contra Tiempo en Grupo 3. Se adiciona el error estándar de la media.

Grupo 4



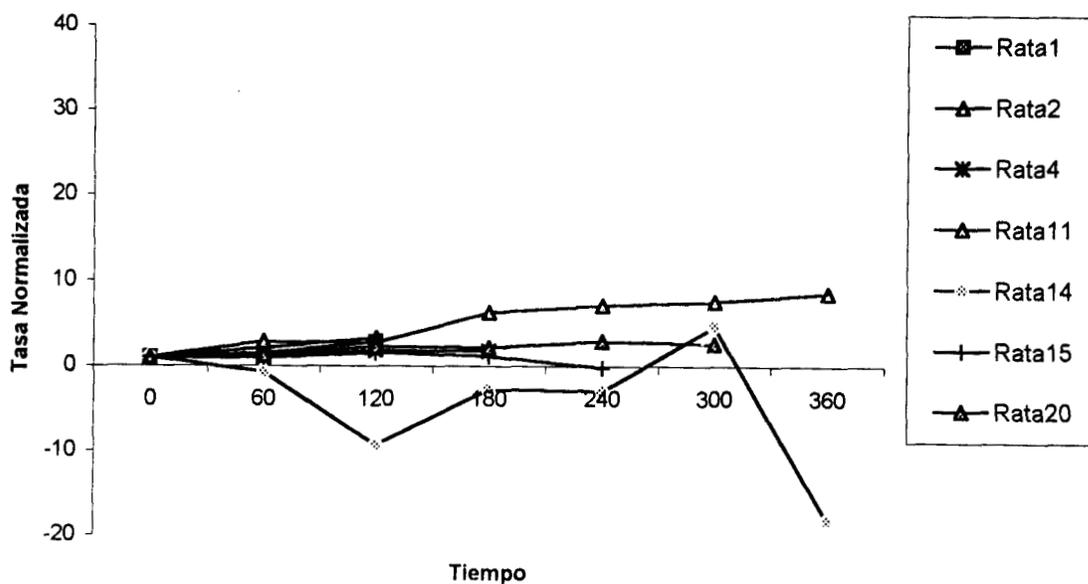
Gráfica 13: Cambio en absorbancia (actividad LDH) contra Tiempo en Grupo 4. Se adiciona el error estándar de la media.



Gráfica 14: Actividad LDH por gramo de tejido, normalizada, con respecto al tiempo, para el grupo 0.

En la gráfica 14 puede observarse una gran variación en la tendencia de la actividad LDH entre el minuto 0 y el 60. De este minuto en adelante se ve tendencia en el grupo 0 de mantener valores normalizados de absorbancia menores a 5, con excepción de la rata 13.

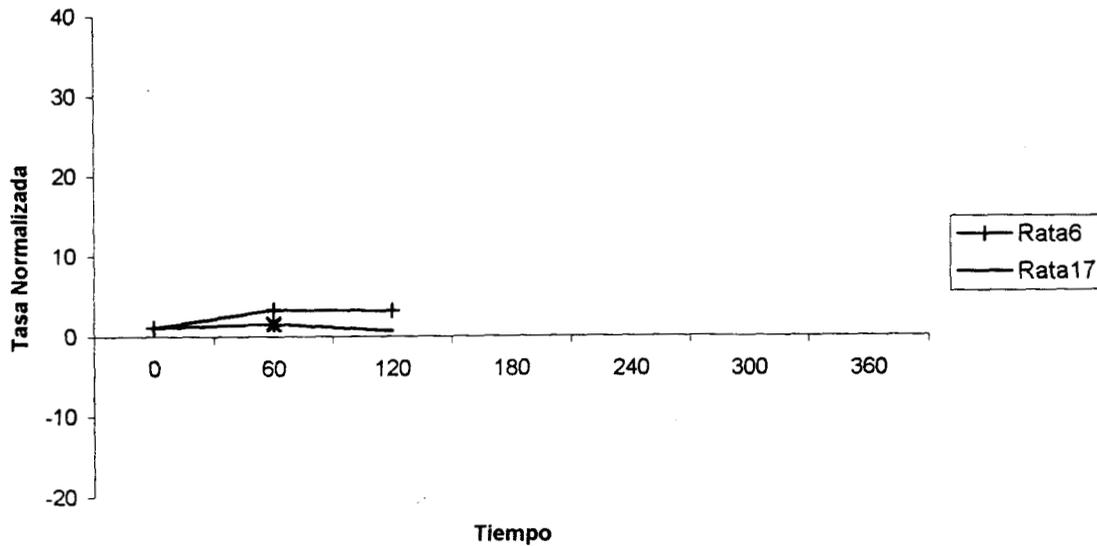
Grupo 1



Gráfica 15: Actividad LDH por gramo de tejido, normalizada, con respecto al tiempo, para el grupo 1.

En la gráfica 15 obsérvese la tendencia a aumentar la actividad de la LDH en todas las ratas excepto la número 14, y la número 15 a partir del minuto 180.

Grupo 2

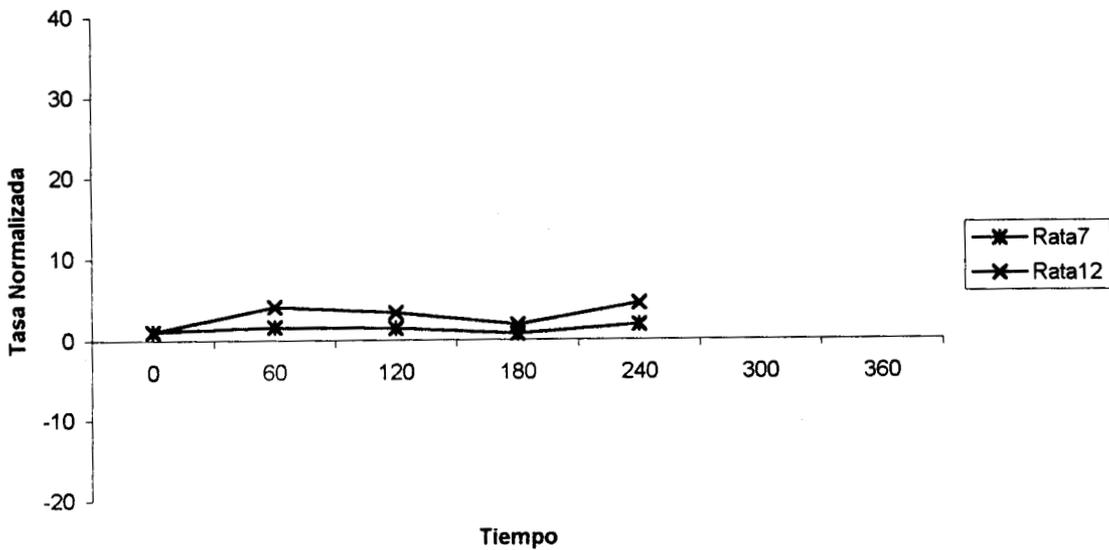


Gráfica 16: Actividad LDH por gramo de tejido, normalizada, con respecto al tiempo, para el grupo 2.

En la gráfica 16 se observa que el grupo 2 es el que mejor se ajusta a nuestra hipótesis. Esto se evidencia también en las gráficas 11 y 21.

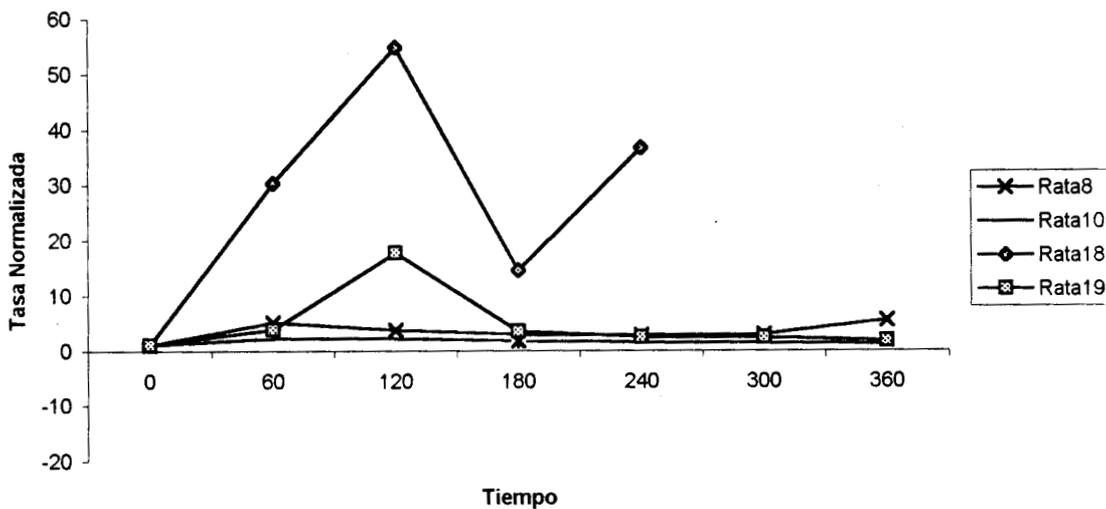
En la gráfica 17 se puede observar la tasa normalizada de actividad LDH para el grupo 3. Este grupo muestra progresión de actividad LDH entre el minuto 0 y el 60, seguida por una meseta, y descenso de dicha actividad coincidente con la reperusión. Luego, a partir del minuto 180, se observa un nuevo aumento de actividad con igual pendiente que entre el minuto 0 y el 60. Ambos grupos mantienen valores normalizados menores a cinco.

Grupo 3



Gráfica 17: Actividad LDH por gramo de tejido, normalizada, con respecto al tiempo, para el grupo 3.

