



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Fisiología**

Estudio de la función endotelial durante la  
isquemia/reperfusión mesentérica en la rata

**TESIS DOCTORAL**

**Raúl Narváez Sánchez**

2009



Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología

Luís Monge Sánchez, Profesor Titular de Fisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA: Que D. Raúl L. Narvárez Sanchez ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado **Estudio de la función endotelial durante la isquemia/reperfusión mesentérica en la rata** para optar al Grado de Doctor dentro del Programa Interuniversitario de Doctorado en Fisiología.

Para que conste, firmo la presente en Madrid a 01 de abril de 2009.

## **AGRADECIMIENTO**

Todos mis agradecimientos al personal docente y de servicios de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y a mis compañeros investigadores en formación. Grandes personas hacen grandes instituciones.

Quiero en particular agradecer la orientación del doctor Luís Monge Sanchez, y la continua colaboración de los doctores Ángel Luís García-Villalón, Godofredo Diéguez Castrillo y Nuria Fernández Monsalve, del Departamento de Fisiología, así como el inmenso apoyo de mi compañera de laboratorio, Adely Salcedo Guerrero, y de la secretaria del departamento, Esther Martínez. Ellos fueron mis compañeros de trabajo, pero ante todo mis amigos, y lo seguirán siendo siempre. Agradezco asimismo la ayuda que recibí del personal de informática y del animalario. Sin la colaboración de estas y muchas más personas de la Facultad de Medicina, no habría sido posible realizar esta tesis.

Gracias también a mis hermanos, especialmente a Helia, que han mantenido activas mis cosas en Colombia y nos esperan con los brazos abiertos.

Un especial reconocimiento a mis amigos de la Universidad Alfonso X, y a José A. Lorente, jefe de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital de Getafe.

Este trabajo fue realizado también “con el apoyo del Programa Alβan, Programa de Becas de Alto Nivel de la Unión Europea para América Latina, beca nº E06D100212CO”.

Dedico este trabajo a mi padre y a mi madre, que me lo dieron todo.

Y a Ivonne, mi esposa, que pasó estos treinta meses en Madrid cuidando nuestras dos hijas, en calidad migratoria de “familiar de estudiante”. Si alguien ha hecho un auténtico sacrificio durante este tiempo y de verdad merece una recompensa, es ella.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<i>Técnica quirúrgica.....</i>	18
<i>Procedimiento experimental.....</i>	18
<i>Protocolo experimental.....</i>	19
<i>Análisis estadístico.....</i>	23
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>69</b>

# **INTRODUCCIÓN**

La isquemia mesentérica es una enfermedad poco frecuente, siendo el 0.1% de todas las admisiones hospitalarias, pero se asocia con mortalidades entre el 60 y el 100%. Fue primero descrita por Antonio Hodgson hacia el final del siglo XV, pero no suscitó gran interés médico hasta la mitad del siglo XIX (Yasuhara, 2005; Chang *et al*, 2006). La isquemia mesentérica es causada por la disminución de flujo sanguíneo al intestino, que induce daños a nivel celular con el desarrollo de daño en la mucosa, necrosis tisular y acidosis metabólica.

Los factores de riesgo para desarrollar isquemia mesentérica incluyen la aterosclerosis, arritmias, hipovolemia, falla cardíaca congestiva, infarto del miocardio, enfermedad valvular, edad avanzada, y tumores intra-abdominales. Su etiología puede dividirse en causas agudas ó crónicas, y obstructivas ó no obstructivas. Las agudas oclusivas son dos: el embolismo, usualmente de la arteria mesentérica superior debido al ángulo de su origen aórtico, dando cuenta del 50% de todos los casos de isquemia mesentérica, y la trombosis, que típicamente ocurre en el origen arterial, por lo que la oclusión afecta a más estructuras (Yasuhara, 2005; Bingol *et al*, 2004).

La isquemia mesentérica aguda no oclusiva puede ocurrir sin anormalidad arterial o venosa, aunque suele darse en pacientes con algún grado de aterosclerosis mesentérica, en los que se agrega una fuerza externa compresiva, como una masa intra-abdominal, o en los que se agrega un vasoespasmo secundario a estados transitorios asociados a la práctica de deportes extremos (Bonilla *et al*, 2005) o secundario a estados de bajo flujo durante un *shock* (American Gastroenterological Association Medical Position Statement, 2000; Chang *et al*, 2006). Los estados de bajo flujo suelen estar acompañados de vasodilatación periférica y cortocircuito (*shunt*) sanguíneo del intestino hacia otros órganos. De los pacientes con isquemia mesentérica aguda, 20-30% tienen un problema no oclusivo (Bingol *et al*, 2004).

La isquemia mesentérica crónica, usualmente aterosclerótica, puede ser precursora de cualquiera de las citadas condiciones. Cualquier incremento en la demanda al intestino (particularmente durante la digestión) o disminución del aporte sanguíneo (como la hipovolemia) puede desencadenar un infarto intestinal. Por tanto, los factores de riesgo para la aterosclerosis son pertinentes para el desarrollo de la isquemia mesentérica crónica e, indirectamente, de la aguda.

#### Fisiopatología de la isquemia mesentérica

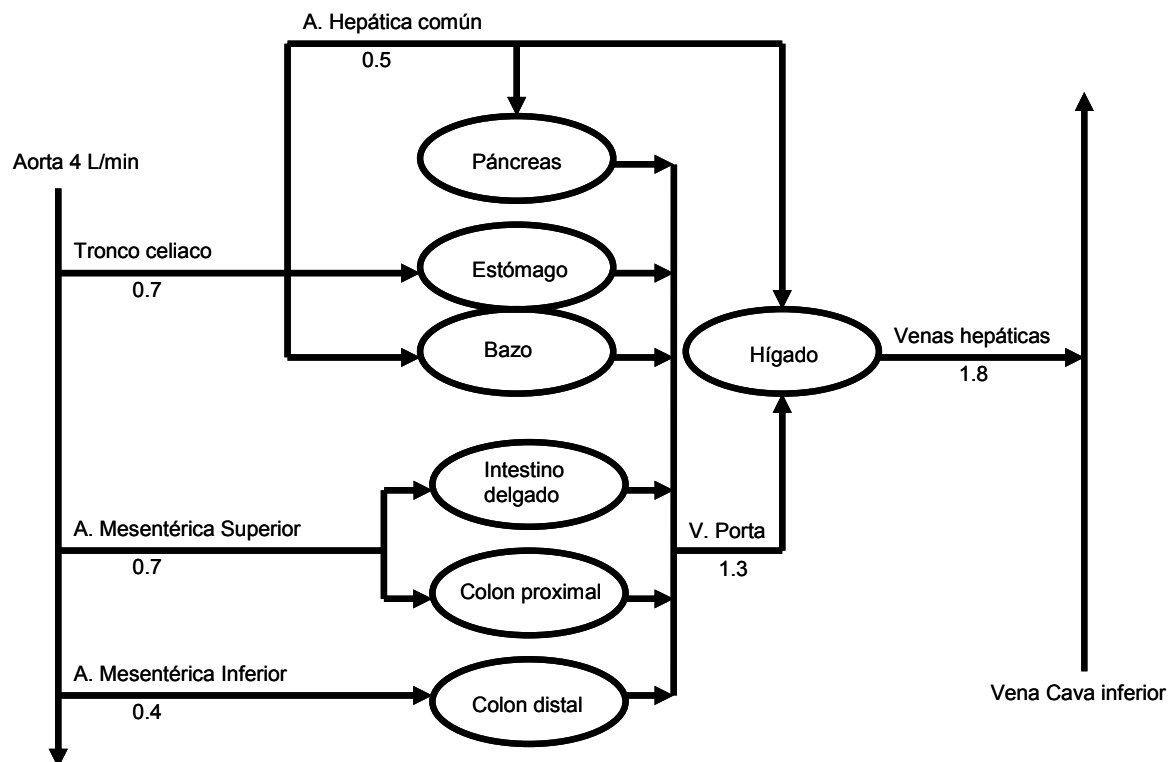
Cualquiera que sea la causa, el resultado es la disminución de flujo sanguíneo al intestino, que puede llegar a la isquemia. Ésta puede inducir en el intestino la pérdida de su función de barrera, permitiendo la translocación de productos bacterianos a la circulación, lo que a su vez puede desencadenar un choque séptico y una consecuente falla multiorgánica fatal.

Pero otra vía para llegar a esta falla multiorgánica es la disfunción endotelial (Cerqueira *et al*, 2005) que puede ser causada por la isquemia/reperfusión tanto localmente, en la arteria que nutre al intestino, como también de manera concomitante en territorios alejados del área afectada. Por ejemplo, se ha encontrado que la isquemia/reperfusión de la arteria cerebral media de la rata afecta la vasodilatación dependiente de endotelio en la arteria mesentérica superior (Martinez-Revelles *et al*, 2008). Esta disfunción endotelial podría ser la causa de la vasodilatación periférica que acompaña a los estados de bajo flujo, así como del cortocircuito sanguíneo del intestino hacia otros órganos.

La circulación esplácnica es la parte de la circulación sistémica que irriga la porción abdominal del tubo digestivo, así como el bazo, el páncreas y el hígado. Es la circulación regional más grande nacida de la aorta y recibe más de una cuarta parte del gasto ventricular izquierdo durante el reposo, independientemente de que el sujeto esté recién alimentado o no (Marston *et al*, 1985). Este volumen equivale a unas diez veces el flujo sanguíneo que recibe toda la masa muscular esquelética en reposo, cifra enorme si se tiene en



cuenta que esta masa tiene el mayor lecho vascular del cuerpo humano. Ese gran tamaño determina que la circulación esplácnica sea el más importante reservorio de sangre de todo el cuerpo. La circulación esplácnica (Figura 1) deriva principalmente de tres arterias que se originan en la aorta abdominal: el tronco celiaco, la arteria mesentérica superior y la arteria mesentérica inferior. Tiene además una circulación colateral importante y diversos arcos anastomóticos. El flujo sanguíneo esplácnico tiene normalmente un rango entre 10-40% del gasto cardiaco, según el estado del paciente. Esta amplia variación del flujo a través del sistema mesentérico es causado por mecanismos de control tanto locales como regionales, que dependen directa o indirectamente del endotelio.



**Figura 1:** Esquema representativo de la circulación esplácnica humana. El número anotado bajo un vaso sanguíneo es su flujo medido en litros por minuto (adaptado de Narváez-Sánchez *et al*, 2004)

### El endotelio

El endotelio es la monocapa celular que tapiza el interior de los vasos sanguíneos y el corazón. Estas células forman el órgano más grande del cuerpo humano, que tiene gran actividad paracrina, endocrina y autocrina (Hadi *et al*, 2005) en respuesta a estímulos físicos y químicos. El endotelio responde a estos estímulos produciendo, entre otras, sustancias vasoactivas relajadoras (principalmente óxido nítrico, prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio) o constrictoras (principalmente endotelina-1 y tromboxano A<sub>2</sub>), que regulan el tono y la permeabilidad vascular, la hemostasia, la angiogénesis y la inflamación (Pacher *et al*, 2007). A continuación detallaremos estas sustancias vasoactivas endoteliales.

El óxido nítrico es el producto endotelial que tiene el papel más destacado en condiciones normales en todos los lechos vasculares, incluida la circulación esplácnica (Alexander, 1998; Bauer *et al*, 1997). El óxido nítrico actúa activando la enzima guanilato ciclasa para formar GMPc. El GMPc activa a su vez la proteína-quinasa G y los canales iónicos GMPc-regulados. El resultado total es una disminución de la concentración de calcio citoplasmático y por ende la relajación del músculo liso vascular, produciendo vasodilatación. El óxido nítrico es sintetizado por la óxido nítrico sintasa a partir de la arginina, y se puede inhibir competitivamente su formación aplicando al tejido análogos de este aminoácido, como el N $\omega$ -nitro-L-arginina-metil-ester, L-NAME (Rees *et al*, 1990). Ver Figura 2.

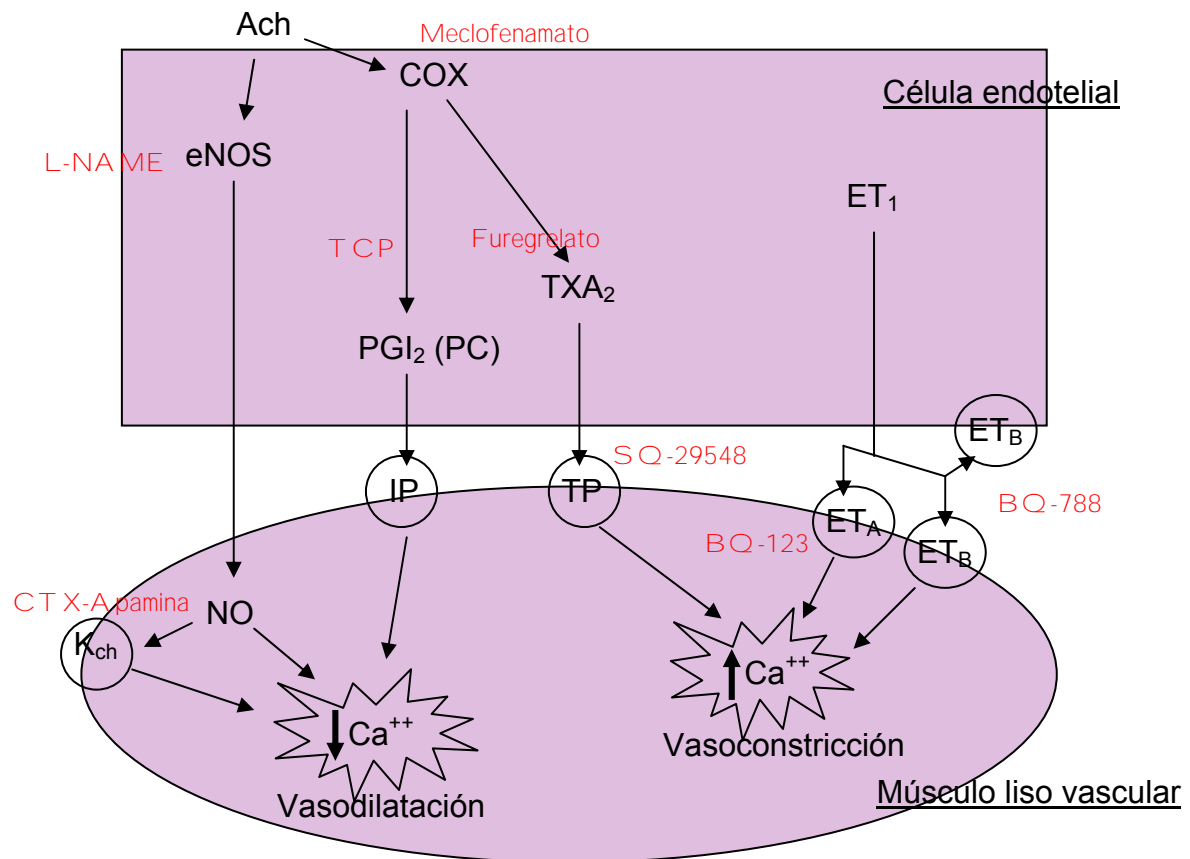
Entre los canales iónicos regulados por el GMPc están los canales de potasio, que son el tipo de canal iónico más ampliamente distribuido en los organismos vivos. Hay varios tipos de canales de potasio; de estos, los dependientes de calcio son los más importantes para la vasodilatación dependiente de endotelio, pues contribuyen a regular el calcio citoplasmático y por tanto a la contracción o relajación muscular. Los canales de alta conductancia dependientes de calcio se pueden bloquear con apamina, y los de baja conductancia se pueden bloquear con caribdotoxina (Simonsen *et al*, 1995). Ver Figura 2.

El factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) es un compuesto desconocido, secretado por el endotelio, que causa vasodilatación independiente del óxido nítrico y de la prostaciclina, actuando mediante apertura de los canales de potasio y por tanto induciendo hiperpolarización del músculo liso vascular. Entre los candidatos a ser el EDHF están los iones potasio, los ácidos epoxieicosatrienoicos, las uniones estrechas endotelio-músculo liso, o el peróxido de hidrogeno, aunque también se ha propuesto que la función del EDHF es resultado de la acción conjunta de varios de los citados compuestos (Krause, 2002). Cabe resaltar que se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno es un EDHF en arterias mesentéricas humanas y porcinas, así como en coronarias de perros, y que se ha propuesto como EDHF en coronarias humanas (Matoba *et al*, 2002) y en arteriolas piales del cerdo pigmeo (Shimokawa y Morikawa, 2005). Además, se ha descrito que la enzima superóxido dismutasa endotelial desempeña un papel en la síntesis del peróxido de hidrógeno, funcionando como una “sintasa de EDHF” en arterias mesentéricas de humanos y de ratones (Morikawa *et al*, 2004). La mayoría de los estudios que examinan la importancia funcional del EDHF usan la combinación caribdotoxina-apamina para inhibir selectivamente la hiperpolarización y vasodilatación que éste induce (Sánchez *et al*, 2006). Cada uno de estos bloqueantes por separado no inhibe completamente la apertura del canal.

Los prostanoides son una subclase de los eicosanoides, formados por acción de la enzima ciclooxigenasa sobre el ácido araquidónico. Los prostanoides pueden ser vasodilatadores, de los cuales el más importante es la prostaciclina, o vasoconstrictores, de los cuales el más importante es el tromboxano A<sub>2</sub>. La ciclooxigenasa es bloqueada por los antiinflamatorios no esteroideos como el meclofenamato. La prostaciclina es bloqueada en su síntesis por la tranilcipromina (Clark y Harrington, 1982). El tromboxano A<sub>2</sub> es bloqueado en su síntesis por el furegrelato (Johnson *et al*, 1986). El receptor del tromboxano A<sub>2</sub>, llamado receptor TP, es bloqueado por el compuesto SQ-29548 (Ogletree *et al*, 1985). Ver Figura 2.

Las endotelinas son una familia de péptidos derivados del endotelio, de 21 aminoácidos cada uno, llamados endotelina-1, endotelina-2, y endotelina-3. La endotelina-1 fue la primera identificada, en 1988, y es la que tiene el mayor significado fisiológico (Yanagisawa *et al*, 1988; Agapitov y Haynes, 2002) con potentes propiedades vasoconstrictoras y proliferativas. El receptor de la endotelina-1 tiene dos subtipos, conocidos como ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. El ET<sub>A</sub> se localiza principalmente en el músculo liso vascular y es responsable de la vasoconstricción y la proliferación de este tipo de célula. El ET<sub>B</sub> está presente de manera predominante en las células endoteliales y media la vasodilatación a través de la liberación de óxido nítrico y prostaciclina. En algunos lechos vasculares se ha identificado que el receptor ET<sub>B</sub> también puede estar presente en el músculo liso, donde media la vasoconstricción, motivo por el que la acción total de la endotelina-1 es de predominio constrictor (Mickley *et al*, 1997; Salcedo *et al*, 2008). El sistema de endotelina-1 es activado en diferentes enfermedades cardiovasculares y se asocia con cambios vasculares funcionales y estructurales, incluyendo hipertensión y falla cardíaca. Existen en la actualidad antagonistas selectivos o no selectivos de los receptores de la endotelina-1, ya que estudios con modelos animales y ensayos preclínicos han aportado fuerte evidencia de que estos antagonistas son efectivos en el tratamiento de la falla cardíaca, la hipertensión esencial o pulmonar, y la aterosclerosis (Witzigmann *et al*, 2003; Schoots *et al*, 2005). Sin embargo, la biología de los efectos mediados por los dos diferentes receptores es compleja, pues además de la selectividad y potencia de los subtipos de receptor, se han encontrado cambios en la distribución de cada subtipo bajo diferentes condiciones patológicas y en diferentes grupos de pacientes (Inoue *et al*, 1989; Dagassan *et al*, 1996; Witzigmann *et al*, 2003).

