

# Flujo mesentérico en un modelo experimental de enterocolitis necrotizante por isquemia - reperfusión en ratas

Freud Cáceres Aucatoma

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**  
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Obstetricia i Ginecología, Pediatría,  
Radiología i Anatomía

**FLUJO MESENTÉRICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE  
ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE POR ISQUEMIA -  
REPERFUSIÓN EN RATAS**

**TESIS DOCTORAL**

Autor: D. Freud Cáceres Aucatoma

Directores:

Prof. Dr. D. Luis Morales Fochs

Dra. D<sup>a</sup>. Montserrat Castañón García-Alix



A Jorge, Tamara, Pavlov, Jorge Luis,  
Andrea y Amelia

A mi familia argentina, Lereña Rodríguez

A mi familia europea, Anna van Nouhuys  
y Pitu Buxo



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Montserrat Castanón García-Alix, Jefa de la Unidad de Neonatos del Servicio de Ciurgía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, directora de esta tesis por sus sabias orientaciones y apoyo incondicional.

Al Profesor Dr. Luis Antonio Morales Fochs, Catedrático de Pediatría, Ex Jefe del Servicio de Ciurgía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, director de esta tesis por creer un mi proyecto académico y formativo.

A la Dra. Victoria Cusi Sánchez, Jefa del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Sant Joan de Déu, por concederme su tiempo y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Joan Rodó Salas, Jefe de la Unidad de Urología del Servicio de Ciurgía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por sus oportunos consejos, confianza y amistad depositada en mi persona.

Al Maestro Dr. Albert Montaner Brunat, Adjunto Señor del Servicio de Ciurgía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por su amistad y guía durante todo mi proceso de formación.

Al Dr. José María Ribó Cruz, Jefe del Servicio de Ciurgía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por su apoyo y confianza dirigida en mi persona.

Al Dr. Joaquín Badosa Pagès, Jefe de Sección del Servicio de Diagnóstico por la Imagen del Hospital Sant Joan de Déu, por compartir su tiempo y sus conocimientos.

Al Antoni Capdevila Cirera, Director de Servicio Diagnóstico por la Imagen del Hospital Sant Pau, Ex Jefe del Servicio de Diagnóstico por la Imagen del Hospital Sant Joan de Déu, por creer que este proyecto era posible.

A la Sra. Isabel Salas Navas y Srta. Ana Clavero Mateo, personal del Estabulario del Hospital Sant Joan de Déu, por su guía durante toda la fase experimental del proyecto.

Al Sr. José Martínez, del equipo técnico de Siemens – Barcelona, por su ayuda a poner a punto la tecnología durante la fase experimental.

Al Departamento de Medicina Materno Fetal del Hospital Universitario Clinic de Barcelona y al Dr. Rogelio Cruz-Martínez, por su ayuda desinteresada durante la fase experimental del proyecto.

Al Sr. Bienvenido Santamaría, Técnico del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Sant Joan de Déu, por su gran trabajo en el procesamiento de las muestras.

Al Dr. Francisco Parri Fernández, Adjunto Señor de la Unidad de Cirugía Plástica y Reconstructiva del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por hacerme ver la importancia de elaborar un trabajo doctoral.

Al Dr. Javier Lerana Rodríguez, por su amistad y consejos útiles a lo largo de todo el proceso de la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Yamile Zabana Abdo, Médica Adjunta del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Máster en Metodología de la Investigación: Diseño y Estadística en Ciencias de la Salud por su ayuda en la edición y aporte técnico.

A la Dra. Rosalía Carrasco, Adjunta de la Unidad de Oncología del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por su apoyo inicial en el desarrollo del proyecto de tesis.

A la Dra. Margarita Vancells Garrido, Adjunta de la Unidad de Oncología Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por su cariño y tener un momento para escuchar.

Al personal de la Biblioteca de la Escuela Universitaria de Enfermería Sant Joan de Déu y al equipo de enfermería del Bloque Quirúrgico Infantil Hospital Sant Joan de Déu, por su ayuda.

***“El genio se compone del dos por ciento de talento y  
noventa y ocho por ciento de perseverante aplicación”***

Ludwing Van Beethoven



Indice

# **INDICE**

## Indice

## **INDICE**

<b>1. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Enterocolitis necrotizante.....</b>	<b>25</b>
2.1.1. Antecedentes históricos .....	25
2.1.2. Epidemiología y factores de riesgo .....	25
2.1.3. Etiología y Patogénesis.....	28
- Mecanismo de Hipoxia-Isquemia .....	29
- Inmadurez del Sistema defensivo local del tracto gastrointestinal .....	29
- Alteraciones del ecosistema intestinal y rol de la alimentación enteral ..	38
2.1.4. Modelos animales y Enterocolitis Necrotizante (ECN) .....	39
- Modelo de isquemia-reperfusión .....	40
- Modelo basado en la administración de mediadores de la inflamación: ..	42
- Modelos basados en la administración de nutrientes enterales .....	42
2.1.5. Anatomía patológica .....	45
2.1.6. Diagnóstico.....	46
- Manifestaciones clínicas .....	47
- Exploraciones complementarias .....	47
2.1.7. Terapéutica, prevención y pronóstico .....	54
<b>2.2. Flujo Mesentérico.....</b>	<b>65</b>
2.2.1. Anatomía del flujo sanguíneo abdominal de la rata .....	65
2.2.2. Anatomía y fisiología del flujo sanguíneo abdominal en humanos ....	68
<b>2.3. Ecografía Doppler abdominal .....</b>	<b>74</b>

## Indice

2.3.1. Generalidades .....	74
2.3.2. Ecografía Doppler: aplicación clínica .....	80
-Experiencia en obstetricia.....	80
-Ecografía Doppler prenatal y ECN .....	81
-Ecografía Doppler postnatal y ECN .....	83
2.3.3. Uso de la ecografía en modelos animales .....	87
-Estudios Doppler sobre la arteria mesentérica superior en rata .....	88
-Estudio Ecografico Doppler e histológico en modelos de ECN.....	89
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>91</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>95</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>99</b>
<b>5.1. Animales de experimentación .....</b>	<b>101</b>
5.1.1. Modelo de Isquemia-Reperusión: ECN .....	102
-Ecografía adaptada al modelo experimental .....	105
<b>5.2. Diseño experimental .....</b>	<b>108</b>
<b>5.3. Estudio de Ecografía Doppler Color .....</b>	<b>109</b>
<b>5.4. Estudio de Anatomía Patológica .....</b>	<b>114</b>
5.4.1. Estudio macroscópico .....	114
5.4.2. Estudio microscópico.....	114
<b>5.5. Estudio estadístico .....</b>	<b>119</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>121</b>
<b>6.1. Resultados del flujo de la arteria mesentérica superior .....</b>	<b>123</b>
<b>6.2. Resultados de Anatomía Patológica.....</b>	<b>130</b>

6.2.1. Resultados Macroscópicos:.....	130
6.2.2. Resultados Microscópicos:.....	133
6.2.3. Otros criterios microscópicos .....	142
<b>6.3. Estudio de Correlación: Ecografía y Anatomía Patológica .....</b>	<b>158</b>
<b>6.4. Estudio de Regresión: Ecografía y Anatomía Patológica .....</b>	<b>164</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>175</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>197</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>201</b>

## Indice

# 1. JUSTIFICACIÓN

## Justificación

## Justificación

La enterocolitis necrotizante (ECN) es una enfermedad digestiva neonatal grave, multifactorial y de etiología diversa, caracterizada por inflamación e isquemia del intestino delgado y colon que progresa hacia la necrosis transmural y perforación. La prevalencia se sitúa alrededor de uno a tres por cada mil recién nacidos vivos siendo mayor en prematuros con un peso inferior a 1500 gramos (g), es decir de muy bajo peso al nacer (MBPN).

Numerosos factores han sido implicados en su etiopatogenia, entre los que destacan: 1) lesión hipóxica-isquémica, 2) inmadurez del sistema inmunitario del tracto digestivo, 3) alteraciones del ecosistema intestinal y rol de la alimentación enteral y, 4) ciertos polimorfismo genéticos. La circulación intestinal neonatal tolera muy mal la hipoxemia y la reperfusión lesionando el endotelio, lo que ocasiona un desequilibrio entre algunos factores vasoactivos como óxido nítrico, interleuquinas, factores de crecimiento, leucotrienos y péptidos de cadena trefoil, los mismos que son esenciales para el mantenimiento de las condiciones hemodinámicas intestinales.

Clínicamente se presenta esta patología con distensión abdominal, intolerancia a la alimentación y signos de sépsis. El íleon y el colon son los tramos del intestino más frecuentemente afectados. El espectro de lesiones va desde el despegamiento epitelial y el edema submucoso hasta la denudación de las velosidades y la necrosis transmural. La perforación del intestino suele ocurrir en un 12%-31% de los pacientes, que predispone a un incremento de la mortalidad en un rango del 30% al 64%. Entre las complicaciones tardías, las más graves son el síndrome de intestino corto y la estenosis intestinal.

La radiografía abdominal es el método estandar de monitorización y detección de la ECN. En las unidades neonatales la presencia de pneumatosis intestinal en una

## Justificación

radiografía nos sugiere que estamos frente a una ECN, sin ser un hallazgo específico. Quizás el pneumoperitoneo es un signo más concluyente y aceptado universalmente para indicar la cirugía. A pesar de este hallazgo radiológico habitual, no siempre está presente en todos los estudios de imagen de los neonatos que han sufrido una necrosis o perforación intestinal. Sin embargo la prevención y el diagnóstico oportuno de la ECN para optar por un tratamiento médico o quirúrgico nos llevan a profundizar en desarrollar de nuevas herramientas diagnósticas con un tinte pronóstico como la ecografía Doppler color.

Sabemos que la ecografía no es una prueba de rutina usada en el diagnóstico de la ECN, pero su práctica limitada a ciertos estudios en pacientes y en modelos de experimentación animal nos anima a investigar y desarrollar el potencial de la ecografía y del Doppler color.

El objetivo del proyecto de investigación es estudiar el valor pronóstico del flujo mesentérico utilizando la Ecografía Doppler en un modelo experimental de ECN y correlacionarlo con hallazgos histológicos: macroscópicos y microscópicos.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## Introducción

## **2.1. ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE**

## **2.2. FLUJO MESENTÉRICO**

## **2.3. ECOGRAFÍA DOPPLER ABDOMINAL**

## Introducción

## **2.1. Enterocolitis necrotizante**

### **2.1.1. Antecedentes históricos**

La enterocolitis necrotizante (ECN) es una de la más enigmáticas enfermedades intestinales del periodo neonatal y pediátrico <sup>1</sup>. Paltauf en 1888 y Generisch en 1891, fueron los primeros en describir casos de esta entidad <sup>2, 3</sup>, pero el término conocido como “enterocolitis necrotizante” fue empleado en 1953 por Schmid y Quaiser <sup>4</sup>. La primera descripción de un caso tratado con éxito fue realizada en 1943 por Agerty: un recién nacido de 35 semanas de gestación presentaba una perforación ileal que fue tratada con sutura primaria <sup>3</sup>.

Esta enfermedad fue considerada en su inicio como ideopática y se reproduce exclusivamente en neonatos, Brendon en 1964 la describió como un síndrome de origen multifactorial <sup>5</sup>. La patogenia de la ECN no esta clara aún a pesar de los avances diagnósticos pre y post natales. Bell en 1978 apporto criterios clínicos y radiológicos que fueron modificados en 1986 por Walsh y Kliegman para definir pronóstico y terapéutica siendo utilizados hasta la actualidad <sup>6,7</sup>.

### **2.1.2. Epidemiología y factores de riesgo**

La incidencia de ECN es muy similar en varios continentes y entre países. En Estados Unidos se ha reportado, entre el 1% al 7,7% de todos los admitidos en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN), o de uno a tres por 1000 nacidos vivos, aproximadamente el 10% de los neonatos con muy bajo peso al nacimiento (MBPN) <sup>8</sup>. En Japón la incidencia entre neonatos con MBPN es de 1-2%, en España 6,9%, en Austria 7%, en Grecia 10%, en Argentina 14% y en Hong Kong 28% <sup>8,9</sup>.

## Introducción

La ECN se diagnostica en el 5% de los nacidos vivos en centros con UCIN, el 75% al 90% ocurre en recién nacidos con menos de 36 semanas de edad gestacional y un peso por debajo de los 2000 gramos (g). El 10% se presenta en recién nacidos a término <sup>10, 11</sup>.

El National Institute of Child Health and Human Development en su estudio observa una relación inversa entre ECN y peso al nacer. Por lo tanto neonatos con peso entre 401 a 750 g desarrollaron esta enfermedad en el 11,5%, entre 751 a 1000 g presentaron un 9% de ECN, entre 1001 a 1250 g el 6% y con un peso entre 1251 a 1500 g el 4% <sup>12</sup>.

El único factor condicionante de riesgo epidemiológico relacionado con ECN es la prematuridad, no estando relacionado con el género, el estatus socioeconómico o la raza <sup>13, 14</sup>. Algunos autores reportan una asociación con la raza negra y sexo masculino. Se han asociado las siguientes variables a enterocolitis: consumo de cocaína en el embarazo, disminución intrauterino de flujo de la arteria umbilical, sufrimiento fetal, infección perinatal, policitemia, distress respiratorio, encefalopatía hipoxica isquémica, transfusiones de sangre/hemoderivados, cateterismo umbilical, uso de medicamentos (ranitidina, cafeína, indometacina) en el periodo neonatal y alimentación enteral (fórmulas hiperosmolares). En recién nacido a término la cardiopatía congénita es la variable que ha demostrado ser significativamente constante entre los diversos estudios <sup>15</sup>.

Como resultado de un incremento de los nacimientos de prematuros y los avances de la medicina neonatal, el riesgo de esta población a presentar ECN sigue latente, manteniéndose la incidencia de morbilidad y mortalidad asociada durante los 20 últimos años <sup>16, 17</sup>. La mortalidad en la población infantil ha disminuido, pero asociada a ECN se ha incrementado entre el 10% y el 30%, sobretodo en neonatos con MBPN <sup>18</sup>.

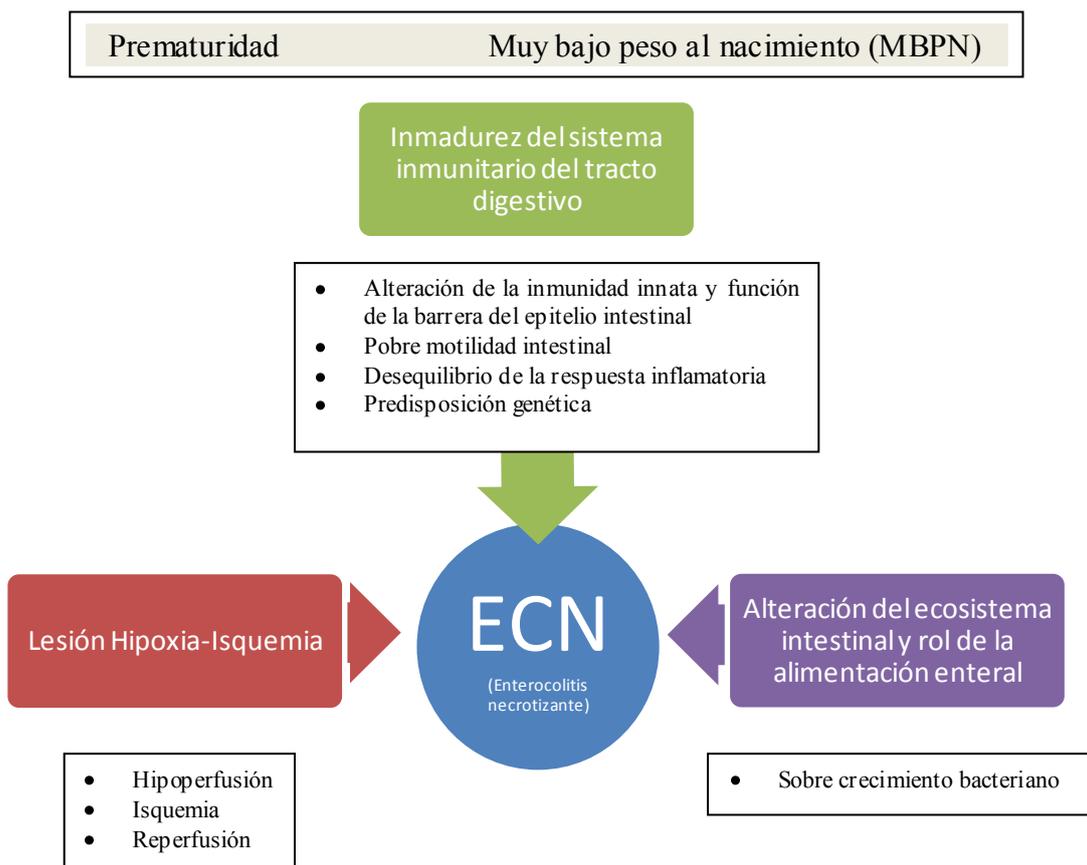
El tratamiento quirúrgico demuestra una reducción significativa de la mortalidad. En el siglo pasado la mortalidad se encontraba alrededor del 70%, en la actualidad oscila entre el 10% a 50% <sup>12, 19, 20, 21</sup>. A pesar de los avances médicos en cuidados neonatales entre el 20% y 63% de los niños con ECN necesitan una intervención quirúrgica justificada por una progresión de la enfermedad. Respecto al pronóstico de sobrevida dependerá de las siguientes condiciones: recién nacidos con peso inferior a 1000 g, baja edad gestacional, pequeño para la edad gestacional, enfermedades asociadas, presencia de gas portal, necesidad de intervención quirúrgica, intestino corto y enfermedad difusa del intestino <sup>22</sup>.

En relación al uso de determinados fármacos con el potencial riesgo de favorecer el desarrollo de ECN, podemos citar algunos ejemplos. La teofilina y la aminofilina, derivados de las xantinas, reducen la movilidad intestinal y pueden dañar los enterocitos, por la formación de radicales libres de oxígeno. Sin embargo, no hay una relación causal entre estos fármacos y la ECN. También la indometacina, utilizada como agente tocolítico en mujeres embarazadas y como tratamiento del conducto arterioso persistente en recién nacidos, ha sido asociada con una mayor incidencia de esta enfermedad. El abuso materno de cocaína, por sus propiedades vasoconstrictoras, puede aumentar la incidencia y la gravedad de la ECN <sup>3</sup>. La serotonina sobre el sistema gastrointestinal, estimula la motilidad intestinal y secreción epitelial, se han relacionado el uso de paroxetina (inhibidor de la recaptación de serotonina) por mujeres gestantes con algunos casos de ECN neonatal <sup>23</sup>.

## Introducción

### 2.1.3. Etiología y Patogénesis

La etiología de la ECN aún es incierta, a pesar de identificar factores de riesgo pre y post-natales <sup>8</sup>. Tiene una causa multifactorial cuya patogénesis no está completamente definida y clínicamente se comporta como un síndrome <sup>24</sup>. Los mecanismos relacionados en uno o más combinaciones son los siguientes: 1) lesión hipóxica-isquémica, 2) inmadurez del sistema inmunitario del tracto digestivo y, 3) alteraciones del ecosistema intestinal (micro flora) y rol de la alimentación enteral <sup>1,17, 24, 25</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Propuesta multifactorial de la patogénesis de ECN

### **- Mecanismo de Hipoxia-Isquemia**

La lesión isquémica sobre el trato gastrointestinal contribuye como un potencial factor de inicio en la ECN. El proceso resulta en una hipoperfusión seguido de hipoxia sobre el intestino, como consecuencia de un mecanismo de “salto reflejo” para preservar de lesiones importantes a órganos críticos como el cerebro y corazón. Este proceso da como resultado una lesión sobre el intestino de hipoxia-isquemia <sup>26, 27</sup>.

La reperfusión como consecuencia de la post-isquemia, es uno de los factores desencadenantes de la cascada pro-inflamatoria, dando como resultado un daño en la barrera mucosa del intestino por invasión y translocación bacteriana. A pesar de los estudios que demuestran esta relación causal, existen neonatos con evidencia en su inicio de presentar una lesión de hipoxia-isquemia, que sin embargo no desarrollaron ECN <sup>24, 26, 28, 29</sup>.

### **- Inmadurez del Sistema defensivo local del tracto gastrointestinal**

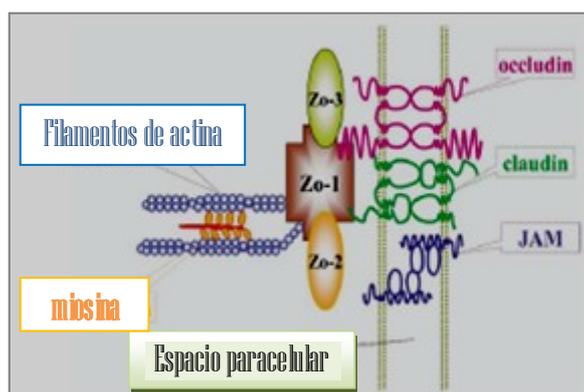
Los factores desencadenantes de isquemia, apoptosis, pneumatosis, coagulación y necrosis de la mucosa seguidos por procesos de perforación, peritonitis y muerte en la ECN, quizás se deban a la inmadurez del sistema defensivo gastrointestinal. Para Neu y Guner esta inmadurez asociada con ECN comprende a varios agentes, entre los que destacamos los siguientes: 1) alteración de la inmunidad innata y función de la barrera del epitelio intestinal, 2) pobre motilidad intestinal, 3) respuesta inflamatoria exagerada y 4) predisposición genética <sup>1</sup>.

1. Barrera intestinal y sistema inmune. Respecto los componentes involucrados tanto en la barrera intestinal como en el sistema inmune, Anand y Neu proponen los siguientes:

## Introducción

a) alteración de la integridad de las uniones herméticas del epitelio (*zonulae occludentes*); b) disminución de las secreciones de ácido gástrico y pancreático-biliares; c) deficiencias en los componentes de revestimiento mucoso; d) factores humorales – celulares y, e) alteración de la regeneración epitelial<sup>1, 30</sup>.

a) El epitelio intestinal tiene una barrera hermética que es resultado de estrechas uniones entre las células intestinales (enterocitos). Esta barrera entre la luz intestinal y el compartimiento de tejido conjuntivo del organismo permite la retención selectiva de sustancias absorbidas por los enterocitos (Figura 2).



**Figura 2.** Uniones estrechas (*zonulae occludentes*) del intestino\*. JAM: molécula de adhesión de la unión. Zo-1/2/3: familia de proteínas zonula occludens Proteínas transmembrana de uniones estrechas claudin-occludin.

\*Neu J CM, Beierle E. Intestinal innate immunity: how does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(3):137-44.

Existen ciertas particularidades, por ejemplo en el íleon y en el colón la barrera no es tan impermeable como en el duodeno y yeyuno, necesario para absorber líquidos, electrolitos y macromoléculas de hasta 11 aminoácidos.<sup>31</sup>. Otro componente que participa en la barrera es el tejido linfático asociado con el intestino, denominado GALT

(gut associated lymphoid tissue). Este se localiza en la lámina propia y su función es de barrera inmunológica en cooperación con células caliciformes, enteroendocrinas y probablemente células M localizadas sobre las placas de Peyer y los nódulos linfáticos más grandes <sup>1</sup>.

Las vellosidades intestinales que se encuentran en los niños de MBPN, presentan cambios especiales en la barrera intestinal potenciados por la introducción de alimentos a través de sondas enterales y por la rotación de antibióticos. Dan como respuesta agentes proinflamatorios que favorecen la permeabilidad de la membrana la invasión y translocación bacteriana vía pared intestinal <sup>1</sup>.

**b)** Los ácidos gástricos y pancreático-biliares en general disminuyen la carga tanto de los microorganismos de la pared como de los antígenos extendidos por el intestino delgado. El efecto sobre la estructura de los antígenos es de destrucción (proteólisis). La proteólisis va a dañar la estructura de los antígenos, destruyendo así los epítomos de reconocimiento inmunológico <sup>32</sup>. Lebenthal y Lee observaron que la función exocrina del páncreas esta limitada durante el primer año de vida <sup>33</sup>. Es importante recordar que los recién nacidos de MBPN, durante sus primeros días no pueden procesar los nutrientes por lo cual tienen una mínima estimulación de ácidos y proteasas con un incremento del pH gástrico. Considerando lo anterior se sabe que es común el uso de bloqueadores H-2 en pacientes de MBPN con sépsis para disminuir la secreción ácida por el potencial riesgo de generar una translocación bacteriana <sup>34</sup>. Basaran y colaboradores comprobaron esta teoría en trabajos experimentales en ratas recién nacidas <sup>35</sup>.

**c)** El moco intestinal es secretado por las células caliciformes, las cuales son muy importantes en su revestimiento. El moco es un complejo gel que cubre la superficie de

## Introducción

las vellosidades epiteliales, compuesto por mucina, glucoproteínas, inmunoglobulinas, glucolípidos y albúmina. Contiene factores bioactivos como lactoferrina y lisosomas, presentes en la leche materna <sup>36, 37</sup>. Este gel aporta antígenos externos a la dieta manteniendo a las bacterias contenidas. La mucina uno de los componentes del moco que pertenece a un grupo de moléculas heterogéneas, su mecanismo de respuesta aún no está muy claro, pero se sabe por estudios aplicados en ratas, que en etapa neonatal existe más producción de esta proteína que en su edad adulta <sup>38</sup>. Sherman y colaboradores encontraron una relación entre la disminución de los niveles de mucina con una pobre nutrición proteica – calórica. Por lo tanto esto juega un rol importante en la patogénesis del daño intestinal, sobre todo en infantes que están expuestos a periodos prolongados de ayuno <sup>1, 39</sup>.

**d)** Los numerosos factores de la inmunidad innata son secretados por la superficie mucosa y las glándulas exocrinas. En el moco secretado se pueden identificar las siguientes proteínas que funcionan en ausencia de un anticuerpo específico: lactoferrinas, lisosomas, peróxidos, péptidos trefoil, defensinas, angiogeninas y criptinas <sup>1</sup>. El intestino se caracteriza por secretar inmunoglobulina A (IgA) la misma que no participa en la reacción inflamatoria pero es muy importante en la defensa de la mucosa, para ir en contra de antígenos complejos e impedir su absorción en el enterocito <sup>40</sup>. La deficiencia de IgA en prematuros facilita la translocación bacteriana a través de la mucosa. Otros elementos relacionados con ECN son la disminución de factor de crecimiento epidérmico, el incremento de factor activador plaquetario (FAP) y óxido nítrico (ON) <sup>30, 32, 40, 41</sup>.

Las células subepiteliales juegan un rol importante en la homeostasis local inmunológica, su función consiste en presentar antígenos no fagocitados a células B y

células T CD4+. Las placas de Peyer son agregaciones de tejido linfoide situadas en la lámina propia y submucosa del borde mesentérico. Su desarrollo es a partir de la semana 19 de gestación y se incrementan entre la semana 24 a 40 de gestación. Las áreas de estas placas contienen células caliciformes productoras de moco cuya función se detallo anteriormente. Otras células son las denominadas M, que poseen micropliegues para captar microorganismos y macromoléculas de la luz. Su función es transportar antígenos hacia el tejido linfático <sup>1</sup>.

e) Respecto a la regeneración epitelial este mecanismo fue valorado in vitro, con células del epitelio intestinal (CEI-6) de rata (células de las criptas de las vellosidades de la línea -6, expuestas a lipopolisacáridos) manifestando una restitución entre 4 a 5 días para neonatos y 2 días para adultos. Si esta afirmación es verdad la regeneración de la mucosa en humanos es más lenta en niños que en adultos <sup>42</sup>.

2. La motilidad intestinal. Quizás sea un elemento crítico en controlar la presencia de antígenos en la barrera mucosa de la luz intestinal. Los complejos motores migratorios que actúan propulsando componentes de la luz en dirección caudal, son los responsables del peristaltismo. Por cuanto alguna alteración de la normalidad de este mecanismo da como resultado un sobre crecimiento bacteriano (bacterias aerobias predominantemente), seguido de una mala absorción de nutrientes. El peristaltismo se reduce al mismo tiempo que los antígenos bacterianos, entran en contacto con los enterocitos. Estudios fetales en animales y seres humanos sugieren que el desarrollo de la motilidad gastrointestinal comienza en el segundo trimestre, pero madura en el tercer trimestre. Estudios sobre la motilidad intestinal ha demostrado que los prematuros

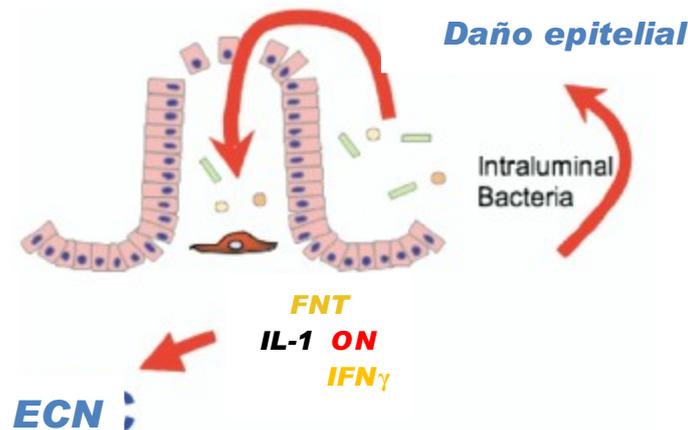
## Introducción

pueden tener patrones de motilidad inmaduros al igual que los nacidos con hipoxia fetal en comparación con los nacidos a término <sup>43, 44, 45, 46</sup>.

3. La respuesta inflamatoria exagerada. La respuesta inflamatoria de células y mediadores del sistema inmune conforman la primera línea de defensa, ocurriendo en el 95% de todas las infecciones bacterianas y virales. Los mediadores involucrados son: citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas, factor de agregación plaquetaria (FAP), endotelinas, óxido nítrico (ON) y ciclooxigenasas que interactúan con células y receptores para la producción de anticuerpos orquestando la respuesta inflamatoria <sup>1, 17</sup>. El papel de las citoquinas derivadas de las células epiteliales intestinales (CEI) incluye: quimiotaxis de neutrófilos, promoción de la expresión de IgA, proliferación de células epiteliales, diferenciación y restitución de la mucosa (posterior a una lesión). La Interleuquina 8 (IL-8) producida por las CEI, fue la primera citoquina determinada en poseer un potente inductor de la infiltración leucocitaria tisular. La IL-6 tiene una función pro-inflamatoria muy importante inducida por la fase aguda (secretora de proteínas hepáticas) y por el intercambio de células T con anticuerpos de las células B <sup>47</sup>. Podemos mencionar a otras citoquinas involucradas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12) en el desarrollo de la respuesta inflamatoria <sup>46</sup> [Schnabl, 2008 #425]. Otros elementos directamente involucrados en la respuesta son: los factores de crecimiento de insulina I y II (FCI-I y II), el factor de crecimiento transformador alfa y beta (FCT- $\alpha$ , FCT- $\beta$ ), el factor de crecimiento epidérmico (FCE), interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Por ejemplo el FCT- $\beta$  tiene la propiedad de suprimir la proliferación e inducir factores asociados con la diferenciación celular <sup>48</sup>. Otros factores involucrados son la endotelina 1 (ET-1), la serotonina y eicosanoides como: prostaglandina E-2 (PGE2) y leucotrieno de receptor B-

4 (LTB4) <sup>46</sup> [Schnabl, 2008 #425]. Por otra parte existen células específicas (Paneth) localizadas en la base de las criptas que desempeñan un papel activo en la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ).