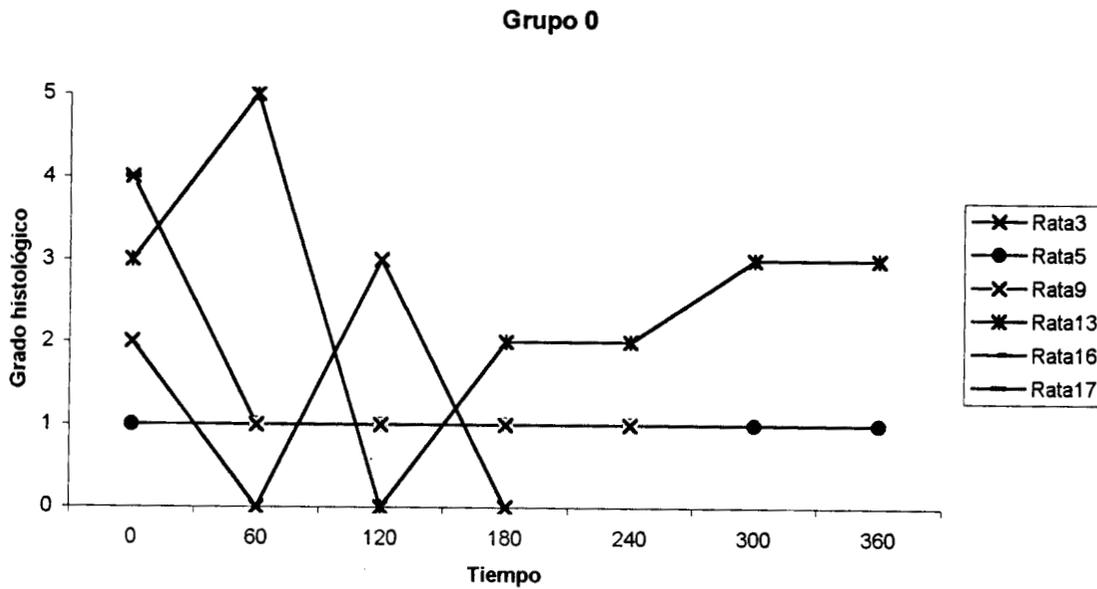
Grupo 4



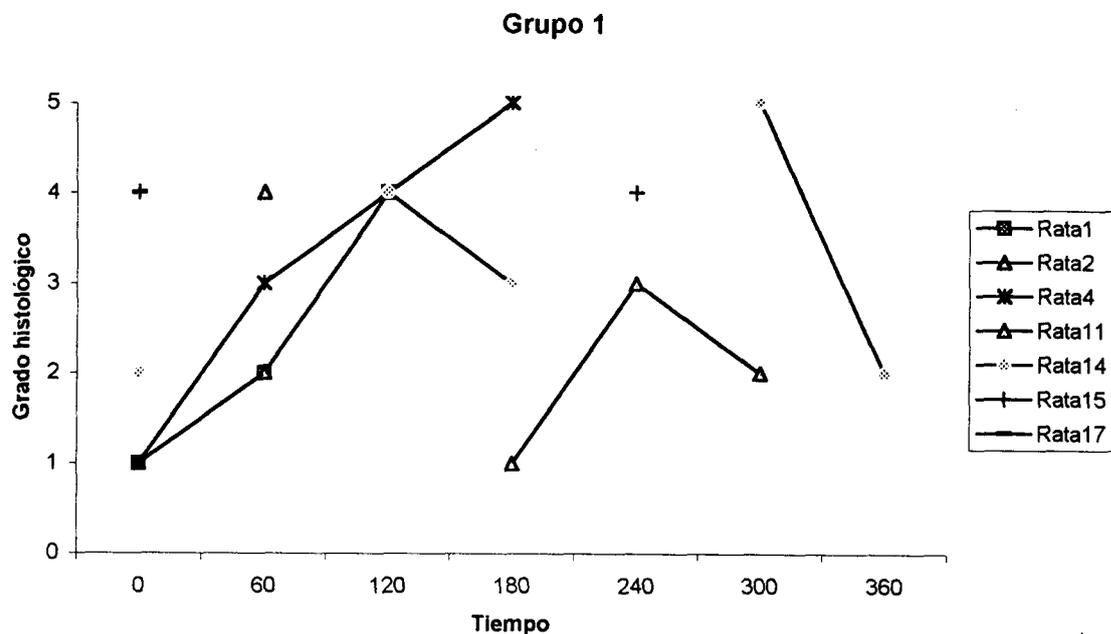
Gráfica 18: Actividad LDH por gramo de tejido, normalizada, con respecto al tiempo, para el grupo 4.

Observe en la gráfica 18 cómo los valores exhibidos se mantienen por debajo de 5 con excepción de la rata 19 al minuto 120, y de la rata 18 en todo momento.

Las gráficas 19 a 23 muestran el grado histológico encontrado en cada tiempo, para cada grupo. En la gráfica 19 las ratas 3 y 9 presentan valores compatibles con daño isquémico leve. Observe que la rata 13 muestra un comportamiento errático. En esta gráfica se observa que también la rata 3 presenta cambios bruscos de valor histológico.



Gráfica 19: Grado histológico con respecto al tiempo, para el grupo 0.

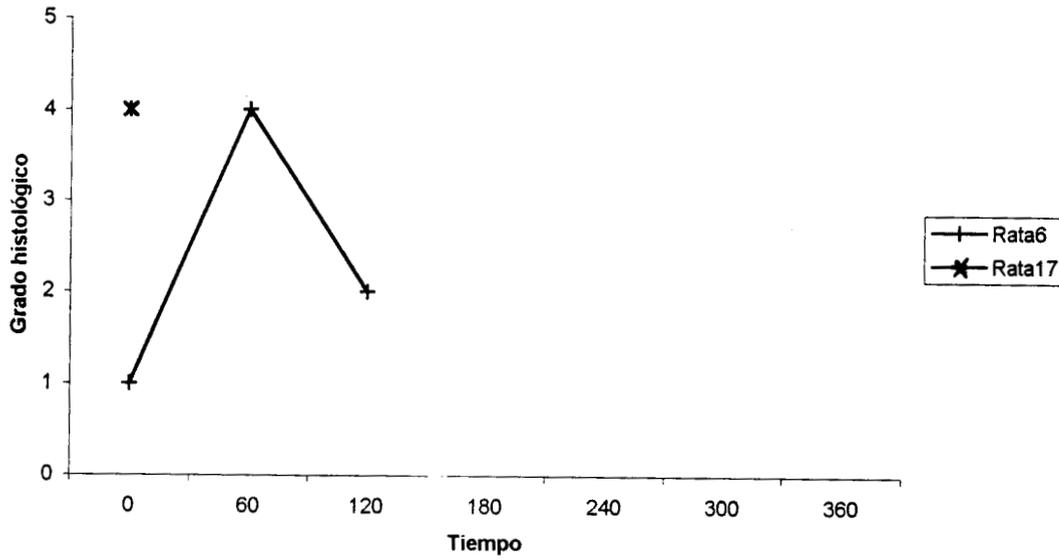


Gráfica 20: Grado histológico con respecto al tiempo, para el grupo 1.

En la gráfica 20 se puede observar que los valores de la rata 4 se apegan a la teoría. Existen muy pocos valores de grado para aproximar una tendencia en los demás animales de este grupo.

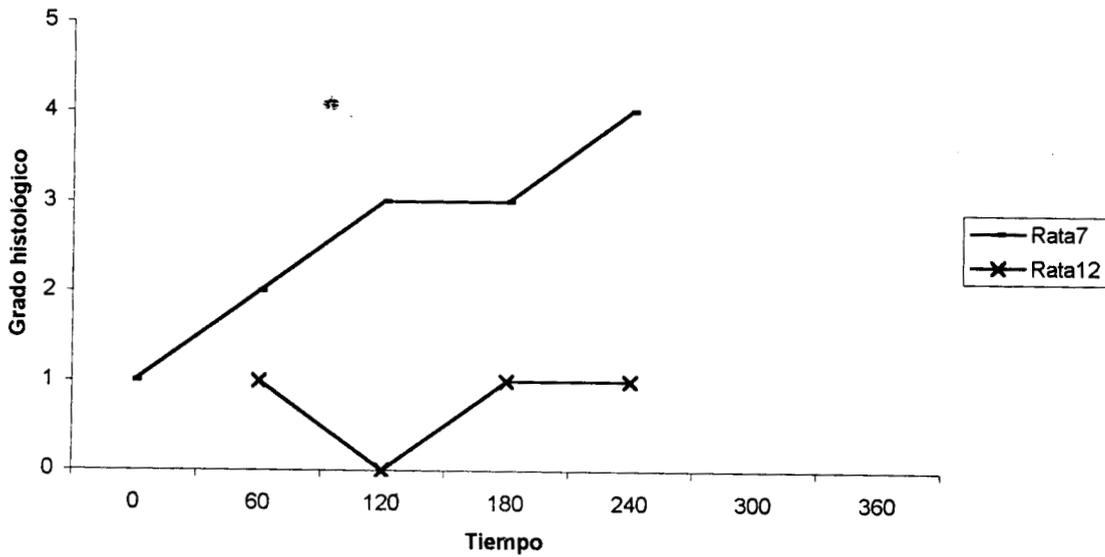
En la gráfica 21 se despliega el grado histológico encontrado en el grupo 2. Se observa progresión de lesiones durante la isquemia, y mejoría con la reperusión, contrario a lo que sucede con los grupos 3 (gráfica 22) y 4 (gráfica 23), en los cuales el daño parece aumentar con la reperusión.

Grupo 2

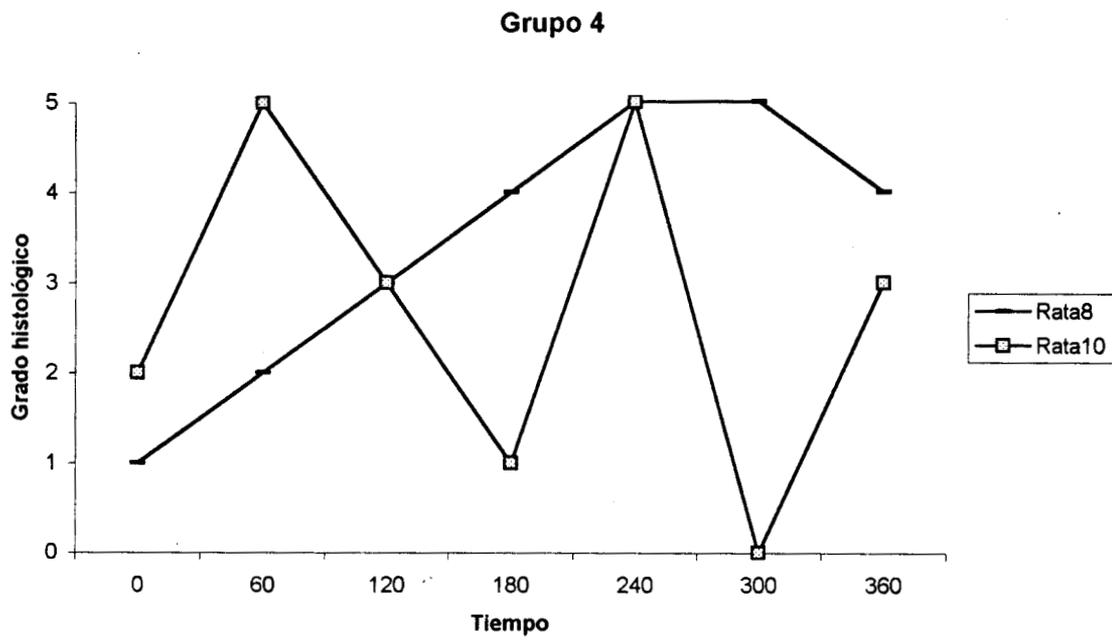


Gráfica 21: Grado histológico con respecto al tiempo, para el grupo 2.

Grupo 3

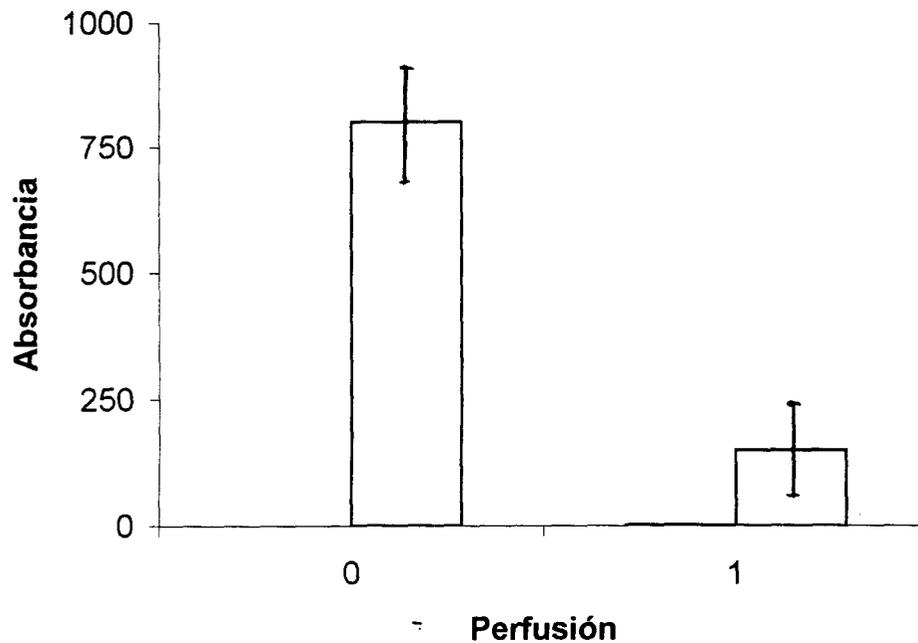


Gráfica 22: Grado histológico con respecto al tiempo, para el grupo 3.