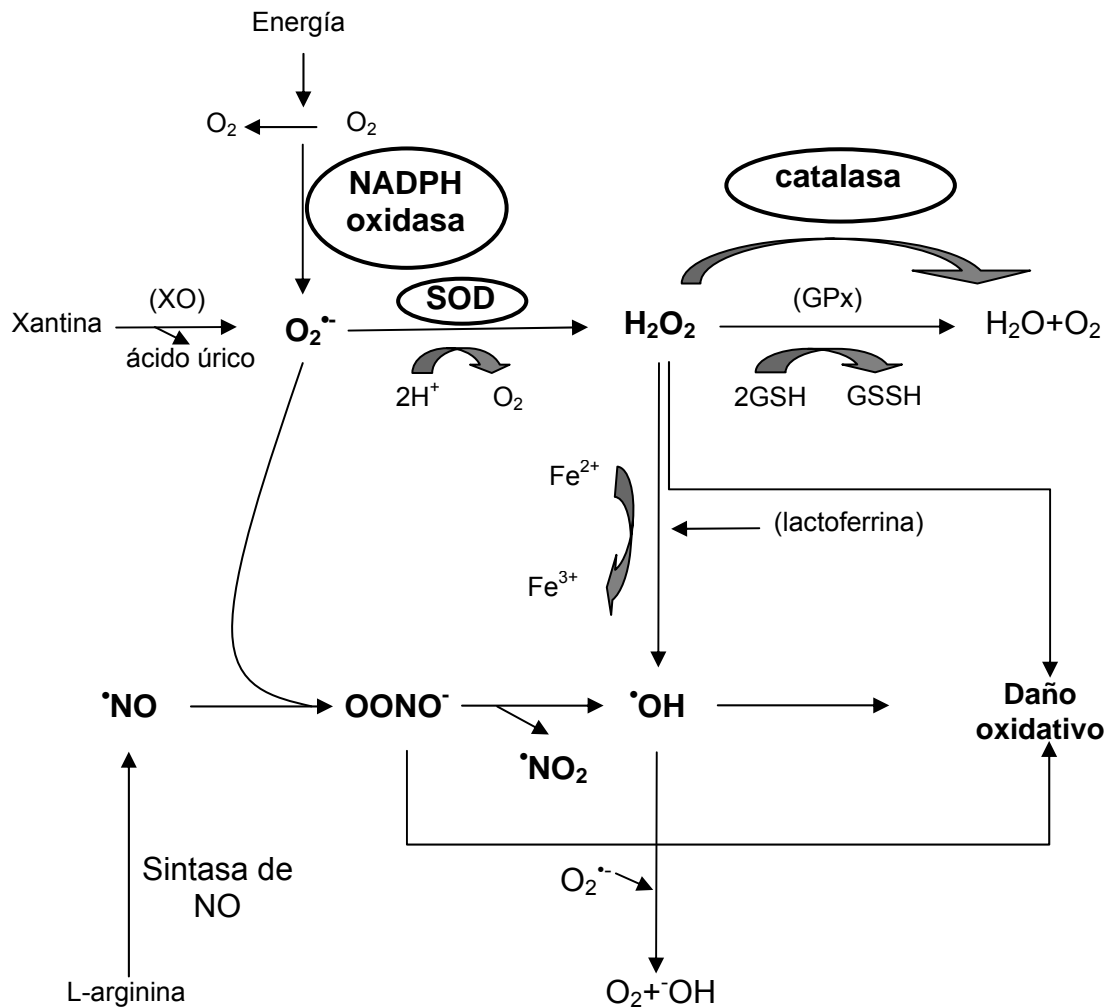
El receptor ET<sub>A</sub> de la endotelina puede ser bloqueado por la sustancia BQ-123, y el ET<sub>B</sub> puede bloquearse con la sustancia BQ-788 (Fukuroda *et al*, 1994). Ver Figura 2.



**Figura 2:** Esquema representativo de las vías descritas y de los bloqueantes usados en el presente trabajo. Ach: acetilcolina; eNOS: sintasa del óxido nítrico; NO: óxido nítrico; K<sup>ch</sup>: canales de potasio; COX: ciclooxigenasa; TCP: tranilcipromina; PGI<sub>2</sub> (PC): prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina); IP: receptor IP de la prostaciclina; TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>; TP: receptor TP del tromboxano A<sub>2</sub>; ET<sub>1</sub>: endotelina-1; ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub>: receptores de la endotelina.

Las especies reactivas del oxígeno son iones o moléculas altamente reactivas, debido a que tienen electrones no apareados en su capa de valencia. Clásicamente se ha explicado que la producción de especies reactivas de oxígeno sucede en los tejidos durante la reperfusión sanguínea, debido a la re-exposición del tejido isquémico al oxígeno molecular (Zweier *et al*, 1994; Kim *et al*, 1998; Bauer *et al*, 2002). De estas especies, las más involucradas en la disfunción endotelial por isquemia/reperfusión son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Kim *et al*, 1998; Li y Jackson, 2002; Pearlstein *et al*, 2002), cuya formación se puede ver en la Figura 3. El anión

superóxido puede inactivar al óxido nítrico, y ha sido involucrado en el estrés oxidativo inductor de disfunción endotelial (Sanchez *et al*, 2006; Martinez-Revelles *et al*, 2008). La acción de algunas enzimas puede proteger el tejido contra el estrés oxidativo. Así, la enzima superóxido dismutasa destruye al anión superóxido, produciendo peróxido de hidrogeno, que a su vez, por la reacción de Fenton, puede ser convertido en radical hidroxilo. Por su parte, la enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, minimizando los efectos lesivos de sus derivados (acerca de la superóxido dismutasa, ver Salvemini y Cuzzocrea, 2003; Bertuglia y Giusti, 2003; Nakae *et al*, 2003. Acerca de la catalasa, ver Christofidou-Solomidou *et al*, 2003; Kozower *et al*, 2003).



**Figura 3:** Esquema que muestra las reacciones implicadas en la formación de especies reactivas de oxígeno. Enzimas: XO: Xantina oxidasa. SOD: Superóxido dismutasa. GPx: Glutatión peroxidasa. Radicales:  $O_2^{\bullet-}$ : superóxido.  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno.  $\bullet NO$ : óxido nítrico.  $OONO^{\bullet}$ : Peroxinitrito.  $\bullet OH$ : hidroxilo.

### Disfunción endotelial

La disfunción endotelial sucede cuando se rompe el balance entre la estimulación y la inhibición de la agregación plaquetaria, de la trombogénesis y la fibrinólisis, de la proliferación y migración del músculo liso vascular, y/o de la vasoconstricción y la vasodilatación. La disfunción endotelial se asocia con enfermedades como hipertensión arterial (Taddei y Salvetti, 2002), preeclampsia (Page, 2002), diabetes (Makimattila e Yki-Jarvinen, 2002),

aterosclerosis (Anderson, 2003), insuficiencia cardiaca (Linke *et al*, 2003), coronariopatía (Schachinger *et al*, 2000) y condiciones clínicas relacionadas con la isquemia/reperfusión (Sotníkova *et al*, 1998; Pagliaro *et al*, 2003). En estas enfermedades, y particularmente en la isquemia/reperfusión, la disfunción endotelial está relacionada con la formación local de especies reactivas de oxígeno en la vecindad del endotelio (Pacher *et al*, 2007).

El sello identificador de la disfunción endotelial es la disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio, aunque también puede determinarse por un aumento de la producción (o de la respuesta) a la endotelina-1 (Endemann y Schiffrin, 2004). Tales cambios en las respuestas dilatadora o contráctil suelen ser el primer signo de eventos cardiovasculares adversos y pueden predecir la evolución del paciente a largo plazo (Schachinger *et al*, 2000; Perticone *et al*, 2001). Por consiguiente, una manera frecuente de evaluar la disfunción endotelial es analizando la vasodilatación dependiente de endotelio inducida con acetilcolina, que se suele comparar con la relajación no dependiente del endotelio inducida con nitroprusiato sódico (Erbs *et al*, 2003). También se puede medir la respuesta del vaso sanguíneo a la administración exógena de endotelina-1, bloqueando alternativamente sus receptores para determinar cuál de ellos está implicado en la respuesta alterada (Fukuroda *et al*, 1994; Ferrero *et al*, 2008).

En diversos lechos arteriales se ha encontrado que la reperfusión acentúa la lesión vascular que tiene lugar durante la isquemia. Por ejemplo, Tsao y Hayward, en modelos experimentales diferentes, no encontraron alteración de la respuesta vascular en coronarias de gato ni en mesentéricas de rata con isquemias de 90 o 120 minutos de duración, pero sí que la reactividad vascular a la acetilcolina se atenúa apenas 2.5 minutos luego de iniciar la reperfusión (Tsao *et al*, 1990; Hayward y Lefer, 1998). Asimismo, Sotníkova encontró que la oclusión parcial de la aorta abdominal de ratas durante 18 horas no cambió la respuesta vascular aórtica significativamente, pero cuando tal isquemia es



seguida por una reperfusión de 30 minutos, la vasodilatación dependiente de endotelio disminuye (Sotníkova *et al*, 1998).

Para reproducir la isquemia/reperfusión en el laboratorio, se suele realizar pinzamiento y posterior liberación de una arteria accesible al procedimiento, en un modelo animal que sea fuerte y relativamente fácil de manejar. Por este motivo, los roedores se han usado extensamente como modelo para estudiar la isquemia/reperfusión. En estos y en otros modelos animales, los vasos sanguíneos más estudiados en isquemia/reperfusión son la arteria cerebral media (Martinez-Revelles *et al*, 2008; Sanchez *et al*, 2006; Salcedo *et al*, 2008) y la coronaria (Garcia-Villalon *et al*, 2009; Townsend *et al*, 2007), y un poco menos la aorta (Sotníkova *et al*, 1998; Nakae *et al*, 2003) y la mesentérica superior (Koksoy *et al*, 2000; Bruce *et al*, 2004). En la tabla 1 se da información de algunos tiempos usados por investigadores de la isquemia/reperfusión en la arteria mesentérica superior de los roedores.

**Tabla 1:** Tiempos de isquemia y reperfusión mesentérica, inducidos mediante pinzamiento arterial, usados por diversos autores en roedores. (Sobrevida=el animal no fue sacrificado el mismo día del pinzamiento).

Isquemia	Reperfusión	Autor, año
30 min	60 min	Haklar, 1998; Banda, 1997; Chen, 2000
30 ó 120 min	30 ó 120 min	Souza, 2002
45 min	90 min	Rosario, 2004
45 min	Sobrevida	Masini, 2006
45 min	90 min ó supervida	Squadrito 1994, 1995
60 min	120 min	Koksoy, 2000
90 min	Sobrevida	Higuchi, 2008
18 horas	30 min	Sotníkova, 1998

La justificación del presente trabajo radica en que, aunque mucho se ha escrito acerca de la isquemia/reperfusión mesentérica y sus consecuencias en el tejido intestinal, es insuficiente lo que se ha investigado acerca de los efectos que tiene el evento isquémico en la disfunción endotelial de la arteria mesentérica superior. De hecho, aún no se conocen bien los detalles de la disfunción endotelial ni los mecanismos implicados en ella (Bruce *et al*, 2004). Es importante aumentar nuestro conocimiento acerca de la disfunción endotelial

en los diferentes territorios vasculares, y por lo expuesto hasta ahora, consideramos de particular interés el territorio mesentérico.

Por otra parte, es factible que los largos tiempos de isquemia/reperfusión usados por muchos investigadores dejen escapar información valiosa acerca de lo que sucede con los mecanismos vasculares en fases relativamente tempranas de la isquemia/reperfusión, donde una intervención diagnóstica o terapéutica probablemente reduciría la morbimortalidad. Además, entre las opciones de tratamiento de la isquemia mesentérica aguda y crónica, se han propuesto técnicas quirúrgicas de reimplantación de vasos mesentéricos en la aorta adyacente a las arterias obstruidas y la colocación de injertos venosos o protésicos (Bingol *et al*, 2004; Schoots *et al*, 2005). Por tanto, es relevante conocer lo que sucede en instantes relativamente tempranos de la isquemia/reperfusión, porque esto puede ayudar a los cirujanos a conocer mejor cuándo la arteria está en condiciones para un eventual trasplante.

Por lo enumerado, creemos necesario profundizar en el conocimiento de la disfunción endotelial para comprender mejor la fisiopatología de la isquemia/reperfusión mesentérica, en aras de contribuir a lograr mejores herramientas diagnósticas y terapéuticas de esta patología en salas de urgencias, cirugía y cuidados intensivos, posibilitando una actuación más temprana y disminuyendo la mortalidad.

## **OBJETIVOS**

La isquemia/reperfusión mesentérica es una situación clínica relacionada con elevada mortalidad, y que se puede reproducir en el laboratorio. Su estudio es un tema actual e interesante para la investigación básica y clínica.

Nuestra hipótesis es que la isquemia/reperfusión mesentérica produce disfunción endotelial alterando los mecanismos de la vasodilatación y de la vasoconstricción dependientes del endotelio en la arteria mesentérica. Para estudiar esta hipótesis, nos propusimos analizar el estado funcional del endotelio de esta arteria en ratas sometidas a isquemia/reperfusión por pinzamiento de la arteria mesentérica superior durante 60 minutos y posterior liberación por otros 60 minutos, examinando la vasoconstricción inducida con endotelina-1, la vasodilatación dependiente de endotelio con acetilcolina y la vasodilatación no dependiente de endotelio con nitroprusiato sódico, en presencia o ausencia de bloqueantes de la formación o acción del óxido nítrico, de la endotelina, de los prostanoïdes, de los canales de potasio y de las especies reactivas del oxígeno.

Este estudio ha sido hecho con la idea de contribuir al conocimiento de la fisiopatología de la isquemia/reperfusión vascular, para aportar a un mejor diagnóstico y tratamiento de la isquemia/reperfusión mesentérica y disminuir la elevada morbimortalidad que se le asocia.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

Los estudios fueron realizados de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los NIH de EUA. Se usaron ratas Sprague-Dawley macho adultas sanas, mantenidas bajo condiciones estándar en el animalario de la UAM. Los animales fueron divididos en dos grupos: un grupo experimental en el que se indujo isquemia/reperfusión de la arteria mesentérica superior por pinzamiento y posterior liberación de dicha arteria, y otro grupo en el que los animales fueron sometidos a operación simulada (*sham*).

### ***Técnica quirúrgica***

Cada rata fue anestesiada con pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/Kg, más un 25% de esta dosis para mantenimiento en caso necesario). Luego el animal se colocó sobre una cama térmica termostaticada (modelo RTC1, Cibertec, Madrid) a 37.5 °C y se dejó respirando aire ambiental. Por incisión abdominal media se expuso el plastrón intestinal para colocar una pinza atraumática cerca al origen de la arteria mesentérica superior. Luego se repuso el plastrón entre la cavidad abdominal y se cubrió la herida con Parafilm (American National Can, Chicago). Luego de 60 minutos se retiró la pinza y se verificó bajo microscopio el retorno de la palpitación en el área intestinal. En el grupo *sham* se realizó idéntico procedimiento, pero sin pinzar la arteria sino un borde de la herida. Al terminar la isquemia/reperfusión real o simulada, el animal fue sacrificado por decapitación y se le extrajo la arteria mesentérica superior, colocándola en una caja de Petri con solución salina, sobre hielo (aprox. 4 °C). Mientras estaba entre este salino frío, la arteria fue liberada de tejido conectivo perivascular y luego cortada en segmentos cilíndricos, cada uno de 1.5 mm de largo y 0.4 mm de diámetro interno promedio.

### ***Procedimiento experimental***

Cada segmento arterial, experimental o *sham*, se montó en un sistema para registro de tensión isométrica dentro de un baño de órganos aislados que puede verse en la Figura 4. La preparación experimental consiste en pasar a través de la luz vascular dos alambres rígidos de tungsteno de 70 µm de

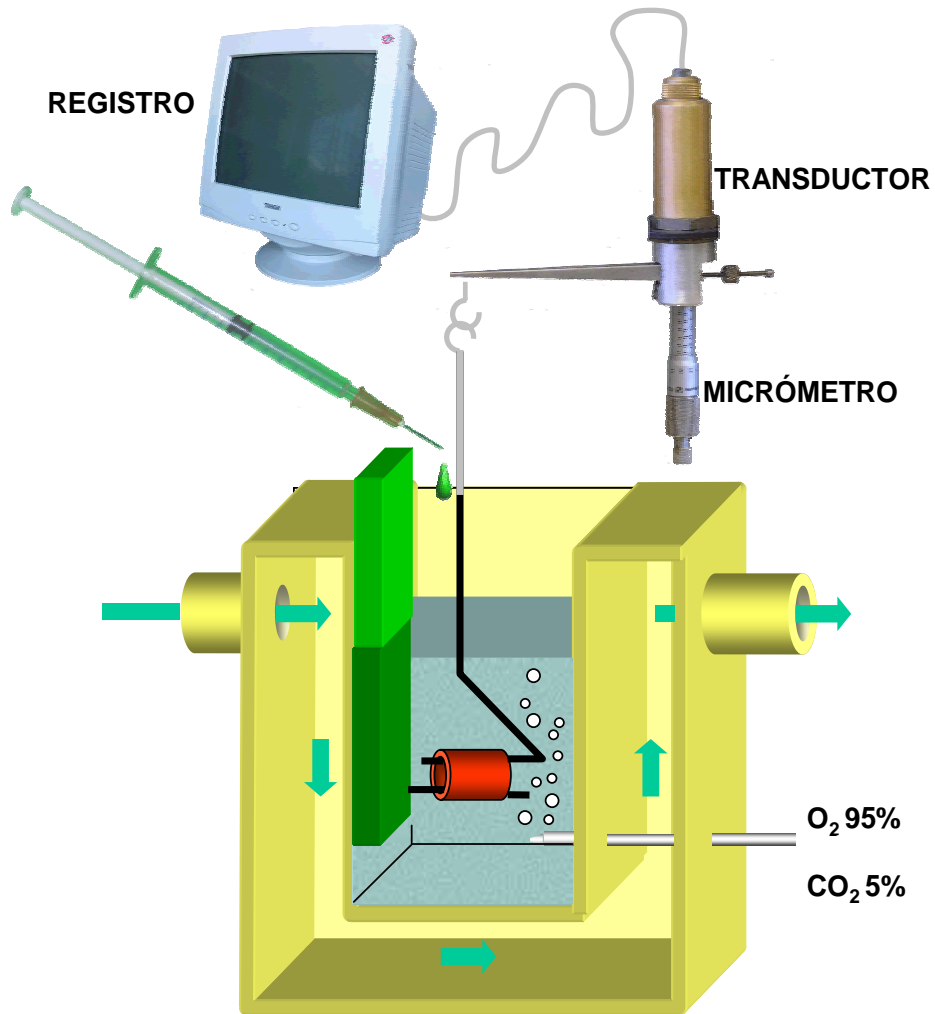
diámetro cada uno. Uno de los alambres queda fijo en un soporte mientras que el otro alambre, móvil y paralelo al anterior, se conecta a un transductor de fuerza (Statham Microscale UL5, New Jersey). Un tornillo micrométrico conectado al alambre móvil permite desplazar este alambre en paralelo al eje mayor del segmento arterial para aplicar una tensión pasiva de 1 g a la pared arterial. Esta tensión se aplica distendiendo repetidamente la pared arterial alejando los alambres mediante el tornillo micrométrico, durante aproximadamente 60 minutos, hasta que el segmento arterial no se relaja más (es decir, cuando la pendiente de relajación pasiva es cero durante al menos diez minutos). Esta tensión pasiva de 1 g se había determinado previamente en nuestro laboratorio como óptima para las respuestas de vasoconstricción y vasodilatación en la arteria mesentérica superior de la rata.