Por lo tanto las CEI en presencia de las bacterias producen los factores antes mencionados, los mismos que constituyen una barrera de defensa y son agentes centinelas en la activación de la respuesta inmune e inflamatoria frente a una infección inminente (Figura 3).



**Figura 3.** Respuesta inflamatoria\*. ECN: enterocolitis necrotizante. FNT: factor de necrosis tumoral. IL-1: interleucina 1. ON: óxido nítrico. IFN $\gamma$ : interferon gamma.

\*Guner YS CN, Petrosyan M, Upperman JS, Ford HR, Grikscheit TC. Necrotizing enterocolitis - bench to bedside: novel and emerging strategies. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17(4):255-65.

Los altos niveles de estos mediadores en la barrera intestinal dan una exagerada respuesta inflamatoria que recae sobre la estructura del enterocito produciendo apoptosis o necrosis, inhibición o restitución así como exacerbación del daño tisular <sup>49</sup>. Upperman y Ford a través de sus estudios han determinado el rol del ON como mediador en la patogénesis de la ECN <sup>50, 51</sup>. El ON es producto de la conversión de

## Introducción

arginina a citrulina, catalizada por el óxido nítrico sintetasa (ONS), esta enzima tiene tres isoformas (*i*) que cumplen un papel citoprotector (*i*ONS) <sup>52</sup>. A través de estudios en ratones knockout se ha establecido que la desregularización de las *i*ONS ocasionan un deterioro del epitelio intestinal favorecido por el aumento de ON y otros efectos inflamatorios. <sup>50, 51</sup>. Durante la inflamación una alteración de la regulación de las *i*ONS produce a nivel local un incremento de ON. Zamora ha demostrado en ratas que los niveles intestinales de compuestos: nitrito, nitrato y nitroso estuvieron elevados en modelos de ECN <sup>53</sup>. El ON reacciona con un superóxido ( $O_2^-$ ) para producir un potente peroxinitrato ( $ONOO^-$ ) <sup>54</sup>. Este componente es la llave que reactiva el nitrógeno intermedio que se genera en las lesiones intestinales. Una vez aclarado el rol del *i*ONS y  $ONOO^-$ , Guner manifiesta que una alteración de estos mediadores genera apoptosis en los enterocitos y un fallo de la barrera intestinal <sup>17</sup>.

Las ciclooxigenasas (COX) participan en la síntesis de prostaglandinas que son importantes en el mantenimiento del epitelio intestinal. Los elevados niveles de COX-2 inducen isoformas de COX que al ser agentes pro-inflamatorios contribuyen en la patogénesis de la inflamación intestinal. Recordaremos que la Indometacina, un inhibidor no selectivo COX-1 y COX-2 de uso común en el ductus arterioso en prematuros se ha asociado con ECN <sup>55</sup>. Grishin y colaboradores utilizando en rata un modelo celular de línea epitelial tipo 6 (CEI-6) sobre las criptas, demostraron que tras recibir el componente lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas se produjo una alteración en la regulación COX-2 con la consecuente endotoxemia <sup>56</sup>. Continuando con el estudio sobre el papel de las ciclooxigenasas, Lugo y colaboradores observaron que la expresión COX-2 se encuentra incrementada en el íleon terminal y al parecer de forma paradójica su rol ofrece un factor protector sobre el intestino en condiciones

normales pero bajo circunstancias inflamatorias puede condicionar el desarrollo de ECN

57.

4. Predisposición genética. El último componente en influir sobre la inmadurez del sistema defensivo local quizás tenga respuesta en la predisposición genética a determinados polimorfismos <sup>46</sup>. En un reciente estudio clínico, los neonatos de MBPN con mutaciones en el dominio de oligomerización de nucleótidos tipo 2 (NOD2) en un miembro de esta familia demostraron tener mayor susceptibilidad a sepsis bacteriana. No obstante polimorfismos genéticos como: CD14, receptor transmembrana lipopolisacárido “toll-like” tipo 4 (TLR4) y, NOD2 no tuvieron asociación con ECN <sup>58</sup>, <sup>59</sup>. Estudios preliminares de polimorfismos genéticos en neonatos de MBPN y que desarrollaron ECN se mostraron susceptibles a poseer menos receptores IL-4  $\alpha$  de la cadena mutante del alelo en comparación con los neonatos sin ECN. Es interesante que el número elevado de células Th2 en portadores de este polimorfismo genético, constituya un factor de protección contra el desarrollo de ECN. Otro factor asociado es la IL-18 en genotipos AA que induce la producción de IFN- $\gamma$  y amplificación de células Th1. Este polimorfismo es significativamente mayor en la etapa III de ECN en comparación con las etapas I y II <sup>60</sup>.

En modelos animales, tratados previamente con anti-FNT- $\alpha$  se observó una reducción de incidencia y severidad de ECN <sup>61</sup>. Sin embargo Treszl y colaboradores no encontraron vínculo entre variantes genéticas del FNT- $\alpha$  y esta enfermedad <sup>62</sup>.

## Introducción

### **-Alteraciones del ecosistema intestinal y rol de la alimentación enteral**

La etiología de la ECN es frecuentemente atribuida a la infección causada por la anormal colonización intestinal de microorganismos que ocasionan translocación bacteriana de la pared intestinal, con la consecuente producción exagerada de citoquinas y endotoxinas, manifestándose como necrosis o daño transmural de la mucosa <sup>27</sup>. Hay especies comensales bacterianas y fúngicas que conviven y colaboran en ciertos aspectos de la digestión. Los prematuros tiene un alto riesgo de infección y están por lo tanto expuestos a fármacos antibacterianos de amplio espectro, alterando el ecosistema de la flora intestinal. La especie predominante en las heces de neonatos sanos a termino alimentados por leche materna es la *Bifidobacteria*. En contraste con especies de *Stafilococos*, *Enterobacterias*, *Enterococos*, *Klebsiela* y *Clostridium* que son predominantes en las heces de neonatos prematuros con ECN. Otros agentes patógenos involucrados son especies de *Eschericha*, rotavirus, coronavirus, enterovirus y *Cándida* <sup>24,25</sup>.

El intestino del prematuro es susceptible a un sobre crecimiento de bacterias patógenas a expensas de bacterias comensales por la consecuente disminución de la motilidad y la respuesta inadecuada del sistema inmune y de barrera, por citar un ejemplo el ácido butírico producto de la fermentación bacteriana enlentece la restauración de la barrera mucosa después de ocurrir una agresión <sup>63</sup>. A estos elementos debemos sumar el rol que juega la alimentación enteral a través de los carbohidratos, que actúan como sustrato para el crecimiento y la proliferación bacteriana <sup>26,29,30</sup>. Respecto a la alimentación de estos niños, el excesivo volumen, las fórmulas hiperosmolares y la rápida administración enteral se han visto involucradas en el desarrollo de ECN.

La microbiota de un adulto humano consiste en más de  $10^{13}$  microorganismos localizados en intestino delgado distal y colon. Esta microbiota sobre la mucosa colabora en procesos de nutrición, inmunidad y angiogénesis. Estudios en ratones demostraron que expresiones de ARNm de angiogenina, están incrementados en los que recibieron lactancia materna exclusiva y tenían una microflora normal con bacterias comensales tipo *Bacteriodes thetaiotaomicron* <sup>64, 65</sup>.

Las primeras moléculas pro-inflamatorias en cruzar la barrera intestinal son los lipopolisacáridos (LPS), componentes de la pared exterior de las bacterias Gram negativas que son reconocidas y enlazadas por receptores TLR4 que a su vez activan al factor nuclear de cadena ligera kappa de células B (FN-κB) <sup>49</sup>. Este factor junto con ON, FNT-α, PGE2 y LTB4 son los responsables de la señal inflamatoria. Por lo tanto los LPS se incrementan en pacientes con ECN, inhibiendo la restitución epitelial y desequilibrando la respuesta inflamatoria.

### **2.1.4. Modelos animales y Enterocolitis Necrotizante (ECN)**

Se han aceptado números modelos que han estudiado los factores relacionados con la cascada de citoquinas y agentes etiológicos. Estos modelos tratan de crear en animales, situaciones semejantes a las expresadas en humanos. Los LPS, el FAP, el FNT-α, la hipoxia y, la administración de nutriente enterales se han empleado en la creación de isquemia intestinal o sobre crecimiento bacteriano. En general los modelos animales pueden reproducir aspectos de la ECN, pero frecuentemente no contienen aspectos de prematuridad y bajo peso condicionando sus conclusiones <sup>46</sup>. Expondremos los modelos más representativos a continuación:

## Introducción

### **-Modelo de isquemia-reperfusión**

Basado en la fisiología de mamíferos acuáticos se conoce que la inducción de asfixia desencadena una gran descarga simpática que genere isquemia intestinal y ECN <sup>66</sup>. Siguiendo estudios en cerdos recién nacidos empleando el mismo mecanismo confirmo la destrucción de la mucosa intestinal, reforzando este modelo <sup>67</sup>.

Las descripciones iniciales acerca del rol de la isquemia en ECN sugieren que por sí solo, un modelo de hipoxia-hipotermia, que comprometa la perfusión intestinal utilizando ratas de semanas de vida no constituye un mecanismo que genere el suficiente daño tisular. Chiu y colaboradores presentaron un modelo en perros para valorar el daño que sufre la mucosa intestinal, cuando se expone a una oclusión temporal de la arteria mesentérica superior (0 ml/Kg/min) o a flujos vasculares entre 5 ml/Kg/min a 15 ml/Kg/min sobre la misma arteria. En resumen el grupo de animales con un flujo de 0 ml/kg/min presento con claridad un mayor grado de afectación intestinal al cabo de 1 hora del experimento <sup>68</sup>.

Más adelante se cambio la especie y se empleó cerdos, en los que se ocluye la arteria mesentérica al 60% del flujo vascular. El concepto de isquemia esta determinado por el compromiso de oxígeno en el parénquima, necesario para mantener el sistema de oxidación mitocondrial. Por otro lado la reperfusión como tal desencadena diversos elementos inflamatorios que incrementan la resistencia vascular extendiendo el daño tisular <sup>69,70</sup>.

Parks y Granger en 1986 demostraron que la reperfusión es más perjudicial que isquemia por sí sola, algo que era aún desconocido. El segundo estudio de gran importancia de isquemia (miocárdica) empleando perros, permitió conocer el concepto de isquémica pre-condicionada. Que hace referencia a mínimos daños de isquemia y

reperusión. Más adelante se presenta el concepto de isquemia post-condicionada, el cual consiste en ciclos cortos (1 ó >1) de reperusión seguidos por ciclos cortos de isquemia, inmediatamente después de la fase de isquemia y antes de la fase de reperusión <sup>71, 72, 73</sup>. Estos estudios aplicados en ratas adultas sobre los vasos mesentéricos por 30 minutos, observaron como el pre y post-condicionamiento minimizó el daño intestinal <sup>74</sup>.

Otro de los modelos de isquemia-reperusión más empleados se basa en la oclusión temporal de la vascularización mesentérica. En un modelo de isquemia-reperusión (60 minutos de total isquemia seguida de 2 horas de reperusión) cerdos de 3 días de vida con lactancia demostraron incremento de la resistencia vascular en respuesta a una variedad de estímulos hemodinámicos a diferencia de cerdos de mayor edad, no lactantes. Subsecuentes estudios revelan que la magnitud de la isquemia reperusión esta medida por el incremento de Guanosín Monofosfato cíclico (GMPc), ON y la acumulación de de *i*ONS durante el periodo perinatal <sup>70, 75, 76</sup>. En un estudio con cerdos recién nacidos de bajo peso (700-1200 gramos), las arcadas mesentéricas correspondientes al íleon distal fueron clampadas durante 48 horas, las lesiones histológicas variaron desde mínimas erosiones mucosas hasta ulceraciones y necrosis transmural con perforación y peritonitis. El mismo tiempo de oclusión vascular en cerdos de más de 1500 g produjo lesiones similares pero menos graves, mientras que en cerdos de 3 meses de edad (35 Kg) no se produjeron lesiones destacables, lo que demostró que en este modelo las lesiones son más frecuentes y más graves en animales recién nacidos y de bajo peso, al igual que ocurre en la ECN <sup>77</sup>. El tiempo de isquemia necesario para producir cambios de enterocolitis fue mucho menor en otras especies animales <sup>3</sup>. En ratones, la oclusión de la arteria mesentérica superior durante 20 minutos

## Introducción

produjo lesiones isquémicas intestinales en el 50% de los animales a las 48 horas <sup>78</sup>. El modelo de isquemia-reperfusión intestinal en la rata de 18 días de vida que ocluye temporalmente durante 60 minutos la arteria mesentérica superior consiguió lesiones muy similares a las de la enterocolitis necrotizante en el recién nacido humano <sup>79</sup>.

### **-Modelo basado en la administración de mediadores de la inflamación:**

En ratas adultas la necrosis intestinal inducida por la administración de FAP, LPS y, FNT- $\alpha$  observó que la combinación de uno o más factores producían un porcentaje más elevado de afectación, que al suministrarlos por separado <sup>24</sup>. Estos elementos generan la activación de polimorfos nucleares (PMN), FN- $\kappa$ B y, LTR4 creando un desequilibrio en el sistema de oxidación/óxido nítrico. Esto motiva un aumento de la permeabilidad y daño sobre la mucosa intestinal. En el 100% de los animales expuestos a LPS y FAP se observó una moderada necrosis del intestino grueso mientras que cuando se expuso a FAP la necrosis bajó al 20% <sup>24</sup>. La respuesta exclusiva FAP quizás se deba a una predisposición a poseer valores reducidos de una enzima que la degrade, la cual está regulada a su vez por el flujo mesentérico y el sistema de defensa <sup>80, 81</sup>.

### **-Modelos basados en la administración de nutrientes enterales**

El modelo consiste en aporte intraluminal de caseína acidificada de bovino. Se basó en el análisis del contenido intestinal en infantes con enterocolitis. La administración de caseína acidificada en conejos causó una lesión en la mucosa intestinal caracterizada por denudación de las vellosidades, dilatación de los vasos linfáticos y edema. En este modelo más del 30% de los animales presentaron una necrosis hemorrágica a las 16 horas y la mortalidad fue del 40%. En otro estudio realizado en cerdos lactantes se combinó la administración intraluminal de caseína acidificada y dismotilidad intestinal

(oclusión de asas). De esta forma se combinaban dos de los factores implicados en la patogénesis de la enfermedad: la inyección intraluminal de una sustancia que imitó el contenido intestinal de los recién nacidos con ECN y la dismotilidad que asoció la inmadurez intestinal. Al microscópico se demostró áreas de necrosis, infiltrado inflamatorio y distensión de los vasos linfáticos. En animales de menos de 3 días de vida la lesión era transmural y en los que tenían 2 semanas de vida la lesión se limitaba a la mucosa. La principal ventaja de este modelo fue la fácil reproducción. Sin embargo se ha cuestionado, si los constituyentes del contenido intestinal en recién nacidos con enterocolitis, fundamento de este modelo, fueron secundarios a la necrosis y no su causa. Por otro lado, en este modelo no apareció pneumatosis intestinal, aunque esto puede ser debido a su carácter agudo<sup>3, 82, 83, 84, 85</sup>.

Ito y colaboradores en ratas neonatales indujeron ECN administrando leche de vaca y más tarde observaron cambios en la microcirculación intestinal a nivel del íleon terminal por cambios en la respuesta de endotelina 1 (ET-1) mediada por el ARNm<sup>86</sup>.

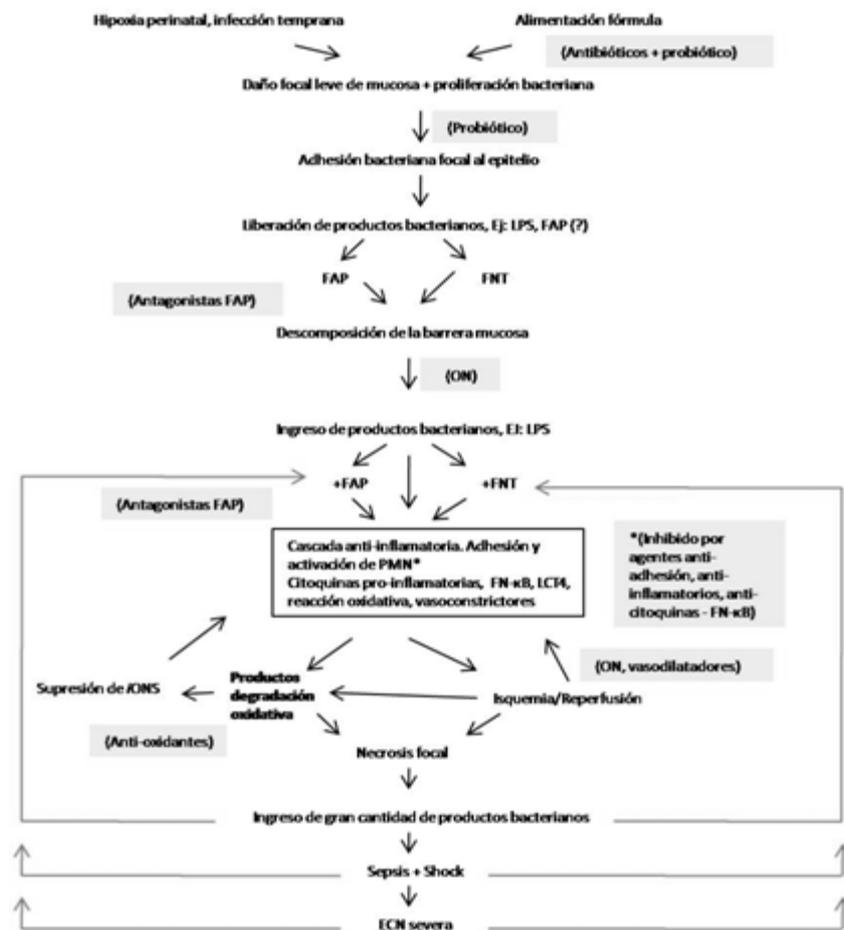
### **-Combinación de modelos**

En un estudio en ratas recién nacidas expuestas a leche materna, asfixia, colonización de bacterias Gram negativas y alimentación artificial con fórmulas, a los pocos días desarrollaron distensión abdominal y melenas<sup>69</sup>.

Otro modelo que expresó isquemia es la inducción de hipoxia por 5 minutos seguida de 10 minutos de oxígeno al 100%, ocluyendo la arteria mesentérica superior junto con la administración de FAP y/o FNT- $\alpha$ <sup>87, 88</sup>. La hipoxia producida por la administración de oxígeno al 5% durante 90 minutos conjuntamente con la administración de 2mg/Kg de endotoxina de *Salmonella tyfosa* en ratas adultas produce necrosis intestinal mediado

## Introducción

por el FAP <sup>89</sup>. Hsueh y colaboradores siguiendo con la combinación de factores, han relacionado el rol de la hipoxia, inoculación bacteriana (*E.coli*) y alimentación enteral en ratas pre-termino observando un 75% de ECN y 100% de muerte cuando se asociaron estos tres factores (Figura 4). Este tipo de modelo por su naturaleza necesita varios factores para ocasionar una lesión que sea reproducible en todos los casos.



**Figura 4.** Propuesta de patogénesis ECN modelos experimentales\*. LPS: lipopolisacáridos. FAP: factor de agregación plaquetaria. FNT: factor de necrosis tumoral. ON: óxido nítrico. PMN: polimorfos nucleares. FNκB: factor nuclear de cadena ligera kappa de células B. LTC4: leucotrieno C4. iONS: isoformas óxido nítrico sintetasa. Cuadros con sombra: agentes terapéuticos

\*Hsueh W CM, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003; 6(1):6-23.

### 2.1.5. Anatomía patológica

En alrededor del 50% de los casos la necrosis involucra tanto el intestino delgado como el grueso <sup>90</sup>. El íleon, ciego y colon proximal son las zonas más comunes de afectación, sin embargo hay otros segmentos intestinales involucrados con menor frecuencia que incluyen el estómago. En la mitad de los pacientes hay una afectación circular simple de un segmento pero en ocasiones puede ser discontinua, randomizada o semi-circular con signos inflamatorios. <sup>91, 92</sup>.

Tras la instauración de una isquemia mesentérica aguda el cambio más precoz detectado al microscopio es el despegamiento del epitelio y la formación de una área entre las células glandulares de revestimiento y la membrana basal, llamado “espacio de Gruenhagen” <sup>68, 93</sup>. A nivel de la mucosa, Black-Schaffer menciona que la destrucción de las células epiteliales es a causa de una explosión osmótica la cual se caracteriza por disrupción en la porción infra-nuclear y alrededor de la membrana basal, sin ser generalizada. El posible paso de fluidos por el espacio de Gruenhagen tiene su inicio en los capilares el cual se va extendiendo hasta conseguir una anoxia tisular <sup>68</sup>. Fuertes en su trabajo experimental describe cronológicamente el efecto que causa la isquemia intestinal sobre el epitelio. Las cúspides de las vellosidades comienzan a desnudarse, acumulándose fibrina, células inflamatorias y bacterias. Más adelante aparece el edema con hemorragia en la mucosa extendiéndose progresivamente a la submucosa. Con el tiempo la mucosa se úlceras, necrosa y desprende <sup>93</sup>.

En la ECN, la congestión, ulceración, hemorragia, coagulación y necrosis esta casi siempre presente limitada a la mucosa en estadios iniciales. Pero en autopsias y en algunos casos que se requiere cirugía la afectación es focal, transmural y con evidencias de perforación (borde anti-mesentérico) <sup>90, 92, 94</sup>. Mientras tanto en la luz intestinal con o

## Introducción

sin necrosis de la mucosa hay presencia de hongos y bacterias que favorecen la generación de pneumatosis intestinal. Se presenta en la mitad de los casos y es debida a la fermentación de productos bacterianos como P-galactocidasa. La pneumatosis que usualmente se limita a la submucosa se observa al microscopio como burbujas de gas.  
24,94

Respecto a las vellosidades se observa atrofia y distorsión de las criptas en la fase de isquemia. Mientras que los cambios reparativos representados por fibrosis, granulación y regeneración, ocurre en las dos terceras partes de los casos diagnosticados de ECN<sup>92</sup>. La regeneración consiste en el reemplazo de la mucosa por un epitelio cuboide o por la aparición de núcleos hipercromáticos, con actividad mitótica sin producción de mucina  
95,96

En un 10% a 20% el intestino comprometido durante un episodio agudo o subagudo de ECN neonatal que no fue resecado (mientras dure la fase de curación) desarrollará progresivamente entre la tercera y décima semana (posterior al diagnóstico) una fibrosis circunferencial en la submucosa, con distorsión de las glándulas y vellosidades<sup>94</sup>. En los casos más severos esta fibrosis se extendió a la muscularis propia, siendo necesaria una intervención quirúrgica para corregir tal defecto<sup>92</sup>

### **2.1.6. Diagnóstico**

La ECN es un proceso que se presenta durante la segunda o tercera semanas de vida. Esta enfermedad se relaciona con la edad de gestación y el peso al nacimiento. Siendo más común en neonatos con un peso menor o igual a 1500 g y/o 30 semanas de gestación. En niños a término usualmente aparecen los síntomas entre el segundo y

tercer día después del nacimiento. Se han mencionado con anterioridad diversos factores de riesgo que condicionan su aparición <sup>17, 24, 25, 97</sup>.

### **-Manifestaciones clínicas**

La sospecha clínica es relativamente inespecífica comprendiendo un conjunto de síntomas y signos que van desde apnea, bradicardia, desaturación de oxígeno, hipoperfusión periférica, letargia, irritabilidad, inestabilidad térmica, hasta distensión abdominal, dolor abdominal, ausencia de ruidos abdominales, sangre en heces (oculta/macroscópica), intolerancia alimentaria que incluye vómitos biliosos y residuos gástricos <sup>98</sup>. La ECN puede instaurarse en pocas horas o bien estar precedida por días de intolerancia alimentaria. Puede presentarse gradualmente con deterioro hemodinámico o en ciertos casos puede ser fulminante con rectorragia franca, sepsis severa, fallo cardiorespiratorio y desequilibrio hemodinámico <sup>97, 99</sup>.

### **-Exploraciones complementarias**

Desde su primera descripción no se ha encontrado un examen diagnóstico lo suficientemente sensible y específico para predecir esta enfermedad. Las pruebas diagnósticas tanto de laboratorio como de imagen nos brindan datos variados que van ligados a la clínica y etiopatogenia.

### ***Análisis de laboratorio.***

Las anormalidades más comunes encontradas en los análisis hemáticos y bioquímicos son: acidosis metabólica, trombocitopenia, leucopenia, leucocitosis con incremento de bandas, hiperglicemia, hiponatremia, aumento de la proteína -C- reactiva, lactato, factor de activación plaquetaria y alteraciones de la coagulación (incremento de tiempo de protrombina/tromboplastina y disminución del fibrinógeno) <sup>25, 46, 100, 101, 102</sup>.

## Introducción

Deducimos de los modelos experimentales y clínicos hallazgos biológicos detectados en suero y plasma, que sugieren un relativo pronóstico sobre la evolución de la enfermedad. Es así que la presencia de hexosaminidasa se relaciona con ECN sin perforación y las citoquinas anti-inflamatorias (IL-2, IL-6, IL-8, IL10, IL-12, IL-18) con escasa sobrevida <sup>103, 104</sup>. Otras determinaciones como por ejemplo el incremento de la isoenzima -BB- de la creatinquinasa (CK-BB) y de las proteínas de enlace de ácidos grasos del hígado (liver fatty acid-binding protein: L-FABP) se relacionan con fases iniciales de ECN mientras que las proteínas de enlace de ácidos grasos del intestino (intestinal fatty acid-binding protein: I-FABP) están presentes en fases más avanzadas de ECN <sup>105</sup>. Otros marcadores descubiertos en plasma y que tiene relación con ECN son los depósitos de islotes amiloide polipéptido (amilin), el tromboxano y la beta-glucosidasa citosólica <sup>106</sup>. La activación del cripto-antígeno -Thomsen Friedenreich- se correlaciona con severidad de ECN. Este anticuerpo monoclonal se ha descrito como la primera señal de ruptura de los glóbulos rojos humanos que contienen ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). Hay ciertas bacterias productoras de neuramidasa como: *Clostridia*, *Bacteroides* y *Streptococo pneumoniae*. <sup>107</sup>.

### **Estudio microbiológico**

Los cultivos en sangre de bacterias aisladas y confirmados en los casos de ECN con un 86% son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Estafilococo aureus*, *Estafilococo epidermidis*, *Estafilococo coagulasa negativa*, *Clostridium perfringens/difficile/butyricum* y *Pseudomona aeruginosa* <sup>97</sup>.

En los cultivos fécales se aisló cepas de *Estafilococo epidermidis/aureus/agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacteroide fragilis* y *Clostridium perfringens* entre los más importantes <sup>6, 97</sup>.

En los cultivos gástricos se aislaron cepas de *Estafilococo epidermidis/aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacteroide fragilis/oralis* y *Streptococo gamma* <sup>6</sup>.

Los virus se identificaron en el 11% de los casos de ECN siendo los más representativos: coronavirus, rotavirus, enterovirus y torovirus <sup>24, 25</sup>. La *Cándida* fue aislada en el 1% los cultivos. Muchos pacientes reportan más de un microorganismo aislado, siendo común la múltiple colonización. En el 3% de los casos no se aisló ningún tipo de microorganismo <sup>97</sup>.

### **Otras mediciones**

Incluyen medición en orina de factor epidérmico de crecimiento y D-lactato. En la respiración el ratio entre el pico de hidrógeno versus dióxido de carbono. El ratio de oxigenación cerebro-esplénico y la tocometría continua del pH de la mucosa gastrointestinal. Los anteriores productos constituyen marcadores que sugieren y nos orientan sobre la evolución de la ECN <sup>8</sup>. Los modelos bioinformáticos conjugan varios marcadores inflamatorios ofreciendo un precoz diagnóstico y tratamiento <sup>17</sup>

### **Pruebas de imagen**

- **Radiografía simple de abdomen.** Es una de las exploraciones más utilizadas con capacidad de brindar información al diagnóstico y ubicarnos en el estadio de esta enfermedad. Los signos encontrados al inicio de forma inespecífica son: distensión aérea difusa, y dilatación intestinal. Si la enfermedad progresa aparece un asa intestinal

## Introducción

fija, ensanchamiento de la pared intestinal, ascitis y pneumatosis intestinal. Por último si la evolución es grave encontraremos aire en el sistema venoso portal y pneumoperitoneo <sup>8, 25, 108</sup>.

La pneumatosis intestinal puede ser lineal (subserosa) o circular (submucosa) y se presenta en el 70-80% de los casos. La región del colón y terminal del íleon son los segmentos más afectados <sup>108, 109</sup>.

La presencia de un asa fija sin cambios por 24 o 48 horas, frecuentemente se asocia a necrosis transmural. El gas en el sistema portal (pneumatosis portal) se identifica en el 10-25% de la radiografías de los casos con ECN. Su presencia se asocia con un mayor compromiso y extensión del daño intestinal. Se observa como líneas o ramificaciones sobre el hígado y representa la disección intramural en los linfáticos y venas mesentéricas. Por otra parte el pneumoperitoneo nos indica que estamos frente a una perforación intestinal, y es una clara indicación de cirugía <sup>8, 109</sup>.

Bell y colaboradores en 1978 basados en datos clínicos y radiológicos, matizan una clasificación de severidad de ECN, que va desde la sospecha (estadio I), pasando por la confirmación (estadio II), hasta llegar a la fase avanzada (estadio III) <sup>6</sup>. Más tarde Walsh y Kliegman proponen una modificación a los estadios planteados por Bell. Al estadio I y II le subdividen en leve (A) o moderado (B). El estadio III que representa la progresión de la enfermedad (shock/pneumoperitoneo), basándose en la integridad del intestino, proponen una subdivisión: con intestino intacto (A) o con perforación intestinal (B) <sup>7</sup>.