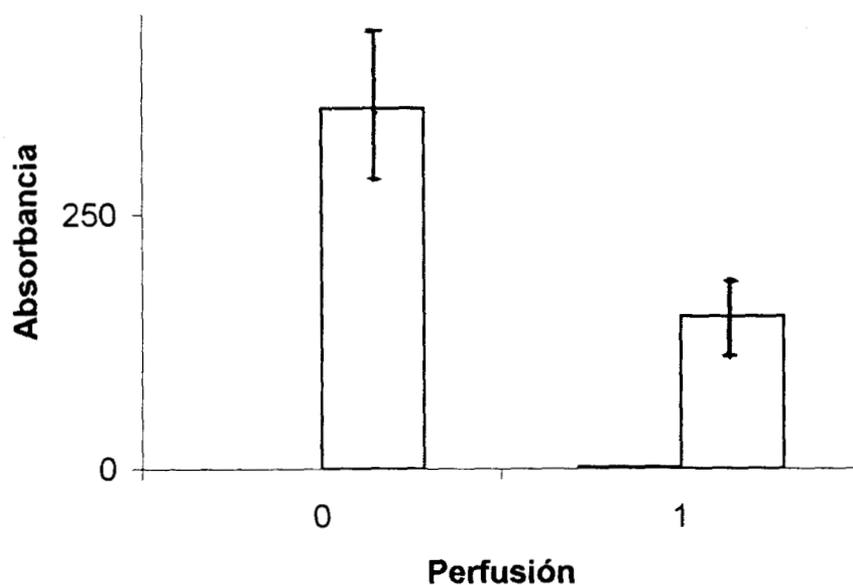
Gráfica 23: Grado histológico con respecto al tiempo, para el grupo 4.

Actividad LDH/Perfusión



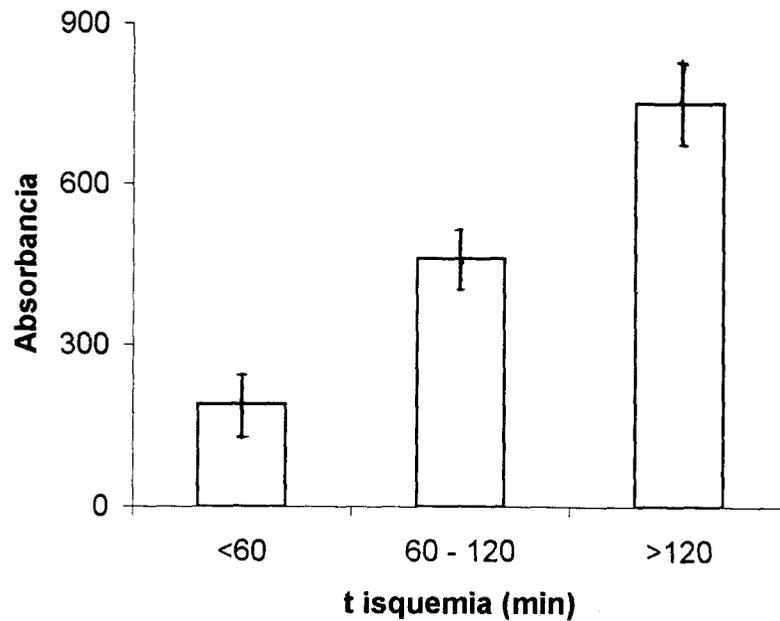
Gráfica 24: Actividad LDH por gramo de tejido, no normalizada, en biopsias con perfusión ausente y tiempo de isquemia >120 minutos, a la izquierda, y en biopsias con perfusión presente y tiempo de isquemia <60 minutos. (ANOVA $p < 0.05$). Obsérvese que el promedio de absorbancia en las muestras extraídas de animales con mayor tiempo de isquemia y no perfundidas triplica los valores de las muestras con menor tiempo y perfundidas.

Actividad LDH/Perfusión



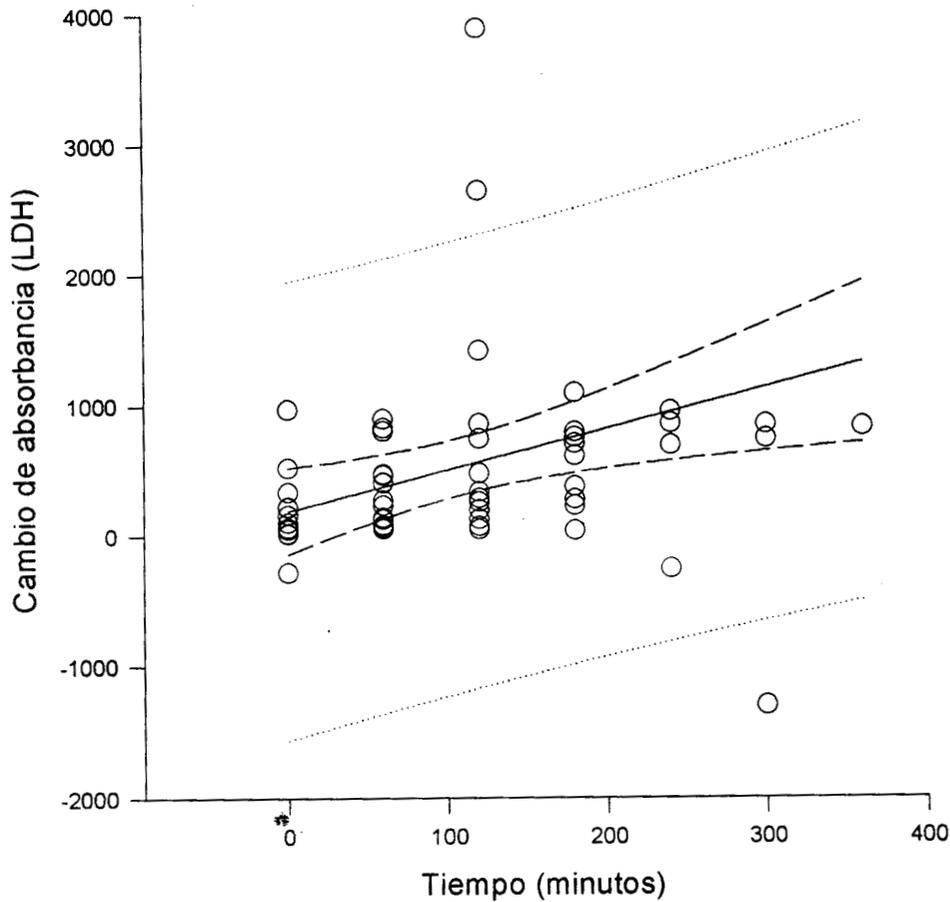
Gráfica 25: Actividad LDH por gramo de tejido, no normalizada, en biopsias con perfusión ausente y tiempo de isquemia entre 60 y 120 minutos, a la izquierda, y en biopsias con perfusión presente y tiempo de isquemia <60 minutos. (ANOVA $p < 0.05$). Obsérvese que el promedio de absorbancia en las muestras extraídas de animales con mayor tiempo de isquemia y no perfundidas triplica los valores de las muestras con menor tiempo y perfundidas.

Actividad LDH/Tiempo de isquemia



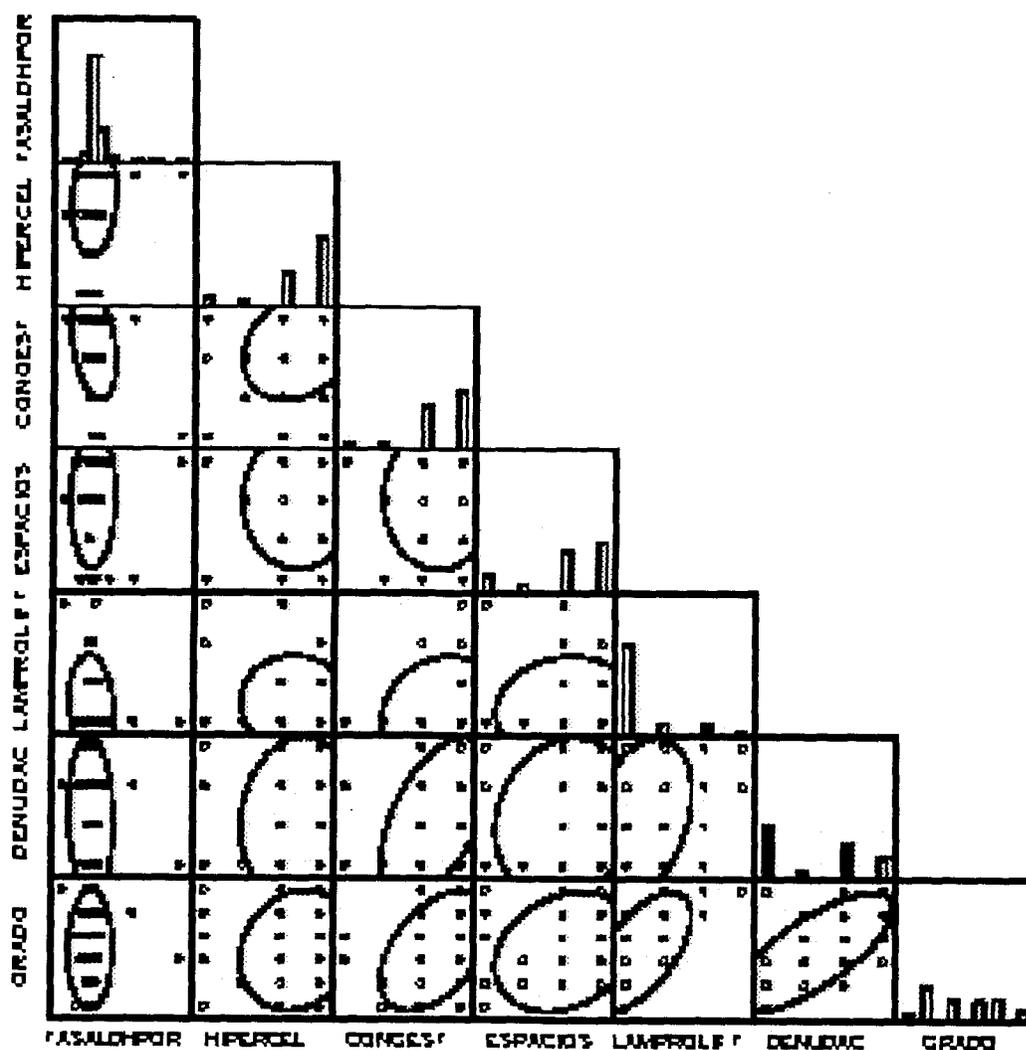
Gráfica 26: Actividad LDH por gramo de tejido, no normalizada, con respecto a los datos agrupados en "Tiempo de isquemia" (ANOVA $p < 0.05$). Se puede observar progresión lineal del valor de actividad LDH en la medida que el posible daño isquémico crece, y que no hay traslape entre las desviaciones estándar. En las gráficas 24 a 26 se evidencia que el promedio de absorbancia en las muestras extraídas de animales con mayor tiempo de isquemia triplica los valores de las muestras con menor tiempo de isquemia. Se puede observar progresión lineal del valor de actividad LDH en la medida que el posible daño isquémico crece.