Dentro del baño de órganos, cada segmento vascular queda sumergido en 4 ml de solución de Krebs-Henseleit, cuya composición es la siguiente: NaCl, 115 mM; KCl, 4.6 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1.2 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 2.5 mM;  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM y glucosa, 11.1 mM. Esta solución se burbujea con carbógeno (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono). Un circuito de agua caliente rodea al baño para mantener los segmentos vasculares entre el Krebs a temperatura constante de  $37 \pm 0,5$  °C. El registro de la tensión se realiza en un ordenador con el sistema de adquisición de datos PowerLab (ADI Instruments, Australia) usando el programa Chart v 5.0.

### ***Protocolo experimental***

Cuando las arterias se estabilizaron a la tensión pasiva de 1 g, se probó su estado funcional registrando la contracción ante el KCl (100 mM). Una vez alcanzada la contracción máxima al KCl, se realizaron repetidos lavados con solución de Krebs conservada a igual temperatura y burbujeo. Si algún segmento respondía al KCl menos de 20% de la respuesta promedio, fue cambiado por otro segmento o no fue tenido en cuenta para la estadística.





**Figura 4:** Esquema de un segmento arterial (cilindro rojo) montado en un baño

Estudio de relajación: Para estudiar la relajación dependiente de endotelio (inducida con acetilcolina) e independiente de endotelio (inducida con nitroprusiato sódico), se indujo primero un tono activo en la arteria aplicando al baño de órganos el U46619, análogo del tromboxano A<sub>2</sub>, en concentración  $10^{-7}$  M. Cuando esta contracción activa se estabilizó, se administraron dosis crecientes acumulativas de acetilcolina entre  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M y se registró la curva de relajación obtenida. La dosis menor se aplicó con la arteria en la máxima tensión activa, y las subsiguientes cuando se estabilizaba la relajación

alcanzada con cada dosis (pendiente cero en la curva de relajación durante cinco minutos), hasta que no se logró más relajación. Una vez registrada esta curva se lavó la arteria exhaustivamente con solución de Krebs, se volvió a contraer con U46619 y cuando se estabilizó en esta nueva contracción se registró la relajación inducida con nitroprusiato sódico en dosis crecientes acumulativas desde  $10^{-8}$  hasta  $10^{-4}$  M. Algunas arterias fueron relajadas únicamente con nitroprusiato sódico para comprobar que no había cambios en el comportamiento de la arteria si se había relajado primero con acetilcolina y luego con nitroprusiato, respecto a si se relajaba sólo con nitroprusiato sódico.

Estudio de contracción: La respuesta contráctil fue estudiada aplicando al baño de órganos endotelina-1 en concentraciones progresivas acumulativas desde  $3 \times 10^{-10}$  hasta  $3 \times 10^{-6}$  M. La dosis menor se aplicó con la arteria en tensión pasiva, y las subsiguientes cuando se estabilizaba la contracción alcanzada con cada dosis (pendiente cero en la curva de contracción durante cinco minutos), hasta que no se logró más contracción.

Aplicación de tratamientos: También se estudió la contracción por endotelina y la relajación por acetilcolina y por nitroprusiato en arterias tratadas con bloqueantes (ver Figura 3) y se comparó su respuesta con la obtenida de arterias no tratadas. Los tratamientos y dosis utilizados fueron los siguientes (las concentraciones se expresan en moles por litro y representan la concentración final en el baño de órganos):

- Nw-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME,  $10^{-4}$  M): Inhibidor la síntesis del NO;
- Caribdotoxina + apamina (CTX  $10^{-7}$  M + Apamina  $10^{-6}$  M): Bloqueantes de los canales de potasio de baja y de alta conductancia, respectivamente;
- Meclofenamato ( $10^{-5}$  M): Inhibidor de la COX, bloqueando la síntesis de prostanoides;
- Catalasa (1000 U/mL): Catalizador de la reacción  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

- Dietil-ditio-carbamato (DETCA,  $10^{-3}$  M): Inhibidor de la superóxido dismutasa (la enzima que cataliza la reacción  $O_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2$ );

En los estudios de contracción se usaron también los bloqueantes:

- BQ-123 ( $10^{-5}$  M): Antagonista específico del receptor A de la endotelina;
- BQ-788 ( $10^{-5}$  M): Antagonista específico del receptor B de la endotelina;
- Furegrelato ( $10^{-6}$  M): Inhibidor de la síntesis del tromboxano A<sub>2</sub>;
- SQ-29548 ( $10^{-5}$  M): Antagonista específico del receptor del tromboxano A<sub>2</sub>;
- Tranilcipromina (TCP,  $10^{-5}$  M): Inhibidor de la síntesis de prostaciclina.

Cada arteria se dejó incubando con su respectivo tratamiento por lo menos durante 25 minutos, excepto con catalasa, que se dejó al menos 60 minutos (se asume que tiene baja difusibilidad). Las soluciones de cada fármaco se prepararon inmediatamente antes de cada experimento, en suero salino fisiológico con 0,01% de ácido ascórbico para evitar la oxidación del fármaco. En ningún caso el volumen total añadido al baño de órganos fue superior al 10% del volumen inicial del mismo.

Proveedores utilizados: De laboratorios SIGMA: clorhidrato de acetilcolina; Nitroprusiato Sódico (NPS); N $\omega$ - nitro-L- arginina metil éster (L-NAME); 2[1,6-Dicloro-3-metilfenil-amino] sal de ácido benzóico (Meclofenamato); Catalasa; BQ-788; BQ-123; CTX-Apamina; Dietilditiocarbamato sódico (DETCA); 9,11-Dideoxy-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoxymetano prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (U46619), Tranilcipromina (TCP). De laboratorios MERCK: cloruro potásico (KCl). De Cayman Chemical, furegrelato.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.). La contracción producida por el cloruro potásico (KCl) y el análogo del tromboxano A<sub>2</sub> (U46619) es expresada en valores absolutos (mg). La contracción producida por la endotelina-1 se expresa en valores relativos (% del tono alcanzado con KCl). La relajación producida por la acetilcolina y el nitroprusiato sódico es expresada como porcentaje del tono alcanzado con el U46619. La pD<sub>2</sub>, logaritmo negativo de la concentración de relajante o constrictor que produce el 50% del efecto máximo, fue calculada por interpolación geométrica. La pD<sub>2</sub> nos muestra la sensibilidad vascular al relajante o constrictor aplicado.

La estadística se realizó con software Excel (Windows) y Graph Pad Prism v4. La comparación estadística de los resultados obtenidos en las arterias mesentéricas no tratadas, isquémicas vs. no isquémicas, fue realizada usando el test de la t de Student para datos no pareados. El efecto de los diferentes tratamientos en la respuesta arterial inducida con endotelina, acetilcolina o nitroprusiato sódico fue evaluado aplicando el ANOVA factorial de una vía seguido del test de Dunnett para comparar todos los grupos de arterias vs. el grupo de arterias sanas no tratadas (arterias controles), o el de Bonferroni para comparar entre sí los grupos que recibieron un mismo tratamiento. En todos los casos, P<0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

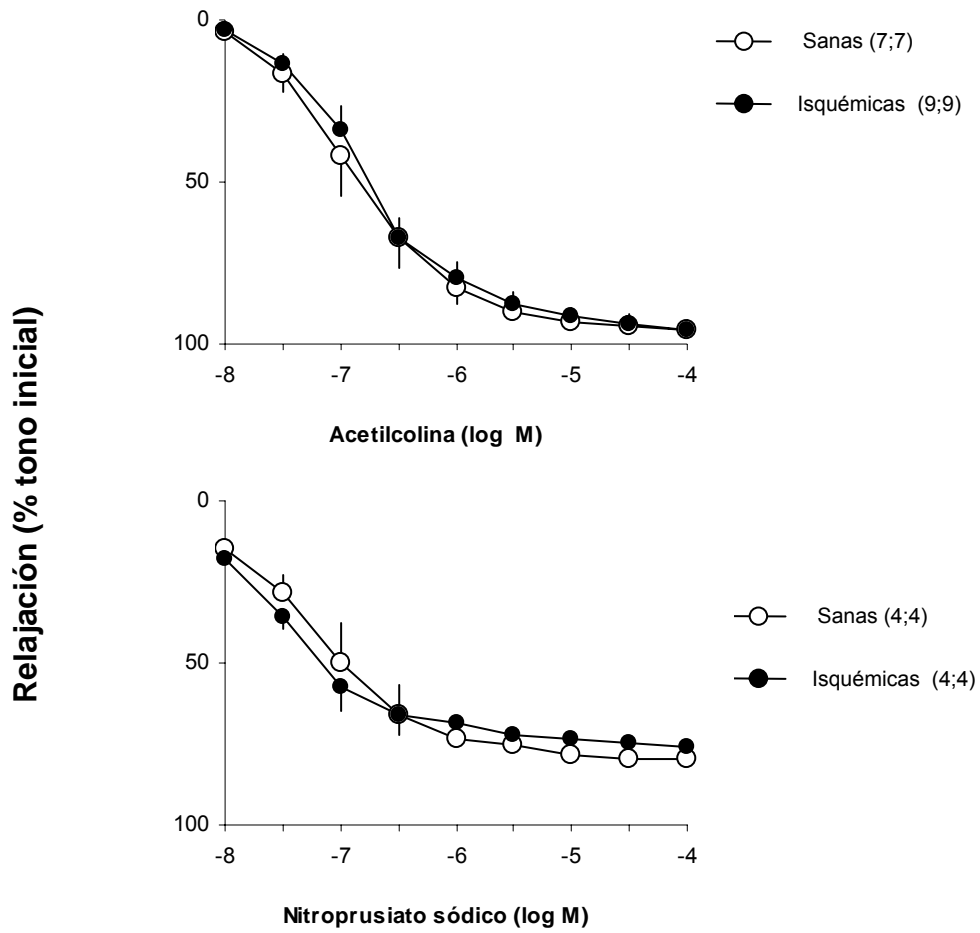
# **RESULTADOS**

### Inspección macroscópica:

En este estudio se utilizaron dos grupos de ratas: 15 ratas fueron sometidas a 60 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión, y otras 14 ratas fueron sometidas a una intervención simulada (*sham*). No hubo mortalidad en ninguno de los dos grupos. El intestino de las ratas sometidas a isquemia se tornó violáceo y fétido, fenómenos que no se observaron en los individuos *sham*. En las arterias isquémicas era más fácil retirar el tejido conectivo perivascular porque se tornaba friable. En la grasa periarterial más vascularizada de las arterias isquémicas llamaba la atención la presencia de muchos puntos violeta de 1 - 2 mm de diámetro (posibles infartos) que tendían a coalescer y que no aparecieron en las arterias controles.

### RESPUESTA ARTERIAL VASODILATADORA

Tanto la acetilcolina como el nitroprusiato administrados en dosis crecientes desde  $10^{-8}$  hasta  $10^{-4}$  M produjeron relajación arterial, cuya magnitud dependió de la concentración. La vasodilatación inducida por ambas sustancias fue igual en arterias no tratadas, sanas o isquémicas. (Figura 5; Tablas 2 y 3)



**Figura 5:** Relajación inducida con acetilcolina (**arriba**) y con nitroprusiato sódico (**abajo**), en arterias no tratadas, sanas e isquémicas, precontraídas con U46619  $10^{-7}$  M. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos)

**Tabla 2:** Valores de la relajación máxima (Em<sub>ax</sub>, porcentaje del tono alcanzado con U46619) y de la sensibilidad (pD<sub>2</sub>) obtenidas con **acetilcolina** en arteria mesentérica de rata. Los valores se expresan como media ± EEM. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos). \*\* P<0.01, entre arterias no isquémicas e isquémicas con igual tratamiento (test de Bonferroni). ° P<0.05. °° P<0.01 entre arterias tratadas y no tratadas (test de Dunnett)

	Sanas		Isquémicas	
	Em <sub>ax</sub>	pD <sub>2</sub>	Em <sub>ax</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>Sin tratamiento</b>	96±1	6.9±0.2 (7;7)	95±3	6.8±0.1 (9;9)
<b>L-NAME</b>	38±4 °°	6.3±0.1 ° (6;5)	20±4 °° **	5.8±0.2 °° (5;5)
<b>Meclofenamato</b>	101±1	6.9±0.1 (5;4)	74±2 ° **	6.4±0.1 (5;5)
<b>CTX-Apamina</b>	25±2 °°	6.4±0.2 (5;5)	43±4 °°	6.3±0.2 (5;5)
<b>Catalasa</b>	87±3 °	6.1±0.1 ° (8;7)	82±4 °	6.1±0.1 °° (8;8)
<b>DETCA</b>	80±4 °°	6.5±0.2 (7;7)	80±4	6.4±0.1 (7;7)

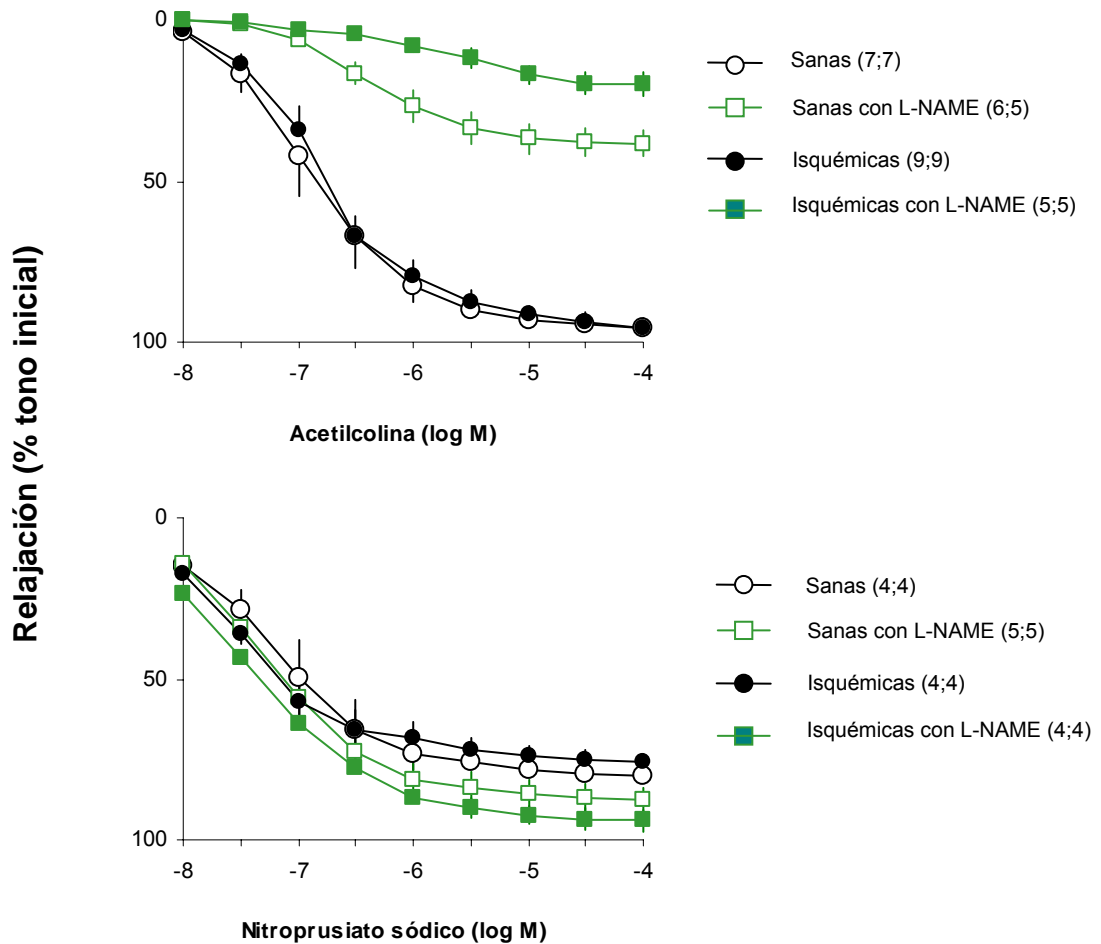


**Tabla 3:** Valores de la relajación máxima (Em<sub>ax</sub>, porcentaje del tono alcanzado con U46619) y de la sensibilidad (pD<sub>2</sub>) obtenidas con **nitroprusiato sódico** en arteria mesentérica de rata. Los valores se expresan como media ± EEM. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos). ° P<0.05. °° P<0.01 entre arterias tratadas y no tratadas (test de Dunnett).

	Sanas		Isquémicas	
	Em <sub>ax</sub>	pD <sub>2</sub>	Em <sub>ax</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>Sin tratamiento</b>	80±2	7.2±0.1 (4;4)	76±2	7.5±0.1 (4;4)
<b>L-NAME</b>	88±3	7.3±0.1 (5;5)	94±3 °°	7.4±0.1 (4;4)
<b>Meclofenamato</b>	93±2	7.3±0.1 (6;5)	91±3 °	7.5±0.1 (4;4)
<b>CTX-Apamina</b>	64±5	6.6±0.1 °° (6;5)	68±4	6.8±0.1 °° (4;4)
<b>Catalasa</b>	78±5	6.9±0.2 (4;4)	92±3 °°	7.2±0.1 (4;4)
<b>DETCA</b>	78±6	6.9±0.1 (4;4)	80±3	6.7±0.2 °° (4;4)

Efecto del L-NAME en la relajación inducida con acetilcolina: Las arterias isquémicas con inhibición de la síntesis de óxido nítrico alcanzaron un efecto máximo menor que las no tratadas ( $p < 0.001$ ) y que las arterias sanas con igual tratamiento ( $p < 0.01$ ). A su vez, las arterias sanas tratadas se relajaron menos que sus controles ( $p < 0.01$ ). La  $pD_2$  fue menor en arterias tratadas sanas ( $p < 0.05$ ) e isquémicas ( $p < 0.01$ ) que en sus respectivos controles. Tabla 2 y Figura 6.