En el estadio I no están claros los signos radiológicos y son inespecíficas las manifestaciones clínicas, sugestivas de enfermedad pero sin compromiso intestinal o progresión de la enfermedad. En el estadio II el diagnóstico es claro, aparece

pneumatosis intestinal o gas libre portal. El estadio III indica que la enfermedad esta avanzada, radiológicamente aparece a demás de los signos descritos anteriormente pneumoperitoneo y clínicamente se manifiesta por shock, coagulopatía intravascular diseminada, acidosis, trombocitopenia, perforación intestinal, peritonitis y muerte <sup>24, 110</sup> (Tabla 1).

Estadio	Clínica	Síntomas intestinales	Signos Radiológicos
IA sospecha	Inestabilidad térmica, apnea, bradicardia, letargia	Hiporexia, vómitos, distensión abdominal moderada, residuos gástricos aumentados, sangre oculta en heces	Normal o dilatación intestinal , íleo moderado
IB sospecha	Lo mismo que antes	Lo mismo + sangre en heces franca	Lo mismo que antes
IIA definida	Lo mismo que antes	Lo mismo + ausencia de ruidos abdominales + con o sin dolor abdominal	Intestinal dilatación, íleo, pneumatosis intestinal
IIB definida	Lo mismo + Acidosis metabólica + trombocitopenia	Lo mismo + dolor abdominal con o sin celulitis abdominal	Lo mismo + gas venoso portal + posible ascitis
IIIA avanzado	Lo mismo + hipotensión + acidosis respiratoria + neutropenia, coagulopatía intravascular diseminada	Lo mismo + peritonitis + marcada distensión abdominal con dolor abdominal intenso	Lo mismo + ascitis
IIIB avanzado	Lo mismo que antes	Lo mismo que antes	Lo mismo + pneumoperitoneo

## Introducción

**Tabla 1.** Clasificación de severidad de ECN propuesta por Bell\* y modificada por Walsh y Kliegman\*\*

\* Bell MJ TJ, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 1978; 187(1):1-7.

\*\* Walsh MC KR. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986:179-201.

- **Ecografía de abdomen.** Es una prueba mucho más sensible para detectar gas venoso portal y gas intramural, además de observar el grosor y la ecogenicidad de la pared intestinal, la peristalsis de las asas intestinales y la presencia de colecciones abdominales <sup>111, 112, 113</sup>.

La especificidad de la ecografía para detectar gas portar se ve incrementada (90%) en los estadios II y III, no así en estadios I cuya sensibilidad es del 45% y especificidad del 85%, quedado de manifiesto la importancia en considerar todos los criterios propuestos por Bell más tarde modificados por Walsh y Kliegman para un adecuado diagnóstico y tratamiento de la ECN <sup>114</sup>.

Kim y colaboradores en un estudio de casos y controles sobre prematuros con ECN estadio I observo que las características ecogénicas de la pared intestinal (puntillado o una imagen granular densa) nos indica la presencia de aire intramural, permitiéndonos así diferenciar otras enfermedades gastrointestinales en ausencia de gas venoso portal <sup>115</sup>.

La ecografía también es utilizada para valorar ascitis en el contexto de una probable perforación y para identificar el sitio de paracentesis <sup>116, 117</sup>. La ecografía ayuda a determinar alteraciones de la perfusión de la pared intestinal al igual que del flujo mesentérico. Evalúa la velocidad del pico sistólico y radios entre el troco célico y la arteria mesentérica superior, por Doppler pulsado <sup>109</sup>.

- **Gammagrafía y Resonancia Magnética.** Se ha ensayado el uso de radionucléotidos con Tecnecium 99m difosfanato, para detección de necrosis intestinal. De igual manera estudios utilizando Resonancia Magnética revelan una apariencia de burbujas en las zonas de necrosis intestinal. Estas pruebas de imagen tiene escaso utilidad clínica en ECN <sup>8</sup>.

- **Tomografía Computarizada (TC).** Se ha desarrollado estudios por Patton y colaboradores que utilizan la TC como indicador más sensible en el diagnóstico y progresión de la ECN <sup>118</sup>. Se utiliza un compuesto enteral de iohexol que es impregnado a través de la pared intestinal, absorbido por el peritoneo y excretado por los riñones expresando un coeficiente de atenuación medido en Unidades Hounsfield. Este proceso al parecer no se desarrolla en intestinos normales y esta presente en isquemia intestinal. Rencken y Patton en pacientes con ECN encontraron niveles más altos de este coeficiente de atenuación en orina <sup>118,119</sup>.

### **-Diagnóstico Diferencial**

De los signos y síntomas descritos anteriormente la pneumatosis intestinal que es un hallazgo común de la ECN, debemos considerarla que puede estar presente en casos de enterocolitis por Hirschsprung o casos severos de gastroenteritis. El pneumoperitoneo en ausencia de pneumatosis intestinal quizás sugiere una perforación intestinal espontánea o focal. Esto ocurre alrededor del séptimo día de vida en el 3% de los infantes con un peso menor a 1000 g y de 26 semanas de gestación. Los niños con perforación focal no desarrollan un compromiso sistémico, radiológico o histológico de enterocolitis. Los microorganismo relacionados son *Cándida* y *Estafilococo coagulasa-negativo*. Por lo tanto debemos separar los pacientes que sufren una ECN utilizando los

## Introducción

criterios modificados de Bell de los que presentan una perforación intestinal espontánea, ya que su manejo es diferente <sup>14, 97, 120</sup>.

### **2.1.7. Terapéutica, prevención y pronóstico**

#### ***- Terapéutica***

Existe una amplia gama de opciones terapéuticas acerca de la ECN, cuyo objetivo es tratar la enfermedad o limitar su progresión. La ECN puede tratarse sintomáticamente (médico) y/o quirúrgicamente. Esto dependerá del estadio en que se encuentre el paciente al momento del diagnóstico.

#### ***Tratamiento sintomático o médico***

En estadios I y II de la enfermedad (menor a IIIA) el tratamiento consiste en reposo intestinal y la administración de anti-microbianos por vía parenteral para limitar la invasión y translocación bacteriana. El tratamiento esta basado en la severidad de la enfermedad y esta relacionado directamente con la reducción de los factores que agravan la enfermedad, tratando la infección y ofreciendo soporte respiratorio y cardiovascular <sup>46</sup>. La presión sanguínea, glucosa, electrolitos y equilibrio ácido-base, se deben monitorizar. Toda alimentación y medicación enteral se debe discontinuar y se debe descomprimir el tracto gastrointestinal a través de una sonda oro-gástrica, evacuando el aire y los fluidos residuales <sup>99</sup>. Es necesario revertir la hipotensión con fluidos isotónicos e iniciar por infusión intravenosa una adecuada nutrición parenteral durante 10 a 14 días, periodo considerado de reposo intestinal. Posteriormente se debe recolectar muestras en sangre, orina, heces y líquido céfalo raquídeo para identificar una posible causa infecciosa. Sin embargo tenemos que administrar por vía parenteral anti-microbianos que cubran especímenes anaerobios como aerobios. Los fármacos

utilizados incluyen Ampicilina o Vancomicina para cubrir patógenos Gram positivos; Gentamicina o una cefalosporina de tercera generación como Cefotaxime para cubrir agentes Gram negativos; y Metronidazol o Clindamicina para cubrir organismos anaerobios. Cuando el diagnóstico de ECN es definitivo (IIA) iniciaremos la administración parenteral de antibacterianos y respectivo reposo intestinal <sup>27, 98</sup>. Los anti-microbianos seleccionados deberían tomar en consideración las guías de resistencia local de las propias UCIN <sup>121</sup>.

La terapia cardiovascular incluye expansión de volumen (concentrado de glóbulos rojos), soporte pulmonar (oxigenación y ventilación) y soporte hematológico (transfusión de productos sanguíneos), según indicación clínica <sup>25</sup>.

Sumado a la monitorización clínica y cardiopulmonar, es necesaria una evaluación radiográfica rutinaria. La solicitud de una radiografía abdominal se basará en el estatus clínico o los cambios de conducta de la enfermedad. Se recomienda evaluar cada 4-8 horas. La ecografía abdominal puede ser útil también para monitorizar a estos pacientes.

### ***Tratamiento quirúrgico***

Un 20% a 60% de los neonatos con ECN requieren algún tipo de intervención quirúrgica. Los infantes con diagnóstico de ECN beneficiarios en un inicio, de un manejo agresivo médico con resucitación vascular y terapia anti-microbiana, que evidencian una persistencia o incremento del déficit respiratorio, colapso cardiovascular o deterioro clínico, son tributarios de un manejo quirúrgico <sup>25, 46, 122</sup>.

La perforación intestinal, el aire libre peritoneal o una paracentesis positiva son indicaciones absolutas de cirugía por fallo del tratamiento médico, eritema de la pared

## Introducción

abdominal, masa palpable, gas venoso portal o asa intestinal fija (radiografía simple de abdomen) son consideradas indicaciones relativas de cirugía<sup>123, 124, 125</sup>.

La cirugía consiste en la resección de las áreas necróticas y exteriorización de las asas intestinales viables (múltiples ostomías) seguidas de una descompresión intestinal. Sin embargo la elección quirúrgica dependerá de las condiciones hemodinámicas del paciente, del peso al nacimiento, del grado de afectación intestinal, la cantidad de segmentos afectados y la futura viabilidad del mismo. Un 50% de los neonatos de extremadamente bajo peso al nacimiento (menos de 1000 g) con ECN fallecen posterior a la cirugía<sup>98</sup>.

**-Laparotomía o drenaje peritoneal.** El debate sobre el tratamiento óptimo en los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (mayor a IIIA) o con perforación, sigue en vigencia. El drenaje peritoneal fue reportado por primera vez en 1977 por Ein y colaboradores. Fue practicado en 5 casos de neonatos con un peso entre 750-1600 g<sup>126</sup>. Más tarde Moss y colaboradores presentaron un meta-análisis de 475 pacientes de menos de 1500 g y concluyeron que no existen diferencias significativas entre la laparotomía y el drenaje peritoneal<sup>127</sup>. Demestre y colaboradores en su trabajo de series prospectivas no randomizadas observaron que el drenaje peritoneal fue el tratamiento primario más utilizado con el 44%<sup>128</sup>. En otro sentido Pierro y Rees concluyen que niños de igual o más de 1000 g de peso al nacimiento con ECN tratados por laparotomía tienen mejor sobrevida que los tratados bajo drenaje peritoneal inicial<sup>129, 130</sup>.

**-Enfermedad localizada.** Algunos neonatos presentan una ECN localizada respecto a otros que presentan una afectación desigual y multifocal. La enfermedad localizada se trata de una necrosis de un segmento intestinal, el cual se puede reseca con seguridad, creando una enterostomía proximal con o sin fistula mucosa. Otra propuesta es la

reparación primaria que ocurre cuando los márgenes de los bordes proximales y distales de la resección están bien perfundidos y el neonato se encuentra estabilizado. Hall y Singh en sus estudios de neonatos menores a 1000 g, no encontraron diferencias significativas entre los dos grupos. A pesar de esto la mortalidad sigue siendo alta <sup>131, 132</sup>.

**-Perforación focal intestinal o espontánea.** Hay que notar que la perforación focal ocurre sobre el borde anti-mesentérico de la parte terminal del íleon, las lesiones son pequeñas (5-10 mm), hay contaminación fécal usualmente delimitadas y con un compromiso sistémico medianamente fácil de remontar. La resección intestinal con una reparación primaria es comúnmente practicada. En grupos de neonatos con enfermedad avanzada el drenaje peritoneal es una conducta muy utilizada. Rovin y colaboradores compararon un grupo de niños con ECN más perforación versus otro grupo de niños con perforación focal intestinal o espontánea sin ECN, tratados con drenaje peritoneal. El grupo con ECN el 20% falleció y el 50% requirieron una laparotomía. Mientras que el grupo sin ECN más perforación focal el 100% sobrevivió y un 37% requirió una laparotomía <sup>133, 134</sup>.

**-Enterocolitis necrotizante multifocal.** En estos pacientes con enfermedad multifocal la meta de sobrevida posterior a la cirugía se basa en el control de la sepsis y preservar la mayor cantidad de intestino para evitar asociar morbilidad futura (síndrome de intestino corto o estenosis intestinal). Tradicionalmente las múltiples resecciones seguidas de la creación de estomas se correlacionan con una elevada mortalidad y morbilidad <sup>135</sup>. Se ha propuesto por Moore y colaboradores otro método (Parchar-Drenar-Esperar “PD&E”) que consiste en reparar las zonas perforadas y recubrir con epiplón. Posteriormente se coloca drenajes en los cuadrantes superiores abdominales

## Introducción

más la pelvis y esperar de 7 a 14 días, para un segundo tiempo quirúrgico según la evolución del paciente <sup>136</sup>. Esta alternativa quirúrgica (PD&E) propuesta por el Departamento de Cirugía de UCLA-USA, quizás sea una opción válida sin embargo plantea una dificultad extrema de decisión y de validación por otras instituciones <sup>17</sup>. Otro abordaje descrito en 1996 por Vaughan y colaboradores (“clip&drop-back”) consiste en reseca las zonas intestinales necróticas, cerrar los bordes finales del intestino viable discontinuando el tránsito intestinal (no se realiza anastomosis o enterostomías) y finalmente irrigar la cavidad abdominal copiosamente. Después el paciente recibe una adecuada resucitación y se inicia el control de la respuesta inflamatoria. Al cabo de 48 o 72 horas se realiza una nueva laparotomía con el fin de restablecer el tránsito intestinal o la creación de estomas <sup>137, 138</sup>. Las técnicas descritas por Moore y Vaughan necesitan de futuros estudios para juzgar su efectividad.

**-Pan-necrosis.** Son neonatos que desarrollan una enterocolitis fulminante o total con opciones limitadas de cirugía. La resección intestinal generalmente no es viable. Se han propuesto varias técnicas como: colocación de drenaje percutáneo, efectuar múltiples resecciones con varios estomas, creación de una enterostomía muy proximal seguida de un segundo tiempo al cabo de 48h, o aplicar técnicas descritas por Moore o Vaughn (PD&E o “clip&drop-back”) respectivamente <sup>136, 137, 139</sup>.

### **- Prevención**

Las estrategias de prevenir la ECN recaen en dos categorías: aquellas que han demostrado por medicina basada en evidencia ser eficaces o aquellas cuya eficacia es limitada. La leche materna, el inicio trófico, los esteroides prenatales y la administración de antibióticos enterales son tratamientos efectivos mientras que la

restricción de fluidos, los regímenes estandarizados de alimentación, las inmunoglobulinas orales, los suplementos con: L-arginina y ácidos grasos poli-insaturados, la acidificación de la leche, los bióticos, los factores de crecimiento, la eritropoyetina, los anti-oxidantes y los factores trefoil, entre otros, han resultado limitados o su eficacia esta en estudio <sup>121</sup>.

-Leche Materna. Esta reportado que reduce la incidencia y severidad de padecer ECN. Se ha correlacionado varios componentes de su contenido con efectos preventivos. Estos componentes son: agentes anti-inflamatorios (IL-10), factor de crecimiento endotelial, eritropoyetina (Epo), lisoenzimas, inmunoglobulinas (IgA), pre y probióticos que modulan la microflora intestinal y acetil-hidrolasa (enzima que degrada el FAP) <sup>140</sup>. En pre-términos no esta claro que la leche materna reduzca la incidencia de ECN <sup>106</sup>.

-Alimentación trófica. El inicio de la alimentación a volúmenes pequeños, quizás revierta la respuesta inflamatoria y atrofia intestinal asociada a un prolongado reposo intestinal. Se sugiere que activa enzimas digestivas, establece enlaces de hormonas digestivas, incrementa el flujo intestinal y la motilidad en infantes prematuros <sup>141</sup>. Berseth y colaboradores en el 2003 fueron los primeros en publicar que el inicio de alimentación temprana disminuye la incidencia de ECN <sup>142</sup>. Según la Cochrane no esta claro el rol que juega esta estrategia en los niños prematuros.

-Corticoides prenatales. Los glucocorticoides tienen efectos beneficiosos sobre la maduración y la supresión inflamatoria. Estudios randomizados han observado una significativa reducción de la incidencia y riesgo de padecer ECN. Quizás se deba a una reducción de la translocación bacteriana o por un incremento de la actividad enzimática (lactasa, maltasa, sucrasa) y Na/K-ATPasa <sup>143,144</sup>.

## Introducción

-Antibióticos enterales. Son utilizados de manera profiláctica en neonatos pre-término de bajo peso al nacer, previniendo la colonización de patógenos. Una revisión Cochrane por Bury y Tudehope concluyen que la administración profiláctica enteral de antibióticos reduce significativamente la posibilidad de desarrollar ECN pero no las muertes ocasionadas por la enfermedad <sup>145</sup>.

-Prebióticos. Una estrategia potencialmente preventiva que consiste en administrar sustancias como carbohidratos de cadena larga/corta o mucina, promoviendo la proliferación de bacterias comensales como *Bifidobacterium*. El tratamiento con prebióticos quizás tengan un efecto positivo sobre el sistema inmune innato. La administración de este tratamiento ocasiona algunos efectos indeseables (reversibles) como flatulencias o diarrea <sup>146</sup>.

-Probióticos. Emergen como una prometedora terapia. Son microorganismos que provocan cambios sobre la mucosa respecto a: permeabilidad, intercambio, producción y protección intestinal mediada por IgA y citoquinas. Los componentes más empleados en las fórmulas infantiles corresponden al género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y en menor extensión *Streptococos*. Hay estudios clínicos en niños de menos de 1500 g, que sugieren una reducción de la incidencia y severidad de ECN, sin embargo es necesario confirmar su eficacia y seguridad con estudios a largo plazo, para recomendar su práctica en prematuros <sup>147</sup>. Estudios in vitro han demostrado que bacterias comensales reducen la señal inflamatoria por inhibición del FN-κB <sup>148, 149</sup>, dando paso a que Lin y colaboradores más tarde sugieran que la colonización con probióticos (*Lactobacilos* y *Bifidobacterias*) disminuye el riesgo de ECN en neonatos de MBPN <sup>150</sup>.

-Postbióticos. Interactúan sobre los metabolitos producidos por bacterias comensales del colon. El ácido butírico es un ácido graso de cadena corta que generan algunos efectos beneficiosos sobre la flora en procesos de crecimiento y diferenciación intestinal, supresión inflamatoria y apoptosis. El butirato se ha administrado en modelos experimentales con animales de enfermedad inflamatoria intestinal con limitados resultados <sup>46, 151</sup>. Otros productos de las bacterias comensales pueden inducir patrones moleculares -“patógeno asociado”- que interactúan con receptores de defensa transmembrana lipopolisacárido “toll-like” (TLR), generando efectos protectores al disminuir el riesgo infeccioso de las terapias probióticas <sup>152</sup>.

-Otros agentes involucrados. Existen múltiples estudios que relacionan una significativa reducción de los estadios descritos por Bell empleando suplementos de L-arginina (sustrato del ONS) que se encuentra en bajos niveles plasmáticos en neonatos con ECN <sup>47, 153</sup>.

Los anti-oxidantes (vitamina E) o enzimas anti-oxidantes (superóxido dismutasa) reducen la peroxidación lipídica y el daño intestinal. En una revisión Cochrane sobre su implicación en la prevención de ECN se recomienda hacer más investigaciones <sup>154</sup>.

Se ha propuesto por Neu y Tamaki el uso de glutamina como factor protector de la barrera hermética, al disminuir la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana y producción de FNT y al aumentar factores citoprotectores (heme oxigenasa-1) y anti-oxidantes (superóxido dismutasa y glutatión) <sup>155, 156</sup>.

La acidificación del contenido gástrico documentada por Carrión y Egan, disminuye el riesgo y la incidencia de ECN <sup>157</sup>. Los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (long chain polyunsaturated fatty acids “PUFA”) tienen un efecto modulador de la

## Introducción

inflamación y del sistema inmune, al parecer reduce la incidencia de los estadios II y III de ECN, mediante regulación del FAP <sup>158, 159</sup>.

Las inmunoglobulinas (IgA y IgG) en numerosas publicaciones han manifestado un efecto inmuno-protector sobre la mucosa gástrica. En 1988 Eibl y colaboradores encontraron una asociación favorable en la reducción de la incidencia de ECN <sup>160</sup> [Eibl, 1988 #1164]. Sin embargo Foster y Cole en una revisión Cochrane en el 2004 no encontraron tal asociación. Solamente un estudio no randomizado y controlado apoyo la relación de IgA con reducción de ECN <sup>161</sup>.

El Factor de crecimiento endotelial (FCE) constituye un potente inductor y estimulador de células citoprotectoras, enzimas, péptidos trefoil y de procesos de proliferación y migración <sup>162</sup>. En neonatos pre-término con ECN los niveles en saliva y suero de FCE se encuentran disminuidos <sup>163</sup>. En modelo de rata neonatal de ECN el tratamiento con FCE mantiene la integridad intestinal en el lugar del daño intestinal, acelerando la maduración de células caliciformes y producción de mucina <sup>164</sup>. Debido a su potencial efecto adverso (sobre-expresión celular) el uso de factores de crecimiento en neonatos prematuros se debe valorar con extrema precaución <sup>165</sup>.

La presencia de eritropoyetina (Epo) en la leche humana y la expresión de los receptores Epo en las vellosidades intestinales sugiere que la Epo tiene un rol en el desarrollo del tracto gastrointestinal <sup>166, 167</sup>. Estudios en modelos animales y clínicos observan que el uso de Epo recombinante (rEpo) disminuye la incidencia de ECN. Ledbetter dispuso rEpo como prevención en el tratamiento de anemia del prematuro observando una reducción en la incidencia de ECN. El efecto sobre elementos vasoactivos indica que su administración ocasiona una reducción de lípidos peroxidantes y formación de ON pero no modifica la generación de FAP <sup>166, 168, 169</sup>.

Los péptidos trefoil son considerados protectores y reparadores del tracto intestinal. Modelos experimentales en rata neonatal observan un efecto protector con disminución de la severidad de ECN <sup>79, 170</sup>.

### **- Pronóstico**

Desde su primera descripción en 1888 hasta la actualidad la ECN sigue siendo una enfermedad devastadora en neonatos a pesar de los estudios experimentales sobre marcadores biológicos, moleculares, de ingeniería celular y diagnósticos. Bell y colaboradores en 1978 en su estudio sobre decisiones terapéuticas basadas en la clínica, concluyen que la cirugía se reserva a estadios avanzados y en pacientes que no responden al tratamiento médico. Por lo tanto este grupo es el que tiene menor posibilidad de supervivencia <sup>6</sup>. De Souza y colaboradores han observado una relación entre la extensión y el lugar donde ocurre el daño intestinal con la mortalidad de los pacientes afectados de ECN. En el grupo de pacientes en los que sólo el íleon estuvo afectado el riesgo (odds ratio -“OR”- ajustado a extensión y edad gestacional) de mortalidad fue muy bajo (OR: 1). Mientras que sí, la afectación compromete el íleon-yeyuno más el intestino grueso su riesgo de fallecer aumento a 2,85. Se encontraron en este estudio otros factores de riesgo asociados como enfermedad extendida (OR: 1,08) y ser pequeño para la edad gestacional (OR: 4,62) <sup>22</sup>. La mortalidad total de los pacientes con ECN esta en un rango entre el 10 a 50% <sup>18</sup>. De los que sobreviven debemos mencionar algunas consecuencias secundarias a la terapéutica médica o quirúrgica como: síndrome de intestino corto, estenosis y alteraciones del desarrollo neurológico <sup>12</sup>.

## Introducción

-Síndrome de intestino corto. Este síndrome se caracteriza por la inadecuada absorción de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo. Es secundario a una reducción importante intestinal fruto de una gran extensión de la ECN (enfermedad multifocal, diseminada o fulminante). Estudios que evidencien estrategias reales para minimizar el riesgo de intestino corto están bajo investigación. No existe un gran registro prospectivo de pacientes sometidos a resección por ECN <sup>12</sup>.

-Estenosis intestinal. Estudios retrospectivos y prospectivos reportan una incidencia de estenosis entre el 10% al 55% de los pacientes que recibieron tratamiento médico y/o quirúrgico. En una serie los pacientes con ECN severa que se les practicó una enterostomía muy proximal la incidencia fue del 55%. Mientras que otras series reportan una menor incidencia (10% a 35%) tanto en anastomosis primaria como en pacientes portadores de enterostomía. La mayoría de estenosis post-ECN ocurre en el colón siendo más común el lado izquierdo <sup>171, 172</sup>. El impacto de la estenosis intestinal sobre el resultado a largo plazo nos indica que este grupo de pacientes tiene un alto riesgo de adquirir el síndrome de intestino corto <sup>12</sup>.

-Resultados del desarrollo neurológico. En un estudio de corte retrospectivo Stevenson y colaboradores confirmaron el pobre desarrollo neurológico de los niños sobrevivientes de ECN. Menos de la mitad de estos pacientes a los tres años de seguimiento, tuvieron un desarrollo normal <sup>12</sup>. Dos revisiones sistemáticas y meta-análisis recientes han asociado la ECN con el incremento a largo plazo de riesgos neurológicos como: parálisis cerebral y deterioro “cognitivo, visual, auditivo o psicomotor”. Estos riesgos se duplican en neonatos tratados quirúrgicamente respecto a los que recibieron tratamiento médico <sup>173, 174</sup>.

## 2.2. Flujo Mesentérico

### 2.2.1. Anatomía del flujo sanguíneo abdominal de la rata

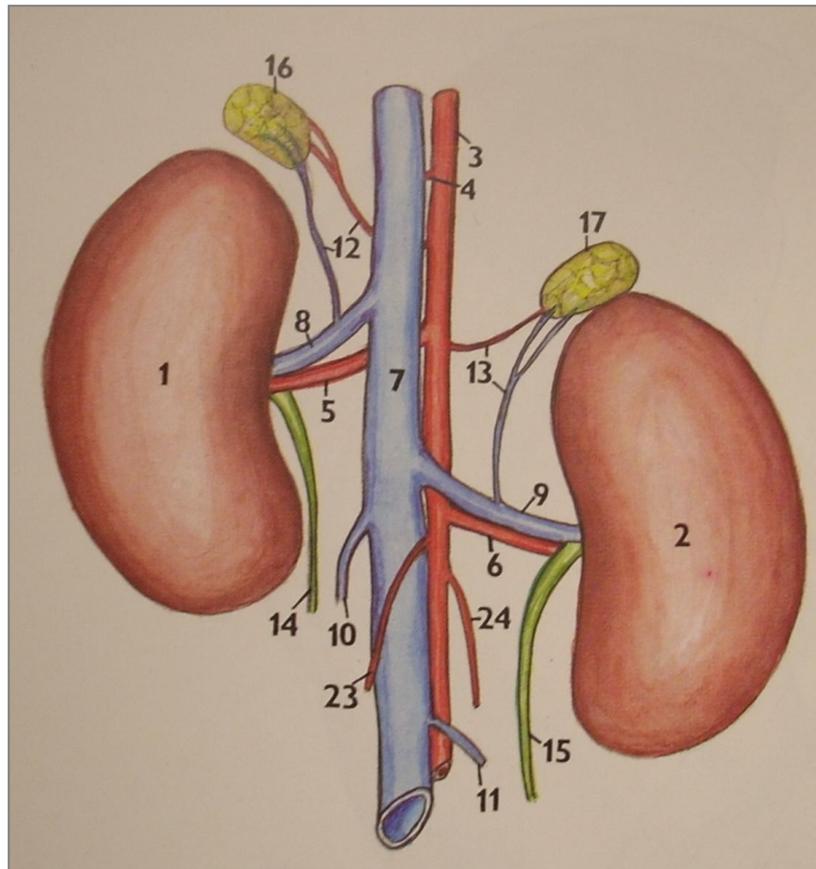
Para entender la cantidad de flujo sanguíneo a estudiar en un modelo experimental de rata repasaremos algunos valores hemodinámicos básicos como: ritmo cardiaco (320-480) pulsaciones por minuto; presión diastólica (60-90) mm Hg; presión sistólica (75-120) mm Hg; ritmo respiratorio (85-110) respiraciones por minuto; volumen sanguíneo (5,6-7,1) ml/100 g; hemoglobina (11,5-16,1) g/dl y; glóbulos rojos ( $6,76-9,75 \times 10^6$ ) por  $\text{mm}^3$  son valores a considerar como punto de partida para el estudio vascular <sup>175</sup>.

#### **-Irrigación abdominal**

La primera rama de la aorta abdominal por debajo del diafragma es el tronco celiaco con sus tres ramas: arteria gástrica (estómago), arteria hepática (hígado) y arteria esplénica (páncreas-bazo). La segunda arteria es la *mesentérica superior* o *craneal* que va a irrigar directamente al intestino a través de sus ramas: cólica media, pancreaticoduodenal caudal, cólica derecha, arterias yeyunales y arteria íleon-cecólica (colis-ilei-cecalis). La tercera arteria que nace de la aorta abdominal es la arteria renal, la cual es corta y va al riñón. Posterior a la arteria renal se localizan las arterias genitales con salida a los testículos o los ovarios. Siguiendo el recorrido abdominal de la aorta en sentido caudal se encuentran las arterias iliolumbares que van a proporcionar irrigación a la musculatura dorsal y lumbar. Continuando la siguiente rama de la aorta abdominal es la arteria mesentérica inferior o caudal con sus ramas: cólica izquierda y rectal craneal. En el punto más distal del recorrido de la aorta abdominal se localiza la arteria caudal que brinda su aporte a la cola del animal. Por último la aorta abdominal se divide

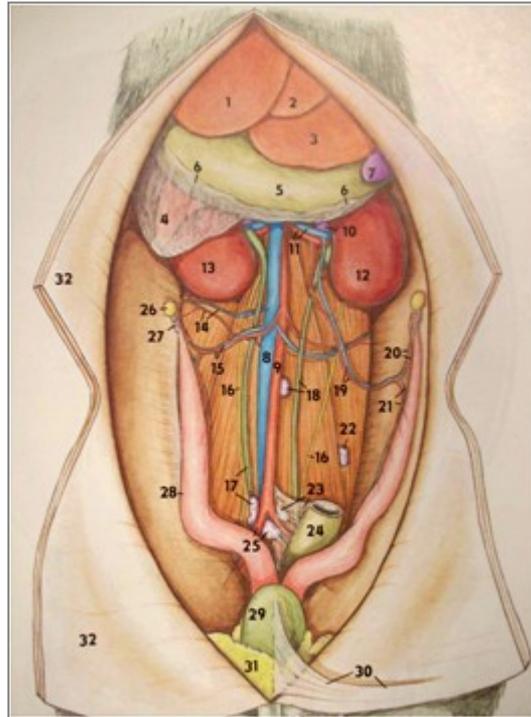
## Introducción

en dos arterias iliacas que más adelante siguiendo el recorrido de las extremidades inferiores pasan a formar las arterias femorales (Figuras 5 y 6) <sup>176</sup>.