Correlación Tiempo de isquemia / LDH



Gráfica 27: Correlación entre el cambio de absorbancia y el tiempo del experimento, para todos los grupos. $r=0.337$; $p=0.008$

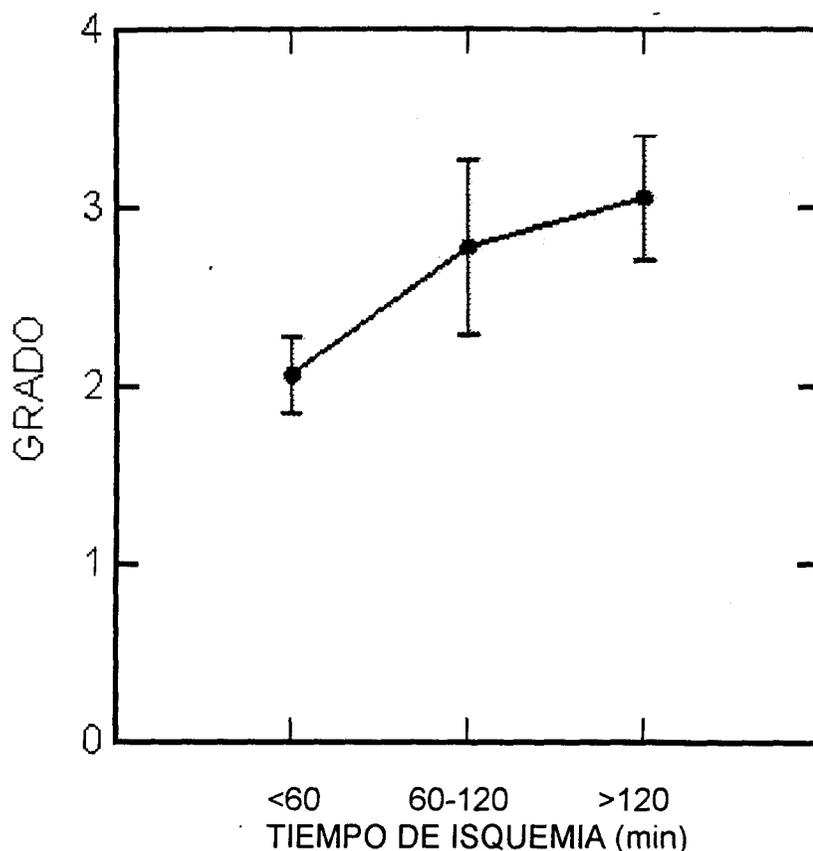
La gráfica 27 exhibe una regresión lineal entre el tiempo como variable independiente, y el cambio de absorbancia, consecuencia de la actividad de la LDH, como variable dependiente. Note la correlación y los valores de probabilidad <0.05 .



Gráfica 28: Correlación entre actividad LDH con cada parámetro histológico, para determinar el peso que cada parámetro de estos tiene en la determinación del daño isquémico. Coeficiente de Pearson para denudación contra grado =0.75. Para denudación contra congestión =0.53. Para actividad LDH contra congestión =-0.3. TASALDHPOR: Tasa de actividad LDH por gramo de tejido. HIPERCEL: Hipercelularidad. CONGEST: Congestión. ESPACIOS: Formación de espacios subepiteliales. LAMPROLIFT: Despegamiento de la *lamina propia*. DENUDAC: Denudación de las vellosidades. GRADO: Grado histológico observado.

Aunque la gráfica 28 presenta los coeficientes de Pearson más altos para denudación contra grado y denudación contra congestión, y que el parámetro más correlacionado con actividad LDH es congestión, para el patólogo usando el microscopio de luz los criterios de dicha graduación con mayor peso fueron en su orden la hipercelularidad (muy en particular linfocitosis), la vasodilatación-

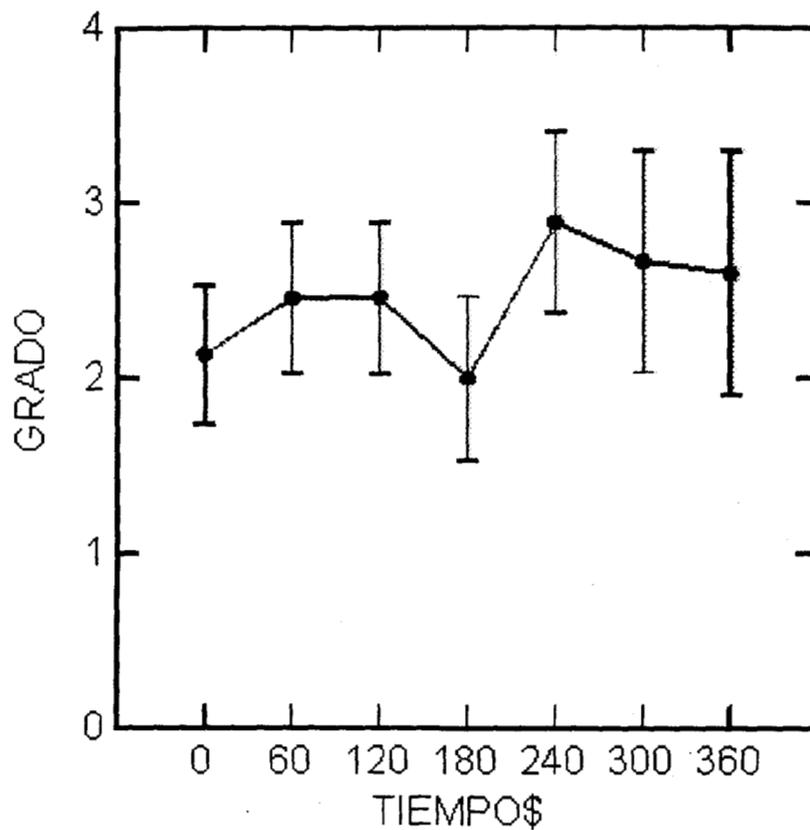
congestión, y la aparición de espacios subepiteliales. El denudamiento de las vellosidades tuvo un peso intermedio en la graduación, y finalmente el despegamiento de la lámina propia y el despegamiento del epitelio casi no tuvieron valor diagnóstico, para el patólogo. En la columna de observaciones, la observación más veces encontrada es hiperplasia folicular linfoide (11 casos). Hallazgos de hemorragia y ulceración se dieron apenas 1 y 2 veces respectivamente.



Gráfica 29: Grado histológico con respecto del posible daño isquémico, para todos los grupos.

Observe la proporción directa que hay entre las variables Grado Histológico y "Tiempo de isquemia".

En la gráfica 29 puede observarse que no hay traslape entre las desviaciones estándar de los tiempos 0 (<60 min) y 2 (>120 minutos de pinzamiento de la AMS), pero también que cuando el posible daño es apenas 0, ya el Grado tiene una media de 2. La gráfica 29 muestra la proporción directa que hay entre el Grado Histológico y el posible daño isquémico dado por un progresivo tiempo de isquemia. Es significativa la diferencia que hay entre los posibles daños 0 y 2, pero obviamente las muestras estaban lesionadas desde el tiempo 0. De hecho en el tiempo 0 de todos los grupos la media del grado histológico fue 2.1 (gráficas 29 y 30) y se mantienen valores altos de graduación en todos los tiempos.



Gráfica 30: Grado histológico a medida que transcurre el tiempo, para todos los grupos.

Observe en la gráfica 30 que en el tiempo experimental 0 de todos los grupos la media del grado histológico es de 2.1 (desviación estándar 1.3; probabilidad para medir daño con base en el grado histológico =0.04). Resalta el descenso del grado para el tiempo 180. Los valores de los demás tiempos se comportan según lo esperado con valores altos de graduación y una discreta tendencia a recuperarse por la reperfusión, con aumento de la desviación estándar.

7. Discusión

El presente estudio aplicó la medición de actividad de LDH en tejidos completos, específicamente en la pared del íleon; agregó mediciones durante la reperfusión, y trató de aportar a la caracterización del daño isquémico intestinal llevando los animales hasta seis horas de isquemia.

Lo que más resalta en las tablas 1 y 2 son los altos errores estándar de la media. Graficados en las figuras 9 a 13, hacen evidente que los valores de absorbancia no presentan muy grandes variaciones entre grupos, con la sola excepción de los grupos 1 y 4. Dicho de otra manera, que la medición hecha en un individuo no permite la automática determinación de su estado. Por su parte, las micrografías presentan con claridad la progresión del daño isquémico. Esto es consecuente con los hallazgos de Thompson⁸¹, Decker⁷⁹ y Chiu⁴, respectivamente.

En algunas ratas como la 13 (grupo 0), la 14 y la 15 (grupo 1), el comportamiento de los valores es impredecible tanto en actividad LDH como en grado histológico. Las citadas ratas son las únicas que muestran absorbancias negativas, si bien la última apenas toca dichos valores. Estos tres animales fueron operados el mismo día, junto con la rata número 16, que murió espontáneamente a las 2 horas de procedimiento. No hay registrado en bitácora ningún otro evento especial que explique lo errático de sus valores. En publicaciones de graduaciones histológicas no se encuentran comentarios de variabilidad en los resultados⁴.

Los valores negativos de absorbancia son atribuibles a que el valor final de absorbancia se obtuvo restando la absorbancia del medio con tetrazolio luego de haber adicionado la biopsia, de la absorbancia del medio antes de haber adicionado la biopsia. Es inesperado que el medio presente una absorbancia menor luego de haber interactuado por una hora con la biopsia, respecto de la absorbancia de ese mismo medio antes de dicha interacción..

El grupo 2 es el que mejor se ajusta a nuestra hipótesis, según se evidencia también en las gráficas 11, 16 y 21. Esto es compatible con los hallazgos de Powell².

En la graduación histológica, las ratas cuyo comportamiento se apega mejor a la teoría son la 4, la 6, la 7, y la 8, cada una perteneciente a un grupo diferente. En algunos otros casos no hay una tendencia definida hacia la progresión del daño isquémico, y en otros más existen muy pocos valores de grado para aproximar una tendencia. Observando las gráficas 21, 22 y 23, es muy interesante que en el grupo 2 (una hora de isquemia seguida por una hora de reperfusión) se vea progresión de lesiones durante la isquemia, y mejoría con la reperfusión, contrario a lo que sucede con los grupos 3 (dos horas de isquemia seguidas por dos horas de reperfusión) y 4 (tres horas de isquemia seguidas por tres horas de reperfusión), en los cuales el daño aumenta con la reperfusión en la escala histológica y en la prueba bioquímica. Esto nos permite postular que la ventana terapéutica para que la reperfusión sea útil y no perjudicial puede estar antes de la segunda hora de isquemia.

Las curvas presentadas en las gráficas 24 a 27 apoyan el postulado de que la actividad de la LDH se incrementa linealmente a medida que el tiempo de isquemia aumenta.