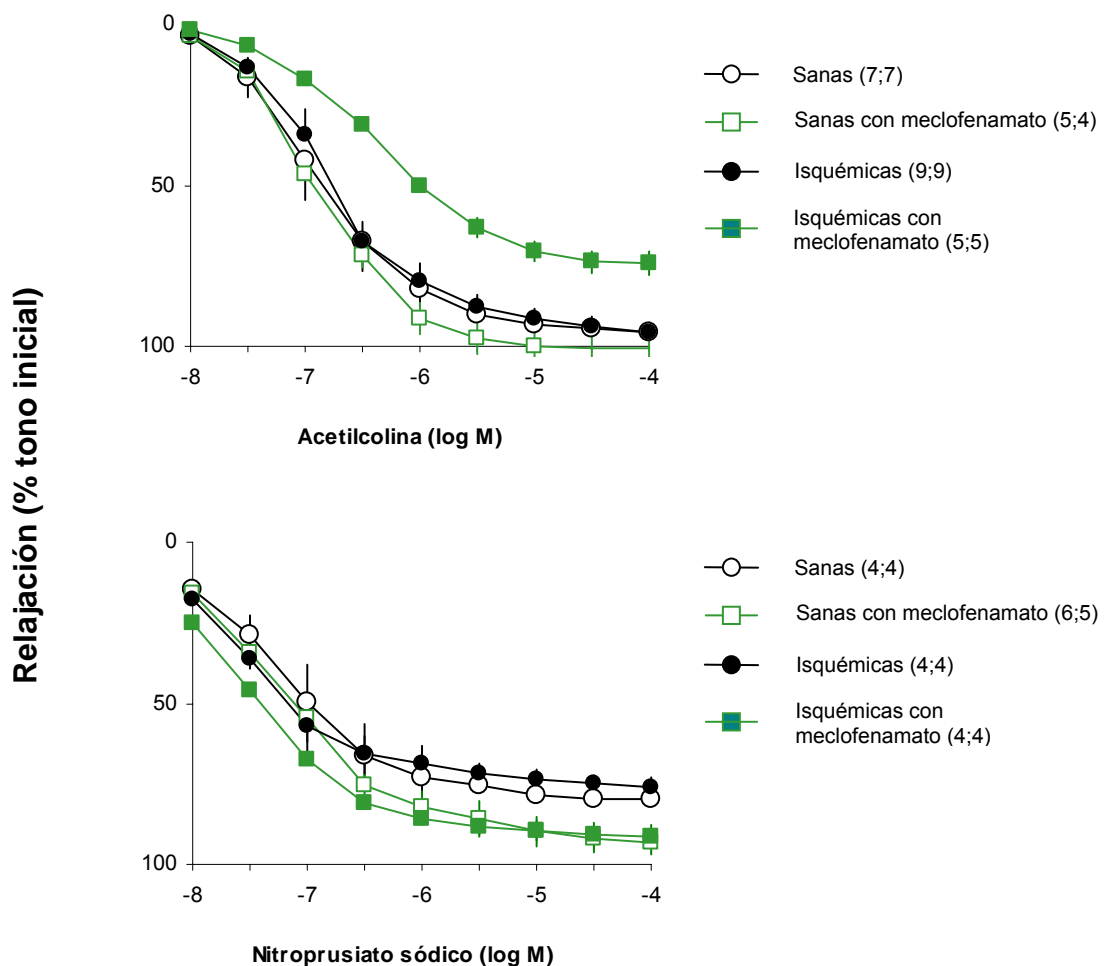
Efecto del L-NAME en la relajación inducida con nitroprusiato sódico: Este tratamiento aumentó el efecto máximo del nitroprusiato en las arterias isquémicas pero no el de las sanas ( $p < 0.01$ ), sin causar cambios en la  $pD_2$ . Tabla 3 y Figura 6.



**Figura 6:** Efecto del L-NAME en la relajación inducida con acetilcolina (**arriba**) y con nitroprusiato sódico (**abajo**), en arterias precontraídas con U46619, no isquémicas e isquémicas. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

Efecto del meclofenamato en la relajación inducida con acetilcolina: La inhibición de la síntesis de prostanoideos con meclofenamato causó disminución del efecto máximo en las arterias isquémicas ( $p < 0.05$  respecto a las isquémicas no tratadas), pero no en las sanas. La  $pD_2$  fue igual en los cuatro tipos de arterias. Tabla 2 y Figura 7.

Efecto del meclofenamato en la relajación inducida con nitroprusiato sódico: Este tratamiento aumentó el efecto máximo del nitroprusiato en las arterias isquémicas pero no el de las sanas ( $p < 0.05$ ), sin causar cambios en la  $pD_2$ . Tabla 3 y Figura 7.



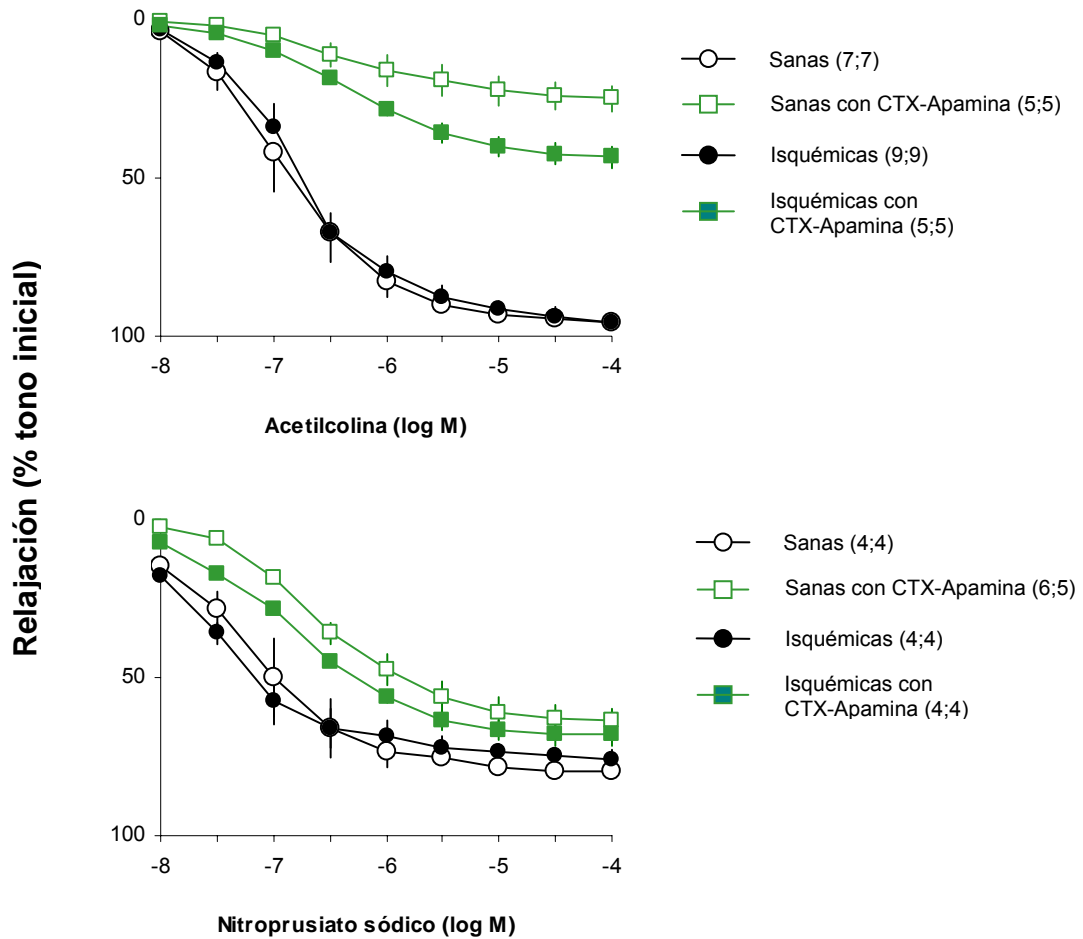
**Figura 7:** Efecto del meclofenamato en la relajación inducida con acetilcolina (**arriba**) y con nitroprusiato sódico (**abajo**), en arterias precontraídas con U46619, no isquémicas e isquémicas. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

Efecto de la caribdotoxina+apamina en la relajación inducida con acetilcolina:

Cuando se bloquearon los canales de potasio con caribdotoxina+apamina, las arterias isquémicas alcanzaron un efecto máximo menor ( $p < 0.001$ ) que las no tratadas. A su vez, las arterias sanas tratadas con caribdotoxina+apamina se relajaron menos que sus controles no tratadas ( $p < 0.01$ ). La  $pD_2$  fue igual en los cuatro tipos de arterias. Tabla 2 y Figura 8.

Efecto de la caribdotoxina y apamina en la relajación inducida con nitroprusiato

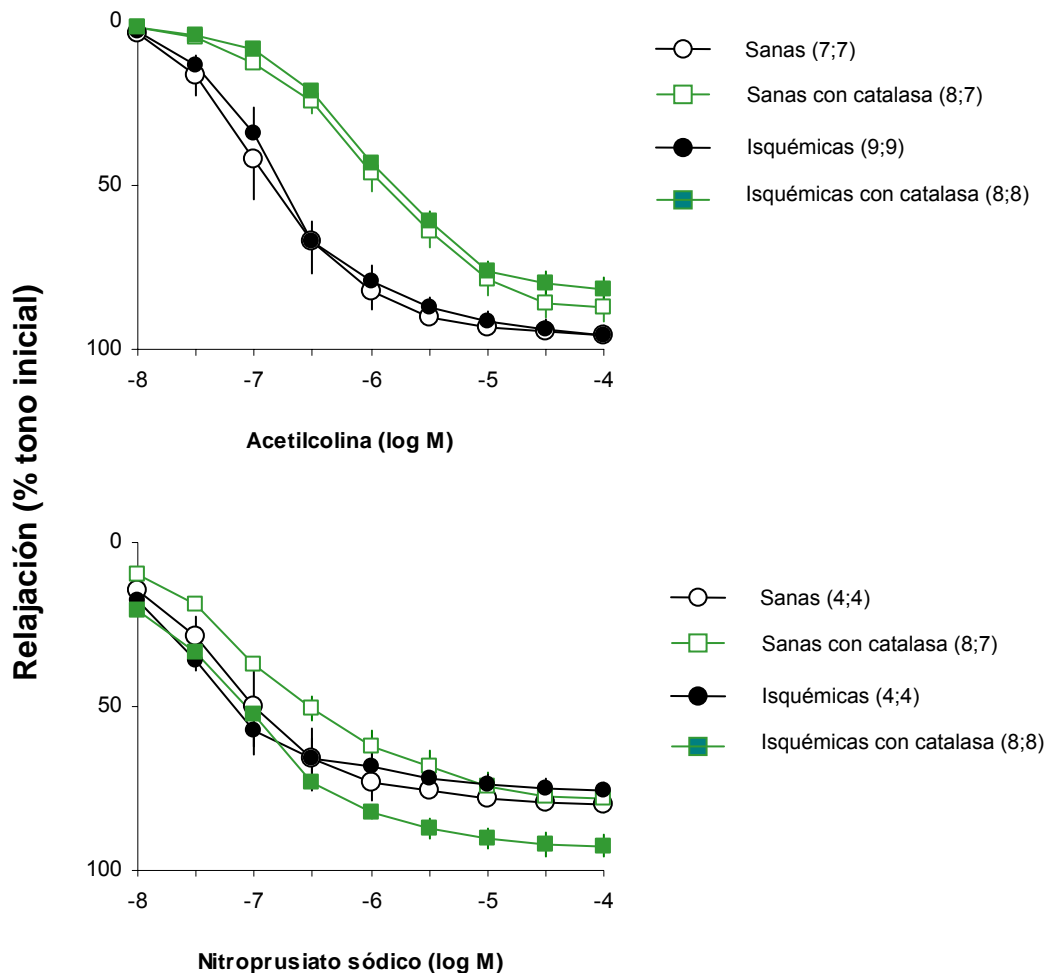
sódico: Este tratamiento no produjo cambios en el efecto máximo, pero disminuyó la  $pD_2$  ( $p < 0.01$ ) de arterias no isquémicas respecto a sus controles. Tabla 3 y Figura 8.



**Figura 8:** Efecto de la caribdotoxina + apamina en la relajación inducida con acetilcolina (**arriba**) y con nitroprusiato sódico (**abajo**), en arterias precontraídas con U46619, no isquémicas e isquémicas. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

Efecto de la catalasa en la relajación inducida con acetilcolina: La eliminación del peróxido de hidrógeno mediante el tratamiento con catalasa disminuyó el efecto máximo y aumentó la  $pD_2$  tanto en las arterias sanas como en las isquémicas, respecto a las arterias no tratadas. Tabla 2 y Figura 9.

Efecto de la catalasa en la relajación inducida con nitroprusiato sódico: Este tratamiento aumentó el efecto máximo del nitroprusiato en las arterias isquémicas pero no el de las sanas ( $p < 0.01$ ), sin causar cambios en la  $pD_2$ . Tabla 3 y Figura 9.

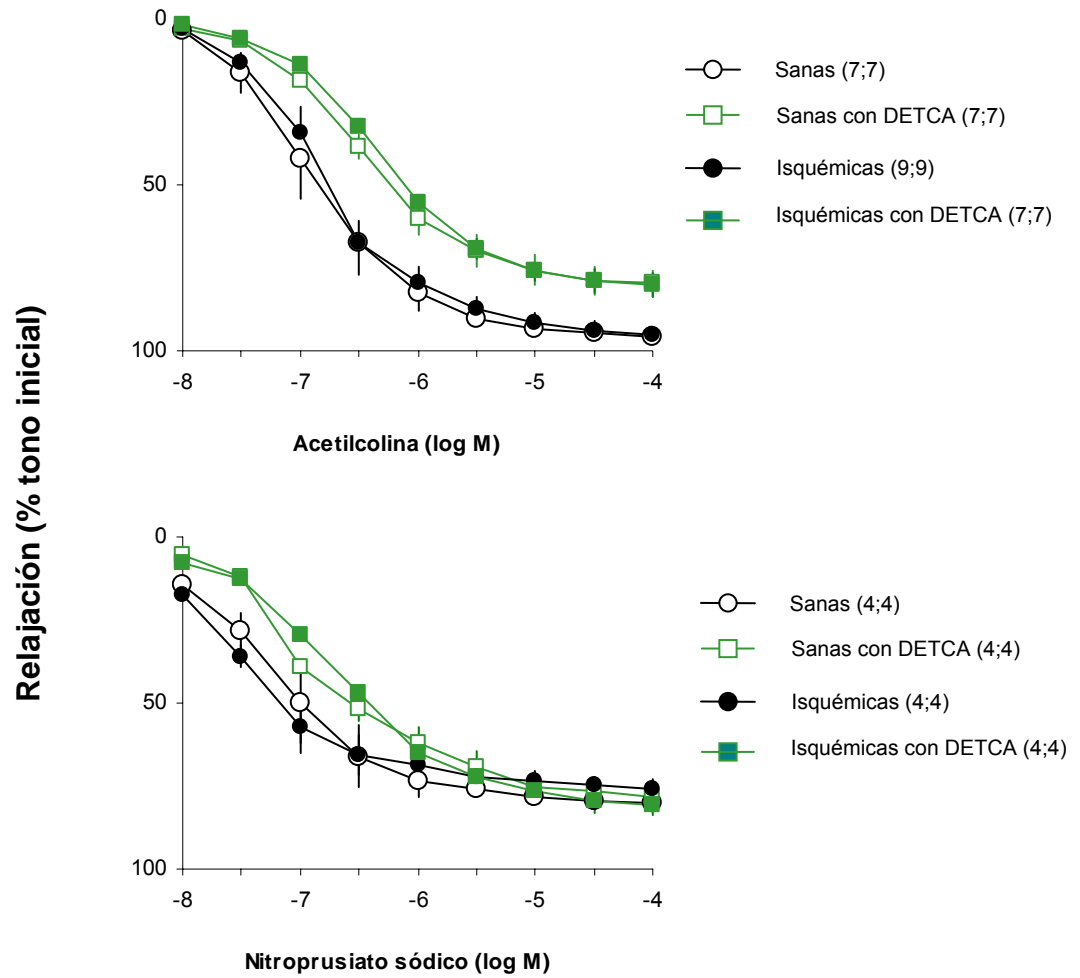


**Figura 9:** Efecto de la catalasa en la relajación inducida con acetilcolina (**arriba**) y con nitroprusiato sódico (**abajo**), en arterias precontraídas con U46619, no isquémicas e isquémicas. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

Efecto del DETCA en la relajación inducida con acetilcolina: Cuando se inhibió la superóxido dismutasa con DETCA, las arterias sanas alcanzaron un efecto máximo ligeramente menor ( $p < 0.01$ ) que las no tratadas. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre las arterias isquémicas tratadas con DETCA y las no tratadas, a pesar de lo mostrado por la gráfica. La  $pD_2$  fue igual en los cuatro tipos de arterias. Tabla 2 y Figura 10.

Efecto del DETCA en la relajación inducida con nitroprusiato sódico: Este tratamiento hizo que en las arterias isquémicas la  $pD_2$  fuera menor ( $p < 0.05$ ) que en las no tratadas. No hubo otras diferencias significativas entre los cuatro tipos de arterias. Tabla 3 y Figura 10.





**Figura 10:** Efecto del DETCA en la relajación inducida con acetilcolina (**arriba**) y con nitroprusiato sódico (**abajo**), en arterias precontraídas con U46619, no isquémicas e isquémicas. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

## RESPUESTA ARTERIAL VASOCONSTRICTORA

### Obtenida con la aplicación de cloruro de potasio:

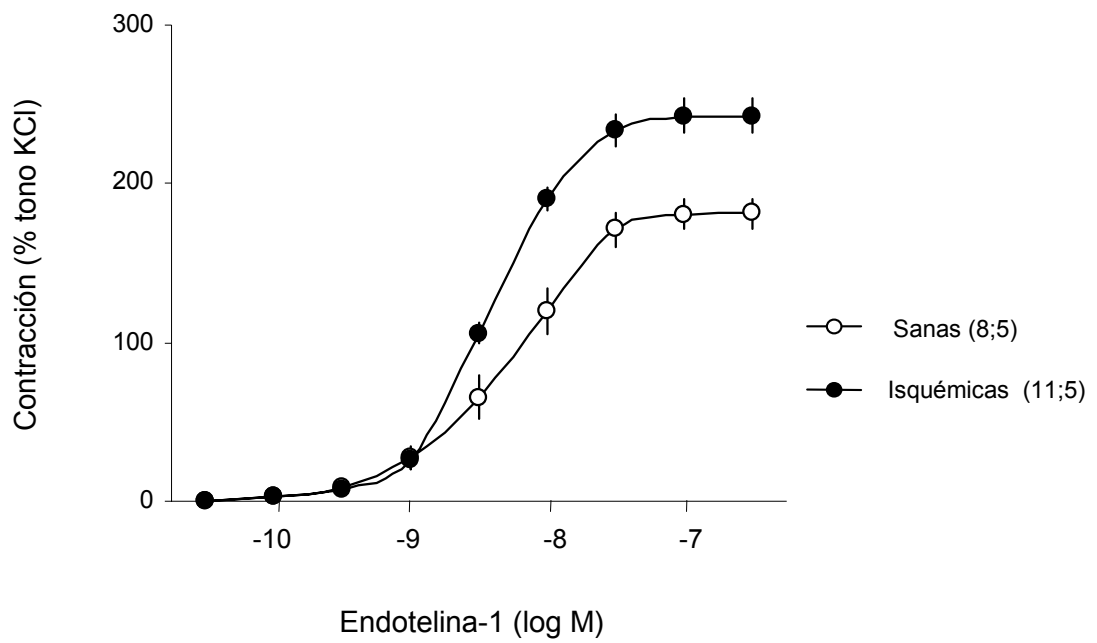
En todos los segmentos arteriales el KCl (100 mM) produjo contracción, la cual no fue estadísticamente diferente entre las arterias sanas (994±68 mg, 15 segmentos de 12 individuos) y las isquémicas (917±91 mg, 20 segmentos de 14 individuos).

### Obtenida con la aplicación del análogo del tromboxano U46619:

El análogo del tromboxano U46619 ( $10^{-7}$  M) produjo contracción, y su efecto máximo fue mayor ( $P < 0.05$ ) en las arterias isquémicas (1300±37 mg, 9 segmentos de 9 individuos) que en las arterias sanas (1100±35 mg, 7 segmentos de 7 individuos).