**Figura 5.** Irrigación abdominal y relación anatómica de la rata macho\*. 1. Riñón derecho. 2. Riñón izquierdo. 3. Aorta abdominal. 4. Arteria mesentérica superior o craneal. 5. Arteria renal derecha. 6. Arteria renal izquierda. 7. Vena cava inferior. 8. Venal renal derecha. 9. Vena renal izquierda. 10. Rama musculo dorsal derecho. 11. Rama musculo dorsal izquierdo. 12. Arteria y vena adrenal derecha. 13. Arteria y vena adrenal izquierda. 14. Uréter derecho. 15. Uréter izquierdo. 16. Glándula adrenal derecha. 17. Glándula adrenal izquierda. 23. Arteria testicular derecha. 24. Arteria testicular izquierda.

\*Popesko P, Rajtová V, Horak J. *A Colour Atlas of Anatomy of samall Laboratory animals. Vol 2: rat, mouse, hamster.* Ed. Saunders, 2002



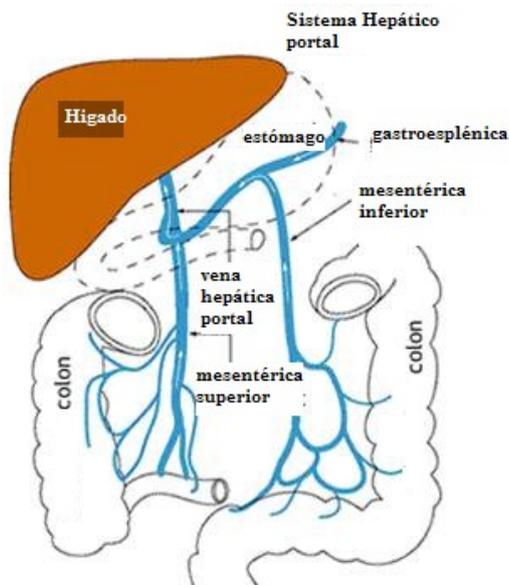
**Figura 6.** Irrigación abdominal y relaciones anatómicas de la rata hembra\*. 1. Hígado: lóbulo lateral derecho. 2. Lóbulo lateral medio. 3. Lóbulo lateral izquierdo. 4. Proceso caudal. 5. Estómago. 6. Omento mayor. 7. Bazo. 8. Vena cava inferior. 9. Aorta. 10. Nódulo linfático renal izquierdo. 11. Arteria y vena renal izquierda. 12. Riñón izquierdo. 13. Riñón derecho. 14. Arteria y venal abdominal craneal. 15. Vena y arteria ovárica derecha. 16. Nervios esplénicos. 17. Uréter derecho y nódulo linfático iliaco derecho. 18. Uréter izquierdo y nódulo aorto-lumbar. 19. Arteria y vena ovárica izquierda. 20. Arteria y vena tubárica. 21. Arteria y vena uterina. 22. Nódulo linfático psoas. 23. Nódulo linfático iliaco izquierdo. 24. Recto. 25. Nódulo linfático sacro. 26. Ovario. 27. Tubo uterino. 28. Cuerno del útero. 29. Vejiga. 30. Ligamento de la vejiga.

\*Popesko P, Rajtová V, Horak J. *A Colour Atlas of Anatomy of samall Laboratory animals. Vol 2: rat, mouse, hamster.* Ed. Saunders, 2002

En el sistema venoso a nivel abdominal se localiza la vena cava inferior que drena a través de la vena hepática la sangre procedente del hígado. La venal renal drena la sangre del riñón, las venas genitales drenan el flujo de las gónadas e ingresan en la cava

## Introducción

inferior, las venas caudal, iliaca y femoral reciben el flujo de la región distal (cola) y de las extremidades inferiores. El sistema portal hepático conduce la sangre del mesenterio, intestino delgado, bazo, estómago y páncreas hacia el hígado <sup>177</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Sistema hepático-portal y relaciones anatómicas de la rata\*

\*Rat- Circulatory 2010. Available from URL: [http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat\\_circulatory.html](http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat_circulatory.html)

## 2.2.2. Anatomía y fisiología del flujo sanguíneo abdominal en humanos

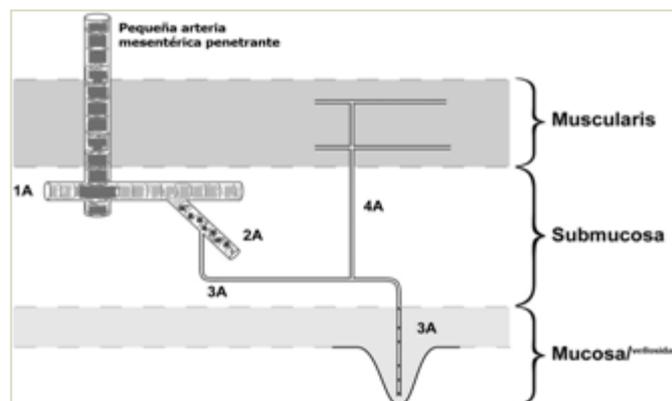
La distribución de los vasos principales en los seres humanos, sus territorios de irrigación y su drenaje hacia la vena cava inferior nos da una orientación de la importancia que tiene el flujo intestinal representado en litros por minuto (l/min) sobre los tejidos al proveer oxígeno y a transferir nutrientes absorbidos hacia resto del cuerpo. El tubo digestivo es un órgano de gran superficie (300 metros cuadrados), donde 250 corresponden al intestino delgado <sup>178</sup>.

Nowiki en sus estudios sobre isquemia y enterocolitis divide en tres segmentos (basados en su función) la anatomía arterial intestinal <sup>70</sup>. El primer segmento inicia con los dos

troncos mesentéricos (superior/inferior) hasta dar origen a pequeñas arterias mesentéricas penetrantes. Este segmento finaliza en las ramas terminales de las arcadas de la arteria mesentérica para conducir el flujo a la pared intestinal.

El segundo segmento empieza con las ramas terminales de la arcada mesentérica (arterias muy pequeñas de 200 micras= $\mu\text{m}$ ) que penetran la muscularis y desciende directamente a la submucosa. Cada arteria da origen a varias arteriolas (1A), las cuales cambian de dirección generando arteriolas (2A). Estos vasos permanecen en la submucosa interconectándose con vaso 1A, formando puentes o “shunts” arteriolar-arteriolar. La función del segundo segmento es servir de puente entre la macro y micro circulación, como una especie de colector de presiones.

El tercer segmento comienza con arteriolas (3A) que descienden a la mucosa y vellosidades. A demás cada arteriola 3A regresa a la muscular a través de arteriolas (4A) las mismas que van paralelas generando puentes entre las ramas 3A y 4A. Este segmento da origen a capilares, los mismos que son responsables en su porción terminal (circulación intestinal) del intercambio entre solutos y agua <sup>70</sup> (Figura 8).



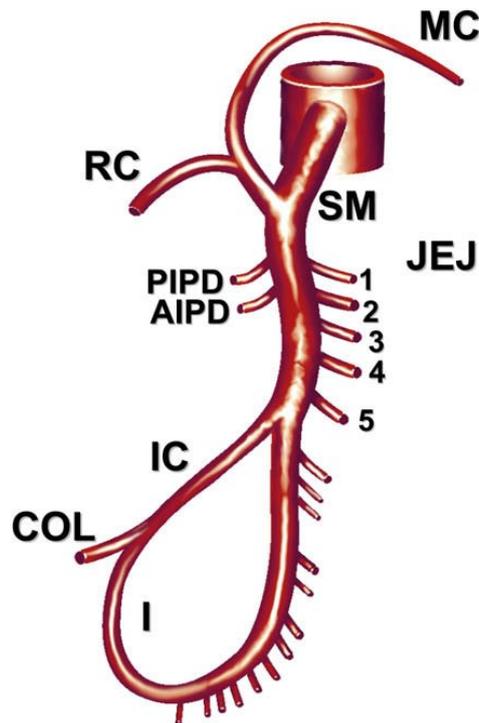
**Figura 8.** Representación esquemática de la microcirculación intestinal\*. 1A. 2A. 3A.4A: segmentos de arteriolas. \*Philip T. Nowicki. *Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how.* *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(3):152-58.

## Introducción

### **-Irrigación abdominal**

El tronco celiaco se desprende de la aorta a la altura de la primera vértebra lumbar, su longitud es de un centímetro y su diámetro cercano a la mitad del aórtico. El tronco celiaco tiene tres ramas: la arteria esplénica (bazo), la arteria gástrica izquierda (cardias y curvatura menor del estómago) y la arteria hepática común (cabeza del páncreas, primera porción del duodeno y el hígado). La oclusión del tronco celiaco no alcanza a distorsionar sensiblemente la función de estos órganos.

La *arteria mesentérica superior (AMS)* emerge de la aorta por detrás del páncreas, a la altura del plano trans-pilórico, a 1,25 centímetros por debajo del tronco celiaco, usualmente a nivel de la primera vértebra lumbar<sup>179, 180</sup>. Su diámetro es similar al del tronco celiaco y desciende en la raíz del mesenterio disminuyendo rápidamente de calibre<sup>180</sup>. Su fuente principal de irrigación es el intestino. El ángulo que forma con su origen y el eje longitudinal de la aorta es menor a 90 grados, lo que permite capturar un importante caudal, pero también posibles émbolos. De la AMS se originan ramas muy anastomosadas. Estas son: la arteria pancreatoduodenal inferior anterior y posterior (páncreas y duodeno), la arteria cólica media (colon transverso), la arteria cólica derecha (colon ascendente), la arteria ileocólica con 9 a 13 ramas (íleon terminal y ciego) y arterias yeyunales con 4 a 6 ramas<sup>179, 181</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Diagrama de la anatomía de arteria mesentérica superior\*. SM= mesentérica superior. AIPD= pancreatoduodenal inferior anterior. PIPD= pancreatoduodenal inferior posterior. COL= ramas cólicas. I= ileal. IC= ileocólica. JEJ= ramas yeyunales. RC= cólica derecha. MC= cólica media.

\*Nebesar RA, Kornblith PL, Pollard JJ, et al. Celiac and superior mesenteric arteries: a correlation of angiograms and dissections. Boston: Little, Brown; 1969. p. 48

A diferencia de los territorios irrigado por el tronco celiaco la AMS esta provista de poca circulación colateral y por ello una oclusión aguda en su tronco principal puede desencadenar necrosis en pocas horas o muerte <sup>178</sup>.

Las vías colaterales que van hacia la AMS son los vasos pancreáticos, las arcadas gástricas - gastroepiploicas, y los vasos extracelómicos. Marston y colaboradores comentan que si la oclusión de esta arteria es gradual, se podría dar lugar a la formación de nuevas vías anastomóticas dadas sus condiciones fisiológicas e histológicas <sup>178, 182</sup>.

## Introducción

En las autopsias aproximadamente el 20% de los individuos tienen el 50% de estenosis en el tronco celiaco, sin embargo muchos de estos pacientes son asintomáticos por el riego colateral con los vasos provenientes de la AMS (gastroduodenal y pancreático duodenal) <sup>179</sup>. Por otro lado en autopsias no es común que el 30% de la AMS y de la arteria mesentérica inferior estén estenóticas debido a que la arteria marginal de Drummond y el arco de Riolan permiten crear una circulación colateral importante entre arteria mesentérica superior e inferior <sup>179</sup>.

La arteria mesentérica inferior se origina a unos centímetros antes de la bifurcación a nivel de la tercera vértebra lumbar por debajo de la AMS a unos 6 o 7 centímetros. Sus ramas son: la arteria cólica izquierda, sigmoidea y hemorroidal que irriga la parte final del colon transversal, del colon descendente, sigma y parte proximal del recto. El diámetro de la mesentérica inferior es un tercio de la AMS (0,5 centímetros) y cuenta con circulación colateral cuantiosa <sup>179</sup>.

## **-Fisiología y regulación del flujo intestinal**

La ecuación de Poiseuille<sup>a</sup> evidencia que principal factor regulador del flujo en un vaso es el radio, pues el único factor no lineal. Al examinar esta ecuación se observa que el radio es el responsable de la resistencia al flujo de sangre, porque la resistencia varía inversamente a la cuarta potencia del radio. El primero en medir el flujo de la sangre en el intestino fue Mall en 1888. A partir de su investigación en perros se conoce que el flujo gastrointestinal guarda más relación con la intensidad de la función que con el

---

<sup>a</sup> Flujo=  $\frac{N \pi r^4 (P_1 - P_2)}{8 \eta L}$ , donde  $\eta$  = constante de proporcionalidad; N= número de tubos paralelos, idénticos en radio y longitud, en que se distribuye el flujo; (P1 -P2)= diferencia de presiones entre los extremos de los vasos, r=radio del vaso;  $\eta$ =viscosidad del vaso; L=longitud del vaso.

soporte vital del mismo <sup>183</sup>. El intestino recibe más de la mitad de la circulación esplácnica en proporcionalidad con su área, siendo el gradiente de flujo máximo en el duodeno y mínimo en el colon. El intestino delgado recibe cerca del doble de sangre que el colon y por lo tanto consume más oxígeno. Del flujo total que el intestino recibe en reposo el 60% ó 70% va al epitelio (vellosidades), y el 40% va a las criptas y células caliciformes <sup>179</sup>. Cuando se eleva el flujo (estimulado por la ingestión de alimento) se incrementa el volumen que va a la mucosa, hasta alcázar el 70% ó 80% del total ocurriendo un robo de flujo de las capas más profundas, quizás esto explique en parte porque la autorregulación de este flujo es menos eficiente en el intestino que el riñón o en el cerebro <sup>178</sup>.

Otro lugar donde se regula flujo y la resistencia ocurre en las arteriolas 1A y 2A a nivel de la submucosa. Es importante comentar que los estímulos de daño sobre la luz intestinal (toxinas o agentes infecciosos), no están en contacto directo con estos sitios donde se regula la resistencia. La distancia entre la submucosa y la base de la vellosidad es de 500  $\mu\text{m}$ , una distancia que permite la difusión pasiva intersticial en ausencia de un daño extenso de la mucosa. Los agentes mediadores de la inflamación sin embargo pueden alterar la perfusión y permitir el ingreso a la mucosa y submucosa de agentes externos favoreciendo la lesión epitelial <sup>70</sup>.

## **2.3. Ecografía Doppler abdominal**

### **2.3.1. Generalidades**

El principio de la ecografía Doppler es el análisis del cambio en las ondas sónicas reflejadas (ecos) por estructuras en movimiento, que son en general células sanguíneas.

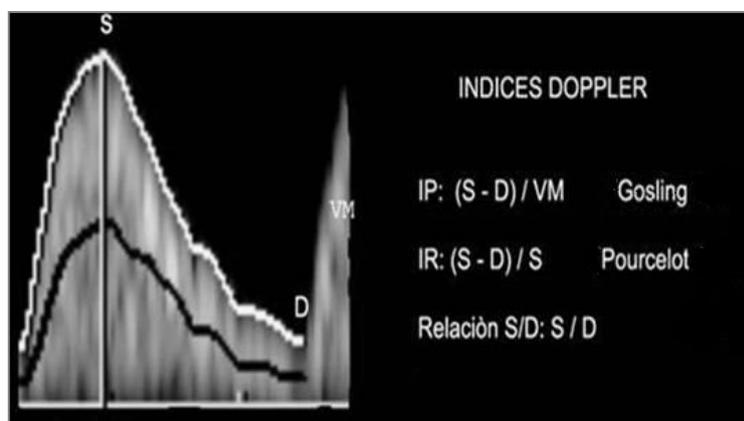
El Doppler continuo consta de dos componentes para trabajar de forma simultánea (emisor y receptor). Su mayor utilidad consiste en la evaluación de los vasos con muy alta velocidad, ya que no presenta el fenómeno de “aliasing” y todas las velocidades aparecen en el gráfico. Cuando la velocidad es muy alta y el sistema no puede analizar correctamente, lo interpreta como una superposición de señales y lo representa al otro lado de la línea del espectro Doppler. A este fenómeno se le denomina “aliasing”. El Doppler pulsado consiste en la emisión y recepción de las ondas por el mismo cristal de la sonda. Al captar sólo ecos que tarden determinado tiempo en llegar, el volumen de la muestra se mueve a distinta profundidad y es necesario estimular más cristales que emitan ultrasonido Doppler al mismo tiempo. Su mayor limitación radica en que no se puede evaluar estructuras que se mueven a muy altas velocidades. La máxima velocidad que se puede medir es la que corresponde a la mitad de la frecuencia de emisión. A esto se llama “límite de Nyquist”<sup>184</sup>.

Hay determinados aspectos técnicos del Doppler pulsado a considerar como: 1) la corrección del ángulo de insonación que debe ser menor a 45 grados, para que su influencia en el cálculo sea mínima o de lo contrario cambiar de orientación la sonda para alcanzar el menor ángulo posible. 2) Es necesario ajustar la ganancia para observar una buena definición de los bordes del espectro Doppler. 3) Regular la velocidad de

repetición de los pulsos o escala y, 4) los equipos Doppler actuales utilizan filtros para eliminar ecos provenientes del ruido sónico y del movimiento de los tejidos que puedan contaminar la señal<sup>184</sup>.

El Doppler color direccional es una variante del Doppler pulsado y esta basado en los cambios de velocidad de las células sanguíneas. Analiza velocidad y dirección y los representa en un código bicromático (rojo y azul). Cuando se acerque a la sonda (positivo) se ha codificado en rojo y el que se aleje (negativo) en azul. El Doppler color también es afectado por el ángulo de insonación. El “aliasing” en el Doppler color se representa como un color opuesto al normalmente esperado<sup>184</sup>.

**-Flujometría Doppler.** Permite medir diferentes velocidades del flujo. Se debe identificar selectivamente un vaso y utilizar escalas de velocidades altas entre 30 y 50 centímetros (cm). El ángulo de insonación debe ser inferior a 45 grados y obtener tres ondas de similares características<sup>185</sup>. En cuanto a los parámetros utilizados en la práctica clínica para valorar la resistencia vascular se toma en cuenta: el índice de pulsatilidad, el índice de resistencia y sístole/diástole. A demás otros parámetros como la velocidad sistólica máxima y el flujo diastólico reverso (Figura 10).



**Figura 10.** *Flujometría Doppler. IP: índice de pulsatilidad. IR: índice de resistencias. S/D: índice sístole/diástole. S: sístole. D: diástole. VM: velocidad media.*

## Introducción

**-Índice de pulsatilidad (IP).** Fue propuesto en 1975 por Gosling y King<sup>186, 187</sup>. Es definido como la velocidad sistólica máxima (S) menos la velocidad diastólica final (D) sobre la velocidad promedio en el ciclo (VM)<sup>184</sup>.

**-Índice de resistencia (IR).** Conocido como índice de Pourcelot, se define como la velocidad sistólica máxima (S) menos la velocidad diastólica final (D) sobre la velocidad sistólica (S)<sup>188</sup>. Este índice tiene la ventaja de ser independiente del ángulo de insonación y la sección del vaso estudiado<sup>184</sup>.

**-Velocidad sistólica máxima (VSM).** Es el pico máximo de la velocidad sistólica.

**-Flujo diastólico reverso (FDR).** Es una característica del flujo diastólico que se presenta en casos de pulsatilidad muy elevada o patológica. Se define como el flujo (negativo) de fin de diástole (reverso) en un patrón cíclico. Erskine y colaboradores en 1986 describieron en fetos de gemelos monocoriónicos la presencia de este comportamiento en el flujo diastólico medido en la arteria umbilical, siendo más tarde confirmado por Hecher, Wee y Gratacos<sup>189, 190, 191, 192</sup>.

**-Índice sístole/diástole (S/D).** Es un ratio o índice entre dos velocidades específicas de dos puntos del ciclo. El índice sístole sobre diástole fue descrito en 1977 por FitzGerald y Drumm, y en 1980 por Stuart lo define como  $S/D = A/B$ <sup>193, 194</sup>.

**-Valoración de la arteria mesentérica superior.** Para identificar la *arteria mesentérica superior (AMS)* tomaremos como referencia el tronco celiaco a 1 ó 2 cm por debajo de este. Como característica destacaremos que la raíz de la AMS se visualiza con claridad por ecografía pero sus ramas pierden definición. En neonatos prematuros tenemos que considerar que al valorar la AMS existe una adaptación circulatoria con arteria cerebral media y ductus arterioso en las primeras horas de vida hasta la primera

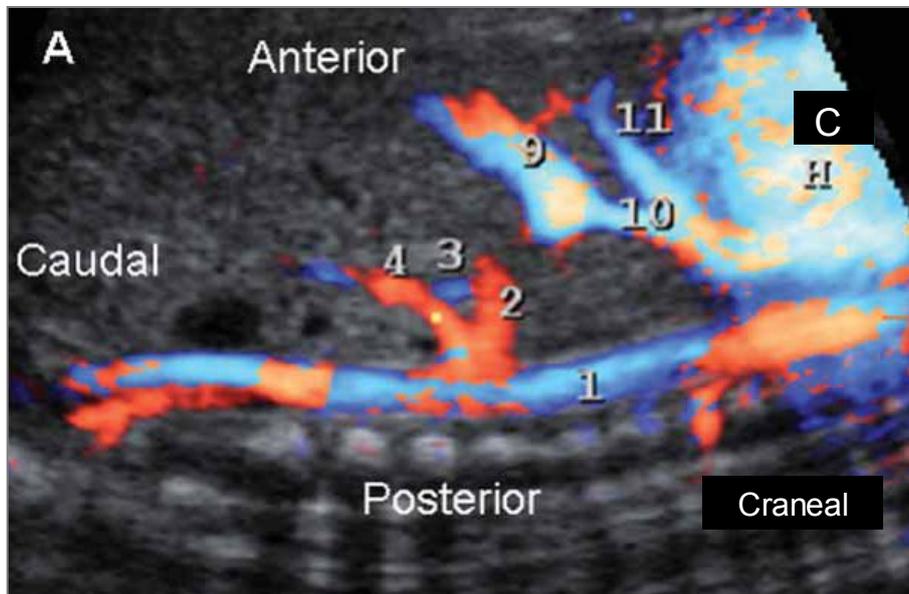
semana comparándolos con los niños a término. De la adecuada adaptación (etapa de transición) dependerá la presencia o ausencia de disturbios circulatorios como hemorragias cerebrales o ECN <sup>195</sup>.

Paacci y colaboradores han cuantificado valores normales de las velocidades de flujo abdominal de dos vasos importantes como la AMS y el tronco celiaco. Los valores que fueron sujetos de estudio son la velocidad sistólica máxima (VSM), la velocidad del final de la diástole, la velocidad media, el tiempo promedio de la velocidad media y los índices de pulsatilidad (IP) y resistencia (IR). El estudio se realizó en cuatro grupos: un grupo de pacientes nacidos a término sin morbilidad asociada; dos grupos de pacientes con nacimientos pre-término sin morbilidad asociada entre las semanas 29 a 36 de gestación y; un cuarto grupo de niños pre-térmico con distress respiratoria al nacimiento entre las semanas 26 a 28 de gestación. Este trabajo en situación normal sobre la arteria mesentérica superior han revelado que las velocidades se incrementan en todos los grupos manteniendo una tendencia entre cada uno de ellos y que a partir del vigésimo octavo día de nacimiento los valores flujométricos descritos anteriormente se acercan al grupo de pacientes a término <sup>196</sup>.

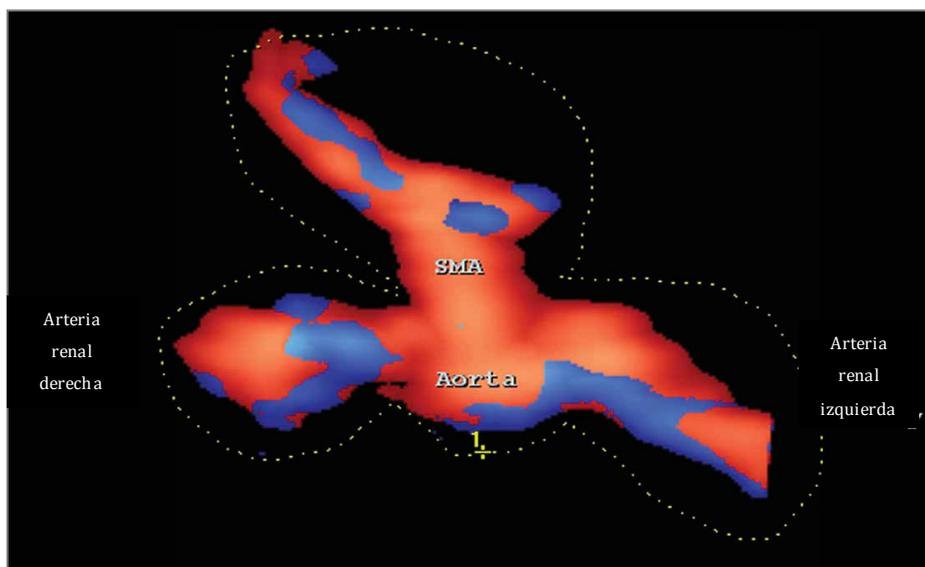
Gindes y colaboradores han realizado un importante estudio anatómico de la vascularización abdominal fetal utilizando ultrasonido tridimensional (3-D) con sondas entre 4 a 8 MHz y técnicas Doppler color, modo B y de alta definición con el objeto de observar la evolución de los vasos a lo largo del desarrollo fetal, describiendo perfectamente la orientación de la AMS en cortes sagitales y axiales <sup>197</sup> (Figura 11).

## Introducción

A



B



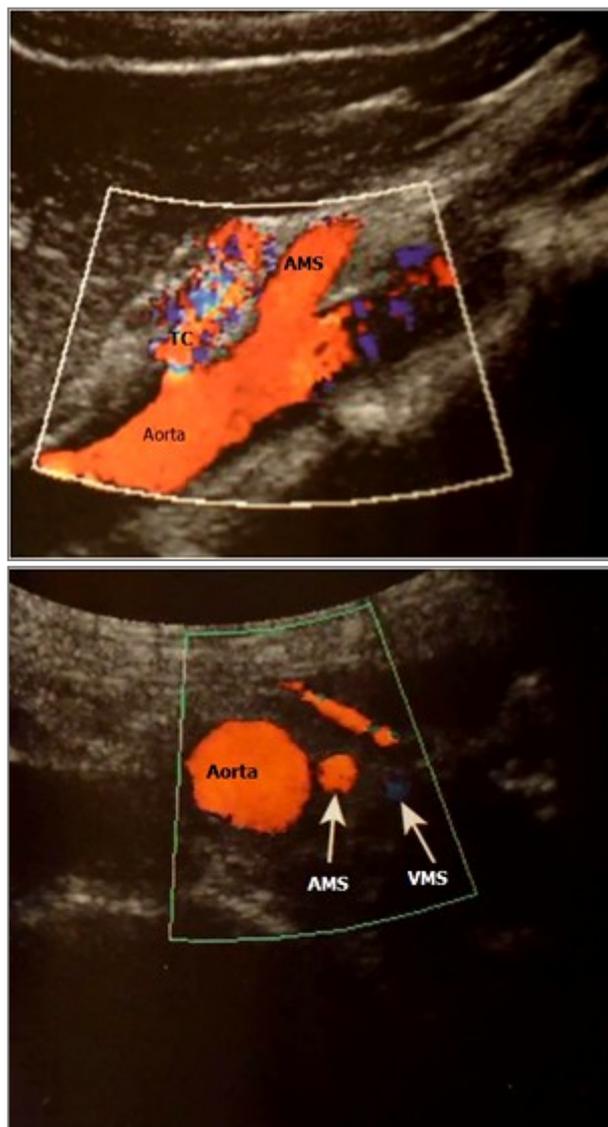
**Figura 11.** Relación anatómica de la arteria mesentérica superior (AMS) fetal a las 27 semanas de gestación valorada por ecografía 3-D en humanos\* **A)** Corte Sagital: 1) Aorta. 2) Tronco celiaco. 3) Vena mesentérica superior. 4) Arteria mesentérica superior. 9). Vena umbilical. 10). Ductus venoso. 11).Vena hepática. C). Corazón. **B)** Corte Axial: Arteria mesentérica superior (SMA).

\*Gindes L, Pretorius DH, Romine LE, Kfir M, D'Agostini D, Hull A, et al. Three-dimensional ultrasonographic depiction of fetal abdominal blood vessels. *J Ultrasound Med* 2009; 28(8):977-88.

## Introducción

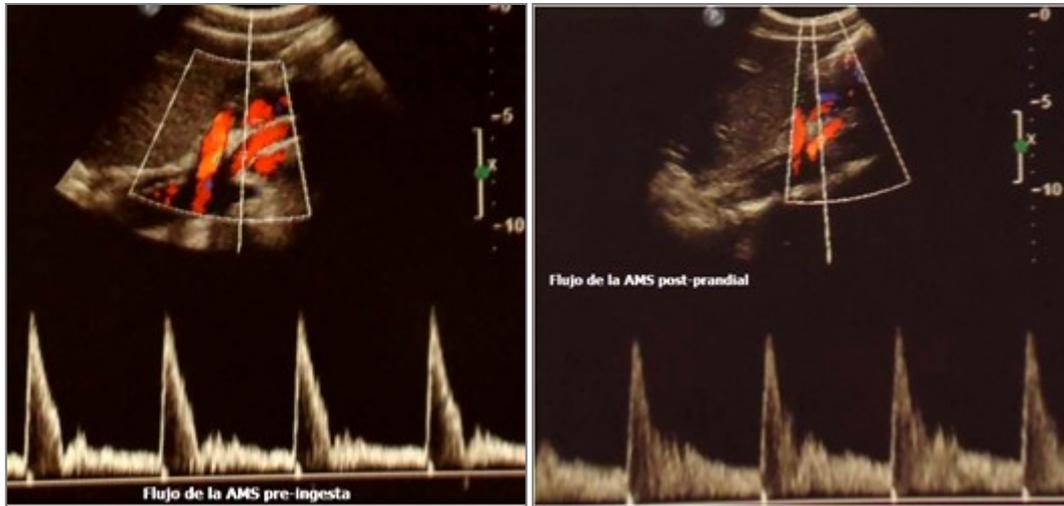
La forma normal de la curva Doppler de la AMS se observa un complejo estrecho bien definido con flujo anterógrado. El flujo de la AMS también depende del ayuno o de la ingesta alimenticia <sup>198</sup>. En ayuno el flujo presenta una alta resistencia vascular con un flujo diastólico bajo. En fase post-prandial (post-ingesta) la resistencia se reduce y se observa un incremento del flujo diastólico (ensanchamiento de la curva Doppler) y de la velocidad sistólica máxima <sup>195, 199</sup> (Figura 12).

A



## Introducción

### B



**Figura 12.** Características Doppler de la arteria mesentérica superior (AMS)\* *A)* Plano sagital y coronal muestra la aorta, el origen del tronco celiaco (TC) en la parte superior y las relaciones anatómicas la arteria mesentérica superior (AMS) y vena mesentérica superior (VMS). El Doppler muestra turbulencia en el TC. *B)* Flujo pre-ingesta y post prandial de la AMS.