Este trabajo muestra una débil asociación entre los hallazgos histológicos y los hallazgos de actividad de la LDH (gráfica 28), y que ninguno de los dos métodos, solos o combinados, es ideal para *monitorear* el daño isquémico, ya que exige la extracción de tejido, un procesamiento de varias horas para obtener datos, y se obtiene una gran varianza en los resultados.

La gran varianza hallada en los valores de absorbancia (actividad de LDH) puede ser consecuente con la realidad, o puede obedecer a insuficiencia de repeticiones, inexperiencia de los investigadores, mal estado de las sustancias utilizadas en el medio que constituiría el sobrenadante, o a que la actividad LDH de los eritrocitos, leucocitos, otras células constitutivas de la pared ileal, y bacterias de la luz intestinal, haya producido un ruido tal que oculta la información.

Otras limitaciones fueron:

- Este trabajo incluyó toda la pared del íleon en las medidas. Trabajos más detallados deben hacerse para caracterizar el daño isquémico exclusivamente en la mucosa intestinal, por ser ésta la primera afectada por la isquemia, y porque una terapia orientada a la defensa de la mucosa podría cambiar radicalmente las abrumadoras cifras presentadas en la referencia [1], sin esperar a que las lesiones abarquen todas las líneas celulares de la pared ileal, es decir, sin esperar al infarto transmural.
- Existe actividad de la LDH en el suero, en todas las líneas celulares involucradas en la pared del intestino, probablemente en varias de las cepas bacterianas de la luz intestinal, y aun posiblemente en las sustancias usadas dentro de la prueba. Inclusive, el daño isquémico en general, y el intestinal en particular, deben considerarse injurias mediadas por células de la defensa^{12,13}. Estas células de la defensa también liberan LDH al sobrenadante, al punto que podrían influir en los resultados. Además, en este estudio pudieron involucrarse sustancias inhibitoras de la actividad de la LDH o de la diaforasa. Por otra parte, un volumen grande de estudios podría llegar a la conclusión de que en general los valores de la actividad de la LDH en la pared completa del íleon, con todo lo que esa pared conlleva, son similares para cada tiempo de isquemia.
- El grupo 0, de control, no estuvo sano todo el tiempo, ya que al no cerrar las heridas causadas por la extracción de las biopsias, se estaba induciendo peritonitis en todos los grupos a partir del inicio de la manipulación.
- No figura en la bitácora la medición precisa del tiempo transcurrido entre el momento de adición de la biopsia al medio de reacción, y el momento de adición de HCl para detener la reacción. Esto abre la posibilidad de que en algunas muestras se haya dejado actuar más tiempo a las enzimas LDH y diaforasa que en otras, con lo cual se pudo acumular más producto.
- Hubiera sido un complemento importante el usar otra prueba estándar, como la tonometría intestinal, que midiera cuánta isquemia había en el tejido en el momento de la extracción de biopsias.

En la parte histológica los hallazgos fueron similares a los de la literatura. Una buena organización del rotulado de las muestras disminuye el riesgo de que algunas se pierdan, y limita desde un principio la posibilidad de que el patólogo infiera la pertenencia de las biopsias a determinado tiempo o grupo. Son obvias las limitaciones de la histopatología para la caracterización del daño isquémico debido a su información no dinámica, y a que la extracción de muestras puede introducir ruido al experimento.

8. Conclusiones

Se acepta la hipótesis de que la actividad de la LDH, reflejada en la reducción de INT, aumenta a medida que aumenta el daño tisular por la isquemia. Por ello, la medición de actividad de LDH permite medir el daño isquémico. No se logra sostener la hipótesis de que dichos cambios se hacen más evidentes con la reperfusión.

Este trabajo encuentra su principal utilidad en hacer un aporte sencillo a la caracterización del daño isquémico de la mucosa intestinal con respecto al tiempo, de manera que complementa la validación del espectrómetro de impedancia construido por nuestro Laboratorio.

Es necesario continuar en la búsqueda de métodos no invasivos para la detección temprana de la isquemia gastrointestinal, que permitan además el monitoreo de su tratamiento.

8.1. Recomendaciones para trabajos futuros

Con la experiencia de haber realizado estas mediciones y haber escrito esta tesis, nos permitimos señalar los puntos principales a corregir o aumentar en un eventual estudio futuro que use los métodos que usamos.

Un estudio posterior debe abarcar controles de la actividad de LDH en el propio medio de ensayo, para sustraer el valor de absorbancia registrado ahí de los valores obtenidos posteriormente. Debe también incluir un control de liberación espontánea de actividad LDH, y un estudio de la cantidad máxima de LDH que puede ser liberada por las líneas celulares involucradas. Haber usado un grupo de animales control puede haber disminuido este tipo de problemas en este trabajo, pero quizás no lo suficiente. Esto en particular porque no podemos calcular, ni siquiera de manera aproximada, las diferencias de cantidad de sangre, bacterias y células de la defensa que hubo entre muestra y muestra.

Debe medirse cuidadosamente la cantidad de tiempo que pasa la enzima actuando en el sustrato antes de añadir el ácido clorhídrico.

Debe usarse un medio de extracción de biopsias que deje cerrado el orificio, y que no agregue más lesión al tejido.

Si se quiere repetir este estudio, conociendo la varianza obtenida, se puede calcular el tamaño de la muestra recurriendo a la ecuación

$$d = t_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}$$

en donde d es la cantidad de unidades que el intervalo se extiende hacia uno y otro lado del estimador, $t_{1-\alpha/2}$ es el coeficiente de confiabilidad (que para la varianza de nuestros datos tendría que ser de máximo 0.90), S_x^2 es la estimación de la varianza de la población para un grupo x a un tiempo determinado, y n es el tamaño de la muestra para dos poblaciones⁸³.

Esta ecuación resuelta para n es

$$n = \frac{S_1^2 + S_2^2}{(d/t_{1-\alpha/2})^2}$$

Visto lo anterior y haciendo los reemplazos correspondientes, se encuentra que para un intervalo d de 10 unidades de absorbancia y un $t_{1-\alpha/2}$ de 1.44, la cantidad de animales a usar en cada grupo estaría alrededor de 3850. Como esto no es factible, se puede continuar ampliando el intervalo a uno y otro lado del estimador, ó bien disminuir el grado de confianza hasta alcanzar un número factible de animales por cada grupo.

Por último insistimos en que lo principal es buscar nuevas formas de diagnóstico y monitoreo del estado de la mucosa. Estos nuevos métodos deben validarse no solo en su valor diagnóstico sino también pronóstico, y en su utilidad para guiar al médico en la terapia del paciente crítico.

9. Apéndice: Publicaciones previas

Se anexa copia del artículo escrito por Gonzalez, Sacristán, Villanueva, Othman, Narváez y Aljama, "Espectroscopía de Impedancia para Monitoreo de Daño Isquémico en la Mucosa Intestinal", presentado en el Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica en La Habana, Cuba, en Abril de 2001.

ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA PARA MONITOREO DE DAÑO ISQUÉMICO EN LA MUCOSA INTESTINAL

César A. González^{1,2,3}, Emilio Sacristán², Cleve Villanueva¹, Salah Othman², Raúl Narváez², Tomas Aljama²

¹ Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad y ³ Laboratorios de Enseñanza, Escuela Militar de Ingenieros. Universidad del Ejercito y Fuerza Aérea, México.

² Laboratorio de Instrumentación Biomédica, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Ave. Michoacán y Purísima, México DF 09340 México, gonzalezantoni@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la posibilidad de utilizar la espectroscopia de impedancia para monitoreo de daño isquémico en la mucosa intestinal, utilizando una sonda intraluminal mínimamente invasiva. En la última década se ha demostrado la importancia de la mucosa intestinal en casos de choque y se han desarrollado varias tecnologías para el monitoreo de la perfusión, la oxigenación, y/o el nivel de isquemia en la mucosa gastrointestinal. Más notablemente se ha comenzado a usar clínicamente la tonometría para medir el pH intramucoso (pHi) como indicador de isquemia tisular. Sin embargo, ninguno de los métodos reportados nos permiten identificar la severidad del daño isquémico en la mucosa intestinal, información crucial para entender el desarrollo del choque y prevenir la Falla Orgánica Múltiple.

El protocolo experimental se desarrolló en un modelo de choque hipovolémico isobárico en conejo anestesiado. Se registraron espectros de impedancia compleja de 50Hz a 500KHz y mediciones simultáneas de pHi en la mucosa del ileon, a diferentes tiempos de isquemia e isquemia-reperfusión. Los resultados muestran que los espectros de impedancia de la mucosa intestinal son reproducibles, que los espectros de tejido dañado por un cierto periodo de isquemia son claramente diferenciables de los espectros de tejido sano, y que estos cambios espectrales dependen del tiempo de isquemia y no del pHi o el nivel de perfusión tisular.

Palabras clave: Tonómetro, isquemia intestinal, Espectro e impedancia, pHi.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha reconocido la importancia de la mucosa gastrointestinal en el proceso de descompensación en choque y el desarrollo de Falla Orgánica Múltiple (FOM). Cualquier insuficiencia sistémica en el suministro de oxígeno afecta de forma muy temprana a la mucosa gastrointestinal [1,2]. Isquemia en este tejido puede ser detectada con frecuencia, antes que cualquier otra irregularidad a nivel sistémico, y puede servir como un indicador muy temprano del inicio de choque. Después de un cierto periodo isquémico, la mucosa intestinal se degrada, perdiendo su función de barrera y permitiendo la traslocación de endotoxinas y bacterias que agudizan el choque [4,5]. La isquemia en la mucosa gastrointestinal ocurre en más del 56% de los pacientes en cuidados intensivos, y ha sido relacionado con el 80 % de las muertes [6].

En los últimos años se han desarrollado y evaluado varias terapias enfocadas a evitar o limitar los efectos negativos del daño isquémico en la mucosa [7,10]. La efectividad de estas

terapias depende de forma crucial del estado de la mucosa en el momento de la intervención. Es importante poder determinar si el daño a la mucosa es irreversible y si se ha perdido su función de barrera. Cuando el tiempo de isquemia es corto, se considera que se ha presentado un daño isquémico todavía reversible, por lo que es óptimo prevenir o limitar una situación de daño isquémico en la mucosa mediante una resucitación hemodinámica agresiva, vasodilatadores para aumentar la perfusión local, oxigenación intraluminal y reducción de los requerimientos de oxígeno, eliminando focos de infección, pus y enfriando el tejido, también se puede prevenir el peligro de bacterias en el lumen, mediante antibióticos y lavados gástricos. En contraste, si el tiempo de isquemia es prolongado, se puede llegar a un punto en el que el daño isquémico es suficientemente grave y es importante prevenir daño adicional por reperfusión mediante aislamiento del tejido, confinando endotoxinas y bacterias, también se debe pensar en eliminar radicales libres por medios farmacológicos y limitación gradual de la perfusión [7]. Sin embargo, para poder hacer más efectivas estas posibles terapias, hace falta un mecanismo capaz de medir el nivel de daño tisular en la mucosa gastrointestinal.

Algunos métodos de monitoreo se han desarrollado para determinar las condiciones de flujo sanguíneo [3] y metabolismo en la mucosa, tales como el nivel de acidosis (pH), presión parcial de oxígeno (PO₂) y presión parcial de dióxido de carbono (PCO₂) con el objetivo de determinar hipoperfusión, hipoxia y particularmente isquemia local en la mucosa intestinal. Entre estos métodos, destaca la tonometría gastrointestinal que permite calcular de forma indirecta el pH intramucoso (pHi) para detectar isquemia en este tejido, y el cual se ha vuelto una técnica de reconocido valor clínico [3].