### Obtenida con la aplicación de endotelina-1:

La endotelina-1 ( $3 \times 10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-6}$  M) produjo contracción, cuya magnitud dependió de la concentración, en todos los segmentos arteriales. El efecto máximo contráctil fue significativamente mayor ( $P < 0.001$ ) en las arterias isquémicas (243±11%, 11 segmentos de 5 individuos) que en las arterias sanas (181±9%, 8 segmentos de 5 individuos). La sensibilidad ( $pD_2$ ) para este péptido fue similar en los dos tipos de arterias (Figura 11 y Tabla 4).



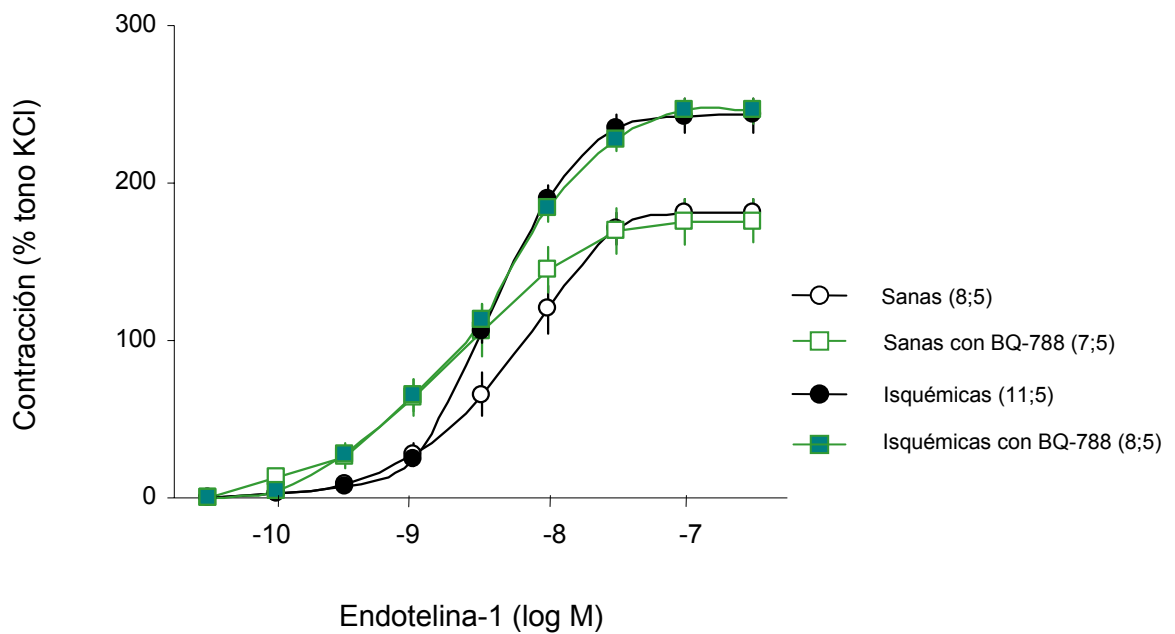
**Figura 11:** Contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

**Tabla 4:** Valores de contracción (% del tono alcanzado con KCl) y de sensibilidad  $PD_2$  obtenidos con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).  $^{\circ}$   $P < 0.05$ .  $^{\circ\circ}$   $P < 0.01$  entre arterias tratadas y no tratadas (test de Dunnett).  $^{***}$   $P < 0.001$  entre arterias no isquémicas e isquémicas con igual tratamiento (test de Bonferroni).

Arterias sanas			Arterias isquémicas		
	Contracción (% tono KCl)	$PD_2$		Contracción (% tono KCl)	$PD_2$
Sin tratamiento (8;5)	181 $\pm$ 9	8.3 $\pm$ 0.1	Sin tratamiento (11;5)	243 $\pm$ 11 ***	8.4 $\pm$ 0.1
BQ-788 (7;5)	179 $\pm$ 8	8.7 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$	BQ-788 (8;5)	246 $\pm$ 7 ***	8.5 $\pm$ 0.2
BQ-123 (6;5)	193 $\pm$ 12	7.6 $\pm$ 0.1 $^{\circ\circ}$	BQ-123 (7;5)	198 $\pm$ 8 $^{\circ}$	7.6 $\pm$ 0.1 $^{\circ\circ}$
L-NAME (7;5)	180 $\pm$ 14	8.4 $\pm$ 0.1	L-NAME (7;5)	242 $\pm$ 8 ***	8.8 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$
TCP (5;5)	210 $\pm$ 4	8.5 $\pm$ 0.1	TCP (6;5)	219 $\pm$ 13	8.6 $\pm$ 0.2
Furegrelato (6;5)	266 $\pm$ 8 $^{\circ\circ}$	8.6 $\pm$ 0.1	Furegrelato (7;5)	192 $\pm$ 5 $^{\circ\circ}$ ***	8.2 $\pm$ 0.1
SQ-29548 (6;5)	238 $\pm$ 10 $^{\circ\circ}$	8.2 $\pm$ 0.1	SQ-29548 (6;5)	165 $\pm$ 12 $^{\circ\circ}$ ***	8.5 $\pm$ 0.1
CTX-Apamina (7;5)	165 $\pm$ 8	8.2 $\pm$ 0.1	CTX-Apamina (8;5)	163 $\pm$ 10 $^{\circ\circ}$	8.6 $\pm$ 0.1
Catalasa (6;5)	190 $\pm$ 23	8.8 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$	Catalasa (7;5)	188 $\pm$ 18 $^{\circ\circ}$	8.9 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$
DETCA (6;4)	246 $\pm$ 9 $^{\circ\circ}$	8.3 $\pm$ 0.2	DETCA (7;5)	242 $\pm$ 4	8.3 $\pm$ 0.1

**Efecto del BQ-788 en la contracción inducida con endotelina-1:**

Cuando se inhibió el receptor  $ET_B$  de la endotelina, aumentó la sensibilidad  $pD_2$  a la endotelina-1 en arterias sanas pero no en las isquémicas ( $p < 0.05$  respecto a las arterias no tratadas). En el efecto máximo no causó diferencias. Tabla 4 y Figura 12.

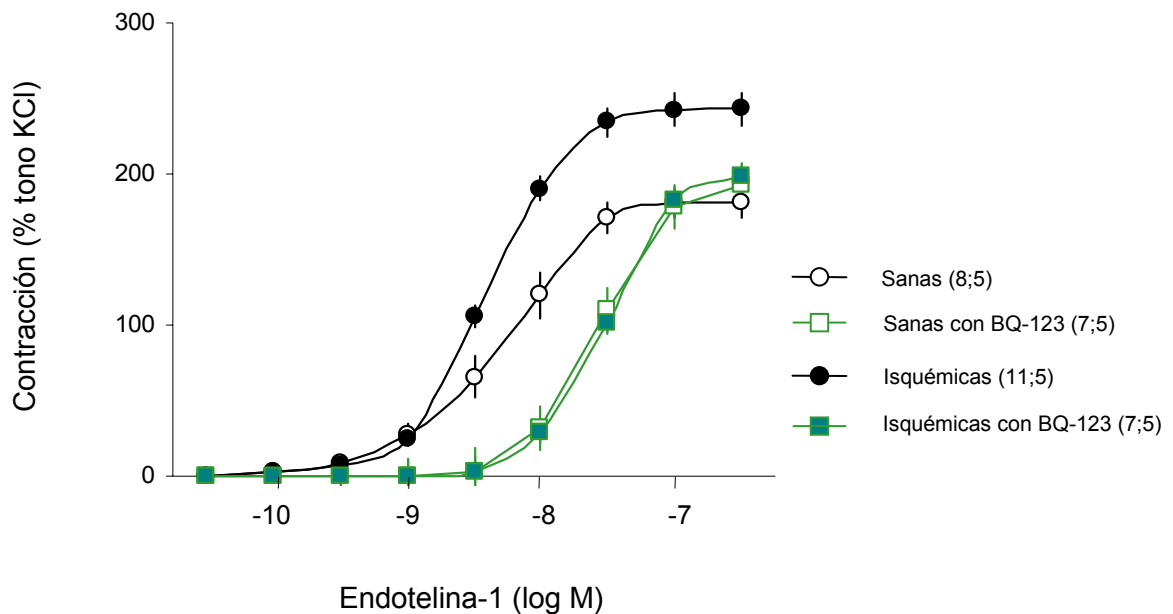


**Figura 12:** Efecto del BQ-788 en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

### Efecto del BQ-123 en la contracción inducida con endotelina-1:

El bloqueo del receptor  $ET_A$  de la endotelina con BQ-123 revirtió el efecto máximo contráctil que estaba aumentado en las arterias isquémicas no tratadas ( $p < 0.05$ ). Esta disminución de la contracción no se observó en las arterias sanas que recibieron el mismo tratamiento.

Este bloqueo de receptores también disminuyó la sensibilidad a la endotelina-1: la  $pD_2$  disminuyó por igual en arterias sanas e isquémicas tratadas respecto a las no tratadas ( $p < 0.01$ ). Tabla 4 y Figura 13.



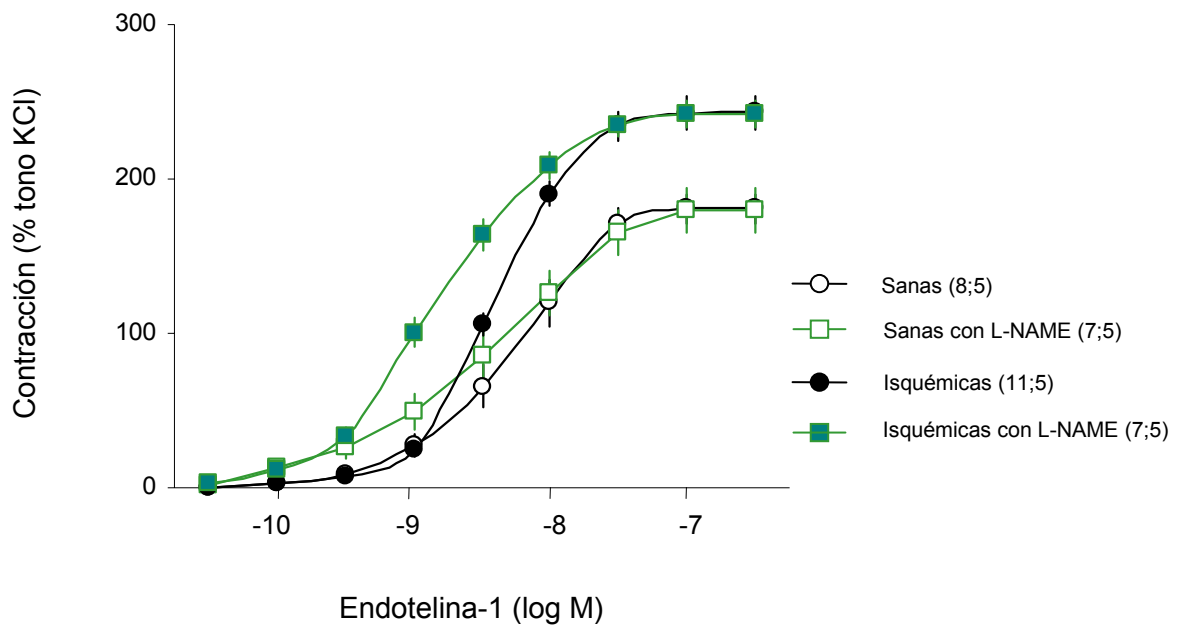
**Figura 13:** Efecto del BQ-123 en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

### Efecto del L-NAME en la contracción inducida con endotelina-1:

Las arterias isquémicas que recibieron este inhibidor de la síntesis de óxido nítrico mostraron una mayor sensibilidad ( $pD_2$ ) a la endotelina-1 ( $p < 0.05$ ) que las arterias isquémicas no tratadas. En cambio, no hubo diferencias de la sensibilidad entre las arterias tratadas con L-NAME y las no tratadas.

El efecto máximo no fue afectado por el L-NAME en los dos tipos de arterias.

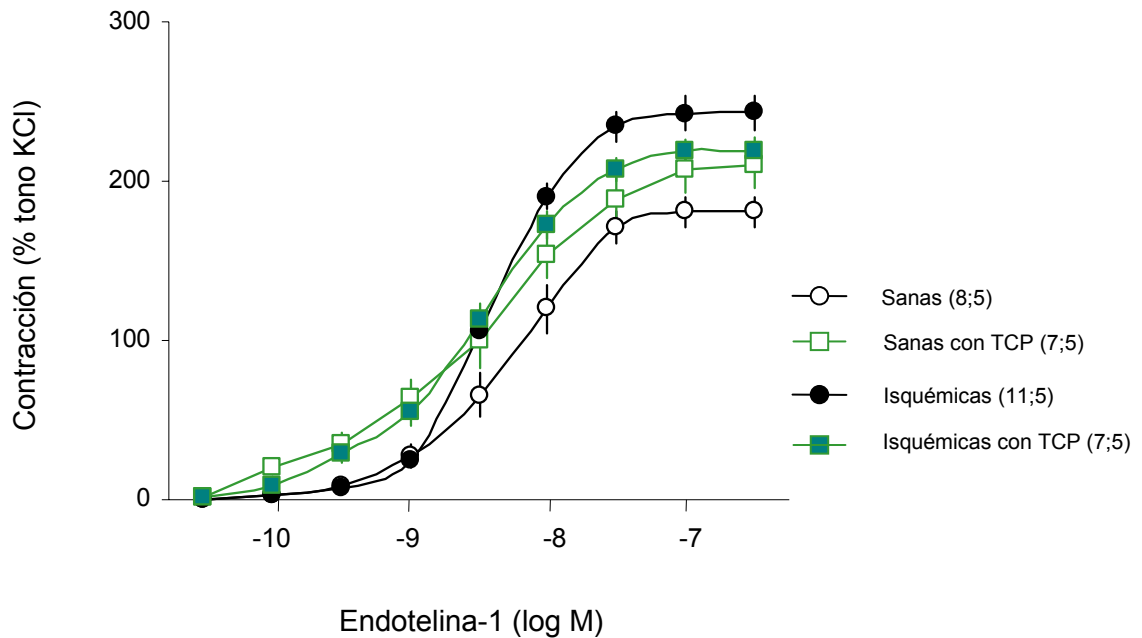
Tabla 4 y Figura 14.



**Figura 14:** Efecto del L-NAME en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

**Efecto del TCP en la contracción inducida con endotelina-1:**

Este inhibidor de la prostaciclina no causó diferencias significativas en el efecto máximo ni en la  $pD_2$  de las arterias sanas o isquémicas. Tabla 4 y Figura 15.



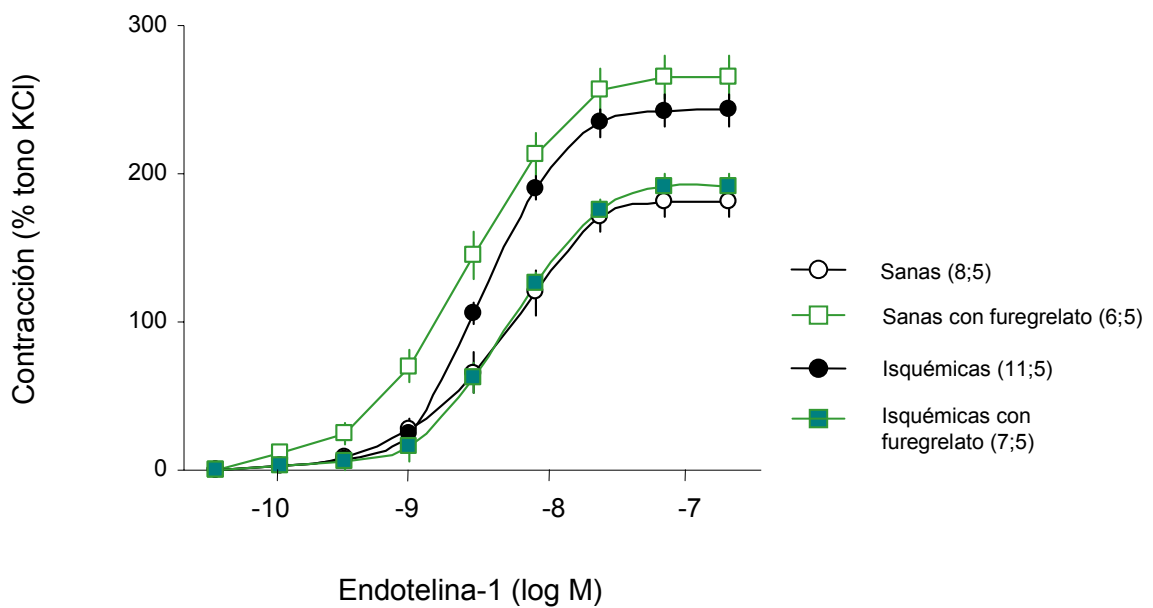
**Figura 15:** Efecto del TCP en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).



Efecto del furegrelato en la contracción inducida con endotelina-1:

Al inhibir la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, las arterias isquémicas alcanzaron un efecto máximo menor ( $p < 0.01$ ) que las arterias isquémicas no tratadas y que las sanas tratadas ( $p < 0.001$ ). Por el contrario, las arterias sanas tratadas alcanzaron un efecto máximo mayor ( $p < 0.01$ ) que las sanas no tratadas.

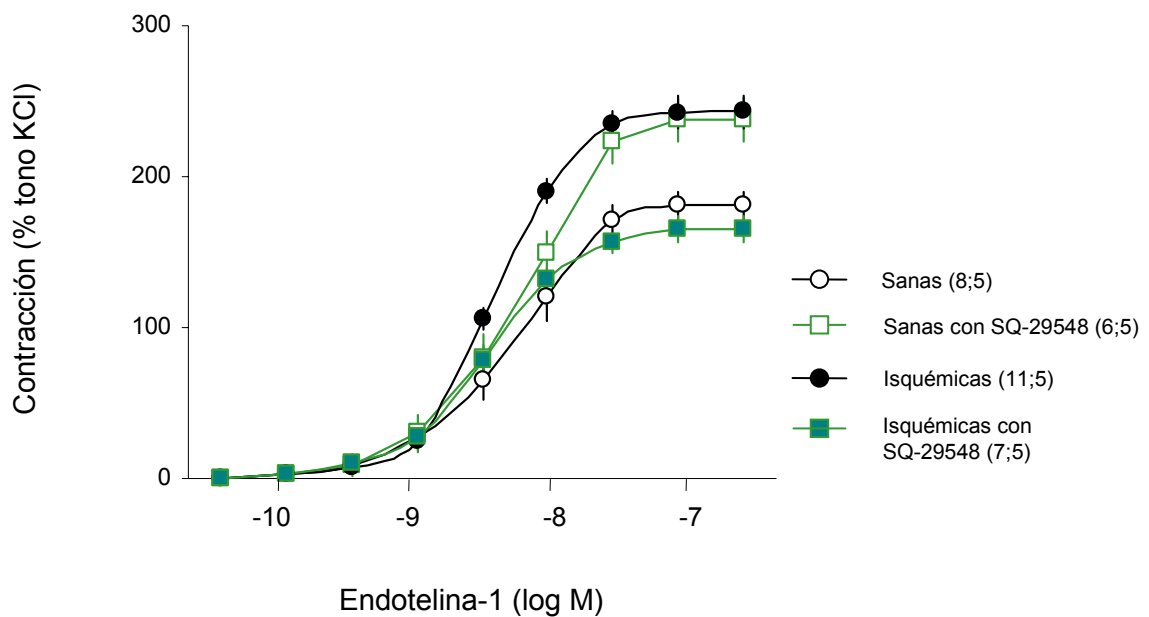
La  $pD_2$  es igual en los cuatro tipos de arterias. Tabla 4 y Figura 16.