\*Allan P DP, Pozniak M, McDicken W.N, editor. *Clinical Doppler Ultrasound. Second ed.* London: Elsevier Churchill Livingstone; 2008

De igual manera debemos referir que ciertos medicamentos utilizados en la práctica neonatal como cafeína o ranitidina responden sobre el flujo mesentérico de similar manera que el estímulo alimentario<sup>200</sup> [Krimmel GA, 2009 #34]. Por el contrario tras una transfusión de glóbulos rojos la velocidad sistólica máxima y la velocidad media disminuyen, potenciando la hipoperfusión mesentérica<sup>200</sup> [Krimmel GA, 2009 #34].

### 2.3.2. Ecografía Doppler: aplicación clínica

#### -Experiencia en obstetricia

En la evaluación del bienestar fetal los parámetros antes descritos tienen su mayor aplicación<sup>185</sup>. Por ejemplo la vasoconstricción crónica sobre la placenta produce una

disminución de los diámetros lumbales e hipertrofia de la capa media arterial que se refleja en una disminución de la velocidad durante la diástole y en consecuencia un incremento del índice de pulsatilidad (IP) en la arteria umbilical. En condiciones más avanzadas de compromiso placentario se observa un flujo diastólico reverso o ausente. Sobre la arteria cerebral media el IP valora la vasodilatación en el contexto de sospecha de hipoxia fetal<sup>185</sup>.

Relativo a la arteria umbilical el flujo reverso de la diástole se correlaciona con un resultado perinatal adverso (asfixia y daño fetal)<sup>201</sup>. Gratacós y colaboradores respecto al flujo diastólico en gemelos monocoriónicos con restricción de crecimiento intrauterino identificaron subgrupos con levado riesgo de fallecimiento del gemelo más pequeño y daño neurológico del otro gemelo<sup>202</sup>. La presencia de flujo reverso al final de la diástole, sobre la aorta y arteria umbilical en fetos de 29 a 35 semanas de gestación fue relacionada con un aumento de la mortalidad perinatal (63,3%)<sup>203</sup>. Del Río y colaboradores estudiaron sobre el istmo aórtico una correlación de morbilidad adversa (retraso del crecimiento) perinatal con flujo retrogrado en fetos<sup>204</sup>.

El índice S/D prenatal aplicado sobre la arteria umbilical en fetos de 27 a 36 semanas de gestación con un peso entre 450 a 2510 gramos, revelo que los grupos con índices elevados y flujo ausente o reverso al final de la diástole presentan riesgo de fallecer 3,7 veces más que el grupo control. Byun y colaboradores a demás manifiestan que este índice es un factor independiente de la edad de gestación<sup>205</sup>.

### **-Ecografía Doppler prenatal y ECN**

Baschat en una amplia revisión compara fetos con velocidad diastólica normal y fetos con flujo diastólico reverso o ausente (FDR/A) sobre la arteria umbilical, ductus venoso

## Introducción

y arteria cerebral media, identificando datos pronósticos respecto a futuras complicaciones perinatales (muerte intrauterina-muerte fetal) y neonatales (síndrome de distress respiratorio, displasia bronco-pulmonar, ECN y hemorragia intraventricular <sup>206</sup>.

En la revisión de las series Muller y Malcolm encontraron en uno y ocho casos de ECN un FDR/A en la arteria umbilical <sup>207,208</sup>. Baschat y colaboradores asociaron alteraciones prenatales Doppler sobre la vena umbilical y vena cava inferior en 6 casos de ECN <sup>209</sup>. Por otro lado Muller y Ozcan en 7 casos con ECN encontraron registros prenatales con incremento del índice del Ductus venoso <sup>207,210</sup>.

Valcamonico y colaboradores, en neonatos con muy bajo peso al nacimiento observaron que las mediciones de velocidad sobre la arteria umbilical y la relación potencial de desarrollar ECN fueron variadas. Respecto al flujo diastólico y su relación con ECN, sólo el 4,8% de los casos presentó un FDR/A mientras que el 10,5% tuvieron un flujo diastólico aumentado y el 3,3% un flujo diastólico normal <sup>211</sup>.

Kamoji en su trabajo Doppler, en prematuros concluye que alteraciones en el flujo diastólico (FDR/A) antenatal sobre la arteria umbilical incremento el riesgo de ECN en los primeros días de vida, independientemente de la edad y peso gestacional <sup>212</sup>.

Otros autores como Mülle-Egloff y colaboradores al estudiar fetos que mantienen un metabolismo cerebral a expensas del fenómeno conocido como “brain sparing” y el posible riesgo de ECN concluyeron que el FDR/A de la arteria umbilical, no es un buen indicador para adelantar el parto o retrasar el inicio la de alimentación enteral con el fin de prevenir el desarrollo de ECN <sup>213</sup>.

Al tratar de buscar factores prenatales predictores de ECN en neonatos con retraso de crecimiento intrauterino, Manogura y colaboradores no han identificado un agente

Doppler aislado arterial o venoso (umbilical, cerebral media o radio cerebro-placentario) que se comporte como desencadenante o “gatillo” ECN <sup>214</sup>.

**-Ecografía Doppler sobre la arteria mesentérica fetal y ECN.** La ecografía Doppler tiene un uso ilimitado en medicina fetal, Rhee de la Universidad de Yale identificó la *arteria mesentérica superior* (AMS) fetal en fétos pequeños para la edad gestacional (21 a 40 semanas de gestación), con la finalidad de comparar los parámetros flujométricos (IP y FDR) de esta arteria con otras arterias comúnmente valoradas en la práctica clínica como: cerebral media y umbilical. No encontró significancia en el uso del índice de Gosling y King (IP) como valor predictivo de ECN, a pesar de que algunos casos de niños que presentaron ECN manifestaron una alteración del índice de pulsatilidad (IP) y dos de ellos flujo diastólico reverso (FDR) <sup>215</sup>.

Por el contrario Korszun y colaboradores presentaron curvas de IP y IR en embarazos normales y de alto riesgo demostrando una correlación positiva entre la velocidad de la AMS fetal, mayor al percentil (th) 97,5 con un desfavorable compromiso fetal. Al nacimiento 5 neonatos con índices de pulsatilidad mayores al 97,5<sup>th</sup> desarrollaron ECN <sup>216</sup>.

### **-Ecografía Doppler postnatal y ECN**

La mayor ventaja de la ecografía abdominal en ECN es que se trata de una prueba en tiempo real, da imágenes directas sobre las estructuras abdominales en particular del intestino, vasos y fluidos de la cavidad peritoneal <sup>217</sup>.

La imagen con Doppler color ayuda a determinar la presencia o ausencia de perfusión de la pared intestinal <sup>217</sup>. Faingold y colaboradores manifiestan que el gas intestinal y el

## Introducción

movimiento de los pacientes son artefactos presentes en la mayoría de ellos, sin embargo sólo en una pequeña minoría la señal Doppler se ve distorsionada <sup>218</sup>. En este estudio Faingold reportó que en 22 neonatos con ECN el flujo de la pared intestinal fue elevado en 10 pacientes y ausente en 12 pacientes. Flujo elevado fue considerado como un incremento del número de señales con patrones en forma de “cebra”, “Y” o “anillo”. Esto sugirió que la hiperemia fue el resultado de la vasodilatación mural y mesentérica secundaria a la inflamación intestinal. El flujo ausente fue considerado cuando no existió una señal Doppler color sobre la pared intestinal y este hallazgo fue correlacionado con necrosis transmural <sup>217</sup>. Silva y colaboradores en neonatos con ECN, al correlacionar los hallazgos ecográficos con el riesgo (OR) de peor pronóstico observaron, que el incremento de la perfusión intestinal (OR: 0,95) y líquido libre anecoico (0,16) presentan un bajo riesgo. La asociación de sobrevida desfavorable fue observada por parte de los autores cuando se encontraron tres o más de los siguientes hallazgos: incremento de la ecogenicidad de la pared (OR: 3,65), ausencia de la perfusión intestinal (OR: 3,27), gas venoso portal (OR: 3,27), engrosamiento/edema de la pared intestinal (OR: 3,07), líquido libre con ecos (OR: 2,78) y gas intramural (OR: 1,64). Por lo tanto este estudio nos brinda la oportunidad de optar por un tratamiento quirúrgico en aquellos pacientes que tengan “odss radio” más elevados <sup>219</sup>.

Respecto al flujo diastólico reverso (FDR) medido sobre la aorta abdominal en pacientes a término con hernia diafragmática congénita (HDC) Carlo y colaboradores han encontrado una correlación interesante entre persistencia del FDR con riesgo de ECN. A pesar de que se conoce la relación entre HDC y ECN (incidencia entre 3% a 7%) y que quizás su desarrollo este condicionado al peso al nacer o cardiopatías

asociadas, este trabajo considera que la persistencia del FRD puede ser un parámetro predictivo <sup>220</sup>.

En pacientes neutropénicos adultos que desarrollaron ECN la ecografía de alta resolución brinda una guía para su seguimiento y pronóstico. Dietrich y colaboradores además de encontrar hipervascularización intestinal en un porcentaje importante (84,61%) identificaron otros hallazgos como: incremento del grosor de la pared intestinal, ascitis, inflamación mural y transmural como corresponsables del diagnóstico de ECN y pronóstico desfavorable <sup>221</sup>.

**-Ecografía Doppler sobre la arteria mesentérica neonatal y ECN.** Se conoce que los neonatos con síndrome de corazón izquierdo hipoplásico (SCIH) tienen un riesgo de 3,8 veces más de desarrollar ECN que cualquier otro paciente con cardiopatía congénita, presumiblemente por una hipoperfusión mesentérica <sup>15</sup>. Harrison y colaboradores empleando Doppler sobre la *arteria mesentérica superior* (AMS), en los pacientes con síndrome de corazón izquierdo hipoplásico (SCIH) a los que se les realizó un procedimiento modificado de Norwood, observaron que el índice de resistencia (IR) por sí sólo no constituye una herramienta que refleje el estado circulatorio. Ningún paciente de su estudio desarrollo ECN <sup>222</sup>.

Otro factor relacionado con la patogénesis de la ECN es la manipulación de la arteria umbilical mediante catéteres <sup>110</sup>, sin embargo los estudios de Shah y colaboradores no han observado tal relación con ECN. Estos autores observaron un incremento del IP en la aorta mientras que sobre la AMS la velocidad del flujo y la resistencia vascular no presentó alteraciones (no se incrementó) <sup>223</sup>.

Las metilxantinas, cafeína y aminofilinas son utilizadas frecuentemente en el tratamiento para prevenir la apneas en prematuros. Una carga de cafeína de 25 mg/Kg

## Introducción

se ha reportado que reduce la velocidad de flujo cerebral e intestinal <sup>224, 225</sup>, mientras que con una dosis de 10 mg/Kg el riesgo de isquemia intestinal en prematuros no se vio incrementado. Esta consideración se produjo después de observar un descenso de la velocidad sistólica máxima y la velocidad telediastólica durante 30 minutos posteriores a la administración de caféina con una recuperación a los 120 minutos. <sup>226</sup>.

En 1992 al valorar la velocidad de flujo y el IP de la AMS, tronco celiaco y arteria cerebral media de casos con ECN IA, IIA y controles, alimentados por vía enteral y fluidoterapia endovenosa se observó una asociación significativa entre el incremento de la velocidad de flujo de la AMS en los casos con ECN IA. Esta asociación también fue positiva en los casos con ECN IIA, sin embargo estadísticamente tal asociación no fue significativa <sup>227</sup>.

Deeg y colaboradores en 1993 utilizaron ecografía Doppler sobre el tronco celiaco y la AMS en neonatos de 2 a 35 días de vida con ECN, constataron un incremento en la velocidad sistólica máxima, del mismo modo que un aumento del tiempo promedio de la velocidad de flujo en los dos vasos estudiados. Y solamente un incremento del IR en el tronco celiaco. Por lo tanto evidenciaron una asociación entre alteraciones de la resistencia vascular con desarrollo de ECN <sup>228</sup>.

Robel-Tillig 2002 estudio el flujo mesentérico postnatal y observó velocidades de flujo sistólico medio y telediastólico (final de la diástole) más bajos e IP más altos en la AMS de los recién nacidos de bajo peso para la edad gestacional con trastornos hemodinámicos prenatales. A pesar de estos hallazgos no encontraron asociación con ECN, contrario a otros autores. Pero sí observó retraso en la eliminación de meconio, distensión abdominal, vómitos biliosos y un retraso en iniciar alimentación enteral <sup>229</sup>.

Murdoch y colaboradores en el 2006 midieron IP, velocidad sistólica máxima y velocidad telediastólica ajustada a la edad de gestación en prematuros. Observaron que el aumento de la resistencia del flujo sanguíneo de la AMS registrada en el primer día de vida, se asoció positivamente con el riesgo a presentar ECN.<sup>230</sup>

### **2.3.3. Uso de la ecografía en modelos animales**

La ecografía Doppler empleada en rata y ratón tiene su aplicación en la determinación de la velocidad del flujo sanguíneo y como técnica no invasiva intravascular y endocavitaria. Se utiliza frecuencias entre 2 y 15 Megahercios (MHz). Los transductores vasculares utilizan frecuencias sobre los 30 MHz. Una limitación del uso de altas frecuencias es que la penetración de la onda puede decrecer. Por ejemplo un transductor de 5 MHz genera una imagen a una profundidad de 12 a 15 centímetros, pero un transductor de 10 MHz la profundidad de la imagen es sólo de 3 a 4 cm. Por lo tanto la selección del transductor tiene un mínimo impacto en roedores (rata o ratón) debido al rango de penetración (0.5 a 2 cm) respecto con la imagen cuando optamos un transductor de alta frecuencia<sup>231</sup>. La resolución temporal es otro factor a considerar expresadas en Hercios (Hz) o ciclos por segundo. Es decir número de imágenes captadas por segundo. Por lo tanto al considerar que las pulsaciones por minuto de la rata varían entre 400 a 600 y del ratón entre 300 a 500 es importante que los sistemas de ultrasonido a utilizar nos permitan obtener una adecuada resolución. La resolución temporal no se considera un factor crítico en órganos sin movimiento relativo, como el riñón, hígado o estructura vascular<sup>231</sup>. Se recomienda que el transductor este orientado paralelamente a la dirección del flujo o movimiento, que el ángulo no supere los 20 a 30 grados y que se aplique el mapa de color para identificas estructuras vasculares<sup>231</sup>.

## Introducción

Las aplicaciones en modo B, dos dimensiones y Doppler color son variadas para evaluar la vascularización periférica, ciclo cardíaco, imagen ocular y ensayo de agentes contrastantes. Se emplean transductores que van desde 5 MHz hasta 13 MHz, con sistemas de ultrasonido Acuson, Sequoia, Sonos entre otros <sup>231</sup>.

### **-Estudios Doppler sobre la arteria mesentérica superior en rata**

Los primeros estudios sobre la *arteria mesentérica superior* (AMS) se hicieron en 1991, para observar el efecto de la anestesia sobre el flujo mesentérico y la recuperación post-anestésica de la circulación. Se compararon tres grupos (A: despertar lento/progresivo; B: despertar brusco; C: control), en ratas de 280 a 300 gramos (g), valorando mediante Doppler los cambios de flujo AMS en mililitros por segundo (ml/s). El estudio indicó que la anestesia (ketamina) no alteró el flujo de la AMS durante la fase anestésica y que la recuperación post-anaestésica independientemente del modelo utilizado, necesitó de 2 horas para conseguir una completa recuperación <sup>232</sup>.

En 1995, D'Almeida, Gaudin y Lebrec al calibrar el tiempo de tránsito del ultrasonido a 1 y 2 milímetros (mm) en la AMS y la aorta de la rata, observaron un flujo basal de la AMS y de la aorta en 13,2 ± 2,8 y 25,8 ± 0,9 ml/min. La pendiente de los datos de la sonda de 1 mm no fue significativamente diferente al flujo basal. Mientras que para la sonda de 2 mm se eliminó progresiva los puntos de variación (bajos y altos) y reveló que la ventana de precisión para esta sonda era entre 10,4 para la AMS y 45,1 ml/min para la aorta <sup>233</sup>.

En 1997 Fenger-Gron y colaboradores implantaron un dispositivo Doppler pulsado sobre la AMS con una salida eléctrica a través de la piel (zona dorsal) y establecieron que el movimiento espontáneo de las ratas genera una verdadera resistencia en las ramas

que nutren la AMS como en los vasos de la microcirculación participando del control del flujo intestinal<sup>234</sup>.

Otro estudio del año 2000, valoró el flujo de la AMS en centímetros por segundo (cm/s) empleando un dispositivo Doppler implantado durante 1 semana en ratas de 350 a 450 g. Observó que en estados de apnea y bradicardia la velocidad de flujo fue de 14 ± 3 cm/s, partiendo de una basal de 28 ± 4 cm/s y en estados de estrés esta velocidad pasó de 25 ± 4 a 30 ± 5 cm/s<sup>235</sup>.

### **-Estudio Ecografico Doppler e histológico en modelos de ECN**

Uno de los primeros estudios en 1994 realizados por Kurose y colaboradores, valoró la velocidad de los glóbulos rojos empleando una óptica Doppler en la vascularización mesentérica en ratas de 200 a 250 g en modelo de isquemia – reperfusión durante 0, 10, 15 y 20 minutos. El grupo control la velocidad fue de 2,84 ± 0,18 milímetros por segundo (mm/s), el grupo isquemia la velocidad fue nula y para el grupo reperfusión la velocidad decreció a 2,32 ± 0,14 mm/s<sup>236</sup>.

Santos y colaboradores al estudiar los cambios histológicos de la mucosa intestinal en ratas adultas (270 a 350 g) en tres grupos diferentes de isquemia- reperfusión: (A) [control] 30 minutos de isquemia seguidos de 60 de reperfusión; (B) [precondicionado] previo a los 30 minutos de isquemia y 60 de reperfusión se practicó tres ciclos de isquemia alternando con tres ciclos de reperfusión de dos minutos cada uno; y (C) [postcondicionado] posterior a los 30 minutos de isquemia se alternó tres los ciclos de isquemia y reperfusión de 2 minutos cada uno seguidos de 60 minutos de reperfusión. Observaron que en los grupos precondición y post-condición se minimizaron los daños histológicos al ser valorados con la escala de Chiu<sup>74</sup>.

## Introducción

Kim y colaboradores aplicando un modelo de isquemia (ligadura de la AMS) en conejos de 10 a 12 semanas de edad, para inducir ECN, propusieron correlacionar resultados ecográficos con hallazgos histológicos. Tal trabajo experimental reflejó que un “puntillado” o un “granulado denso” valorado con ecografía abdominal (10 MHz) sobre la pared intestinal, se correlacionó con daño intestinal. Los hallazgos patológicos observados fueron: congestión y disminución de las vellosidades; edema o pneumatosis en la submucosa, inflamación y necrosis en la muscular; inflamación o pneumatosis en la serosa y signos de infarto transmural <sup>237</sup>.

## **3. HIPÓTESIS**

Hipótesis

### **3.1. Hipótesis Principal**

- Los cambios de flujo mesentérico medidos por Ecografía Doppler color tienen correlación con las lesiones intestinales macroscópicas y microscópicas en un modelo experimental de ECN.

Hipótesis

## **4. OBJETIVOS**

## Objetivos

#### **4.1. Objetivo general**

- Estudiar el flujo mesentérico por Ecografía Doppler color en un modelo experimental de ECN en rata neonatal de 17 días de vida.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Reproducir las alteraciones histopatológicas de ECN mediante un modelo de isquemia – reperfusión en ratas neonatas
- Medir los cambios del flujo en la *arteria mesentérica superior* en un modelo experimental de ECN en rata neonata de 17 días de vida.
- Correlacionar los hallazgos medidos por Ecografía Doppler color del flujo mesentérico con la afectación histológica macroscópica y microscópica en un modelo experimental de ECN.

## Objetivos

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

## Material y Método

## 5.1. Animales de experimentación

Se adquirieron 4 ratas hembra y 2 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley criadas en el Laboratorio de Harlan Interfauna (Ibérica, S.A.) de Barcelona, para reproducción.

Producto de la reproducción para este trabajo se utilizaron 36 ratas de la cepa Sprague-Dawley, nacidas, criadas y destetadas en la Unidad de Experimentación Animal de Medicina del Hospital Sant Joan de Déu de Esplugues de Llobregat de la Universidad de Barcelona.

Las camadas se colocaron junto a sus progenitores en una jaula y se mantuvieron en condiciones ambientales estables (20°C, humedad relativa 55%) en la Unidad de Experimentación Animal de Medicina del Hospital Sant Joan de Déu de la Universidad de Barcelona. Durante 12 horas al día los animales estuvieron en un ambiente con luz artificial, que era apagada durante las otras 12 horas. Las ratas fueron alimentadas durante una semana con *pellet* de dieta (Beekay Feeds, Rodent Diet, B&K Universal, Humberside, England) y recibieron agua *ad libitum*. En el momento de iniciarse el estudio las ratas tenían 17 días de vida y un peso aproximado entre 21 y 36 gramos (Figura 13).



**Figura 13.** Animales de 17 días de vida. Rata Sprague-Dawley

Material y Método

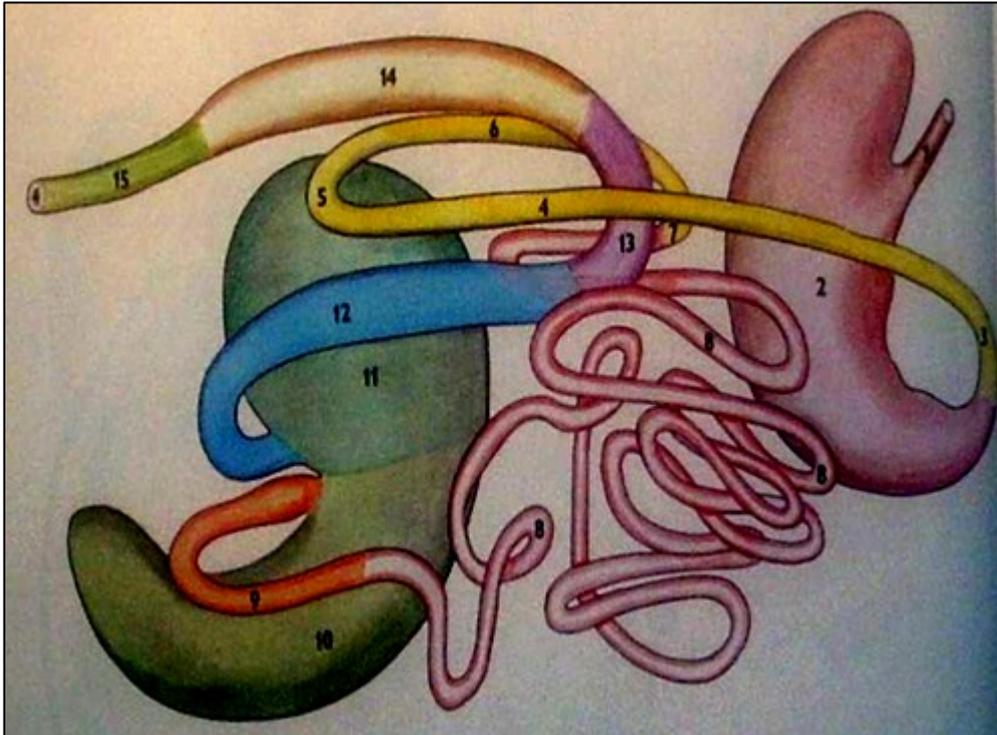
### **5.1.1. Modelo de Isquemia-Reperusión: ECN**

El modelo de isquemia – reperusión utilizado previamente por nuestro grupo<sup>79</sup> reproduce lesiones morfológicas similares a las de la ECN en recién nacidos prematuros.

Decidimos introducir animales de menos días de vida, de menor peso y mayor tiempo de reperusión (17 días de vida con peso promedio de 21 a 36 gramos y 24 horas de reperusión en lugar de los 18 días de vida con 40-50 gramos y 3 horas de reperusión empleados anteriormente) con el fin de que el intestino fuera más inmaduro y ocasionara mayor afectación intestinal producto de la reperusión.

Los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con Isoflorano (Abbott Laboratories Ltd. Queenborough, Kent, Reino Unido) mediante vaporizador Fluovac Harvard de 2 vías, calibrado por Datex-Ohmedo. La inducción se inició a una concentración del 2,5%. Para el mantenimiento se utilizó oxígeno a un flujo de 0,5 litros con una concentración de isoflorano entre 1,5-2%.

Se colocó al animal en decúbito supino con fijación de las cuatro extremidades y se realizó una laparotomía media supra-infraumbilical. El intestino delgado fue exteriorizado y desplazado hacia la izquierda (Figura 14) con el fin de localizar los vasos mesentéricos.



**Figura 14.** Anatomía del sistema digestivo de la rata\*1. Esófago. 2. Estómago. 3. Duodeno. 4-5-6-7. Duodeno. 8. Yeyuno. 9. Íleon. 10. Ciego. 11. Ampolla de colon. 12. Colon ascendente. 13. Colon transverso. 14. Colon descendente. 15. Sigma-recto.

\* Popesko P, Rajtová V, Horak J. *A Colour Atlas of Anatomy of small Laboratory animals. Vol 2 rat, mouse, hamster.* Ed. Saunders, 2002.

Se realizó el clampaje (clamp vascular: animales que se reperfundieron) o ligadura (seda circular 6/0: animales que no se reperfundieron) de los vasos mesentéricos superiores a la salida de la aorta abdominal durante 60 minutos en su segmento más proximal. La oclusión vascular fue confirmada por la pérdida de pulsación en el mesenterio (Figura 15). Durante el tiempo que duró la oclusión el intestino fue reintroducido en la cavidad abdominal y fue irrigado de forma periódica con suero fisiológico. Tal y como se describió anteriormente, tras los 60 minutos de isquemia en los animales que se

## Material y Método

reperfundiran, se retiró el *clamp* vascular y se comprobó que la perfusión fue efectiva.

Se procedió al cierre de la cavidad abdominal en un sólo plano con seda 4/0.



**Figura 15.** Oclusión de la raíz de la arteria mesentérica superior (AMS) con clamp vascular a traumático tipo “bulldog”

En los animales que no se reperfundieron, posterior a los 60 minutos de isquemia se procede al estudio ecográfico y la obtención de muestras, tras la cual todos los animales fueron sacrificados mediante la inhalación de una sobredosis de isoflurano. Posteriormente se procede al cierre de la cavidad tal y como se describió anteriormente.

Los animales que se reperfundieron en el postoperatorio, fueron separados de sus progenitores y ubicados sobre una esterilla precalentada a una temperatura de 36 grados

centígrados. Tras permanecer sobre esta cubierta y observar la reversión de los efectos anestésicos se suministró una dosis única a 10 mg/Kg/dosis de Paracetamol vía oral. Durante las siguientes 12 horas los animales estuvieron en un ambiente con luz artificial, que era apagada durante las otras 12 horas. Las ratas fueron alimentadas con *pellet* de dieta y recibieron agua *ad libitum*, como se ha descrito anteriormente.

A las veinte y cuatro horas después del inicio de la reperfusión se realizó una nueva laparotomía (animales reperfundidos) para: el estudio ecográfico, la obtención de muestras y el sacrificio, tal y como se ha descrito anteriormente.

### **-Ecografía adaptada al modelo experimental**

Se utilizó un equipo de ecografía con un avanzado sistema de formación de imagen 2D y Doppler color/pulsado/power. Siemens Sonoline Antares™ (Siemens Medical Systems, Malvern, PA, USA) equipado con transductor lineal y curvo de 2-7,25 y 4-10 MHz. El equipo fue cedido por el Departamento de Medicina Materno-Fetal, ICGON, Hospital Clínic-IDIBAPS, Universidad de Barcelona, mientras duró el trabajo experimental. Se creó un patrón estándar (Abd Freud) validado por el Servicio de Diagnóstico por la Imagen del Hospital Sant Joan de Déu y el servicio técnico de Siemens – Barcelona, el mismo que fue almacenado en la memoria del equipo de imagen y aplicado en todos animales del experimento (Tabla 2).

## Material y Método

<b>Caracteres estándares</b>	<b>Patrón General</b>	<b>Doppler</b>	<b>Power</b>
Transductor	P10-4	P10-4	P10-4
(Ganancia) dB	25 General 2D	0dB	0dB
PRF (Hercios=Hz)		2441	977
Megahercios (MHz)	7,27	5	5
#ZF	1		
CD	60 dB		
R/V	4	4	4
Mapas	1		
Matriz	2		
Prioridad		4	4
Filtro		2	2
Línea de base		10	10
Barrido		8	8
Contorno	1		
Persistencia	1	1	1
Suavizar		2	2
Mapas		A	A
Muestra (mm)		1	1

**Tabla 2.** Patrón de caracteres ecográficos estándar (Abd Freud) adaptados al modelo experimental

A los 60 minutos del tiempo de apertura de la cavidad abdominal, isquemia y 24 horas de reperfusión, se aprovechó la laparotomía media para exteriorizar nuevamente el intestino delgado con la finalidad de identificar los vasos mesentéricos con sus

## Material y Método

ramificaciones. Es en este momento, que se empleó un transductor P10-4 (4-10 MHz) intra-abdominal impregnado en gel para ultrasonido, el cual se posicionó sobre las ramas mesentéricas y se procedió a aplicar una leve presión, la cual nos permitió captar señales Doppler (Figura 16), teniendo en consideración que una excesiva presión del transductor distorsionará el flujo y la curva Doppler.



**Figura 16.** Estudio de ecografía Doppler color aplicada al modelo experimental de enterocolitis. Sobre el trayecto de la arteria mesentérica superior (AMS) se coloca transductor (P10-4) de 4 a 10 MHz intra-abdominal impregnado en gel.

El transductor se colocó en sentido sagital, luego se tomó como referencia la aorta abdominal, se continuó con su recorrido hasta observar el tronco celiaco y más adelante la arteria mesentérica superior (AMS). En todo momento se utilizó el color para identificar los vasos. El estudio eco-Doppler color tuvo una duración de 10 minutos aproximadamente con el fin medir, capturar y almacenar imágenes estáticas, en movimiento y de color del flujo mesentérico. Estas imágenes se procesaron automáticamente por el software del equipo (Siemens Sonoline Antares™) registrando

## Material y Método

números e índices expresados en unidades de: velocidad, flujo y resistencia (Pourcelot, Gosling y FitzGerald) <sup>187, 188, 193</sup>.

Al finalizar el estudio antes mencionado se continuó con la obtención de muestras y el cierre de la laparotomía media, tal y como se describió en el modelo experimental.

Este modelo fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona.

## 5.2. Diseño experimental

**Grupo 1: Control** [n=10]. También llamado sham, se les practicó una laparotomía media manteniendo el abdomen abierto durante 60 minutos. No se realizó clampaje vascular (isquemia – reperusión). Se practicó en este momento una ecografía Doppler color intra-abdominal y toma de muestras. Posteriormente todas las ratas fueron sacrificadas.