Las medidas de espectroscopia de impedancia son más completas y útiles que sólo medidas de impedancia, esto es porque la impedancia está medida en numerosas frecuencias y los datos se ajustan en el modelo matemático del material medido. Así, los parámetros del sistema extraídos tienen mucho más información, hay también, un número grande de parámetros disponible para la caracterización de materiales.

Se ha propuesto utilizar un espectrómetro de impedancia prototipo [17] para monitorear la permeabilidad iónica e integridad de las paredes celulares de la mucosa intestinal.

El propósito de esta investigación es integrar el sistema de análisis de espectros de impedancia recogidos de un espectrómetro prototipo y determinar si existen diferencias en los espectros registrados bajo diferentes tiempos de isquemia e isquemia-reperfusión con respecto a espectros registrados en tejido sano, el estudio se complementa con una identificación

del nivel de isquemia intestinal mediante el monitoreo de pHi , finalmente determinar si es posible considerar la espectroscopía de impedancia como una herramienta de diagnóstico en la severidad de daño isquémico.

2. METODOLOGÍA

Espectrómetro de impedancia

Se diseñó y construyó un instrumento prototipo, el cual puede medir la impedancia compleja del tejido a frecuencias hasta de 300 KHz. Este instrumento se compone de tres partes principales: La primera parte es la correspondiente al instrumento por sí mismo (espectrómetro), la segunda parte es la que corresponde al control y se basa en una computadora personal. La tercera y última parte corresponde al sensor (sonda de cuatro electrodos). El espectrómetro genera una corriente constante al tejido y mide la impedancia compleja que éste presenta sobre el rango de frecuencias específico. La computadora personal controla las operaciones del instrumento tales como el rango de frecuencias de operación, la captura de datos y su almacenamiento así como el procesamiento de éstos. Por medio del sistema de cuatro electrodos se inyecta una corriente de excitación constante en el tejido. La corriente a su vez genera un voltaje, éste es medido por los electrodos interiores.

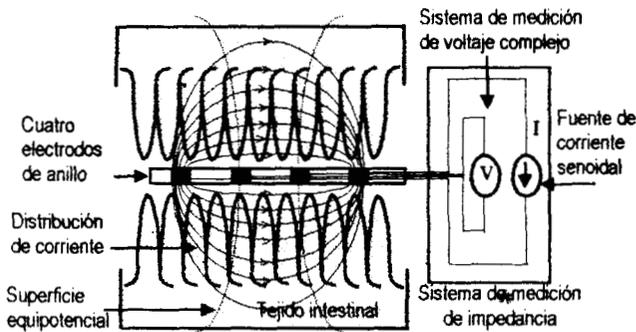


Figura 1. Sistema de cuatro electrodos para medición de impedancia compleja del tejido. La fuente de corriente produce una excitación senoidal constante en el tejido a través de los dos electrodos exteriores. Las mediciones complejas de voltaje se realizan mediante los dos electrodos interiores.

La corriente de excitación aplicada se distribuye en el tejido siguiendo la ley de Ohm y forma superficies equipotenciales. Cada electrodo se encuentra a un potencial fijo y depende de la posición de los electrodos, la distribución de corriente en el tejido y las características eléctricas y geométricas de éste. La impedancia del tejido definida de esta forma corresponde a un volumen de tejido con límites definidos por las superficies equipotenciales.

La parte instrumental del espectrómetro realiza varias funciones. Primero, genera la corriente de salida empleando el módulo de la fuente de corriente. La corriente tiene una forma de onda senoidal con mínima distorsión armónica. Su frecuencia se controla por medio de la computadora personal. La corriente de salida generada se vuelve a medir como referencia por medio del módulo de medición de corriente. Este módulo cambia la corriente de salida a voltaje por medio de una resistencia. El voltaje así generado se amplifica mediante un amplificador de instrumentación (A_c), se modula en el bloque de modulación y se captura por medio del

módulo de adquisición de datos. La corriente pasa por este módulo sin modificación alguna. Por último la corriente de salida pasa por medio del cable blindado al sistema de electrodos y se inyecta en el tejido. El voltaje de entrada así generado (entre los electrodos) se amplifica mediante un amplificador diferencial de instrumentación (A_v) y posteriormente pasa al módulo de modulación y al de adquisición de datos.

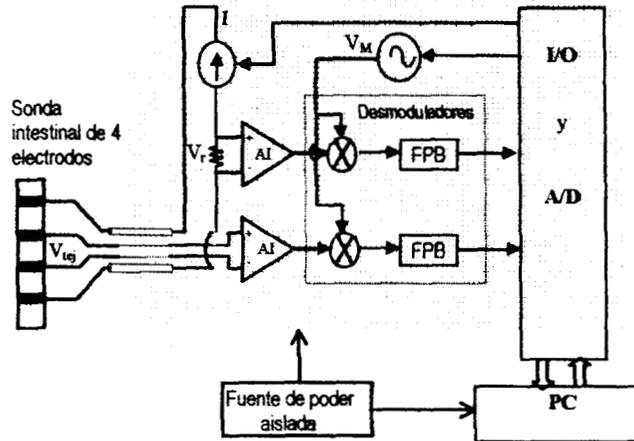


Figura 2 Diagrama a bloques detallado. El sistema de electrodos hace la interfase con el tejido inyectando una corriente de excitación y midiendo el voltaje correspondiente del tejido. El amplificador A_c procesa el voltaje medido se digitaliza y se envía a la PC.

El sistema utiliza para el cálculo de amplitud y fase para determinar la impedancia compleja se realiza fuera de línea mediante algoritmos programados en MATLAB.

Protocolo experimental

La etapa experimental consistió en experimentos *in vivo* en conejos blancos Nueva Zelanda de 2.5 a 4.2 Kg. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a 50mg/Kg, manteniendo la anestesia según necesidad por el resto del experimento. En cada animal se realizó una traqueotomía para asegurar una respiración sin obstrucción. Se colocaron líneas en la vena yugular derecha y en la arteria carótida izquierda para el monitoreo continuo de presión arterial y venosa. También se cateterizó la arteria femoral derecha para muestras de sangre arterial y para extraer volumen sanguíneo como parte del modelo de choque hemorrágico. Se realizó un laparotomía para introducir quirúrgicamente la sonda experimental y el tonómetro en el íleon. Una vez concluida la intervención quirúrgica, se heparinizó al animal con una dosis de 200UI/Kg (IV) y se comenzó el experimento ($t = 0$). En todos los experimentos se obtuvieron muestras arterial y tonométrica, y se registró un espectro de impedancia cada 30 minutos hasta $t = 270$ min. o hasta la muerte del conejo. Las muestras de sangre arterial y del tonómetro fueron analizadas por gasometría para calcular el pHi . Al concluir el experimento se aplicó eutanasia por inyección de solución de KCl endovenoso.

Se realizaron espectros de impedancia cada 30 minutos en el transcurso de cada experimento, se aplicó una corriente alterna de 2 mA a 25 frecuencias diferentes en un ancho de banda de 50Hz a 300kHz. Se calculó el valor de impedancia en magnitud y su correspondiente en fase para cada

frecuencia en intervalos de 30 min. Se determino el diagrama de Nyquist correspondiente.

Grupos experimentales

El diseño experimental consistió en la creación de 3 grupos experimentales: Grupo Control (n=6). Grupo Isquemia (n=5) y Grupo Isquemia-Reperfusion (n=5). En el grupo control, se completo el experimento sin ninguna manipulación adicional, tomando las muestras cada 30 min. hasta t= 240. En los otros dos grupos, después de una hora de estabilización (t=60), Los conejos fueron sometidos al modelo de hipovolemia isobárica de WIGGERS. En este modelo se extrae sangre via la arteria femoral hasta alcanzar una PAM de 40 mmHg ("presión de choque") en un lapso aproximado de 15 minutos, y se mantiene dicha PAM inicialmente por nuevas extracciones (fase compensada). En el grupo de isquemia, cuando el volumen exsanguinado llegó a su máximo y la presión empezó a caer (inicio de la fase descompensada), el experimento se continuó sin ninguna manipulación adicional hasta la muerte del conejo. En el grupo de isquemia-reperfusion, al comenzar la fase descompensada, la presión arterial de choque se mantuvo por 15 minutos más a base de pequeñas reinfusiones de la sangre extraída. Al concluir los 15 minutos, se reinfundió 60% del volumen exsanguinado y se continuó el experimento sin ninguna manipulación adicional hasta t=240 o hasta la muerte del conejo.

Análisis espectral

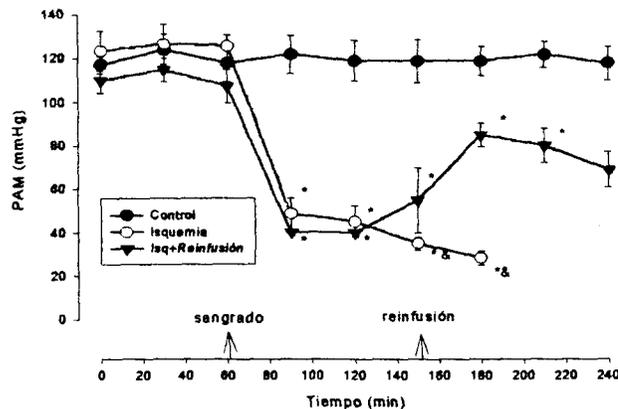
Los espectros de impedancia fueron normalizados con relación a la impedancia de referencia medida a 300KHz (el punto más insensible a los cambios estructurales en el tejido), dividiendo las impedancias por la impedancia de referencia y restándole a las fases la fase de referencia. Los espectros luego fueron promediados por tiempo y grupo. Finalmente, los espectros normalizados y promediados para cada tiempo fueron comparados para establecer si se podían encontrar laras diferencias en los espectros de los diferentes grupos.

3. RESULTADOS

En la figura 3 se muestra el curso temporal de la PAM de los tres grupos experimentales. En la figura 4 se muestra el curso temporal del pHi medido por tonometría en el ileón. En el grupo de control la PAM y el pHi se mantienen estables y normales durante todo el experimento. En los grupos de isquemia e isquemia-reperfusion se ve que la caída de la PAM causa isquemia casi inmediatamente en la mucosa, y que en solo 30 minutos el pHi se encuentra completamente anormal. En el grupo de I-R, el pHi comienza a recuperarse después de la reinfusión.

El análisis de varianza frecuencia por frecuencia de los espectros muestra que no hay una diferencia significativa entre los espectros de los 3 grupos en los tiempos de t=0 a t=90. A t=120 se encuentra ya una diferencia estadísticamente significativa entre los espectros, la cual crece y se vuelve más obvia hasta que empieza la reinfusión. A t= 195 todos los conejos del grupo de isquemia habían muerto. A t=240 ya no se encuentra una diferencia significativa entre los espectros de isquemia reperfusion con los normales. La figura 5 muestra gráficas de Nyquist de los espectros normalizados promedio de isquemia o isquemia reperfusion contra los espectros control a los tiempos t=90, t=180, y t=240.