**Figura 16:** Efecto del furegrelato en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

### Efecto del SQ-29548 en la contracción inducida con endotelina-1:

En concordancia con el resultado anterior, cuando el receptor del tromboxano A<sub>2</sub> fue inhibido con SQ-29548, las arterias isquémicas alcanzaron un efecto máximo menor que las arterias isquémicas no tratadas ( $p < 0.01$ ), y las sanas tratadas alcanzaron un efecto máximo mayor ( $p < 0.01$ ) que las controles. No hubo diferencia en la  $pD_2$  de los cuatro tipos de arterias. Tabla 4 y Figura 17.

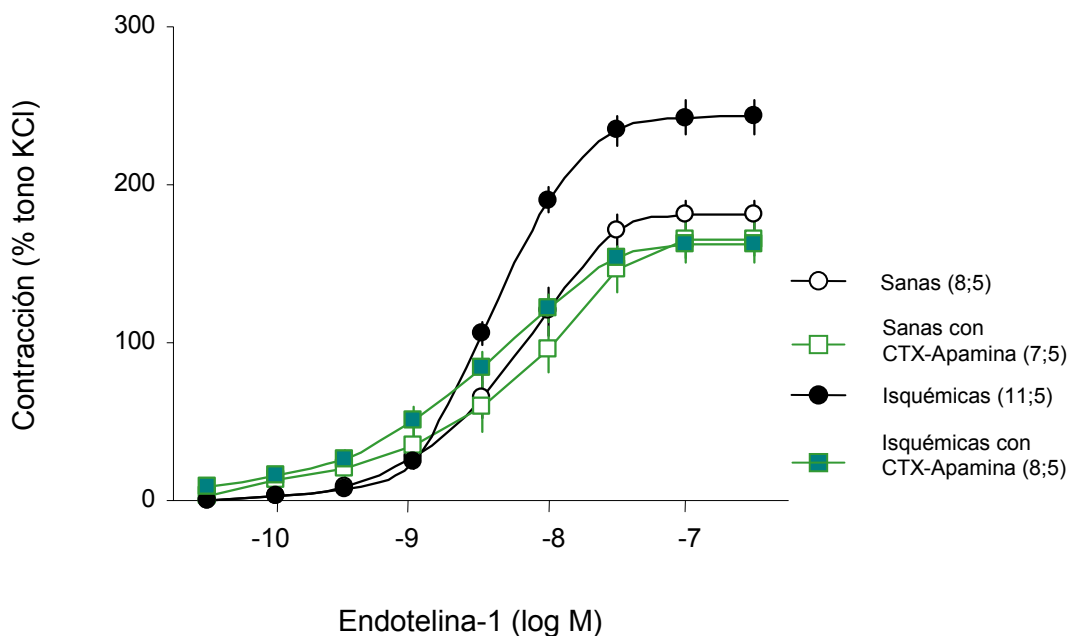


**Figura 17:** Efecto del SQ-29548 en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

### Efectos de la caribdotoxina+apamina en la contracción con endotelina-1:

La aplicación de caribdotoxina+apamina indujo, *per se*, una contracción de base en todas las arterias, tanto sanas como isquémicas ( $461 \pm 297$  mg, 15 segmentos de 10 individuos). Dicha contracción no fue estadísticamente diferente entre los dos tipos de arterias.

En las arterias isquémicas, el tratamiento con estos bloqueantes de los canales de potasio provocó una disminución del efecto máximo alcanzado ( $p < 0.01$ ) respecto a las arterias isquémicas no tratadas. En las arterias sanas no se observaron cambios con estos bloqueantes. El tratamiento con caribdotoxina+apamina no modificó significativamente la sensibilidad ( $pD_2$ ) de las arterias sanas ni de las isquémicas. Tabla 4 y Figura 18.

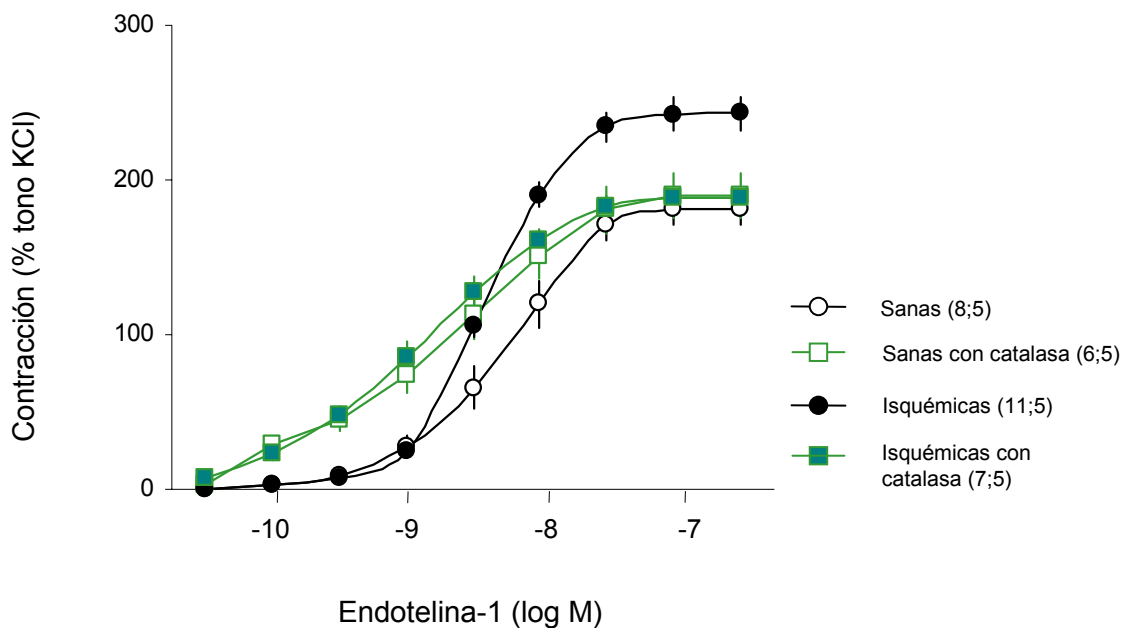


**Figura 18:** Efecto de la CTX-Apamina en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

Efecto de la catalasa en la contracción inducida con endotelina-1:

Cuando se disminuyó el peróxido de hidrógeno con catalasa, las arterias isquémicas alcanzaron un efecto máximo menor ( $p < 0.01$ ) que las isquémicas no tratadas. No hubo diferencias entre las arterias tratadas, sanas o isquémicas.

Este tratamiento además aumentó la sensibilidad a la endotelina-1, pues la  $pD_2$  fue mayor ( $p < 0.05$ ) en arterias tratadas, sanas o isquémicas, que en las no tratadas. Tabla 4 y Figura 19.

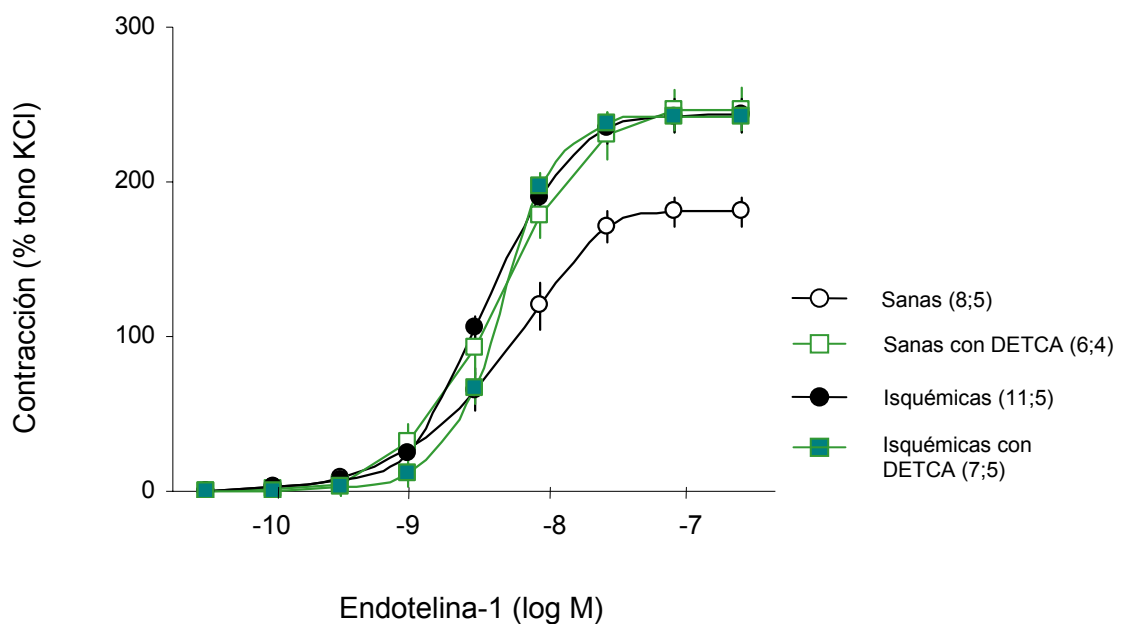


**Figura 19:** Efecto de la catalasa en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

### Efecto del DETCA en la contracción inducida con endotelina-1:

En las arterias sanas tratadas con este inhibidor de la superóxido dismutasa se alcanzó un efecto máximo mayor ( $p < 0.01$ ) que en las sanas no tratadas. En cuanto a las arterias isquémicas, no hubo diferencia entre las arterias tratadas y las no tratadas.

La  $pD_2$  fue igual en los cuatro tipos de arterias. Tabla 4 y Figura 20.



**Figura 20:** Efecto del DETCA en la contracción obtenida con endotelina-1 en arteria mesentérica de rata. Entre paréntesis (número de segmentos; número de individuos).

## **DISCUSIÓN**

La isquemia/reperfusión mesentérica es un problema relativamente infrecuente, pero se asocia con mortalidades entre el 60 y el 100% (Chang *et al*, 2006). Esto se debe a que la isquemia/reperfusión induce en el intestino una pérdida de su función de barrera, permitiendo la translocación de productos bacterianos a la circulación, seguida de choque séptico y la consecuente falla multiorgánica fatal. Pero otra vía para llegar a esta falla multiorgánica es la disfunción endotelial (Cerqueira *et al*, 2005) que puede ser causada por la isquemia/reperfusión tanto localmente, en la arteria que nutre al intestino, como a distancia, en otras arterias no directamente involucradas en la zona isquémica (Martinez-Revelles *et al*, 2008). Es mucho lo que se ha publicado acerca de los efectos de la isquemia/reperfusión mesentérica sobre la mucosa intestinal, pero en cambio se han estudiado poco esos efectos en la arteria mesentérica. De hecho, aún no se conocen bien los detalles de la disfunción endotelial ni los mecanismos implicados en ella (Bruce *et al*, 2004). Por tanto, creemos necesario profundizar en tal conocimiento para comprender mejor la fisiopatología de la isquemia/reperfusión vascular, en aras de contribuir a lograr mejores herramientas diagnósticas y terapéuticas de la isquemia/reperfusión mesentérica en salas de urgencias, cirugía y cuidados intensivos, posibilitando una actuación más temprana y disminuyendo la mortalidad.

Para estudiar la fisiopatología de la isquemia/reperfusión mesentérica, uno de los modelos experimentales más usados es el de la oclusión de la arteria mesentérica superior de rata, debido a la fortaleza y relativa facilidad de manejo de este animal y la accesibilidad de dicha arteria. Para desarrollar el presente trabajo escogimos este modelo, y usamos tiempos de isquemia/reperfusión que coinciden con los de muchos investigadores de la isquemia mesentérica (ver Tabla 1). El presente trabajo se desarrolló para analizar *in vitro* cómo afecta la isquemia/reperfusión al endotelio de la arteria mesentérica, midiendo las respuestas vasoconstrictora y vasodilatadora. Se evaluaron varios mecanismos implicados en esas respuestas, determinando que algunos de ellos se encuentran alterados en un aparente esfuerzo adaptativo para compensar la disfunción endotelial.

En nuestro estudio, el intestino de las ratas sometidas a isquemia adquirió la presencia usual del tejido infartado. Esto es sugestivo de que, aunque no hubo mortalidad en ese grupo, las ratas estaban siendo sometidas a isquemia mesentérica. En un estudio previo no publicado, el autor del presente trabajo encontró que usando 60 minutos de isquemia y 60 de reperfusión la mucosa intestinal de la rata presenta congestión capilar, moderado despegamiento epitelial, desnudamiento de las puntas de las vellosidades e hiperplasia de la lámina propia, y una actividad de lactato deshidrogenasa casi tres veces mayor a la basal. Por consiguiente, con este tiempo de isquemia/reperfusión se producen alteraciones estructurales y metabólicas en el tejido, que son parecidas a las observadas en humanos con similares tiempos de isquemia (Derikx *et al*, 2008).

#### RESPUESTA VASODILATADORA

Vasodilatación con acetilcolina: La acetilcolina es un neurotransmisor que actúa sobre receptores muscarínicos del endotelio, induciendo liberación de óxido nítrico, por lo que es un potente vasodilatador dependiente del endotelio.

En nuestro estudio las arterias isquémicas no tratadas se relajaron ante el estímulo colinérgico de manera similar a como lo hicieron las controles. Es decir, la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio se conserva en esta arteria, de modo que bajo nuestras condiciones experimentales el grado de lesión infligido no es suficiente para que se manifieste la disfunción endotelial. Sin embargo, esto no excluye que puedan existir alteraciones adaptativas en los mecanismos relajadores/constrictores que llevan a una “compensación” de esta disfunción endotelial.

Esta parte de nuestros resultados contrasta con los de Hayward y Lefer (1998), que encontraron una significativa disminución de la respuesta endotelial a la acetilcolina posterior a 120 minutos de isquemia y 2.5 minutos de reperfusión



en la mesentérica superior de rata. La diferencia de nuestros resultados con los de estos investigadores puede atribuirse a que ellos usaron el doble de tiempo de isquemia que nosotros, y también a que realizaron una isquemia más amplia, con pinzamiento de la mesentérica superior y además del tronco celiaco, que irriga al páncreas, estómago, bazo y parcialmente al hígado (ver Figura 1). Un modelo como el de Hayward profundiza los efectos observados en el vaso sanguíneo, pero puede no reproducir con precisión la situación clínica ya que la isquemia aguda de etiología oclusiva no suele abarcar un área tan grande (Yasuhara, 2005; Bingol *et al*, 2004). Por este motivo, el método de pinzar únicamente la arteria mesentérica superior nos parece más adecuado, y además es mucho más usado como modelo para reproducir este evento clínico en el laboratorio. En procura de profundizar la lesión, diversos grupos que practican sólo el pinzamiento de la mesentérica prolongan el tiempo de reperfusión hasta 24 horas, posterior a isquemias de 30, 45, 60, 90 o 120 minutos (Martinez-Revelles *et al*, 2008; Victorino *et al*, 2008). Estos tiempos de isquemia/reperfusión mesentérica son factibles en clínica, pero nuestro interés ha sido el observar cambios relativamente tempranos y muy importantes en el endotelio, porque sabemos que una intervención más temprana contribuye a conservar la función de barrera de la mucosa intestinal y a disminuir la probabilidad de que se desarrolle una disfunción endotelial. Tiempos tan prolongados de isquemia o de reperfusión harían totalmente inviable el intestino (Koksoy *et al*, 2000) y prácticamente garantizan que la disfunción se habrá establecido.

Nuestros resultados también difieren con los de Sánchez *et al* (2006), que, usando nuestros mismos tiempos de isquemia/reperfusión en la arteria cerebral media de la cabra, encontraron disfunción endotelial dada por disminución en la capacidad vasodilatadora. Estos autores atribuyeron esta disfunción a un descenso de la biodisponibilidad de óxido nítrico, además de una disminución en la liberación de un hipotético EDHF, y también a un incremento en la producción de prostanoïdes vasoconstrictores. En ese estudio, cada uno de estos tres eventos fue relacionado con una elevada producción de anión

superóxido. Más adelante discutiremos lo correspondiente al papel de estos mecanismos que encontramos en la arteria mesentérica superior.

Vasodilatación con nitroprusiato sódico: El nitroprusiato sódico es un donante de óxido nítrico (Ramakrishna y Cederbaum, 1996; Emre *et al*, 2008) y por lo tanto es un potente vasodilatador no dependiente del endotelio. En nuestro estudio, el efecto del nitroprusiato fue igual en arterias no tratadas sanas o isquémicas, sugiriendo que la sensibilidad del músculo liso arterial al óxido nítrico no se ha modificado por la isquemia/reperfusión y que el músculo liso conserva su capacidad de relajación. Por tanto, si se observara algún cambio en la respuesta arterial, sería atribuible a eventos inducidos por la isquemia exclusivamente en el endotelio y no en el músculo liso.

#### RESPUESTA VASOCONSTRICTORA

Contracción con cloruro de potasio: El cloruro de potasio en elevadas concentraciones produce despolarización de la membrana, lo cual causa apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y la consecuente contracción del músculo liso vascular, constituyendo una prueba de su capacidad contráctil (Somlyo, 1994). En nuestro estudio, el hecho de que la respuesta al cloruro de potasio haya sido igual en las arterias sanas e isquémicas sugiere que los tiempos usados de isquemia/reperfusión no dañan la integridad funcional del músculo liso en la arteria mesentérica, coincidiendo con nuestro hallazgo en la relajación con nitroprusiato de sodio en arterias no tratadas, sanas o isquémicas.

Contracción con endotelina-1: La endotelina es uno de los más potentes vasoconstrictores conocidos. En el presente estudio, la endotelina-1 aplicada en concentraciones progresivas produjo contracción, cuya magnitud dependió de la concentración, en todos los segmentos arteriales. La isquemia/reperfusión indujo un muy significativo aumento del efecto máximo provocado por la

endotelina-1 en las arterias no tratadas. Dado que la contracción en respuesta al cloruro de potasio fue igual en las arterias sanas e isquémicas, tal incremento de la respuesta a la endotelina-1 en las arterias isquémicas parece ser específico del endotelio y no sería debido a que esté aumentada la contractilidad del músculo liso vascular. Esta elevación de la actividad de la endotelina ha sido descrita también en mesentéricas de rata con hipoxia *in vitro* (Douglas *et al*, 1991) y en coronaria del cerdo (Climent *et al*, 2006), y posiblemente contribuye a la vasoconstricción e hipoperfusión tisular que acompaña a los estados isquémicos (Stenman *et al*, 2002).

#### MECANISMOS IMPLICADOS EN ESTAS RESPUESTAS

Papel de los receptores de endotelina-1: Como se dijo en la Introducción, la endotelina-1 puede producir vasoconstricción actuando sobre receptores ET<sub>A</sub>, directamente sobre el músculo liso, pero también relajación actuando sobre receptores ET<sub>B</sub>, indirectamente a través del endotelio, donde induce liberación de prostaciclina y óxido nítrico (Douglas *et al*, 1991; Agapitov y Haynes, 2002).

En nuestro estudio de contracción, cuando se aplicó un bloqueante del receptor ET<sub>A</sub> de endotelina-1, se disminuyó la sensibilidad a la endotelina-1 tanto en arterias isquémicas como en las sanas, y se revirtió el aumento de contracción a la endotelina-1 que habíamos observado. Resultados similares se han descrito en la arteria mesentérica humana sana, donde la contracción producida por la endotelina-1 es mediada principalmente a través de receptores ET<sub>A</sub> (Ferrero *et al*, 2008). Cuando se aplicó un bloqueante del receptor ET<sub>B</sub>, hubo un aumento de la sensibilidad a la endotelina-1 en las arterias sanas, sugiriendo que los receptores endoteliales ET<sub>B</sub> modulan la respuesta contráctil de la mesentérica a la endotelina-1. Este efecto modulador, sin embargo, desapareció tras la isquemia, evento que explicaría al menos una parte del aumento en la respuesta contráctil. Este hallazgo, además, apoyaría la idea de

que existe disfunción endotelial en la arteria mesentérica con los tiempos de isquemia/reperfusión aplicados en este trabajo.