**Grupo 2: Isquemia** [n=10]. Se realizó la isquemia (ligadura) tal y como se ha descrito en el modelo experimental. Se practicó ecografía Doppler color intra-abdominal y toma de muestras. Posteriormente todas las ratas fueron sacrificadas.

**Grupo 3: Reperusión** [n=16]. Se realizó isquemia (clamp) y la reperusión, tal y como se ha descrito en el modelo experimental. A las veinte y cuatro horas del inicio de la reperusión, se practicó una segunda laparotomía para realizar la ecografía Doppler color intra-abdominal y toma de muestras. Posteriormente todas las ratas fueron sacrificadas.

### 5.3. Estudio de Ecografía Doppler Color

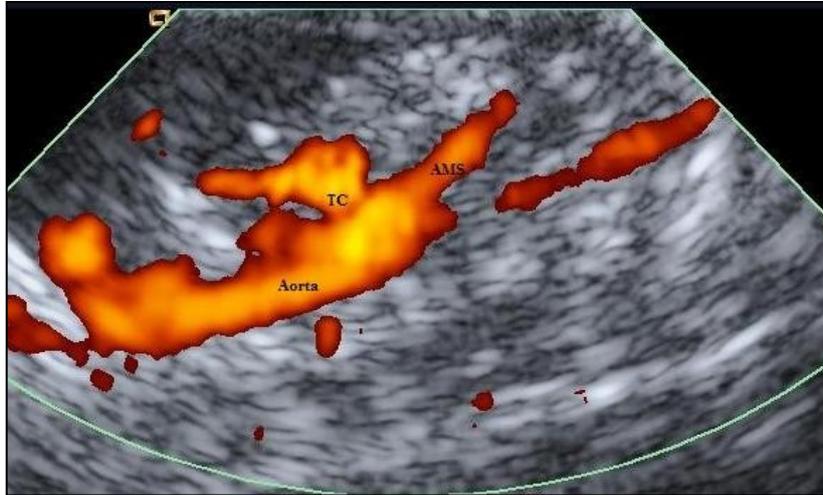
Según la descripción experimental y la adaptación de la ecografía a este modelo comentada con anterioridad, inmediatamente antes del sacrificio, a los 60 minutos (Grupos control / isquemia) y 24 horas después del inicio de la reperfusión (Grupo reperfusión), se estudió el flujo de la arteria mesentérica superior colocando el cursor entre la sístole de la primera curva y la diástole de la tercera curva, partiendo de que es importante obtener un patrón continuo de cinco curvas como mínimo. Se dibujó automáticamente sobre las tres ondas marcadas, el recorrido del flujo que registró el Doppler color, pulsado y power. Los parámetros que se valoraron a continuación fueron calculados por el software del equipo: (Siemens Sonoline Antares™):

1. Velocidad sistólica media (**VSM**): Expresada en cm/s
2. Flujo diastólico (**FD**): Expresado en cm/s
3. Velocidad media (**Vm**): Expresada en cm/s
4. Índice de pulsatilidad (**IP**)
5. Índice de resistencia (**IR**)
6. Índice sístole - diástole (**S/D**)

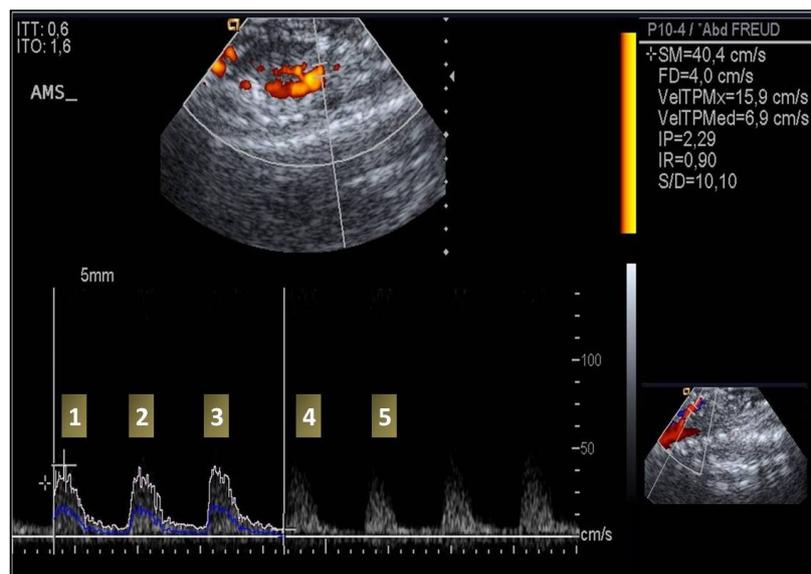
En el grupo control, el registro de las curvas como velocidad e índices ecográficos basados en el patrón estándar (Abd Freud) aplicados al modelo experimental antes descritos no fueron manipulados por el operador (Figura 17)

## Material y Método

A



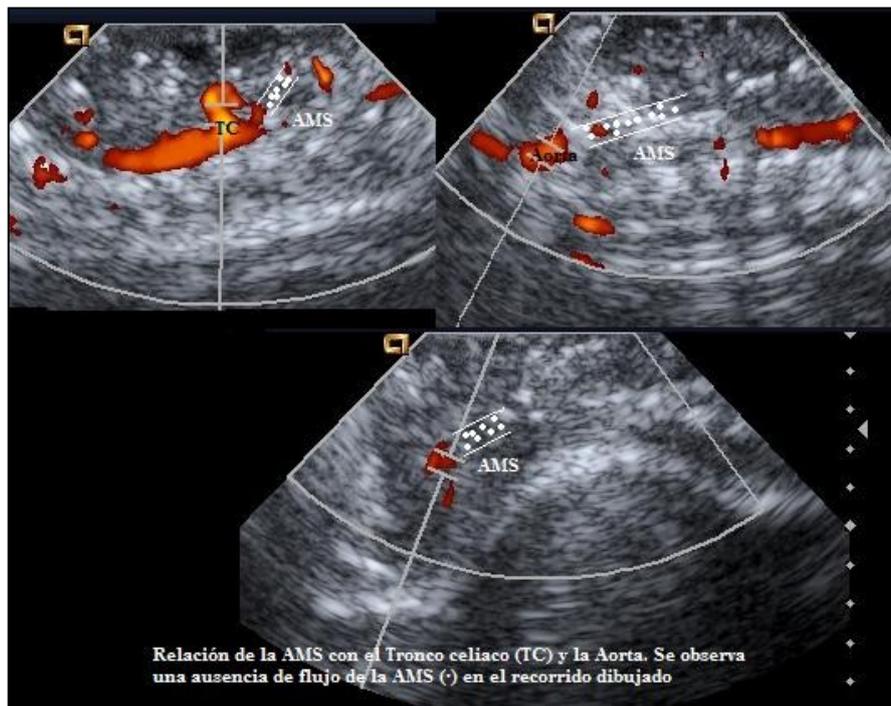
B



**Figura 17. Grupo 1: control:** Identificación y valoración de la arteria mesentérica superior (AMS) en rata de 17 días de vida. **A)** Relaciones anatómicas de la AMS con el tronco celiaco (TC) y la aorta. **B)** Medición del flujo mesentérico sobre la AMS empleando transductor P10-4 con patrón ajustado al modelo experimental (Abd Freud). La velocidad sistólica máxima (VSM) 40,4 cm/s, el flujo diastólico (FD) 4 cm/s, la velocidad media (Vm) 6,9 cm/s, el índice de pulsatilidad (IP) 2,29, el índice de resistencia (IR) 0,9 y sistole/diástole (S/D) 10,10. Se observa valores en condiciones normales. SM=VSM. VelTPMed=Vm.

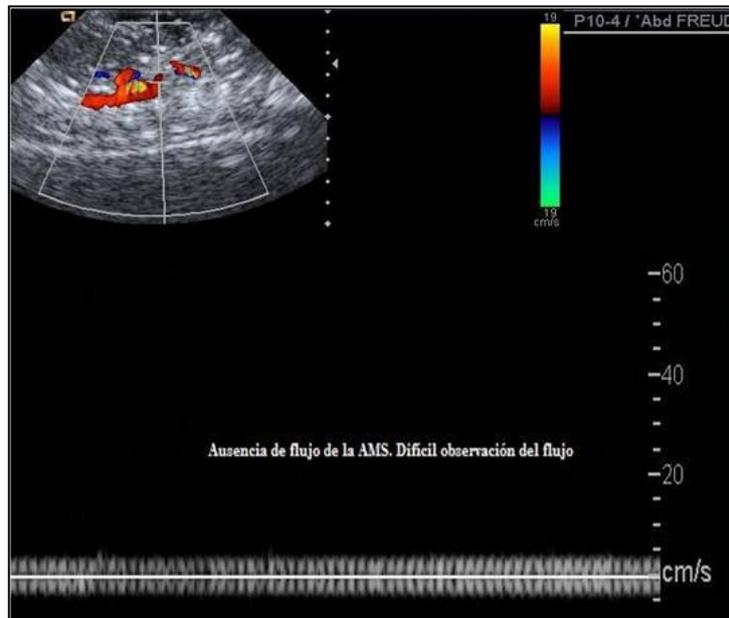
Aclaremos que para el grupo isquemia todas las mediciones de índices y velocidades los resultados fueron de 0 cm/s (Figura 18). Registro que es atribuible y explicado por el modelo de isquemia detallado anteriormente (ligadura de la arteria mesentérica superior).

A



## Material y Método

### B



**Figura 18. Grupo 2: Isquemia:** Identificación y valoración de la arteria mesentérica superior (AMS) en rata de 17 días de vida posterior a un clampaje de la AMS. **A)** Relaciones anatómicas de la AMS con el tronco celiaco (TC) y la aorta. **B)** Medición del flujo mesentérico sobre la AMS empleando transductor P10-4 con patrón ajustado al modelo experimental (Abd Freud). En ausencia de flujo, tanto velocidades como los índices tienen un valor de cero.

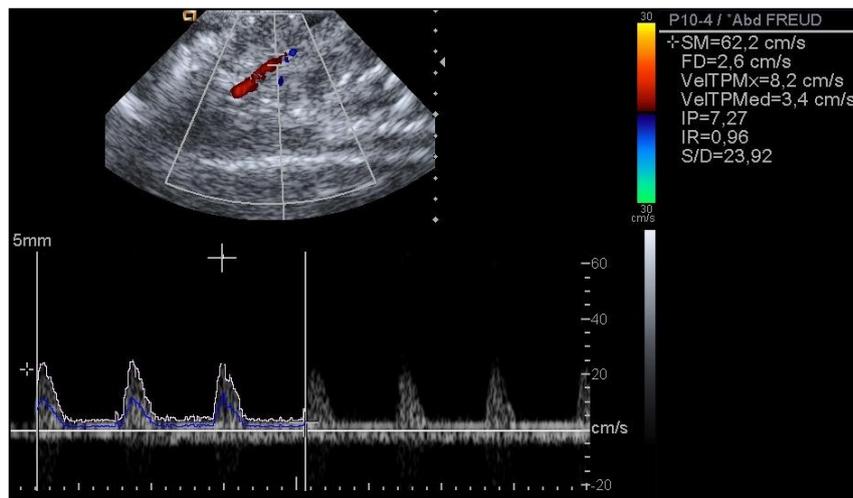
En el grupo de perfusión el registro de los valores ecográficos fue similar a los descritos anteriormente para el grupo control (Figura 19).

En este grupo (perfusión) se valoró además el siguiente parámetro: pico de flujo diastólico reverso (**PFDR**), expresado cm/s. A pesar de registrar un número negativo, para nuestros cálculos lo valoramos en positivo. Este parámetro se calculó sólo en los estudios en los que se observó un pico en el fin de la diástole en cualquiera de las cinco ondas, el mismo que se debía repetir constantemente. El cálculo fue manual, dibujando una línea oblicua desde el inicio de la sístole hasta el pico diastólico ubicado por la línea de base. Nos basamos en los trabajos de Gratacos y colaboradores para medir este índice <sup>192</sup>.

A



B



**Figura 19. Grupo 3: Reperusión:** Identificación y valoración de la arteria mesentérica superior (AMS) en rata de 17 días de vida posterior a un clampaje de la AMS y reperusión de 24 horas. **A)** Relaciones anatómicas de la AMS con el tronco celiaco (TC) y la aorta. **B)** Medición del flujo mesentérico sobre la AMS empleando transductor P10-4 con patrón ajustado al modelo experimental (Abd Freud). La velocidad sistólica máxima (VSM) 62 cm/s, el flujo diastólico (FD) 2,6 cm/s, la velocidad media (Vm) 3,4 cm/s, el índice de pulsatilidad (IP) 7,27, el índice de resistencia (IR) 0,96 y sístole/diástole (S/D) 23,92. Se observa incremento de la VSM, IP, IR y S/D y descenso del FD y Vm. SM=VSM. VelTPMed=Vm.

## 5.4. Estudio de Anatomía Patológica

### 5.4.1. Estudio macroscópico

Inmediatamente después del estudio ecográfico y antes del sacrificio, a los 60 minutos (Grupos control / isquemia) y 24 horas después del inicio de la reperfusión (Grupo reperfusión), la cavidad abdominal fue inspeccionada y se anotó la presencia o no de dilatación intestinal, cambios en la coloración de la serosa, ascitis y/o perforación. Se utilizó un sistema de puntuación de lesión macroscópica modificado a partir del descrito por Wallace y Keenan<sup>238</sup> (Tabla 3).

Puntuación	Descripción
0	Mucosa intestinal normal
1	Hiperemia local sin ulceración
2	Ulceración sin hiperemia
3	Ulceración con hiperemia en un punto
4	Ulceración con hiperemia en 2 o más sitios
5	Ulceración que se extiende más de 2 cm en varios puntos

**Tabla 3.** Valoración macroscópica de las lesiones, modificada por Wallace y Keenan.

### 5.4.2. Estudio microscópico

Se tomaron muestras a 3 cm del íleon distal y 1 cm de la ampolla del colon de cada animal (Figura 14). Estas muestras fueron lavadas en PBS (phosphate buffered saline) y fijadas en formol al 10% durante 24 horas. A todas las muestras se les realizó varios cortes transversales y posteriormente fueron incluidas en parafina tras una deshidratación previa con concentraciones crecientes de alcohol y aclarado en tolueno.

## Material y Método

De cada bloque de parafina se practicaron varias secciones sucesivas de 4 mm de grosor que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. El estudio microscópico tuvo un control externo (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Sant Joan de Déu, Universidad de Barcelona) que desconocía la procedencia de origen de las muestras estudiadas.

El estudio con microscopía óptica utilizó un microscopio Olympus BX51. Se inició con la aplicación del sistema de lesión microscópica descrito por Chiu <sup>68</sup>. La escala fue valorada en todas las secciones de cada corte y se calculó la media. (Tabla 4).

Grado	Descripción
0	Vellosidades de características normales
1	Espacio subepitelial de Gruenhagen; congestión capilar
2	Separación moderada entre el epitelio y la lámina propia
3	Separación masiva del epitelio que se extiende hacia la base de la vellosidad; algunas vellosidades aparecen denudadas
4	Denudación de múltiples vellosidades con exposición de la lámina propia y de los capilares dilatados
5	Digestión y desintegración de la lámina propia; hemorragia y ulceración

**Tabla4.** Clasificación microscópica de Chiu.

Se prosiguió con el estudio microscópico, a una magnificación de 40x/0.65 y 60x/0.80, esta vez, valorando cualitativamente la arquitectura de vellosidades de cada grupo (Grupos 1, 2 y 3). Esta estructura o forma de vellosidad fue definida como: normal, atrofia y regeneración <sup>239</sup>. Se repitió esta valoración en todas las secciones de cada corte en tanto por ciento y la media (Tabla 5).

## Material y Método

<b>Forma.....Descripción</b>	
Normal	Vellosidades simétricas-equidistantes de características normales.
Atrofia	Asimetría de las vellosidades las que pueden estar involucionadas, disminuidas, alargadas o replegadas de forma arbitraria.
Regeneración	Presencia de mitosis en el tercio inferior de las criptas de Lieberkühn y /o. algunas vellosidades que tienen una cúspide más ancha que su base.

**Tabla 5.** *Valoración de la arquitectura de vellosidades*

Además se registró la presencia de pneumatosis, perforación<sup>31, 109</sup> y/o hipertrofia glandular. Respecto a este registro se contabilizó en porcentaje la presencia de estos hallazgos en cada sección de todos los cortes, se calculó la media (Tabla 6).

<b>Hallazgos</b>	<b>Descripción</b>
Perforación	Extensión transmural, pérdida de continuidad
Pneumatosis	Presencia de gas en la submucosa
Hipertrofia glandular	Distorsión exagerada de la glándulas con presencia moco en su interior

**Tabla6.** *Valoración de otros hallazgos de lesión intestinal.*

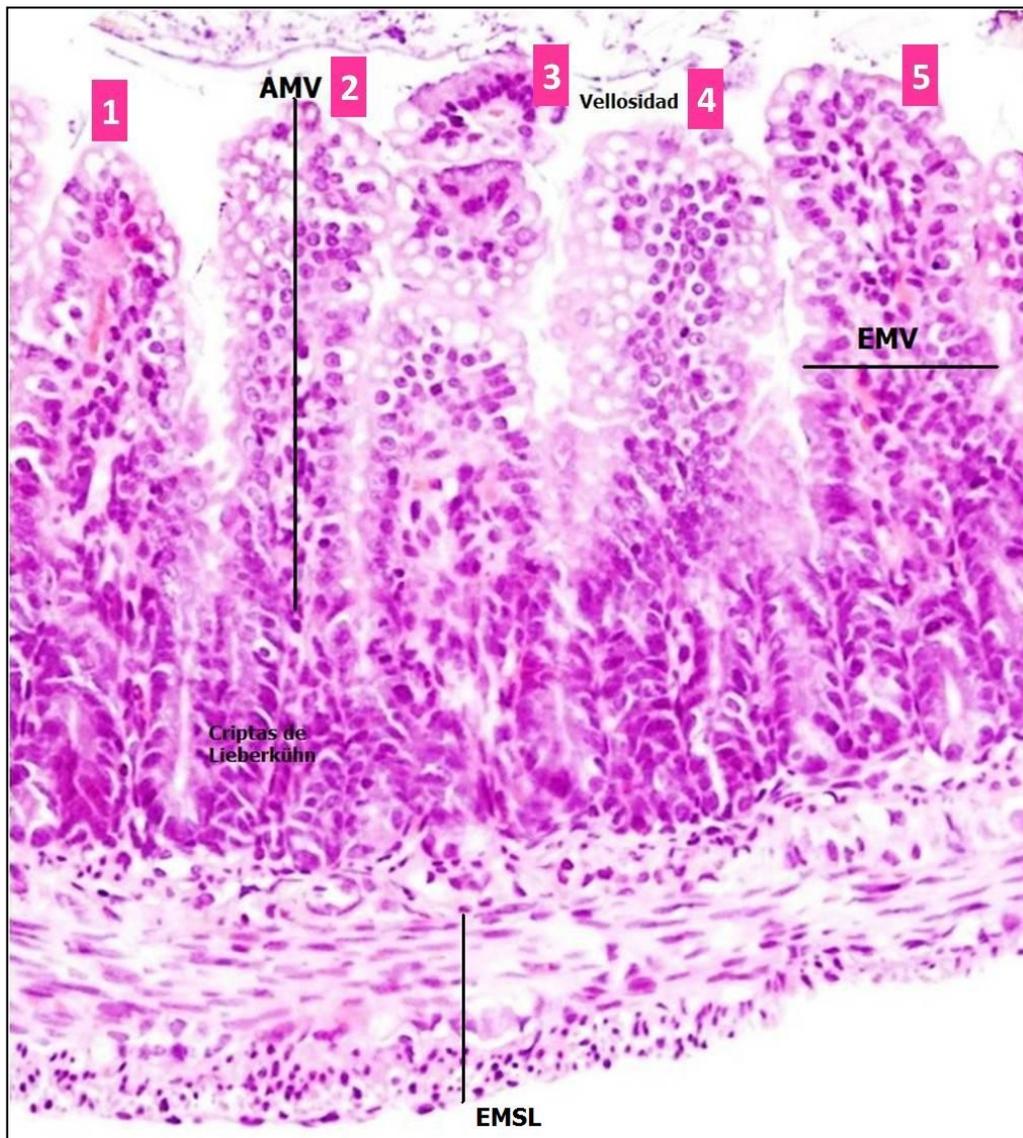
Continuando con el estudio microscópico se cuantificó el número de células caliciformes en una vellosidad al azar y en las criptas el número de células de Paneth y mitosis comprendidas entre cinco vellosidades al azar de cada corte<sup>31</sup> (Tabla 7).

<b>Célula.....</b>	<b>Descripción</b>
Caliciforme	Tienen forma de copa o cáliz, su núcleo está en la porción basal y su mayor parte esta llena de gránulos de mucina
Paneth	Poseen un citoplasma basal basófilo, un aparato de Golgi supranuclear y grandes gránulos de secreción apical que son acidófilos y refráctiles (observándose de manera intensa por la tinción de hematoxilina-eosina), localizados en la base de las glándulas intestinales (Lieberkühn)
Mitosis	Células con dos núcleos (observándose de manera intensa por la tinción de hematoxilina-eosina) y citoplasma en proceso de partición localizadas en las glándulas intestinales

**Tabla 7.** *Valoración de las células de vellosidades y criptas de Lieberkühn*

Las mediciones detalladas a continuación fueron realizadas a una magnificación de 10x/0.20 (Grupos control y reperfusión) y de 20x/0.40 (Grupo isquemia). Fueron medidas en micras con una escala milimétrica. La conversión de milímetros (mm) a micras ( $\mu\text{m}$ ) corresponde para una magnificación 10x el valor de 1 mm=10  $\mu\text{m}$  y para una magnificación 20x el valor de 1 mm=5  $\mu\text{m}$  (Figura 20).

## Material y Método



**Figura 20.** Valoración morfométrica en 5 puntos mediante la altura media de vellosidades (AMV), espesor medio de vellosidades (EMV) y el espesor medio de la serosa a la base de la lámina propia (EMSL)

Altura media de vellosidades (AMV): La altura de la vellosidad fue calculada dibujando una línea desde el vértice de la misma hasta su base en 5 puntos. Esta medición fue repetida en al menos el 70% de las vellosidades de cada sección y se calculó la media.

Espesor medio de vellosidades (**EMV**): El espesor de una vellosidad fue calculado midiendo la anchura de la vellosidad en 5 puntos. Esto fue repetido en al menos el 70% de las vellosidades en cada corte y se calculó la media.

Superficie media de vellosidades (**SMV**): La superficie de la vellosidad fue medida utilizando la AMV (como altura) y el EMV (como base), aplicando la fórmula del cálculo del área del triángulo (base por altura dividido por dos). Esto fue repetido en todas las muestras y se calculó la media.

Espesor medio de la serosa hasta la base de la lámina propia (**EMSL**): Fue calculado dibujando una línea desde el inicio de la serosa hasta la base de la lámina propia. Esto fue repetido en al menos el 70% de los cortes y se calculó la media.

## 5.5. Estudio estadístico

Todos los valores descriptivos fueron expresados en forma de mediana con rangos intercuartil (RI) I y III. Posteriormente los datos fueron estudiados mediante prueba de *Kruskal-Wallis* y en caso de que se encontrara una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ), se realizaron comparaciones entre los grupos específicos mediante la prueba de contraste de rangos U-Mann-Whitney (*Mann-Whitney-Wilcoxon*). A continuación se valoró la intensidad de correlación entre la ecografía Doppler color y la anatomía patológica (macro y microscópica) a través del coeficiente de correlación de rangos de *Sperman* ( $r_s$ ). En el caso de que se apreciará una correlación significativa ( $p < 0,01$ ), se realizó el análisis de *regresión cuadrática* por grupos mediante el coeficiente de determinación ajustado o corregido ( $R_a^2$ ). Consideraremos un modelo significativo entre la variable dependiente (ecografía Doppler color) y la variable

## Material y Método

independiente (anatomía patológica) aquel que alcance una diferencia ( $p < 0,01$ ).

Utilizamos el programa Statistics versión 17 (SPSS).

## **6. RESULTADOS**

## Resultados

## 6.1. Resultados del flujo de la arteria mesentérica superior

### - Estudio con Ecografía Doppler color en el modelo isquemia - reperfusión: ECN experimental

Al realizar la comparación entre los grupos de estudio (1, 2 y 3) la velocidad sistólica máxima (VSM), la velocidad media (Vm) y el flujo diastólico (FD) y los índices: de pulsatilidad (IP), resistencia (IR) y sístole/diástole (S/D) demostraron tener diferencias interesantes. En el grupo isquemia todas las mediciones de índices y velocidades fueron de 0 cm/s. No fue significativa la comparación del pico de flujo diastólico reverso (PFDR) en nuestra investigación (Tabla 8).

Ecografía	CONTROL	ISQUEMIA	REPERFUSION
VSM	41,35 (39,4-60)	0 <sup>**</sup>	74,3 (63,5-74,9) <sup>**0</sup>
Vm	13,15(11,4-15,2)	0 <sup>**</sup>	8,15 (7,5-10) <sup>**0</sup>
FD	3,8 (3,6-4,6)	0 <sup>**</sup>	2,6 (2,3-3,3) <sup>**0</sup>
PFDR <sup>#</sup>	0	0	5,9 (4,6-6,2)
IP	3,12 (2,82-3,34)	0 <sup>**</sup>	7,33 (6,63-9,64) <sup>**0</sup>
IR	0,91 (0,9-0,93)	0 <sup>**</sup>	0,96 (0,93-0,97) <sup>**0</sup>
S/D	12,45 (9,59-14,48)	0 <sup>**</sup>	25,75 (19,24-32,57) <sup>**0</sup>

**Tabla 8.** Registro y comparación del flujo de la arteria mesentérica superior tras 60 minutos de oclusión intestinal y 24 horas de reperfusión, en los grupos 1: control, 2: isquemia y 3: reperfusión.

RI: rango intercuartil I-III

Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$  frente al grupo 1: control

$\delta p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

VSM: velocidad sistólica máxima (cm/s)

Vm: velocidad media (cm/s)

FD: flujo diastólico (cm/s)

PFDR: pico de flujo diastólico reverso (cm/s). #: 4 casos

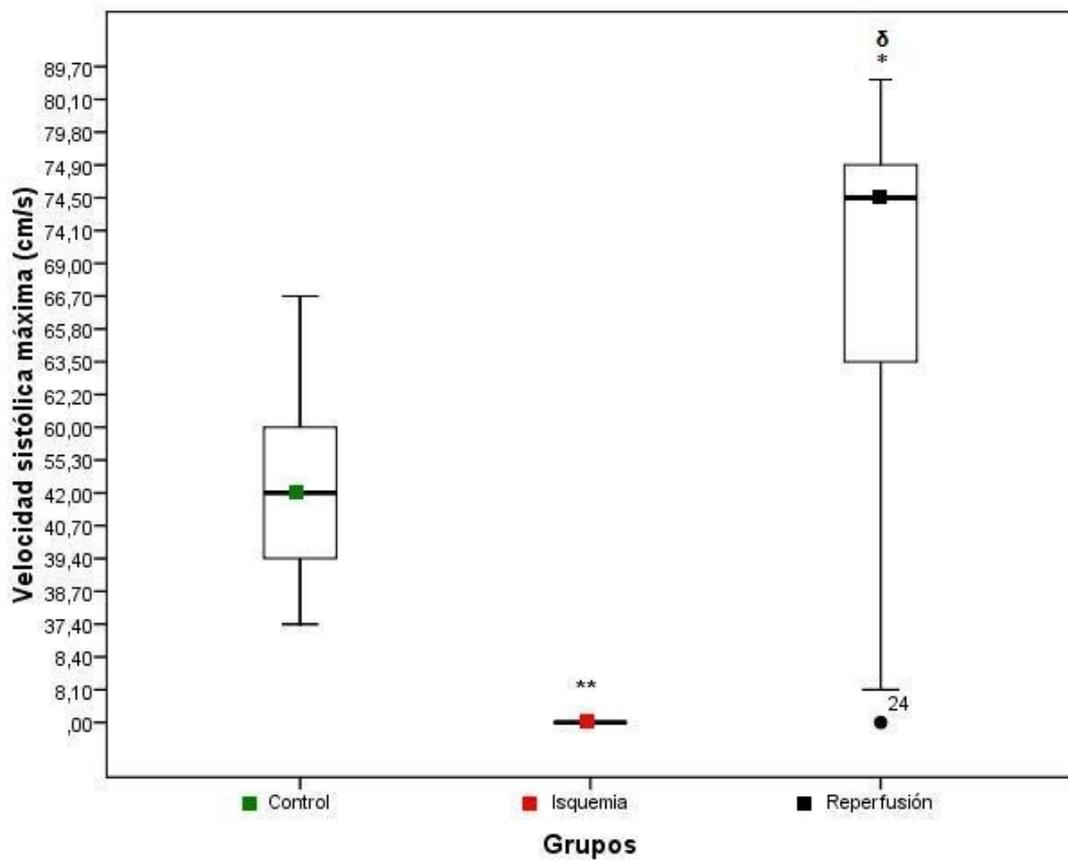
IP: índice de pulsatilidad

IR: índice de resistencia. S/D: índice sístole/diástole

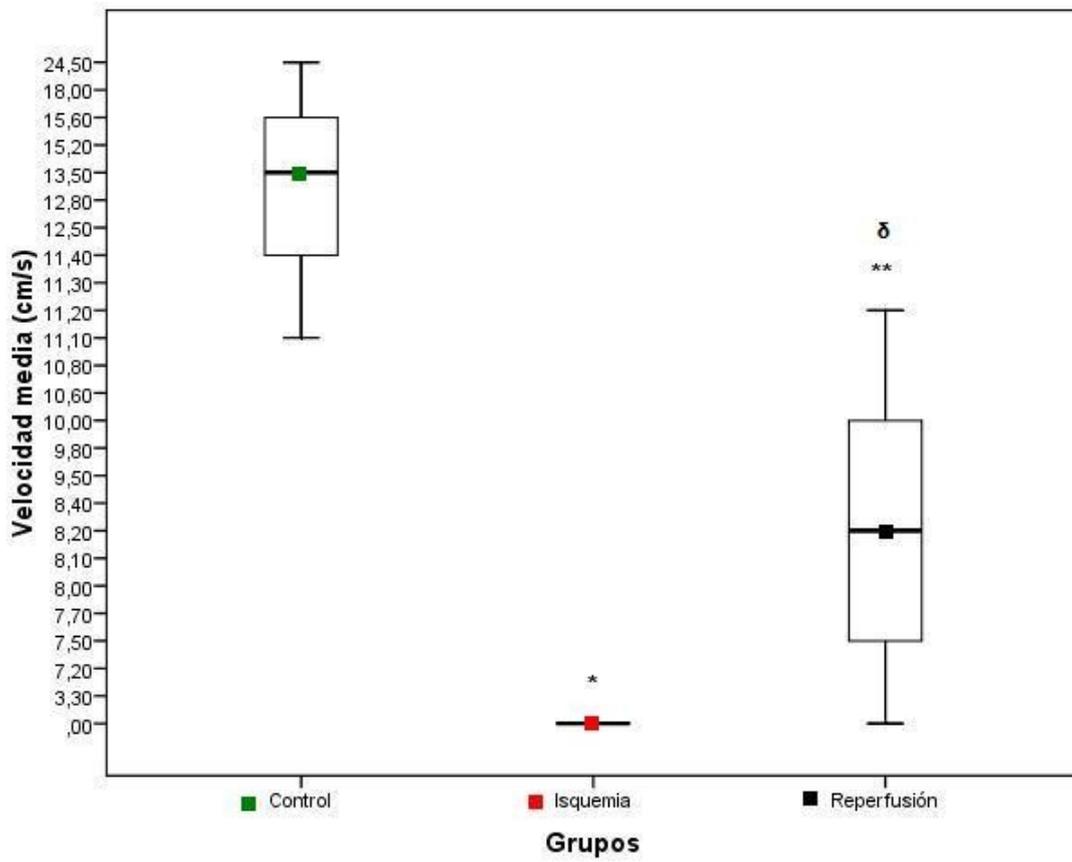
## Resultados

Respecto al registro valorado en cm/s existen diferencias interesantes entre los grupos estudio. La VSM se encuentra significativamente aumentada en el grupo reperfusión comparado con el grupo isquemia ( $p < 0,001$ ) y grupo control ( $p < 0,01$ ). Mientras que se observa un descenso significativo de la Vm y FD en el grupo reperfusión respecto a los grupos isquemia y control ( $p < 0,001$ ) (Figura 21).