Curso Temporal de la Presión Arterial Media



* p<0.001 respecto al Control
 &p<0.01 respecto a Isq+reperfusion

Figura 3. Representación gráfica de la Presión Arterial Media en los tres grupos de experimentación protocolo. Nótese las curvas claramente definidas para los grupos isquemia sin tratamiento e isquemia-reperfusion así como la estabilidad de la curva control. Se muestra también los datos de significancia estadística mediante un análisis anova de 2 vías.

Curso Temporal del pHi

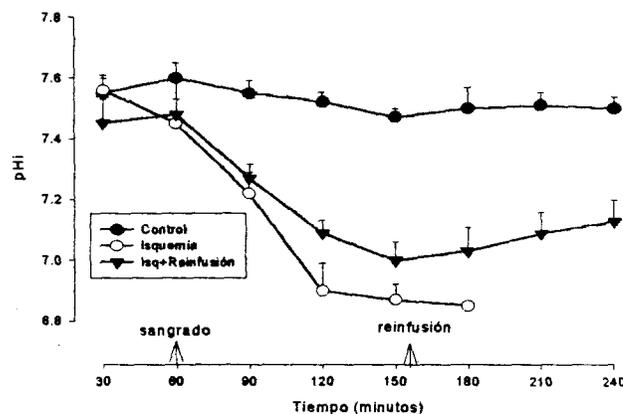


Figura 4. Representación gráfica del pH intramucoso calculado. Nótese que esta gráfica nos garantiza que para los grupos isquemia después de los 90 minutos ya tenemos una marcada isquemia en el intestino

4. DISCUSIÓN

La representación gráfica del curso temporal de la presión arterial media (Gráfica 1), refleja claramente el correcto desarrollo del protocolo experimental de choque isobárico para los grupos isquemia e isquemia-reperfusion con respecto al grupo control.

A t=90 la presión arterial y el pHi ya son anormales (El pHi no ha caído por debajo de 7.0 pero eso es de esperarse puesto que el tonómetro nos da una medición ponderada de los últimos 30 minutos). De estos datos se infiere que a t=90 la mucosa ya se encuentra hipoperfundida e isquémica, pero los espectros aún no marcan una clara diferencia con los espectros normales porque el tejido aún no se ha dañado mucho. A medida que transurre el tiempo de isquemia, se supone que el daño tisular se agrava, y vemos como la diferencia espectral también aumenta.

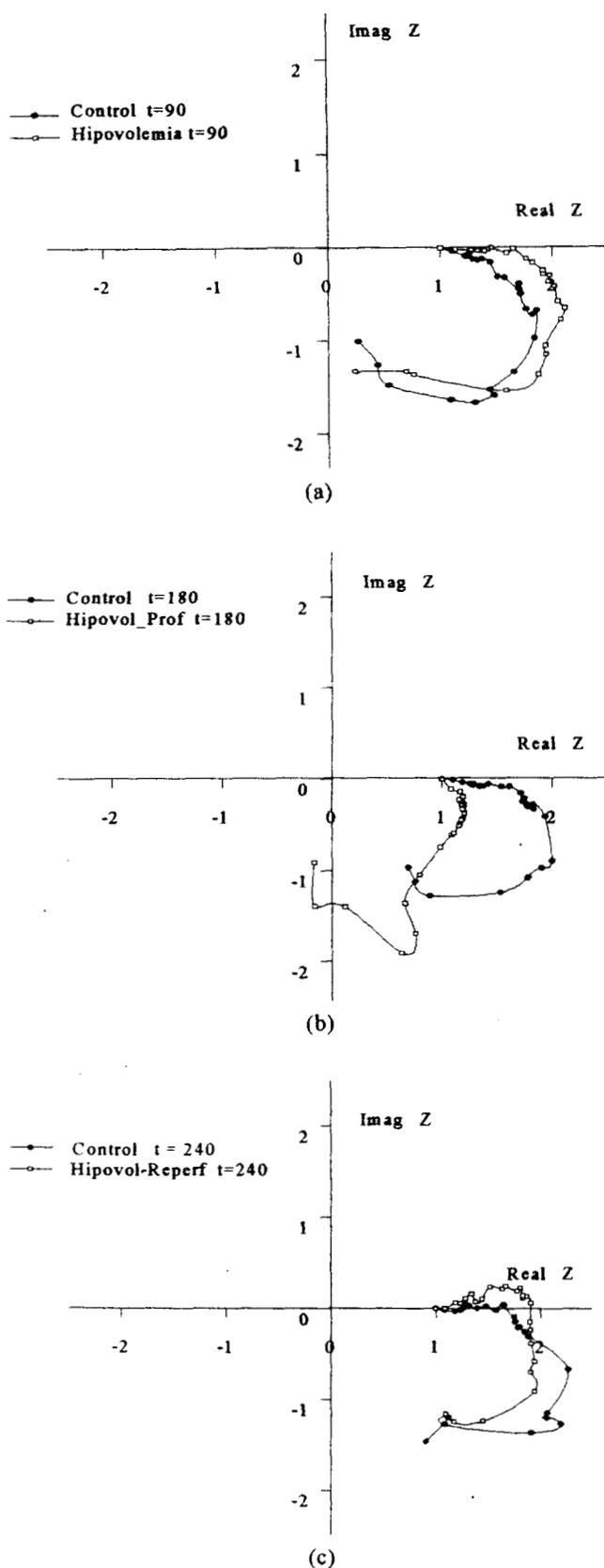


Figura 5. Diagramas de Nyquist de los espectros promedio normalizados de tejido sano y tejido isquémico a tres tiempos diferentes. En (a) a $t=90$ la mucosa ya está en isquemia y el espectro empieza a diferenciarse del control. En (b) a $t=180$ la mucosa ya sufrió 90 minutos de isquemia y su espectro es claramente diferente al control. En (c) a $t=240$ la mucosa lleva una hora de reperfusión y a medida que se recupera, el espectro vuelve a parecerse al control.

Es interesante notar que los espectros no sólo se separan uno del otro, pero también cambian de morfología en los diagramas de Nyquist: Los espectros normales tienen una forma circular (en acuerdo con el modelo de Cole y Cole), mientras que los espectros del tejido a más de una hora de isquemia empiezan a dibujar una sigmoide. Al restaurar la presión arterial con la reinfusión, suponemos que se restaura parcialmente la perfusión a la mucosa, y vemos como se recupera un poco el pHi . De la misma manera los espectros vuelven a tomar su forma circular y se reduce la diferencia con los espectros de tejido normal.

5. CONCLUSIONES

La diferencia entre los espectros de tejido sano e isquémico no parecen estar directamente relacionados ni al nivel de perfusión tisular ni a la isquemia tisular, más bien esta relacionada con el tiempo de isquemia o con el tiempo de recuperación, por lo que concluimos que el espectro de impedancia refleja daño tisular. El pHi muestra una caída antes de que se detecten cambios espectrales, lo cual sugiere que el tonómetro es un mejor indicador temprano de problemas metabólicos, siempre y cuando se realice un monitoreo rápido y continuo de pHi . Pero una vez que se tienen mediciones anormales de pHi , el tonómetro ya no proporciona ninguna información útil sobre los cambios tisulares causados por la isquemia o la reperfusión, y solo la información del espectrómetro de impedancia puede ser útil para guiar la terapia.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es producto de la tesis de Maestría del Ing. César Antonio González Díaz y fue realizada en el Laboratorio Multidisciplinario de investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México. El espectrómetro de impedancia prototipo evaluado es producto de la tesis de Maestría del Ing. Salah Othman y fue financiado con el apoyo del Laboratorio de Instrumentación Biomédica de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México

REFERENCIAS

- [1] ACCM practice parameters, Part 2: "Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients", Critical Care Medicine, 1998.
- [2] Doglio et al.-"Gastric mucosal pH as a prognostic index of mortality in critically ill patients", Critical Care Medicine, 1991, vol. 19 No. 8: 1037-1040.
- [3] Fiddian-Green RG, Amelin PM, Hermann JB, et al. "Prediction of the development of sigmoid ischemia on the day of aortic operations". Arch Surg 1986; 121:654-60.
- [4] Fiddian-Green RG, "Tonometry: Theory and Applications". Intensive Care World, 1992 9(2):60.65.
- [5] Fiddian-Green RG. "Splanchnic Ischemia and multiple organ failure in the critically ill". Ann Coll Surg. Engl 1988;70:128-134.
- [6] Geddes L.A. and Baker L.E., "The Specific Resistance of Biological Material - A Compendium of Data for the Biomedical Engineer and Physiologist", Med. & Biol. Engineering, 1966 vol. 5, pp. 271-293
- [7] Gielen F.L.H., Wallinga-de Jonge W. and Boon K.L., "Electrical Conductivity of Skeletal Muscle Tissue., Experimental Results from Different Muscles *In Vivo*", Medl & Biological Engineering & Computing, 1984 vol. 22, pp. 569-577.

- [8] Haglund U, Bulkley GB, Granger DN, "On the pathophysiology of intestinal ischemic injury", *Acta Chir. Scand.* 1987 153:321-324.
- [9] Othman Salah, "Espectrometro de Impedancia para monitoreo de daño isquémico tisular", tesis de maestría, UAM-Iztapalapa 1999.
- [10] Shoemaker WC, Apple PL, Kran HB, et al. "Prospective trials of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high-risk surgical patient". *Chest* (in press).
- [11] Schiedler MG, Cutler BS, Fiddian-Green RG. "Sigmoid intramural pH for prediction of ischemic colitis during aortic surgery". *Arch Surg* 1986;122:881-6.
- [12] Wiggers CJ. *Physiology of shock*. New York: Oxford Univ Press, 1950; p121

10. Referencias

1. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Guidelines in Intestinal Ischemia. *Gastroenterology* 2000;118:951-953
2. Powell RJ, Cronenwett JL, Gauthier AJ, Wagner RJ. Quantitating intestinal ischemia with nitroblue tetrazolium salts. *J Surg Res* 1995 Apr;58(4):359-66
3. Haglund U et al, On the pathophysiology of intestinal ischemic Injury. *Acta Chir Scand.* 153: 321- 324, 1987
4. Chiu C *et al*, Intestinal mucosal lesion in low-flow states. *Arch Surg* vol 101:478-83, 1970
5. Doglio et al. Gastric mucosal pH as a prognostic index for mortality in critically ill patients, *Critical Care Medicine*, Vol. 19No. 8:1037-1040, 1991
6. Catalano O. CT in the diagnostic approach to acute mesenteric ischemia. *Radiol Med (Torino)* 1995;89(4):440-6
7. Gutierrez G. et al "Gastric intramucosal pH as therapeutic index of tissue oxygenation in critically ill patients", *The Lancet*, Vol. No. 8787, Jan 25,1992
8. Gonzalez, Sacristán, Villanueva, Othman, Narváez, Aljama. Espectroscopía de impedancia para monitoreo de daño isquémico en la mucosa intestinal. *Memorias del Congreso Internacional de Ingeniería Biomédica.* Habana, Cuba. Abril de 2001
9. Hassan HA. Oral contraceptive-induced mesenteric venous thrombosis with resultant intestinal ischemia. *J Clin Gastroenterol* 1999;29(1):90-5
10. Thoren A et al, Baroreceptor-mediated reduction of jejunal mucosal perfusion evaluated with endoluminal laser Doppler flowmetry in conscious humans. *J Auton Nerv Syst.* 1998;68(3):157-63
11. Marston et al editors, *Splachnic Ischemia and Multiple Organ Failure*, Mosby Co. St. Louis, 1989
12. Fiddian-Green RG. The role of the gut in shock and resuscitation, The importance of the regional blood flow in the critically ill patient. *Clinical Intensive Care*, Supplement. Vol.3, No.1, 1992