Nuestro hallazgo de que el aumento de la respuesta contráctil post-isquémica, en la arteria mesentérica de rata, puede atribuirse a una menor actividad del receptor  $ET_B$  de la endotelina coincide con lo informado por Climent *et al* (2006), que observaron en coronarias de cerdo sometidas a 30 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión, un incremento de la vasoconstricción en respuesta a la endotelina-1, hecho que atribuyeron a una menor actividad del receptor endotelial  $ET_B$  de la endotelina, con la consecuente disminución de la liberación de óxido nítrico y prostaciclina, así como a una mayor actividad del receptor muscular  $ET_B$  de la endotelina, mediador de vasoconstricción. En nuestro estudio, tal actividad aumentada de los receptores  $ET_B$  en el músculo liso no se identificó, ya que la curva de sensibilidad a la endotelina no se desplazó hacia la derecha en las arterias isquémicas.

Uno de los posibles mecanismos para la elevación de la respuesta contráctil es el aumento del número de receptores. Wackenfors *et al* (2004) confirmaron por PCR que la isquemia induce una regulación al alza (*upregulation*) de los receptores a la endotelina-1, tanto  $ET_A$  como  $ET_B$ , en coronarias humanas. La causa de esta regulación al alza de los receptores es desconocida, aunque parece estar mediada por la proteína-kinasa C y vías mitogénicas activadas por la kinasa (Nilsson *et al*, 2008). En el genoma humano, los genes que codifican los receptores a endotelina contienen múltiples elementos reguladores, que podrían ser activados por mediadores inflamatorios secundarios a la isquemia. En un evento isquémico se liberan citoquinas pro-inflamatorias tipo interleucina y factor de necrosis tumoral (White *et al*, 1999). Se ha encontrado aumento de receptores de la endotelina en arterias incubadas con estas citoquinas, lo que apoya la hipótesis de que los componentes inflamatorios están involucrados en la regulación al alza de los receptores (White *et al*, 1999).

Papel del óxido nítrico: En el estudio de relajación, las arterias sanas que fueron tratadas con un inhibidor de la producción de óxido nítrico se relajaron con acetilcolina menos que las sanas no tratadas, lo que muestra que el óxido nítrico media normalmente al menos una parte de la relajación dependiente de endotelio en la mesentérica superior. En el estudio de la relajación no dependiente de endotelio, encontramos que la inhibición de la producción de óxido nítrico aumenta el efecto máximo del nitroprusiato sódico, en parte porque la donación exógena de óxido nítrico por el nitroprusiato rebasa la inhibición que puede hacer el L-NAME, y en parte también porque hay una sensibilización del músculo liso al GMPc ante el bloqueo de la producción de óxido nítrico, como ha sido recientemente estudiado en la arteria pulmonar de la rata (Gupta *et al*, 2008).

En las arterias isquémicas tratadas con L-NAME se obtuvo con la acetilcolina un efecto máximo aún menor que el de las arterias sanas con igual tratamiento, sugiriendo que la isquemia hace ganar importancia al óxido nítrico para mantener la respuesta relajadora inducida con acetilcolina. Esta mayor importancia del óxido nítrico en las arterias isquémicas es apoyada por nuestro hallazgo de que la inhibición de la producción de óxido nítrico no produjo cambios en el efecto máximo del nitroprusiato sódico en arterias sanas pero sí que lo aumentó en las arterias isquémicas. Un resultado también equivalente se obtuvo al estudiar la contracción con endotelina-1, en la que el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico causó un aumento de la sensibilidad a la endotelina-1 en las arterias isquémicas pero no en las sanas. Estos hallazgos podrían interpretarse a la luz de que la isquemia/reperfusión estimula vías alternas de producción de óxido nítrico, particularmente la de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Shah y Billiar, 1998; Ozaki *et al*, 2002). Diversos investigadores han encontrado que la isquemia/reperfusión causa una disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (Khanna *et al*, 2000). Líneas atrás discutíamos que Sánchez *et al* (2006), usando nuestros mismos tiempos de isquemia/reperfusión en la arteria cerebral media de la cabra, encontraron disfunción endotelial dada por disminución en la capacidad

vasodilatadora, hecho que atribuyeron a un descenso de la biodisponibilidad de óxido nítrico, relacionado con una elevada producción de anión superóxido. El que nosotros hayamos encontrado un aumento de la biodisponibilidad podría explicarse porque los diferentes lechos vasculares presentan distintos tiempos para la expresión de enzimas productoras de óxido nítrico (Pacher *et al*, 2007).

Papel de los prostanoides: Como se dijo en la Introducción, los prostanoides pueden ser vasodilatadores, de los cuales el más importante es la prostaciclina, o vasoconstrictores, de los cuales el más importante es el tromboxano A<sub>2</sub>.

En nuestro estudio de vasodilatación con acetilcolina, cuando inhibimos la producción de prostanoides, las arterias isquémicas presentan un efecto máximo ligeramente menor que las arterias sanas, sugiriendo que las prostaglandinas vasodilatadoras no participan en la relajación colinérgica normal, pero sí lo hacen durante la isquemia. Esto es comparable a lo descrito por Tadros *et al* (2004) en la arteria hepática común del cerdo, en la cual la administración de prostaciclina parece no tener efectos benéficos en la perfusión hepática durante la fase más temprana del choque endotóxico, donde la disfunción endotelial podría estar todavía compensada, mientras que durante una fase avanzada del choque la prostaciclina exógena mejoró significativamente el flujo sanguíneo hepático y atenuó la hipertensión portal inducida por la sepsis.

En cuanto a la relajación no dependiente de endotelio, parece que los prostanoides no desempeñan papel alguno en la relajación de la arteria sana, pues la inhibición de la producción de prostanoides no produjo cambios en el efecto máximo ni en la sensibilidad al nitroprusiato sódico en las arterias no isquémicas. En cambio, el hecho de que el efecto máximo del nitroprusiato se haya acentuado ligeramente en las arterias isquémicas, podría sugerir que la isquemia causa un aumento de la actividad de los prostanoides vasoconstrictores.

Para precisar el papel de los prostanoïdes en la isquemia/reperfusi3n, en el estudio de la respuesta contr3ctil inducida con endotelina-1 usamos tres bloqueantes altamente especïficos de la cascada de la ciclooxigenasa: el TCP, inhibidor de la prostaciclina, el furegrelato, inhibidor de la sïntesis de tromboxano A2, y el SQ-29548, inhibidor del receptor del tromboxano A2 (ver figura 2). La aplicaci3n de TCP no caus3 diferencias significativas en el efecto m3ximo ni en la sensibilidad a la endotelina-1 de las arterias sanas o isqu3micas, lo cual descartarïa a la prostaciclina, potente vasodilatador, como una vïa importante en la respuesta contr3ctil a la endotelina-1.

En cambio, fue notable la disminuci3n del efecto m3ximo contr3ctil en arterias isqu3micas tratadas con el inhibidor de la sïntesis de tromboxano A2 o con el bloqueante del receptor de este tromboxano, sugiriendo que la respuesta contr3ctil a la endotelina-1 durante la isquemia es coadyuvada por el tromboxano A2. Esta propuesta se apoya tambi3n en el hecho de que en el estudio de relajaci3n realizamos la pre-contracci3n de las arterias con un an3logo del tromboxano, el U46619 ( $10^{-7}$  M), y obtuvimos un tono significativamente mayor en las arterias isqu3micas que en las sanas. Estos resultados en conjunto pueden explicarse por la actividad contr3ctil propia del tromboxano A2, pero adem3s por la inhibici3n que el tromboxano A2 hace sobre la expresi3n de la 3xido nïtrico sintasa inducible, acci3n que ha sido descrita en la aorta de ratones sometidos a sepsis (Yamada *et al*, 2003). Esta parte de nuestros resultados coincide con los de investigadores que, usando tiempos de isquemia/reperfusi3n similares a los nuestros, en la arteria cerebral media de la cabra (S3nchez *et al*, 2006) y en la coronaria de cerdo (Climent *et al*, 2006) encontraron un incremento en la producci3n de prostanoïdes vasoconstrictores.

Papel de los canales de potasio: Los canales de potasio sensibles al calcio participan en la vasodilataci3n, regulando la cantidad de calcio libre en el citosol y por ello causando relajaci3n del m3sculo liso vascular (Eckman y Nelson, 2001). La apertura de estos canales puede ser facilitada por el 3xido

nítrico (Eckman y Nelson, 2001) o por un factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Shimokawa y Morikawa, 2005). En nuestro estudio de vasodilatación, la aplicación de bloqueantes de estos canales redujo el efecto máximo de la acetilcolina y la sensibilidad al nitroprusiato de sodio en las arterias sanas. Esto sugiere que en la arteria mesentérica de la rata el óxido nítrico actúa normalmente, al menos en parte, a través de los canales de potasio.

En las arterias sometidas a isquemia/reperfusión, los bloqueantes redujeron la respuesta a la acetilcolina menos que en las sanas, y no redujeron la respuesta al nitroprusiato, sugiriendo que la actividad de los canales de potasio arteriales disminuye tras la isquemia, por lo podríamos proponer que los canales de potasio estudiados han sido lesionados por el evento isquémico. En este caso, un efecto de la isquemia/reperfusión sería que la mayor parte de la acción del óxido nítrico se realizaría a través de vías del GMP cíclico, diferentes a los canales de potasio, cuando las arterias son estimuladas con acetilcolina. Esta propuesta coincide con hallazgos de otros grupos que recientemente han observado que la administración de nitroglicerina, un donante de óxido nítrico, reduce el daño estructural y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en células intestinales de ratas sometidas a 30 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión, y que estos efectos protectores suceden a través de un cambio en la ponderación de diferentes vías dependientes del GMP cíclico (Li *et al*, 2009).

En la respuesta contráctil, el bloqueo de los canales de potasio disminuye el efecto máximo a la endotelina-1 en arterias isquémicas. Esto podría deberse a que la aplicación de estos bloqueantes induce *per se* una vasoconstricción de base que podría saturar la capacidad contráctil de la arteria. Dicha contracción de base es atribuible a la despolarización secundaria al cierre de los canales de potasio, y ocurrió sin diferencia en arterias sanas o isquémicas.



Nuestros resultados relativos a los canales de potasio coinciden con lo que han descrito diversos investigadores acerca de que existe una inadecuada regulación de la actividad de estos canales en situaciones patológicas como la diabetes mellitus, hecho atribuido al aumento del estrés oxidativo (particularmente la excesiva producción del anión superóxido) y que podría participar en la alteración vasomotora observada en estos pacientes (Liu y Gutterman, 2002). En tal caso, podríamos proponer que la isquemia/reperfusión altera la actividad de los canales de potasio vasculares de manera semejante a la observada en el paciente diabético, sugiriendo que pueden existir mecanismos fisiopatológicos similares en las dos situaciones.

Papel del peróxido de hidrógeno: Como se dijo en la Introducción, las arterias pueden conservar su capacidad dilatadora sirviéndose de un factor hiperpolarizante derivado del endotelio, EDHF. Uno de tales EDHF en arterias sanas de diversas especies es el peróxido de hidrógeno, especie reactiva del oxígeno que funciona a través de los canales de potasio induciendo hiperpolarización y vasodilatación (Marrelli, 2002; Shimokawa y Morikawa, 2005). En nuestro estudio de vasodilatación, la aplicación de catalasa, un catalizador de la degradación del peróxido de hidrógeno, disminuye la sensibilidad a la acetilcolina por igual en arterias isquémicas y en sanas, y disminuye ligeramente el efecto máximo relajador, también por igual, en estos dos tipos de arterias. Estos resultados son comparables a los de nuestro estudio de la respuesta contráctil, donde al aplicar el mismo catalizador de la destrucción de peróxido de hidrógeno se aumentó la sensibilidad a la endotelina-1 por igual en las arterias isquémicas y en las sanas.

Estos resultados en conjunto sugieren que, bajo nuestras condiciones experimentales, el peróxido de hidrógeno contribuye a la relajación de la arteria mesentérica superior de la rata, donde probablemente funciona como un EDHF que activa los canales de potasio junto con el óxido nítrico. Esta propuesta coincide con lo descrito por investigadores del peróxido de hidrógeno como

EDHF en diversos lechos vasculares, incluida la mesentérica superior, de especies diferentes a la rata (Shimokawa y Morikawa, 2005).

La aplicación de catalasa produjo un aumento del efecto máximo del nitroprusiato sódico en las arterias isquémicas, aumento que no fue observado en las arterias sanas, sugiriendo que el peróxido de hidrógeno puede ser también un mediador de la relajación no dependiente de endotelio en la arteria mesentérica que ha sido sometida a isquemia. Este efecto podría deberse a que el músculo liso isquémico presenta una sensibilización al peróxido de hidrógeno (Rodríguez-Martínez *et al*, 1998) similar a la que presenta al GMPc (Gupta *et al*, 2008), hechos sugestivos de que el óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno comparten mecanismos de acción en la relajación arterial normal e isquémica.

Papel del anión superóxido: El anión superóxido es una especie reactiva de oxígeno que ha sido implicada en la disfunción endotelial, pues disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico, y que es catabolizada por la enzima superóxido dismutasa (Katusic, 1996; Li y Jackson, 2002; Salvemini y Cuzzocrea, 2003).

En nuestro estudio, la aplicación de un bloqueante de la superóxido dismutasa redujo la relajación a la acetilcolina, y aumentó el efecto máximo contráctil de la endotelina-1, en las arterias sanas pero no en las isquémicas. Estos resultados sugieren que la enzima superóxido dismutasa está más activa en la arteria mesentérica sana que en la isquémica, motivo por el cual su bloqueo se manifiesta en las arterias sanas mientras que en las isquémicas sólo mostró una tendencia que no alcanzó a ser significativa. La disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa secundaria a isquemia/reperfusión ha sido descrita en lechos vasculares de animales (Bertuglia y Giusti, 2003) y humanos (Shimokawa y Morikawa, 2005). Esta disminución de actividad enzimática conduciría a acumulación de anión superóxido y en consecuencia a estrés oxidativo. Así las cosas, se podría proponer que este estrés explica la probable

lesión de los canales de potasio que observamos en la arteria mesentérica de la rata sometida a isquemia/reperfusión.

Hemos discutido que algunos investigadores, aplicando los mismos tiempos de isquemia/reperfusión que los usados en el presente trabajo, han involucrado al anión superóxido en alteraciones de la reactividad arterial en lechos como la arteria cerebral media de cabra (Sanchez *et al*, 2006) o arterias del músculo trapecio de la rata (Tsing, 2002). Estos investigadores han descrito que la remoción de especies reactivas del oxígeno, particularmente el anión superóxido, promueve la recuperación de la capacidad relajadora a modo de reversión de la disfunción endotelial.

Por otra parte, en la relajación no dependiente de endotelio la aplicación del inhibidor de la superóxido dismutasa hizo disminuir la sensibilidad al nitroprusiato en las arterias isquémicas pero no en las sanas, sugiriendo que el estrés oxidativo, y en este caso particularmente la acumulación de anión superóxido y la depleción de peróxido de hidrógeno, lesionan la capacidad de relajación del músculo liso. Esto se explicaría también porque el nitroprusiato de sodio, además de donar óxido nítrico, produce radicales libres directamente en el músculo liso vascular (Ramakrishna y Cederbaum, 1996), disminuyendo más la respuesta en las arterias isquémicas que en las sanas.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la endotelina-1 y el tromboxano A<sub>2</sub> intervienen en el vasoespasmo secundario a la isquemia/reperfusión mesentérica que se mencionó en la Introducción. En ese caso, y aunque estos resultados en vasos grandes no son directamente extrapolables a la respuesta arteriolar, podría sugerirse que el uso de un antagonista del receptor ET<sub>A</sub> de la endotelina o de bloqueantes del tromboxano A<sub>2</sub> sería útil en la prevención o corrección de la hipertonia vascular post-isquémica, el llamado fenómeno de no reflujo.

Nuestros resultados también sugieren que la lesión principal inducida por la isquemia/reperfusión, bajo nuestras condiciones experimentales, sucede sobre los canales de potasio, y que esta lesión parece ser causada por estrés oxidativo, mediado en gran parte por el anión superóxido. Según nuestros resultados, esta lesión es compensada en la célula endotelial aumentando la actividad del óxido nítrico (el cual probablemente estaría actuando a través de vías del GMPc alternas a los canales de potasio) y por el aumento de actividad de los prostanoïdes vasodilatadores. Es probable que mayores tiempos de isquemia/reperfusión limiten esa compensación y hagan evidente la disfunción de la arteria mesentérica.

Como se dijo en la Introducción, una de las opciones de tratamiento de la isquemia mesentérica aguda y crónica es la reimplantación de vasos mesentéricos en la aorta adyacente a las arterias obstruidas, y la colocación de injertos venosos o protésicos (Bingol *et al*, 2004; Schoots *et al*, 2005). Nuestros hallazgos muestran que los tiempos de isquemia/reperfusión aplicados en este trabajo estarían probablemente entre los tiempos límite que puede durar la arteria mesentérica antes de ser transplantada. Después de este lapso, el clínico deberá tener en mente que se incrementa la probabilidad de que los mecanismos compensadores arteriales sean rebasados, hasta el punto de que se instaure una disfunción endotelial que prolongaría fenómenos indeseables como el de no-reflujo, y además podría “contagiar”, localmente o a distancia, tal disfunción a otras arterias.

Entre los trabajos futuros estaría medir la expresión, en la arteria mesentérica, de las enzimas óxido nítrico sintasa endotelial e inducible y ciclooxigenasa, y de receptores de la endotelina, por ejemplo usando Western Blot. Además, dado que no podemos asimilar directamente los resultados de nuestro experimento a un estado de bajo flujo como el debido a un choque cardiovascular de diversa etiología, sería interesante hacer nuestros análisis en experimentos que no detengan completamente el flujo sanguíneo, como en

modelos de hemorragia o sepsis que reproducen muy bien los estados de bajo flujo (Rixen y Neugebauer, 2004).