A

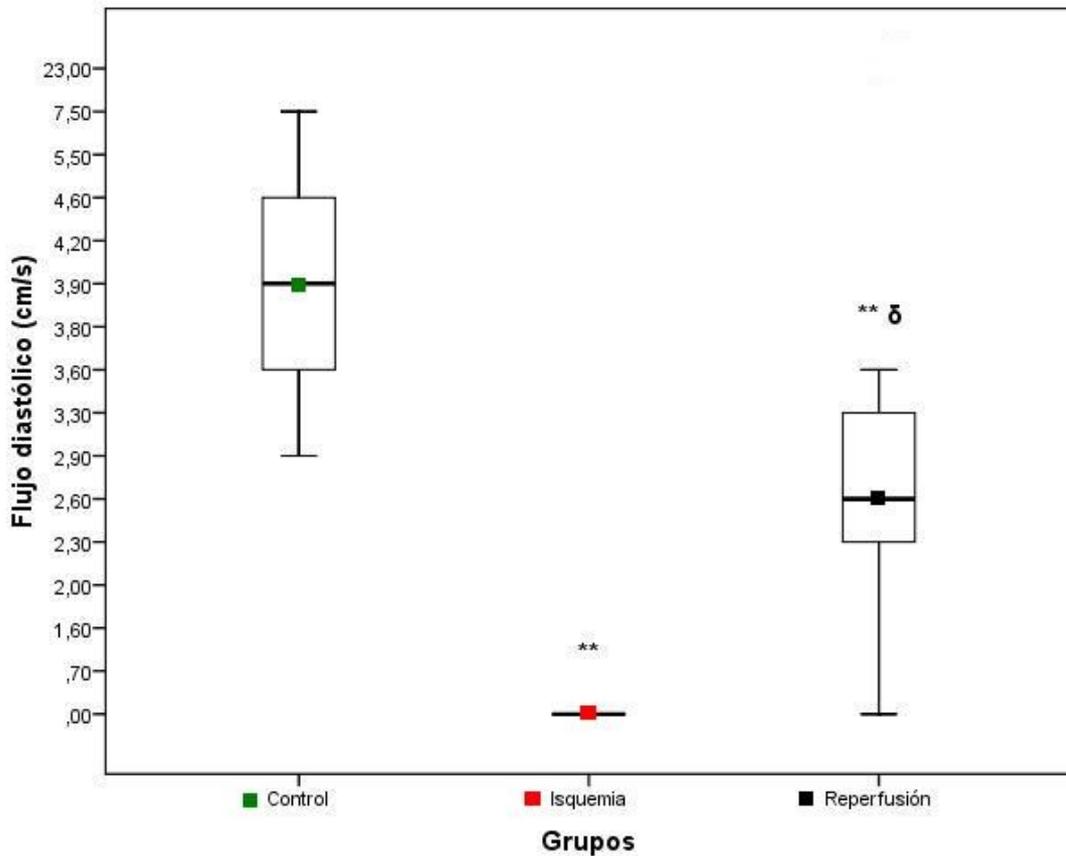


B



## Resultados

C



**Figura 21.** Valoración de velocidades de flujo de la arteria mesentérica superior. **A)** La velocidad sistólica máxima (VSM) en el grupo 3: reperusión fue de 74,3 (63,5-74,9) con un caso aislado (\*24) que registra un valor muy bajo comparado con 0 del grupo 2: isquemia y 41,35 (39,4-60) del grupo 1: control. **B)** La velocidad media (Vm) en el grupo 3: reperusión fue de 8,15 (7,5-10) comparado con 0 del grupo 2: isquemia y 13,15 (11,4-15,2) del grupo 1: control. **C)** El flujo diastólico (FD) en el grupo 3: reperusión fue de 2,6 (2,3-3,3) comparado con 0 del grupo 2: isquemia y 3,8 (3,6-4,6) del grupo 1: control.

RI: rango intercuartil I-III

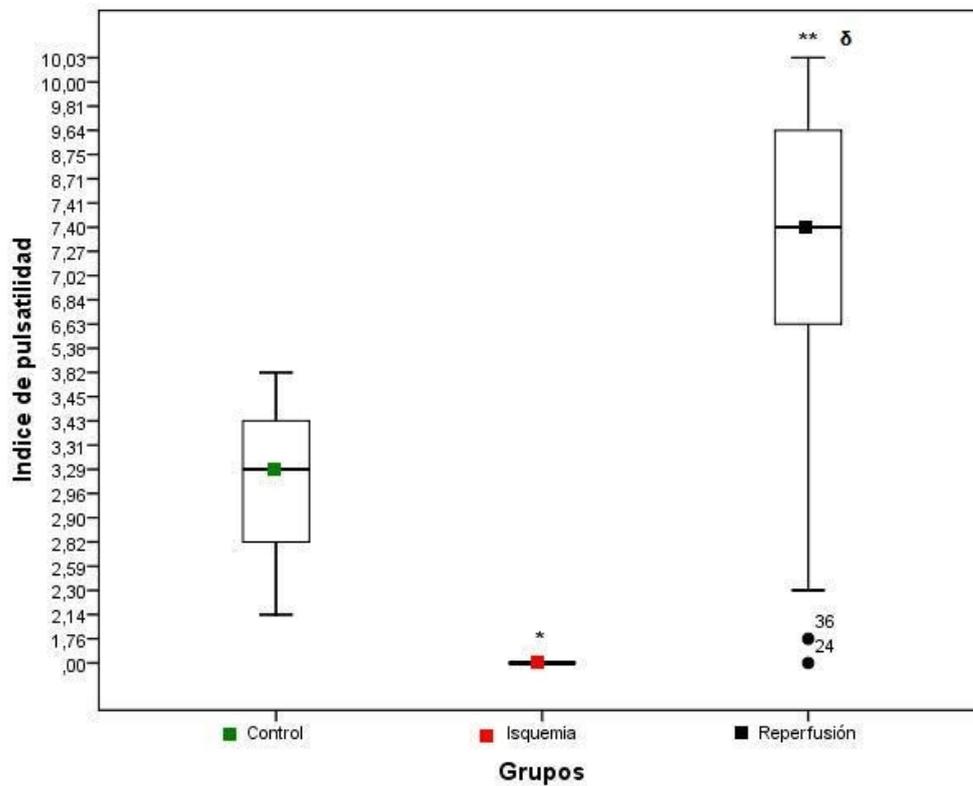
Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$  frente al grupo 1: control

$\delta$   $p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

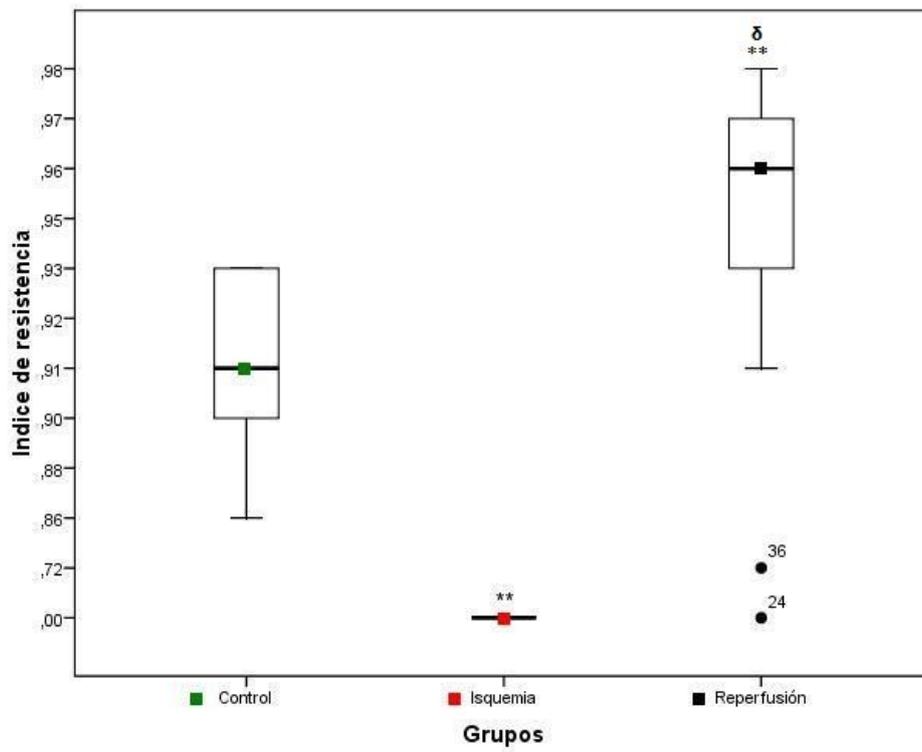
Respecto al registro de los índices de resistencia vascular (IP, IR, S/D) existe un incremento significativo en el grupo reperfusión al comparar con el grupo isquemia y grupo control ( $p < 0,001$ ) (Figura 22)

A

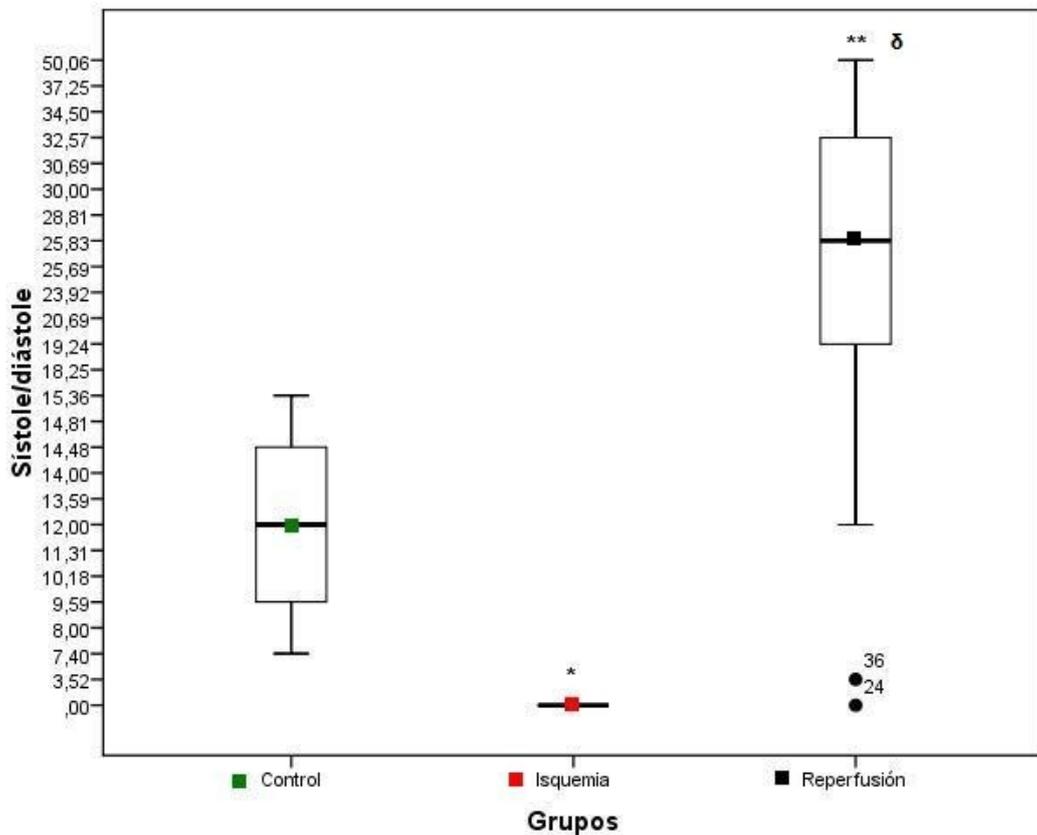


## Resultados

B



C



**Figura 22.** Valoración de índices de flujo de la arteria mesentérica superior. **A)** El índice de pulsatilidad (IP) en el grupo3: reperusión fue de 7,33 (6,63-9,64) más casos aislados (\*24 y \*36) con valores muy bajos comparado con 0 del grupo 2: isquemia y 3,12 (2,82-3,43) del grupo control. **B)** El índice de resistencia (IR) en el grupo 3: reperusión fue de 0,96 (0,93-0,97) más casos aislados (\*24 y \*36) con valores muy bajos comparado con 0 del grupo 2: isquemia y 0,91 (0,9-0,93) del grupo1: control. **C)** El índice sistole/diástole (S/D) en el grupo3: reperusión fue de 25,75 (19,24-32,57) con casos aislados (\*24 y \*36) que registran índices muy bajos comparado con 0 del grupo 2: isquemia y 12,45 (9,59-14,48) del grupo1: control.

0RI: rango intercuartil I-III

Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$  frente al grupo 1: control

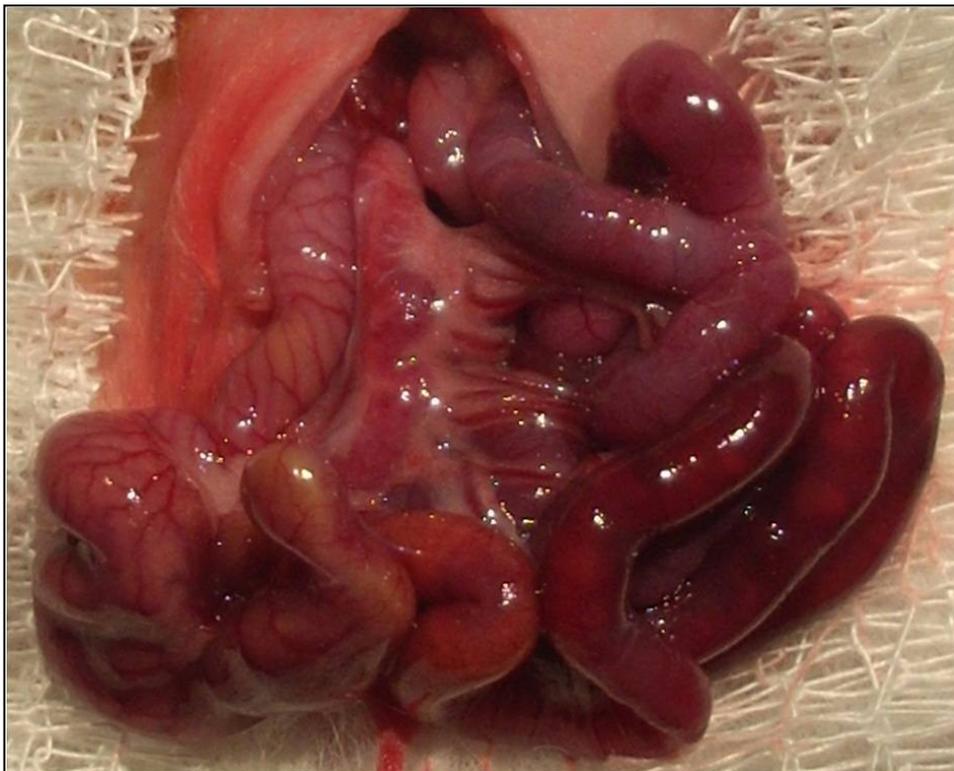
$\delta p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

Resultados

## 6.2. Resultados de Anatomía Patológica

### 6.2.1. Resultados Macroscópicos:

**- Reproducción del modelo ischemia -reperusión: ECN experimental.** En el grupo reperusión (Figura 23), el intestino delgado y colon se encontraba dilatado presentando un color oscuro o rojo intenso con signos macroscópicos de hiperemia, adherencias, úlceras y necrosis comparado con los animales del grupo control.



**Figura 23.** Dilatación intestinal y signos de isquemia tras la oclusión de los vasos mesentéricos superiores durante 60 minutos y reperusión de 24 horas (Grupo 3: reperusión)

Estos mismos cambios en mayor intensidad se apreciaron en el grupo isquemia, tras 60 minutos de oclusión de la *arteria mesentérica superior* (Figura 24).



**Figura 24.** Dilatación intestinal y signos de isquemia tras la oclusión de la arteria mesentérica superior durante 60 minutos (Grupo 2: isquemia)

## Resultados

El grupo control o sham presento ausencia de lesión intestinal, dilatación o cambios de coloración de la mucosa tanto en el intestino delgado como en el colon (Figura 25)



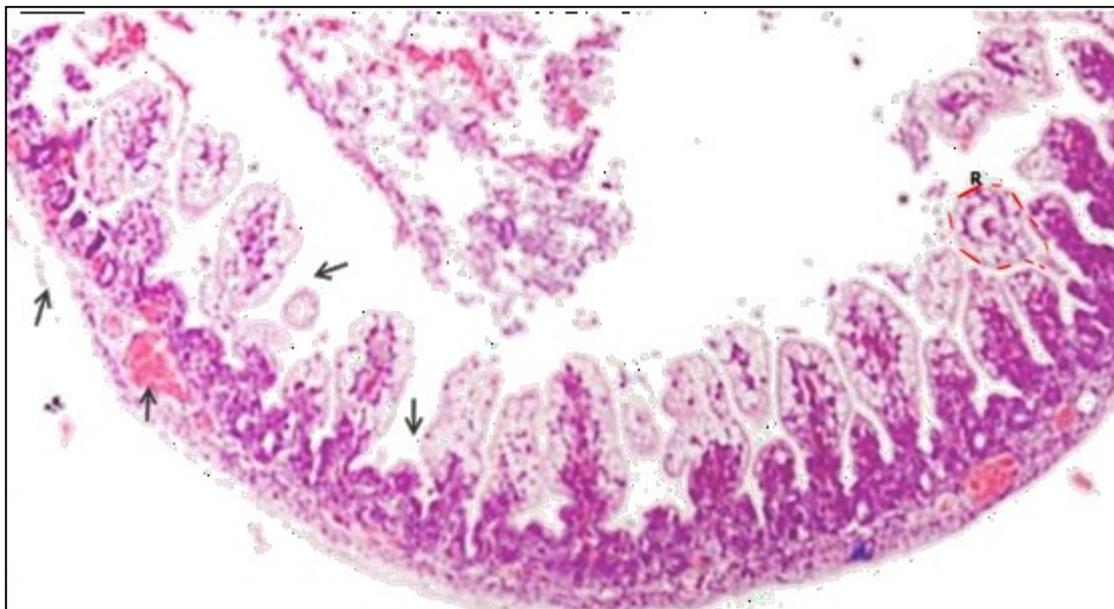
**Figura 25.** Ausencia de signos de dilatación o lesión intestinal (Grupo 1: control)

En los grupos reperfusión e isquemia se apreció un menor nivel de lesión en el colon derecho y no se encontró ascitis ni perforación intestinal en ninguna de las ratas. La valoración macroscópica de las lesiones según el sistema de puntuación modificado de Wallace y Keenan para el grupo reperfusión fue 4 (3-5) comparado con 5 del grupo isquemia y con 0 del grupo control ( $p < 0,001$ ). En todos los casos de los grupos reperfusión y control las lesiones fueron significativamente menores ( $p < 0,001$ ) que en el grupo isquemia.

### 6.2.2. Resultados Microscópicos:

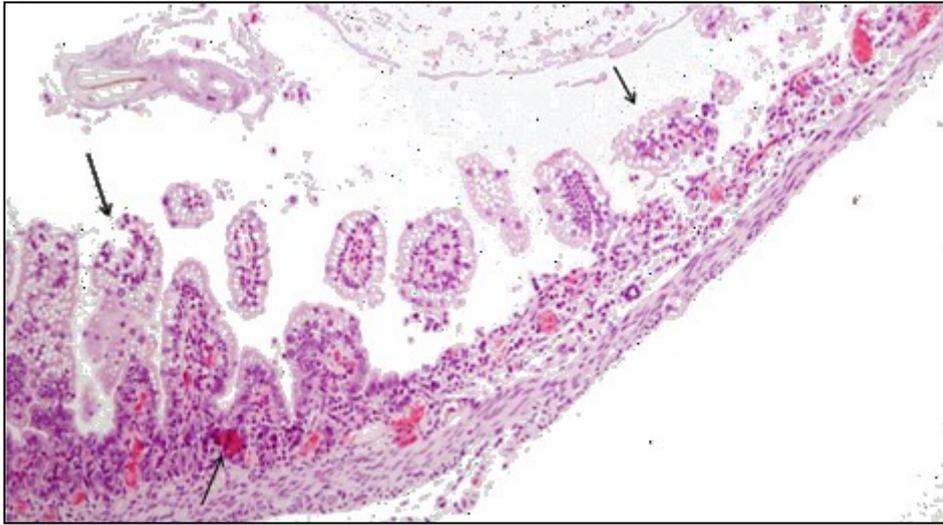
- **Reproducción del modelo ischemia - reperfusión: ECN experimental.** El examen microscópico del grupo reperfusión mostró alteraciones significativas en la mucosa del intestino delgado en comparación con el grupo control. En todos los animales se apreció desde una separación masiva del espacio de Gruenhagen, denudación y desintegración de las vellosidades hasta necrosis de la lámina propia incluyendo en algunos casos necrosis transmural focal. Similares cambios pero de mayor intensidad se apreciaron en el grupo ischemia (Figura 26).

A

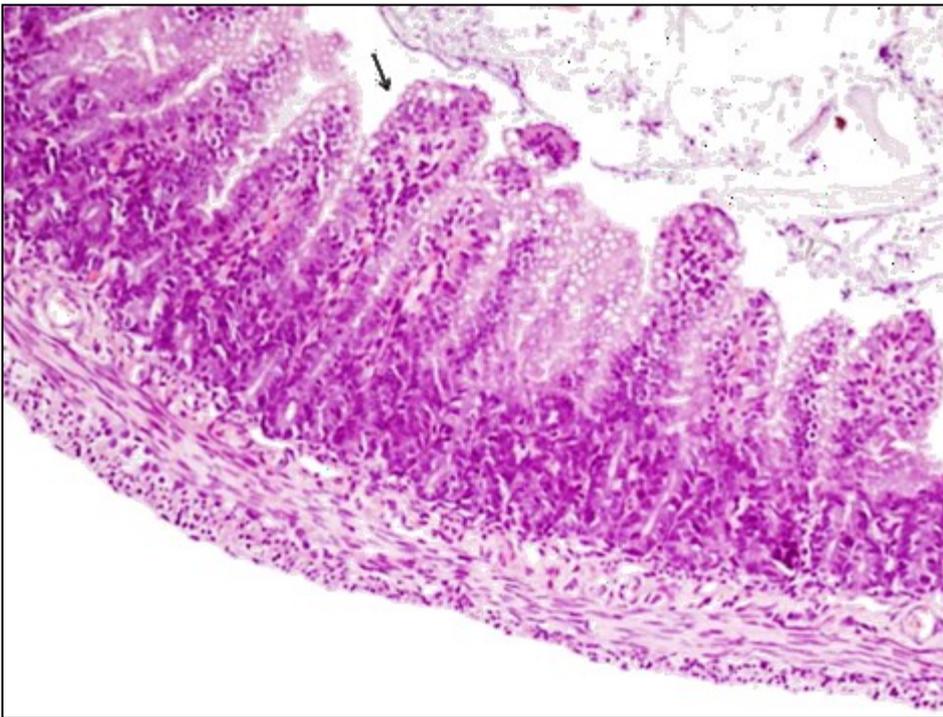


## Resultados

B



C

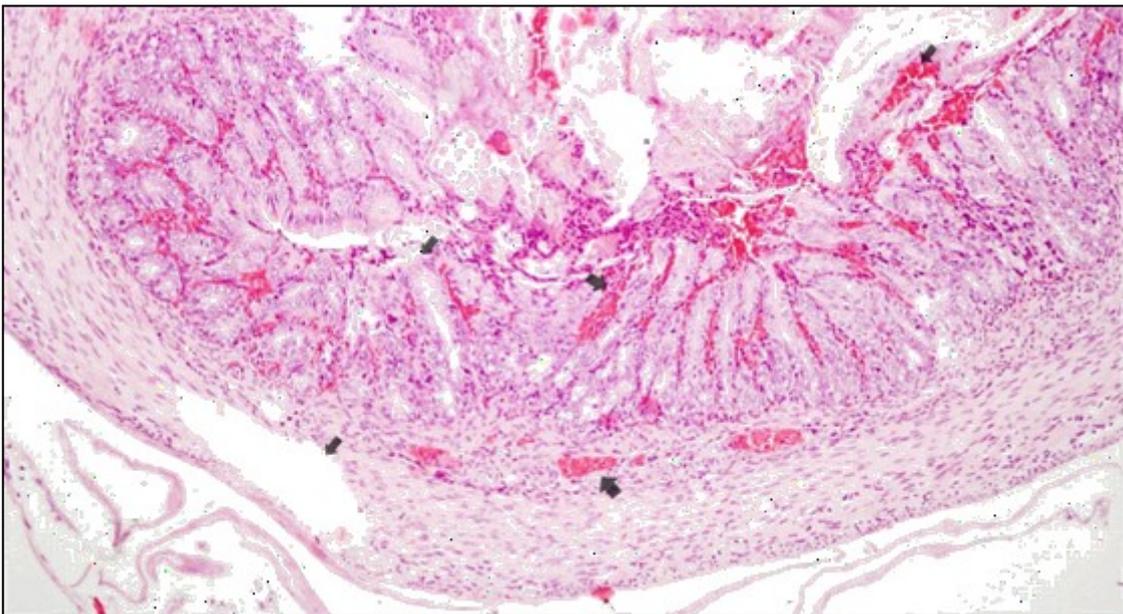


**Figura 26:** *A) Denudación masiva, necrosis y zonas de hemorragia (flecha) de vellosidades en el íleon distal de una rata con cambios regenerativos (R) del grupo 3: reperfusión B) Denudación masiva y necrosis más intensa de vellosidades en el íleon distal con zonas más marcadas de atrofia (flecha) de una rata del grupo 2: isquemia C) Mucosa del íleon distal en un animal del grupo 1: control en la que se aprecian las microvellosidades de características normales (flecha).*

## Resultados

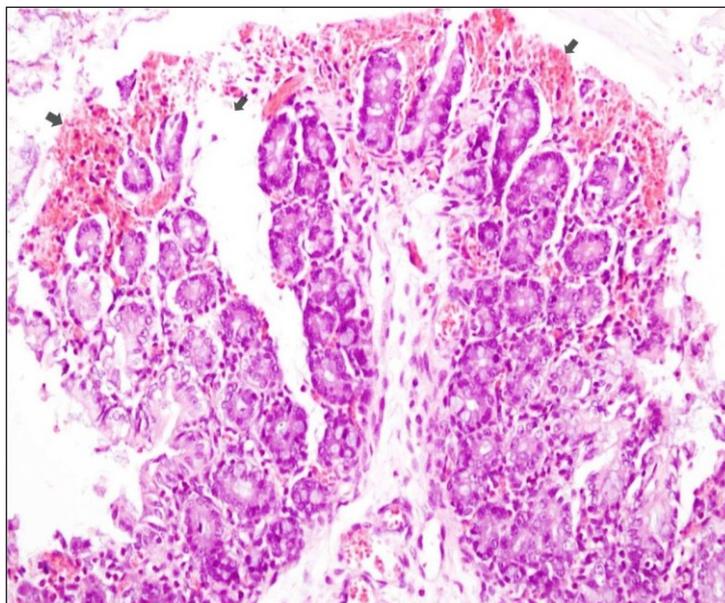
En el intestino grueso (colon) el examen microscópico del grupo reperfusión mostró alteraciones significativas en la mucosa en comparación con los grupos isquemia y control. En todos los animales se apreció desde una separación masiva del espacio de Gruenhagen, denudación y desintegración de las vellosidades hasta necrosis de la lámina propia incluyendo en algunos casos necrosis transmural focal. (Figura 27).