13. Grotz M et al, The intestine as the central organ in the development of multiple organ failure after severe trauma: Pathophysiology and therapeutic approaches. *Zentralbl Chir* 1998;123(3):205-17
14. Xiao F et al, Complement-mediated lung injury and neutrophil retention after intestinal ischemia reperfusion. *J Appl Physiol* 1997;82(5):1459-65.
15. Williams JP et al, Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *J appl Physiol* 1999;86(3):938-42
16. Katsaragakis S, et al. Comparison of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) and Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) scoring systems in a single Greek intensive care unit. *Crit Care Med* 2000 Feb;28(2):426-32
17. Gross B, Sacristan E, et al, Supplemental systemic oxygen support using an intestinal intraluminal membrane oxygenator. *Proceeding of the 1st Latinoamerican Biomedical Engineering Conference, Mazatlán, 1998*, pp. 386-391
18. Petros A et al, Effects of nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovascular Res* 1995;28:34-39;
19. Villanueva GC, Papel del óxido nítrico en shock hemorrágico experimental en ratas, Tesis de doctorado en Farmacología, CINVESTAV-IPN, México DF, 1993
20. Grover R, et al: "Multicenter, randomized, placebo-controlled, doubleblind study of the nitric synthase inhibitor 546C88: Effect on survival in patients with septic shock". *Abstr. Crit Care Med* 1999; 27:A33
21. McDonald JR, Impedance spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*, 1992;20;289-305.
22. Concannon MJ, et al, Impedance plethysmography: a new method for continuous muscle perfusion monitoring. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol.88 No.2 pp.292-298, 1991.
23. Harrison DH. et al, Impedance monitoring for subcutaneous Free Flap Transfer. *British Journal of Plastic Surgery*. Vol. 42, PP. 318-324, 1989

24. Kun S, et al, Experimental system for accurate tissue impedance spectroscopy measurements. 16th Annual International Conference IEEE/EMBS, Baltimore, 1994
25. Othman S. Espectrómetro de impedancia para monitoreo de daño isquémico tisular, Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 1999)
26. González C. Evaluación de un sistema de espectroscopía de impedancia como herramienta de diagnóstico en terapia intensiva. Tesis de Maestría en Ingeniería Biomédica. Universidad Autónoma Metropolitana de México, 2000
27. Barker PB. Acute stroke: Evaluation with serial proton MR spectroscopic imaging. *Radiology*. 1994;192:723-732
28. Nedgedank W. Studies of human tumors by MR: A review. *NMR in Biomedicine*. 1992;5:303-324
29. Ross B, et al, Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q*. 1994;10:191-247
30. Elizondo G et al, Principios Físicos de la IRM. *Rev Mex Radiol* 1989;43:3-12
31. Thomas S et al, *NMR in Medicine Monograph 14*. AAPM, New York 1986
32. Gruetter R et al, Direct measurement of brain glucose concentrations in humans by ¹³CNMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:1109-1112
33. Fukushima E et al, *Experimental pulse NMR*. Perseus Books. 1981
34. Neil J, Measurement of water motion (apparent diffusion) in biological systems. *Concepts Magn Reson* 9: 385-401, 1997
35. Anderson A, Gore J, Analysis and correction of motion artefacts in diffusion-weighted imaging. *Magn Reson Med*. 1994, 32, 379
36. Müller M, Prasad P, Siewert B, Nissenbaum M, Raptopoulos V, Edelman R. Abdominal diffusion mapping with use of a whole-body echo-planar system. *Radiology* 1994, 190, 475

37. Gore J, Kennan R. Physical and physiological basis of magnetic relaxation. In *Magnetic Resonance Imaging*, volume I, pages 33-42. Stark and Bradley, editors. Mosby, USA, 1999
38. Vejchapipat P, Williams SR, Spitz L, Pierro A. Intestinal metabolism after ischemia-reperfusion. *J Pediatr Surg* 2000 May;35(5):759-64.
39. Sato A, Kuwabara Y, Sugiura M, et al. Intestinal energy metabolism during ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 82, 261-267, 1999.
40. Temes RT, Kauten RJ, Schwartz MZ. Nuclear magnetic resonance as a noninvasive method of diagnosing intestinal ischemia: technique and preliminary results. *J Pediatr Surg* 1991 Jul;26 (7):775-9
41. Ha HK, Rha SE, Kim AY, Auh YH. CT and MR diagnoses of intestinal ischemia. *Semin Ultrasound CT MR* 2000 Feb; 21(1): 40-55
42. Wilkerson DK, Mezrich R, Drake C, Sebok D, Zatina MA. Magnetic resonance imaging of acute occlusive intestinal ischemia. *J Vasc Surg* 1990 Apr; 11(4):567-71
43. Blum H, Summers JJ, Schnall MD, Barlow C, Leigh JS, Chance B, Buzby GP. Acute intestinal ischemia studies by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Surg* 1986 Jul; 204(1): 83-8.
44. Filez L, Stalman[§] W, Penninckx, Kerremans R. Influences of ischemia and reperfusion on the feline small-intestinal mucosa. *J Surg Res* 49, 157-163, 1990
45. Kuwabara Y, Kato T, Sato A, Fujii Y. Prolonged effect of leukocytosis on reperfusion injury of rat intestine: real-time ATP change studied using 31P MRS. *J Surg Res* 2000 Mar; 89(1): 38-42
46. Sato A, Kataoka M, Kuwabara Y et al. Ischemic injury of the small intestine studied by 31P MRS. *J Surg Res* 61, 373-378, 1996
47. Pelias M, Townsend M. In vivo 31P NMR assessment of early hepatocellular dysfunction during endotoxemia. *J Surg Res* 52, 505-509, 1992
48. Dousset V. Stroke. *Proceedings ISMRM eight scientific meeting*, page 11. USA, 2000

49. Zahler R, Majumdar S, Frederick B, Laughlin M, Barrett E, Gore JC. NMR Determination of Myocardial pH in vivo: Separation of Tissue Inorganic Phosphate from Blood 2,3-DPG. *Magn. Reson. Med.* 17, 368-378, 1991
50. Zahler R, Barrett E, Majumdar S, Greene R, and Gore JC. Lactic acidosis: effect of its development and treatment on intracellular pH and energetics in living rat heart. *American J. Physiology*, H1572-1578, 1992
51. Fiddian-Green RG, et al, Objective evidence for gastric ischemia from measurements of intramural pH made with silastic tonometers, *Digestive Surgery*, 1:87, 1984
52. Fiddian-Green RG, *Tonometry: Theory and applications*, Intensive Care World, 1992
53. Antonsson JB, Sacristan E, et al, Validation of tonometric measurement of gut intramucosal pH during endotoxemia and mesenteric occlusion in pigs. *Am J. Physiology* 259. *Gastroinest. Liver Physiol.* 22): G519-G523, 1990
54. Slichtig R et al, Tissue-arterial PCO₂ difference is a better marker of ischemia than intramural pH (pHi) or arterial pH-pHi difference. *J crit Care* 1996;11(2):51-6. 22
55. Myles P et al, The association among gastric mucosal pH, endotoxemia, and low systemic vascular resistance after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996;10(2):195-200).
56. Papadakos P, editor. *Gastrointestinal tonometry: Does it work? Controversies in critical care.* Vol. 2, Number 1, Sept. 1995
57. Friedman G et al. Combined measurements of blood lactate concentrations and gastric intramucosal pH in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1995 Jul. 23(7):1184-93
58. Liao XP et al, Changes in body fluid markers in intestinal ischemia. *J Pediatr Surg* 1995;30(10):1412-5
59. Murray MJ et al, Serum D(-)lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *Am J Surg* 1994;167(6):575-8

60. Headley JM, Invasive Hemodynamic Monitoring: Physiological principles and clinical applications. Edwards Critical Care Division. Baxter. ACCM practice parameters, part2: "Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients", Critical Care Medicine, 1998
61. Rowley KM et al, Right-sided effective endocarditis as a consequence of flow directed pulmonary/artery catheterization. N Engl J Med 1984;311:1152-6. Patel C et al, Acute complications of pulmonary catheter insertion in critically ill patients. Crit Care Med 1986;14:195-7
62. Balthazar EJ et al, Intestinal ischemia in patients in whom small bowel obstruction is suspected: evaluation of accuracy, limitations, and clinical implications of CT in diagnosis. Radiology 1997;205(2):519-22
63. Bartnicke BJ et al, CT appearance of intestinal ischemia and intramural hemorrhage. Radiol Clin North Am 1994;32(5)845-60
64. Frager D et al, Detection of Intestinal Ischemia in patients with acute small-bowel obstruction due to adhesions or hernia: efficacy of CT. AJR Am J Roentgenol 1996;166(1):67-71
65. Linkous MD et al, Noninvasive method for the detection of bowel ischemia: computed tomography detection of absorbed iodinated contrast material. Acad Radiol 1994;1(1):15-20
66. Schlichting E et al, Endothelin and hemodynamic responses to superior mesenteric artery occlusion shock and hemorrhagic shock in pigs. Shock 1995;3(2):109-15
67. Jakob SM et al, Regional perfusion and gastrointestinal function after cardiac surgery, New Horizon 1999;7:514-23
68. Sanjay S et al, Effects of mesenteric ischemia and reperfusion on small bowel electrical activity. J Surg Res 1998;74: 86-95
69. Bradshaw A et al, Correlation and comparison of magnetic and electric detection of small intestinal electrical activity. Am J Physiol 1997;G1159-G1167
70. Seidel S et al, Noninvasive detection of ischemic bowel. J Vasc Surg. 1999;30:309-19

71. Redaelli CA et al, Intraoperative assessment of intestinal viability by laser Doppler flowmetry for surgery of ruptured abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 1998;22(3):283-9
72. DiResta GR et al, Infrared laser Doppler flowmeter in the determination of small bowel perfusion after ischemic injury. *J Pediatr Surg* 1994;29(10):1352-5
73. Danse EM et al, Diagnosis of acute intestinal ischemia by color Doppler sonography. *Acta Gastroenterol Belg* 1996;59(2):140-2
74. Turkyilmaz Z et al, Assessment of anastomotic reliability with pulse oximetry in graded intestinal ischemia: an experimental study in dogs. *Pediatr Surg* 1997;32(12):1728-31
75. Walsh RM et al, Bedside diagnostic laparoscopy and peritoneal lavage in the ICU. *Surg Endosc* 1998;12(12):1405-9
76. Benoist S et al, Role of celioscopy in acute obstructions of the small intestine. *Gastroenterol Clin Biol* 1996;20(4):357-61
77. Semmlow JL et al, Evaluation of quantitative approaches to assessment of bowel viability. *Biomed Instrum Technol* 1997;31(6):591-9
78. Matern U et al, Emergency Laparoscopy: Technical support for the laparoscopic diagnosis of intestinal ischemia. *Surg Endosc* 1996;10(9):883-7
79. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988 Nov 25;115(1):61-9
80. Szekeres J, Pacsa AS, Pejtsik B. Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *J Immunol Methods* 1981;40(2):151-4
81. Thompson JS, Bragg LE, West WW. Serum enzyme levels during intestinal ischemia. *Ann Surg* 1990 Mar;211(3):369-73
82. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989 May 15;179(1):1-7

83. Wayne D. Bioestadística. Noriega editores. México, 1997