## **RESUMEN Y CONCLUSIONES**

La isquemia/reperfusión mesentérica es una situación clínica poco frecuente pero se asocia con una elevada mortalidad. Se sabe que esta situación produce disfunción endotelial, pero aún no se conoce con detalle esta disfunción ni los mecanismos implicados. El presente estudio se realizó para examinar los efectos de la isquemia/reperfusión en la vasodilatación y en la vasoconstricción dependientes de endotelio en la arteria mesentérica superior. La isquemia/reperfusión se produjo en ratas macho adultas, pinzando dicha arteria durante 60 minutos y luego liberándola por 60 minutos. Se montaron segmentos de esta arteria en un baño de órganos para registrar la respuesta vascular, obteniendo los siguientes **resultados**:

1. La acetilcolina y el nitroprusiato sódico produjeron relajación que fue igual en las arterias isquémicas y en las sanas.
2. La relajación a la acetilcolina fue reducida por el L-NAME, inhibidor de la síntesis del óxido nítrico, más en las arterias isquémicas que en las sanas; por el meclofenamato, inhibidor de la producción de prostanoïdes, en arterias isquémicas pero no en las sanas; y por los bloqueantes de los canales de potasio, caribdotoxina+apamina, en arterias sanas más que en las isquémicas.
3. La relajación a la acetilcolina fue reducida por la catalasa, un catalizador de la degradación del peróxido de hidrógeno, por igual en arterias sanas e isquémicas, y por el DETCA, inhibidor de la superóxido dismutasa, en las arterias sanas pero no en las isquémicas.
4. La relajación al nitroprusiato fue reducida por los bloqueantes de los canales de potasio en las arterias sanas pero no en las isquémicas; y fue aumentada por el inhibidor de la producción de óxido nítrico, por el inhibidor de la producción de prostanoïdes y por el inhibidor de la producción del peróxido de hidrógeno en las isquémicas pero no en las sanas.
5. La contracción a la endotelina-1 y al U-46619, análogo del tromboxano A<sub>2</sub>, fue mayor en las arterias isquémicas que las sanas.
6. La contracción a la endotelina-1 fue reducida por el BQ-123, antagonista del receptor ET<sub>A</sub> de la endotelina, en ambos tipos de arterias, y aumentada por

el BQ-788, antagonista del receptor  $ET_B$  de la endotelina, en las arterias sanas pero no en las isquémicas.

7. La contracción a la endotelina-1 fue aumentada por el L-NAME, inhibidor de la síntesis del óxido nítrico, en las arterias isquémicas pero no en las sanas, y fue reducida por los bloqueantes de los canales de potasio, en arterias isquémicas pero no en las sanas.
8. La contracción a la endotelina-1 fue reducida por el furegrelato, inhibidor de la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, y por el SQ-29548, inhibidor del receptor del tromboxano A<sub>2</sub>, en arterias isquémicas pero no en las sanas, y no fue modificada por el TCP, inhibidor de la prostaciclina.
9. La contracción a la endotelina-1 fue aumentada por la catalasa, catalizador de la degradación del peróxido de hidrógeno, por igual en arterias isquémicas y en sanas, y por el DETCA, inhibidor de la superóxido dismutasa, en arterias sanas pero no en las isquémicas.

Estos resultados nos permiten llegar a las siguientes **conclusiones**:

Tras una isquemia de 60 minutos y una reperusión de 60 minutos, en el lecho vascular mesentérico:

1. La vasodilatación dependiente de endotelio a la acetilcolina está conservada, con aumento de la actividad del óxido nítrico y de la prostaciclina, y disminución de actividad de los canales de potasio.
2. La contracción a la endotelina está aumentada por una disminución en la actividad de los receptores  $ET_B$  endoteliales, y por un aumento de actividad del tromboxano A<sub>2</sub>.
3. La actividad de la enzima superóxido dismutasa está disminuida, y el papel vasodilatador del peróxido de hidrógeno no está modificado.
4. Lo enumerado sugiere que, tras 60 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperusión, existe disfunción endotelial en la arteria mesentérica superior de la rata, secundaria a estrés oxidativo. Esta disfunción está compensada en la relajación colinérgica, pero produce aumento de la respuesta contráctil a la endotelina-1 y al tromboxano A<sub>2</sub>.



Este aumento de la respuesta contráctil puede participar en la fisiopatología de la isquemia/reperfusión mesentérica, dificultando la recuperación del flujo sanguíneo en el área afectada. Por tal motivo, el tratamiento de este vasoespasmo se beneficiaría con el uso de antagonistas del receptor ET<sub>A</sub> de la endotelina, de bloqueantes del tromboxano A<sub>2</sub> y de la eliminación del radical superóxido.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Adachi T, Togashi H, Suzuki A, et al. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2005; 41: 1272-1281

Agapitov A, Haynes W. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2002; 3: 1-15

Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition*. 1998; 14: 376-390

American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Guidelines in Intestinal Ischemia. *Gastroenterology*. 2000; 118: 951-953

Anderson T. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail. Rev*. 2003; 8: 71-86

Banda M, Lefer D, Granger D. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice. *Am. J. Physiol*. 1997; 273: 2721-2725

Bauer C, Walcher F, Kalweit U, Larsen R, Marzi I. Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J. Hepatology*. 1997; 27: 1089-1095

Bauer V, Matyas S, Stolc S, Sotníková R, Nosalova V. (2002): Pathophysiology and pharmacology of reactive oxygen species (ROS). Reactive oxygen species as mediators of tissue injury, diseases and their pharmacology. <http://www.bps.ac.uk/epharnet/ros.ppt>

Bertuglia S, Giusti A, Del Soldato P. Antioxidant activity of a nitro derivative of aspirin against ischemia-reperfusion in hamster cheek pouch microcirculation. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol*. 2004; 286: 437-443

Bertuglia S, Giusti A. Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 2003; 285: 1064-1071

Bingol H, Zeybek N, Cingoz F, et al. Surgical therapy for acute superior mesenteric artery embolism. *Am J Surg.* 2004; 188: 68-70

Blanco-Rivero J, Márquez-Rodas I, Xavier F, Aras-López R, Arroyo-Villa I, Ferrer M, Balfagón G. Long-term fenofibrate treatment impairs endothelium-dependent dilation to acetylcholine by altering the cyclooxygenase pathway. *Cardiovasc Res.* 2007; 75: 398-407

Bonilla J, Narvaez-Sanchez R, Chuaira L. Sports as a cause of oxidative stress and hemolysis. *Colomb. Med.* 2005; 36: 275-280

Bruce J, Taggart M, Austin C. Contractile responses of isolated rat mesenteric arteries to acute episodes of severe hypoxia and subsequent reoxygenation. *Microvascular Research.* 2004; 68: 303-312

Buttemeyer R, Philipp A, Mall J, Ge B, Scheller F, Lisdat F. In vivo measurement of oxygen-derived free radicals during reperfusion injury. *Microsurgery.* 2002; 22: 108-113

Cai H, Harrison D. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000; 87: 840-844

Cerqueira N, Hussni C, Yoshida W. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2005; 20: 336-343

Chang R, Chang J, Longo W. Update in management of mesenteric ischemia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3243-3247

Chen G, Kelly C, Chen H, Leahy A, Bouchier-Hayes D. Thermotolerance preserves endothelial vasomotor function during ischemia/reperfusion. *J. Surg. Res.* 2000; 94: 13-17

Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Wiewrodt R, et al. PECAM-directed delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2003; 285: 283-292

Clark K, Harrington J. Effect of the prostacyclin synthetase inhibitor tranylcypromine on uterine blood flow in pregnancy. *Prostaglandins.* 1982; 23: 227-236

Dagassan P, Breu V, Clozel M et al. Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996; 27: 147-160

Daut J, Maier-Rudolph W, von Beckerath N, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science.* 1990; 247: 2341– 2344

Derikx J, Matthijsen R, de Bruine A, et al. Rapid reversal of human intestinal ischemia-reperfusion induced damage by shedding of injured enterocytes and reepithelialisation. *PLoS ONE* 2008; 3: 1-8

Doglio G, Pusajo J, Egurrola M, et al. Gastric mucosal pH as a prognostic index of mortality in critically ill patients. *Critical Care Medicine.* 1991; 19: 1037-1040

Douglas S, James S, Robin C. Endothelial modulation and changes in endothelin pressor activity during hypoxia in the rat isolated perfused superior mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 103: 1441-1448

Eckman D, Nelson M. Potassium ions as vasodilators: role of inward rectifier potassium channels. *Circ. Res.* 2001; 88: 132-133

Emre A, Bayram O, Salman B, Ercan S, Anadol Z, Akin O. Sodium nitroprusside as a nitric oxide donor in a rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Clinics.* 2008; 63: 91-96

Endemann D, Schiffrin E. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1983–1992

Erbs S, Gielen S, Linke A et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by acute vitamin C application: different effects in patients with coronary artery disease, ischemic, and dilated cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 2003; 146: 280-285

Ferrero E, Lavalde M, Fernandez N et al. Response to endothelin-1 in arteries from human colorectal tumours: role of endothelin receptors. *Experimental Biology and Medicine.* 2008; 233: 1480-1481

Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1994; 113: 336–338

Garcia-Villalon A, Monge L, Fernandez N, Salcedo A, Narvaez-Sanchez R, Dieguez G. Coronary response to diadenosine pentaphosphate after ischaemia—reperfusion in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res.* 2009; 81: 336-342

Gonzalez C, Villanueva C, Othman S, Narvaez-Sanchez R, Sacristan E. Impedance spectroscopy for monitoring ischemic injury in the intestinal mucosa. *Physiol. Meas.* 2003; 24: 277–289

Griendling K, Fitzgerald G. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003; 108: 1912-1916

Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000; 86: 494-501

Guide for laboratory animals care and use. NIH Publication No. 85-23, revised 1996

Gupta P, Subramani J, Singh T, et al. Role of protein kinase G in nitric oxide deficiency-induced supersensitivity to nitrovasodilator in rat pulmonary artery *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 2008; 51: 450-456

Hadi A, Carr C, Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular Health and Risk Management*. 2005; 1: 183–198

Haklar G, Ulukaya-Durakbasa C, Yuksel M, Dagli T, Yalcin A. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1998; 25: 908-912

Hayward R, Lefer A. Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol*. 1998; 275: 2080-2086

Higuchi S, Wu R, Zhou M, Marini C, Ravikumar T, Wang P. Gut hyperpermeability after ischemia and reperfusion: attenuation with adrenomedullin and its binding protein treatment. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008; 1(5): 409–418

Hua C, Harrison D. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000; 87: 840-844

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; 86, 2863.

Johnson R, Nidy E, Aiken J, et al. Thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitors. 5-(3-pyridylmethyl)benzofuran-2-carboxylic acids. *J Med Chem* 1986; 29: 1461-1468

Kaku T, Jiang M, Hada J, Morimoto K, Hayashi Y. Sodium nitroprusside-induced seizures and adenosine release in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 413: 199–205

Katusic, Z. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic. Biol. Med*. 1996; 20: 443–448.

Khanna A, Rossman J, Fung H, Caty M. Attenuated nitric oxide synthase activity and protein expression accompany intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000; 269: 160–164

Kim K, Takeda K, Sethi R et al. Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1. *J. Clin. Invest*. 1998; 101: 1821-1826

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species; pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999; 43: 562-571

Koksoy C, Uydes-Dogan B, Kuzu M, Aydemir-Koksoy A, Demirpence E, Kesenci M. Effects of intestinal ischemia-reperfusion on major conduit arteries. *J. Invest. Surg*. 2000; 13: 35-43

Koshita M, Hidaka K, Ueno H, Yamamoto Y, Suzuki H. Properties of acetylcholine-induced hyperpolarization in smooth muscle cells of the mouse mesenteric artery. *J. Smooth Muscle Res*. 2007; 43: 219-227

Kozower B, Christofidou-Solomidou M, Sweitzer T et al. Immunotargeting of catalase to the pulmonary endothelium alleviates oxidative stress and reduces acute lung transplantation injury. *Nat. Biotechnol*. 2003; 21: 392-398

Krause D. Endothelial regulation. En Edvinsson L, Krause D, "Cerebral blood flow and metabolism" 2nd ed., Chapter 6. Ed. Lippincott. Philadelphia, 2002

Lee J, Drinkwater D, Laks H et al. Preservation of endothelium-dependent vasodilation with low-potassium University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996; 112: 103-110

Li C, Jackson R. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol*. 2002; 282: 227-241



Li J, Zhang M, Yang C, Dun Y, Zhang Y, Hao Y. Nitroglycerin protects small intestine from ischemia-reperfusion injury via NO-cGMP pathway and upregulation of alpha-CGRP. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13: 478-485

Linke A, Recchia F, Zhang X, Hintze T. Acute and chronic endothelial dysfunction: implications for the development of heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2003; 8: 87-97

Liu Y, Gutterman D. The coronary circulation in diabetes: influence of reactive oxygen species on K<sup>+</sup> channel-mediated vasodilation. *Vascul Pharmacol.* 2002; 38: 43-49

Makimattila S., Yki-Jarvinen H. Endothelial dysfunction in human diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2002; 2: 26-36

Marrelli S. Altered endothelial Ca<sup>2+</sup> regulation after ischemia/reperfusion produces potentiated endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations. *Stroke* 2002; 33: 2285-2291

Marston A, Clarke J, García J, Miller A. Intestinal function and intestinal blood supply. *Gut* 1985; 26: 656-666

Martinez-Revelles S, Jiménez-Altayó F, Caracuel L, Pérez-Asensio F, Planas A, Vila E. Endothelial dysfunction in rat mesenteric resistance artery after transient middle cerebral artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325: 363-369

Martorell A, Blanco-Rivero J, Aras-López R, Sagredo A, Balfagón G, Ferrer M. Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovasc Res.* 2008; 77: 590-599

Masini E, Cuzzocrea S, Mazzon E, et al. Protective effects of relaxin in ischemia/reperfusion-induced intestinal injury due to splanchnic artery occlusion. *Br J Pharmacol.* 2006; 148: 1124–1132

Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 909–913

Mickley E, Gray G, Webb D. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 1997; 120:1376–1382

Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, et al. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1871–1879

Nakae I, Matsumoto T, Omura T et al. Endothelial modulation and tolerance development in the vasorelaxant responses to nitrate of rabbit aorta. *Life Sci.* 2003; 73: 3083-3094

Narváez-Sánchez R, Chuaire L, Sánchez M, Bonilla J. Circulación intestinal: Su organización, control y papel en el paciente crítico. *Colomb Med.* 2004; 35: 231-244

Nilsson D, Gustafsson L, Wackenfors A, et al. Up-regulation of endothelin type B receptors in the human internal mammary artery in culture is dependent on protein kinase C and mitogen-activated kinase signaling pathways. *BMC Cardiovasc Disord.* 2008; 8: 21-31

Ogletree M, Harris D, Greenberg R, et al. Pharmacological actions of SQ-29,548, a novel selective thromboxane antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 234: 435-441

Omar H, Cherry P, Mortelliti M, Burke-Wolin T, Wolin M. Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circulation Research.* 1991; 69: 601-608

Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1335–1344

Pacher P, Beckman J, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315–424

Page N. The endocrinology of pre-eclampsia. *Clin. Endocrinol.* 2002; 57: 413-423

Pagliari P, Chiribiri A, Mancardi D, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G. Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion and its prevention by ischemic preconditioning. *Ital. Heart J.* 2003; 4; 383-394

Pearlstein D, Ali M, Mungai P, Hynes K, Gewertz B, Schumacker P. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 566-573

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* 2001; 104: 191-196

Ramakrishna D, Cederbaum A. Generation of reactive oxygen species by the redox cycling of nitroprusside. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 2: 195-202

Rees D, Palmer R, Schulz R, Hodson H, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990; 101: 746–752

Rixen D, Neugebauer E. Changing paradigms in animal models of traumatic/hemorrhagic shock: a critical appraisal. *Eur J Trauma.* 2004; 30: 279-288

Rodriguez-Martinez M, Garcia-Cohen E, Baena A, Gonzalez R, Salaces M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 1329-1335

Rosario H, Waldo S, Becker S, Schmid-Schönbein G. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1707–1716

Rosenblum W, Wormley B. Selective depression of endothelium-dependent dilations during cerebral ischemia. *Stroke.* 1995; 26: 1877-1882

Rosenblum W. Selective Impairment of Response to Acetylcholine After Ischemia/Reperfusion in Mice. *Stroke.* 1997; 28: 448-451

Salcedo A, Fernández N, García-Villalón A, Monge L, Narváez-Sánchez R, Diéguez G. Role of angiotensin II in the response to endothelin-1 of goat cerebral arteries after ischemia–reperfusion. *Vascular pharmacology.* 2009; 50: 160-165

Salvemini D, Cuzzocrea S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 29-38

Sanchez A, Fernandez N, Monge L et al. Goat cerebrovascular reactivity to ADP after ischemia-reperfusion. Role of nitric oxide, prostanoids and reactive oxygen species. *Brain research.* 2006; 1120: 114-123

Schachinger V, Britten M, Zeiher A. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000; 101: 1899-1906

Schoots I, Levi M, Reekers J. Thrombolytic therapy for acute superior mesenteric artery occlusion. *J Vasc Interv Radiol.* 2005; 16: 317-329

Shah N, Billiar T. Role of nitric oxide in inflammation and tissue injury during endotoxemia and hemorrhagic shock. *Environ Health Perspect.* 1998; 106: 1139–1143

Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005; 39: 725–732

Simonsen U, Prieto D, Saenz de Tejada I, Garcia-Sacristan A. Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K<sup>+</sup>-channels. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 116: 2582-2590

Somlyo A. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-236

Sotníková R, Okruhlicová L, Noskovic P. Endothelial protective effect of stobadine on ischaemia/reperfusion-induced injury. *Gen. Physiol. Biophys.* 1998; 17: 253-264

Souza D, Mendonça V, Saete M, Poole S, Teixeira M. Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*. 2002; 135: 303–312

Squadrito F, Altavilla D, Ammendolia L, et al. Improved survival and reversal of endothelial dysfunction by the 21-aminosteroid, U-74389G in splanchnic ischaemia-reperfusion injury in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 115: 395-400

Squadrito F, Altavilla D, Canale P, et al. Contribution of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) to the pathogenesis of splanchnic artery occlusion shock in the rat. *Br. J. Pharmacol*. 1994; 113: 912-916

Stenman E, Malmsjö M, Uddman E, Gidö G, Wieloch T, Edvinsson L. Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ETB receptors in rat. *Stroke*. 2002; 33: 2311-2316

Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefer-Szersen N. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Med Sci Monit*. 2002; 8: 419-424

Taddei S, Salvetti A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *J. Hypertens.* 2002; 20: 1671-1674

Tadros T, Traber D, Herndon D. Opposite effects of prostacyclin on hepatic blood flow and oxygen consumption after burn and sepsis. *Ann Surg.* 2004; 239: 67-74

Taniyama Y, Griendling K. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42: 1075-1081

Terada L. Hypoxia-reoxygenation increases O<sub>2</sub><sup>-</sup> efflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 1996; 270: 945-950

Townsend P, Davidson S, Clarke S, et al. Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly, by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: 928-938

Tsao P, Aoki N, Lefer D, Johnson G, Lefer A. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation.* 1990; 82: 1402-1412

Tsing H. A study on therapeutic effect of glibenclamide and tiron recovering vasoreactivity in severe hemorrhagic shock in rats. *Chinese Journal of Traumatology*, 2002; 10: 633-640

Vanden Hoek T, Li C, Shao Z, Schumacker P, Becker L. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1997; 29: 2571-2583

Victorino G, Ramirez R, Chong T, Curran B, Sadjadi J. Ischemia-reperfusion injury in rats affects hydraulic conductivity in two phases that are temporally and mechanistically separate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295: 164-171

Wackenfors A, Emilson M, Ingemansson R et al. Ischemic heart disease induces upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries. *Eur J Pharmacol.* 2004; 484: 103-109

White L, Leseth K, Moller S, et al. Interleukin-1beta potentiates endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in cultured segments of human temporal artery. *Regul. Pept.* 1999; 81: 89-95

Wiest R, Groszman R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology.* 2002; 35: 478-491

Witzigmann H, Ludwig S, Armann B, et al. Endothelin A receptor blockade reduces ischemia/reperfusion injury in pig pancreas transplantation. *Ann Surg.* 2003; 238: 264-274

Yamada T, Fujino T, Yuhki K, et al. Thromboxane A2 regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003; 108: 2381-2386

Yanisagawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415

Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today.* 2005; 35: 185-195

Zweier J, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D, Luty G. Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1994; 266: 700-708