A

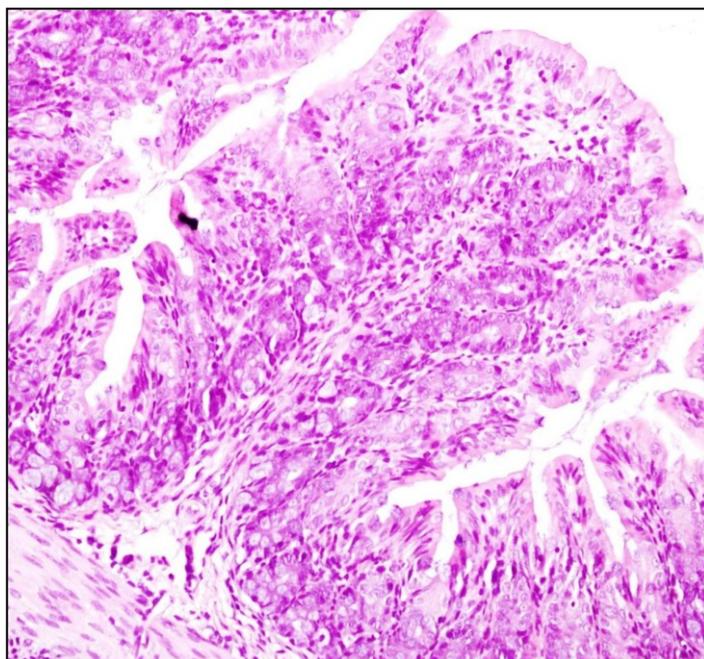


## Resultados

B



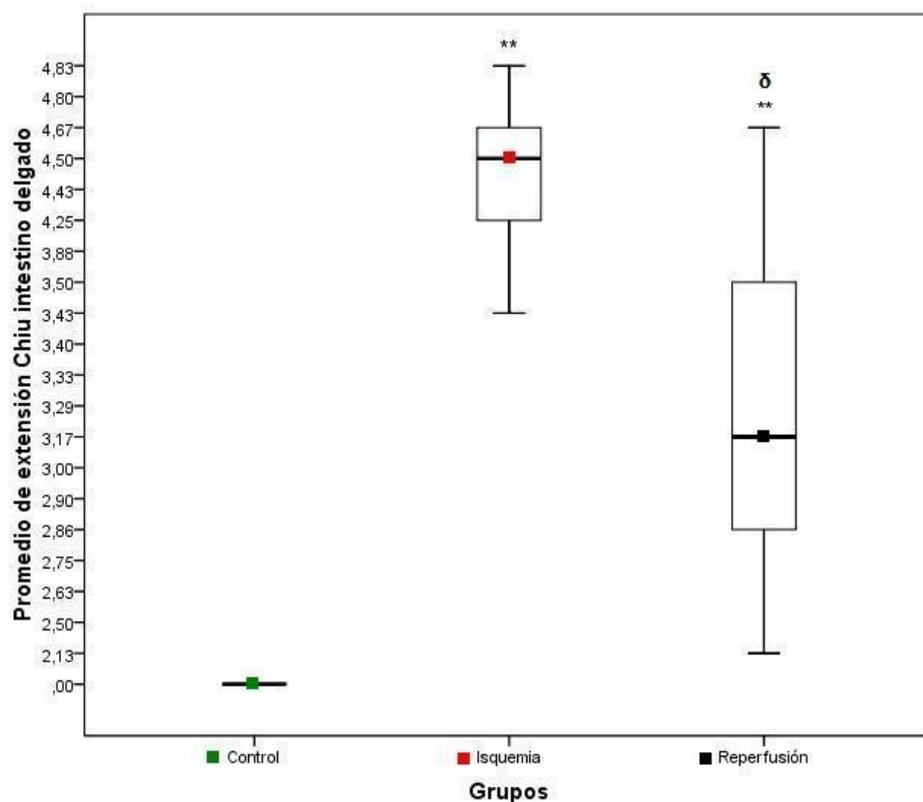
C



**Figura 27:** *A) Necrosis focal transmural más intensa en la mucosa del colon derecho con zonas de hemorragia (flecha) correspondiente a uno de los animales del grupo 3: reperusión. B) Necrosis focal transmural con zonas de hemorragia (flecha) en la mucosa del colon derecho correspondiente a uno de los animales del grupo 2: isquemia. C) Mucosa del colon correspondiente a uno de los animales del grupo 1: control.*

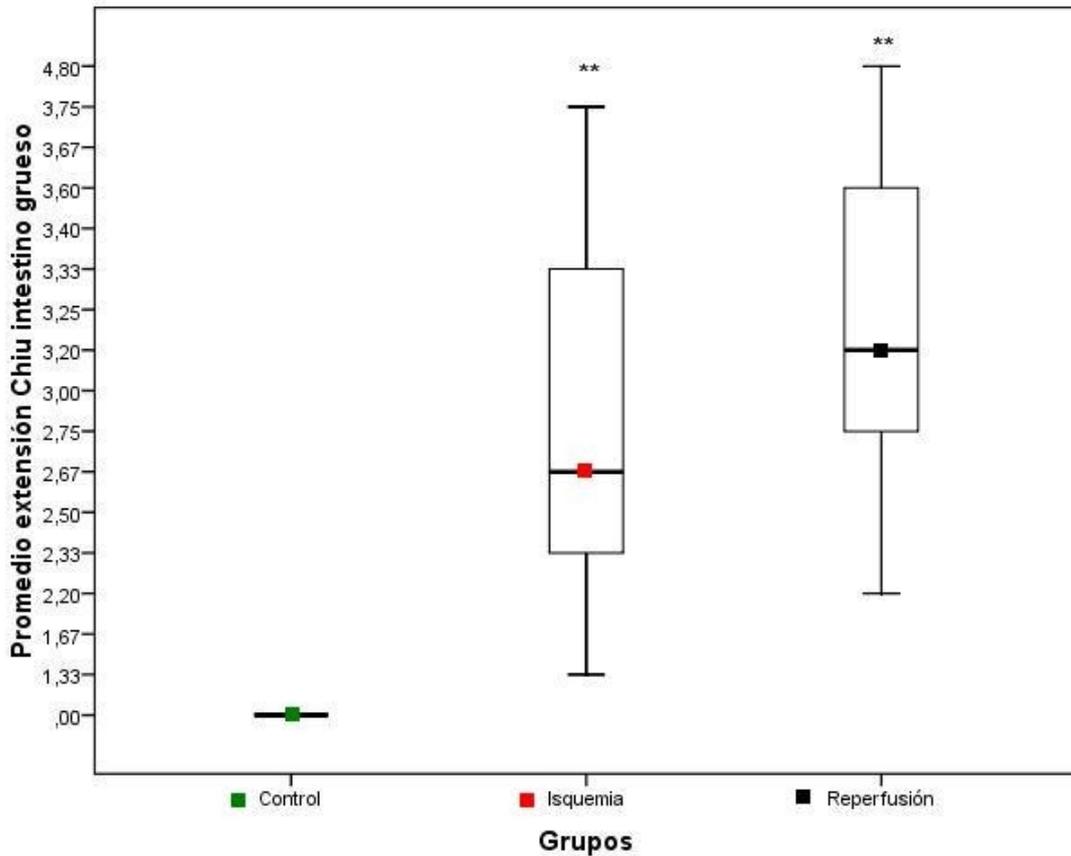
La valoración microscópica de las lesiones en el intestino delgado según el promedio del sistema de puntuación Chiu para el grupo reperfusión fue 3 (2,86-3,5) comparado con 4,46 (4,25-4,67) del grupo isquemia y cero del grupo control ( $p < 0,001$ ). El nivel de lesión intestinal fue más intenso en el grupo isquemia. La puntuación microscópica de las lesiones en el intestino grueso fue de 3,1 (2,75-3,6) en el grupo reperfusión, comparado con 2,67 (2,33-3,33) del grupo isquemia y cero del grupo control ( $p < 0,001$ ). A pesar de no existir diferencias significativas entre el grupo reperfusión respecto al grupo isquemia, el grado de lesión intestinal del colon fue mayor en el grupo reperfusión (Figura 28).

A



## Resultados

### B



**Figura 28.** Valoración del grado de lesión intestinal según la escala de Chiu. **A) Intestino delgado** grupo 3: reperusión fue 3 (2,86-3,5) comparado con 4,46 (4,25-4,67) del grupo 2: isquemia y 0 del grupo 1: control. **B) Intestino grueso** grupo 1: control fue 0 y el grupo 2: isquemia fue de 2,67 (2,33-3,33) comparado con el grupo 3: reperusión que fue de 3,1 (2,76-3,6).

RI: rango intercuartil I-III

Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  frente al grupo 1: control

$\delta p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

En el intestino delgado la isquemia aguda y la reperusión causaron un acortamiento de vellosidades respecto al grupo control. Es así que en el grupo reperusión la altura media de vellosidades (AMV) fue de 150 (138-246) comparado con 74,5 (46-95) del grupo isquemia y con 260 (246-282) del grupo control ( $p < 0,001$ ). Además se encontró

un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) del espesor medio de vellosidades (EMV) y superficie media de vellosidades (SMV) en el grupo reperfusión al compararlo con el grupo isquemia y una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) del EMV y SMV del grupo isquemia al compararlo con el grupo control. En todos los casos la isquemia pura ocasionó más afectación sobre las vellosidades que la isquemia seguida de un periodo de 24 horas de reperfusión. Respecto al resto de variables morfométricas no encontramos diferencias significativas con el grupo control para el EMV y SMV (Tabla 9).

GRUPO	CONTROL		ISQUEMIA		REPERFUSION	
	Promedio	Delgado Grueso	Delgado Grueso	Delgado Grueso	Delgado Grueso	Delgado Grueso
AMV	260 (246-282)	--	74,5 (46-95)**	--	150 (138-246)** <sup>δ</sup>	--
EMV	62 (58-70)	--	38 (30-52)**	--	67 (55-74) <sup>δ</sup>	--
SMV	7903 (6552-14960)	--	1245 (912-2574)**	--	6098 (3528-8576) <sup>δ</sup>	--

**Tabla 9.** Cambios en los parámetros morfométricos después de 60 minutos de isquemia y 60 minutos de isquemia seguidos de 24 horas de reperfusión comparados con los valores del grupo 1: control. A)

Morfometría de vellosidades: intestino delgado.

RI: rango intercuartil I-III

Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  frente al grupo 1: control

<sup>δ</sup>  $p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

AMV: altura media de la vellosidad ( $\mu\text{m}$ )

EMV: espesor medio de la vellosidad ( $\mu\text{m}$ )

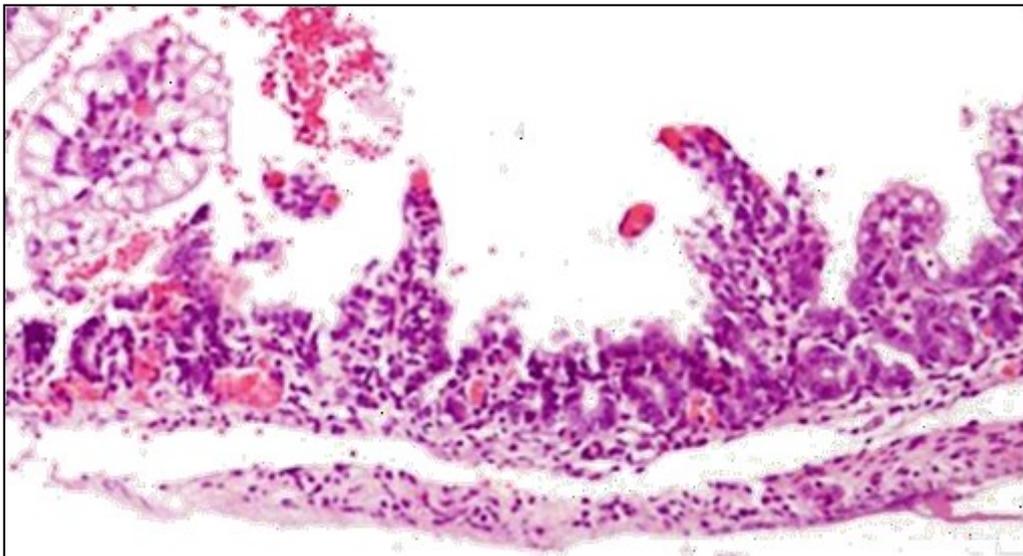
SMV: superficie media de las vellosidades ( $\mu\text{m}^2$ )

## Resultados

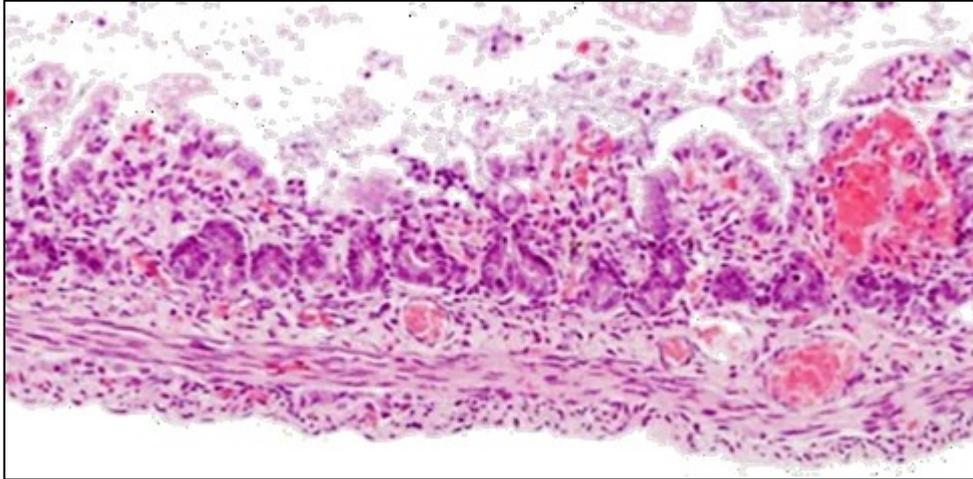
El espesor medio de la serosa a la base de la lámina propia (EMSL) en el intestino delgado como en el grueso no registró ninguna comparación significativa ( $p > 0,05$ ) entre el grupo reperfusión (79,95/108,3) al comparar con los grupos isquemia (59,15/133,3) y control (95/125) respectivamente.

En resumen, después de efectuar el estudio morfométrico se observó que hay una evidente afectación de las vellosidades tanto en los grupos reperfusión e isquemia respecto al grupo control (Figura 29).

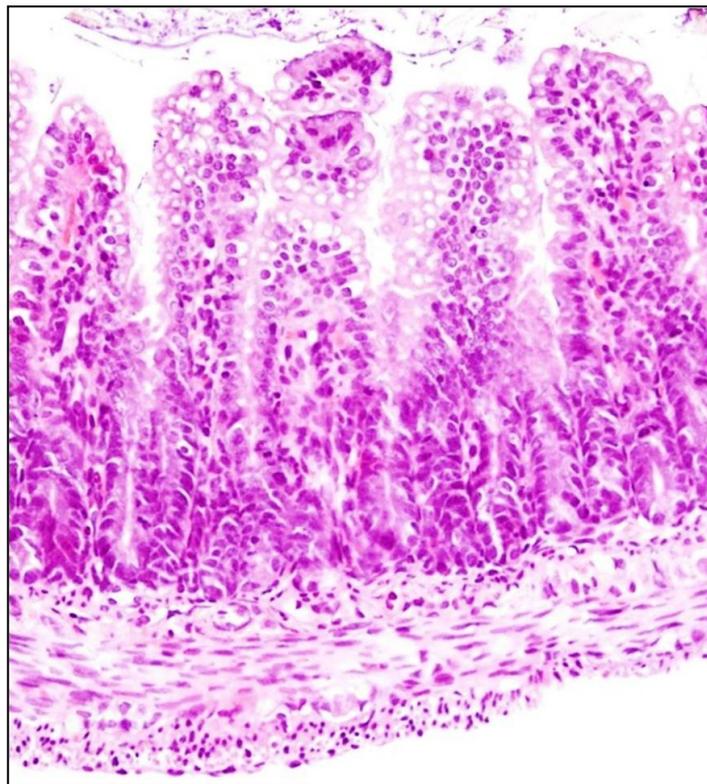
A



B



C



**Figura 29.** Morfometría de las vellosidades, *intestino delgado*. **A)** En el grupo 3: reperfusión, las vellosidades sufren un acortamiento y su espesor se ve afectado. **B)** En el grupo 2: isquemia; las vellosidades sufren un mayor acortamiento y su espesor se ve muy afectado. **C)** En el grupo 1: control, las vellosidades conservan su relación de altura y espesor.

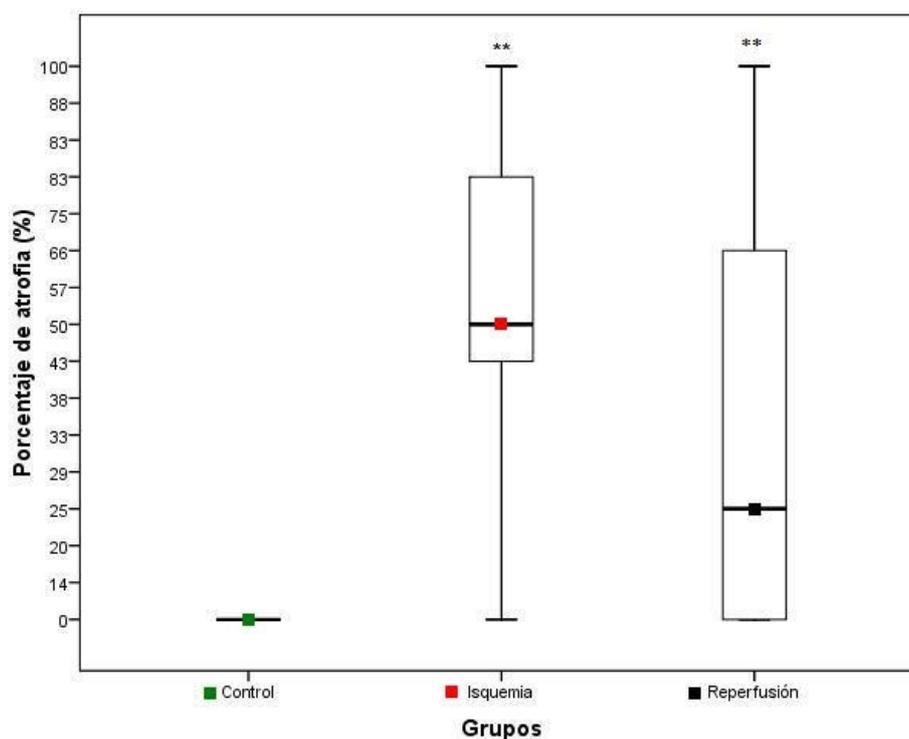
## Resultados

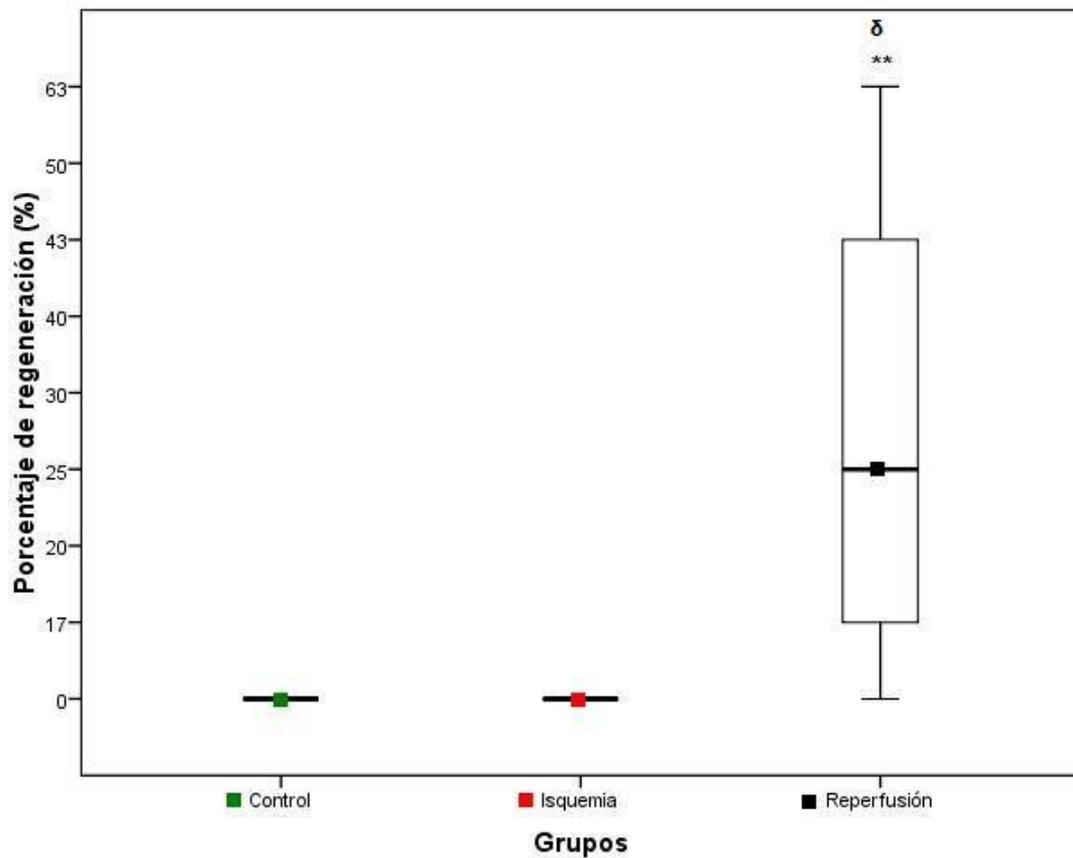
### 6.2.3. Otros criterios microscópicos

Continuando con el estudio microscópico valoramos las siguientes variables: arquitectura de vellosidades, otros hallazgos de lesión intestinal y el número de células en vellosidades/criptas de Lieberkühn tanto en el intestino delgado como en el grueso.

Respecto a la arquitectura de vellosidades observamos porcentajes de atrofia y regeneración. La atrofia de vellosidades en el intestino delgado fue significativamente mayor en los grupos reperusión e isquemia y 2 ( $p < 0,001$ ) comparado con grupo control, pero no existió diferencias significativas entre el grupo reperusión al compararlo con el grupo isquemia. Mientras que la regeneración se manifestó exclusivamente ( $p < 0,001$ ) en el grupo reperusión, al compararlo con los grupos isquemia y control. Podemos deducir que la regeneración es una característica de la reperusión (Figuras 30 y 31).

A



**B**

**Figura 30.** Arquitectura de vellosidades *intestino delgado*. **A)** Corresponde al porcentaje de atrofia de vellosidades. En el grupo 3: reperusión fue 22,5 (0-66) comparado con 50 (43-83) del grupo 2: isquemia y 0 del grupo 1: control. **B)** Corresponde al porcentaje de regeneración de vellosidades. En el grupo 3: reperusión fue 25 (17-43) comparados con 0 de los grupos 1(control) e (isquemia).

RI: rango intercuartil I-III

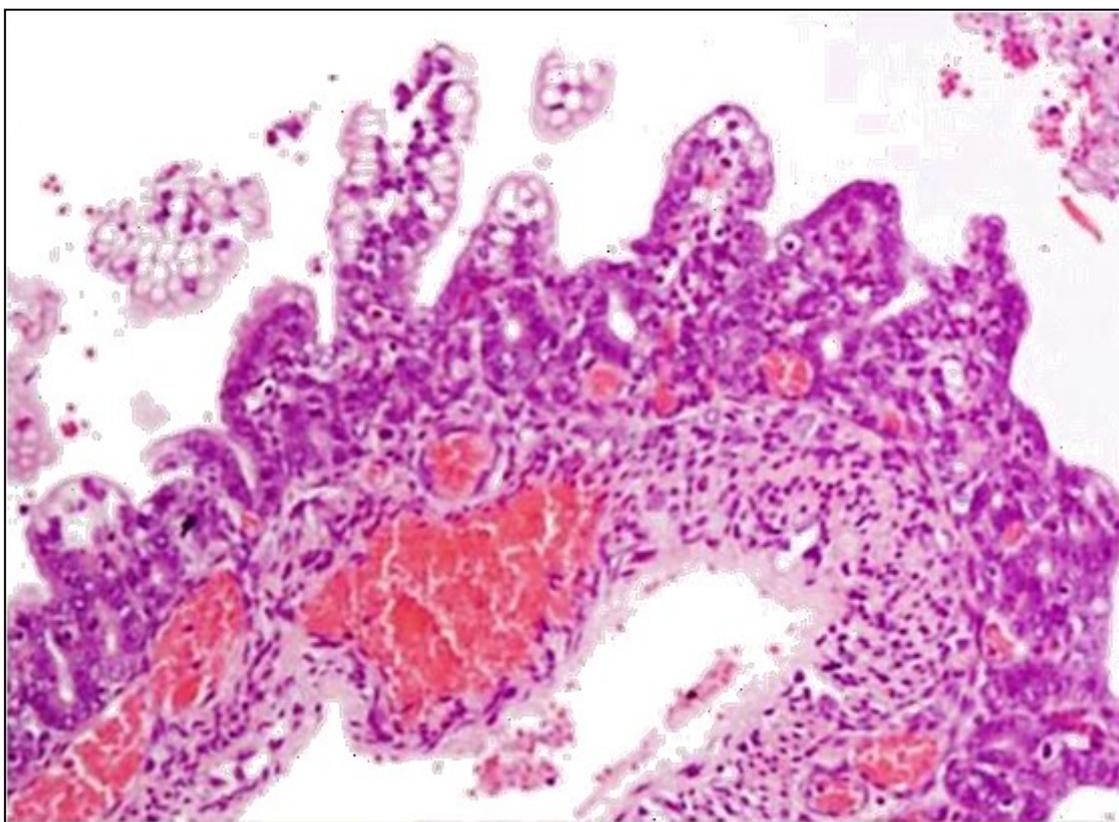
Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  frente al grupo 1: control

\* $p < 0,01$  frente al grupo 1: control

$\delta p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

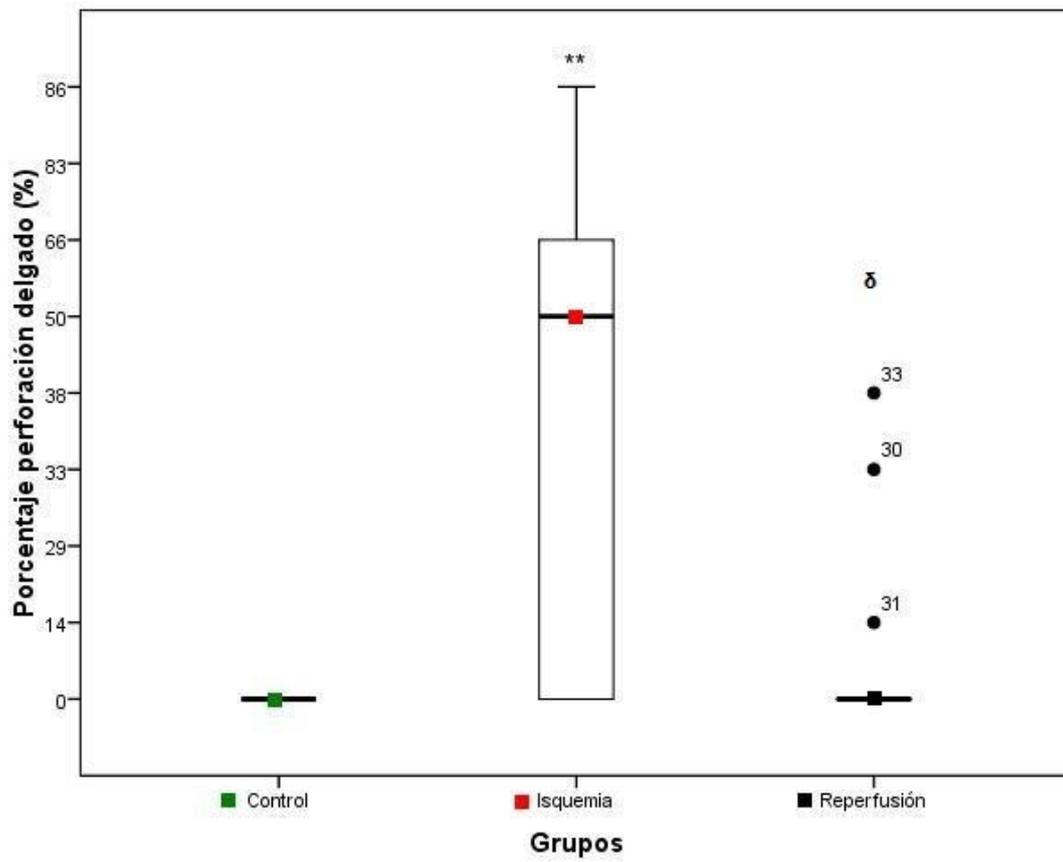
## Resultados



**Figura 31.** *Arquitectura de vellosidades intestino delgado, se observa la regeneración como característica del grupo 3: reperfusión.*

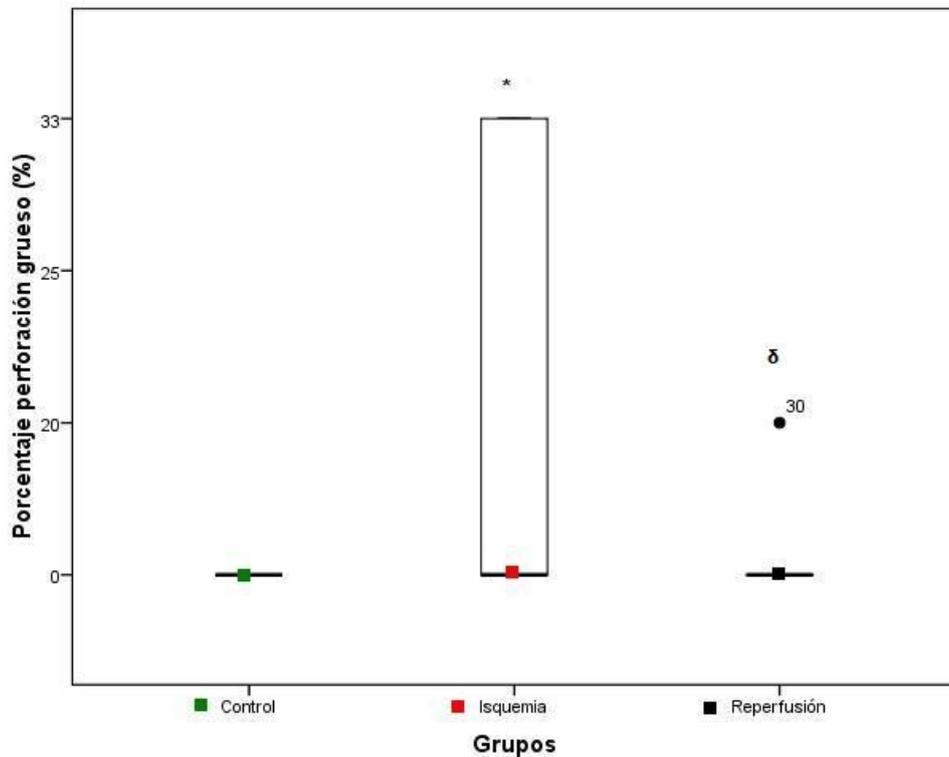
En relación a otros hallazgos de lesión intestinal como perforación valorados en tanto por ciento, encontramos casos aislados en el grupo reperfusión tanto en intestino delgado (3) como en grueso (1) al compararlo con el grupo isquemia ( $p < 0,001$ ). Sin embargo este hallazgo fue más característico del grupo isquemia ( $p < 0,01$ ) al compararlo con el grupo reperfusión y control (Figura 32).

A



## Resultados

### B



**Figura 32.** Hallazgos de lesión intestinal. **A)** Corresponde al porcentaje de perforación del **intestino delgado**, en el grupo 3: reperusión fue 0 (0-38) con casos aislados extremos ( $\bullet$ 30  $\bullet$ 31  $\bullet$ 33) comparados con 50 (0-66) del grupo 2: isquemia y cero del grupo 1: control. **B)** Corresponde al porcentaje de perforación del **intestino grueso**, en el grupo 3: reperusión fue de 0 (0-20) comparados con 0 (0-33) del grupo 2: isquemia y cero del grupo 1: control.

RI: rango intercuartil I-III

Los datos son expresados como mediana (RI)

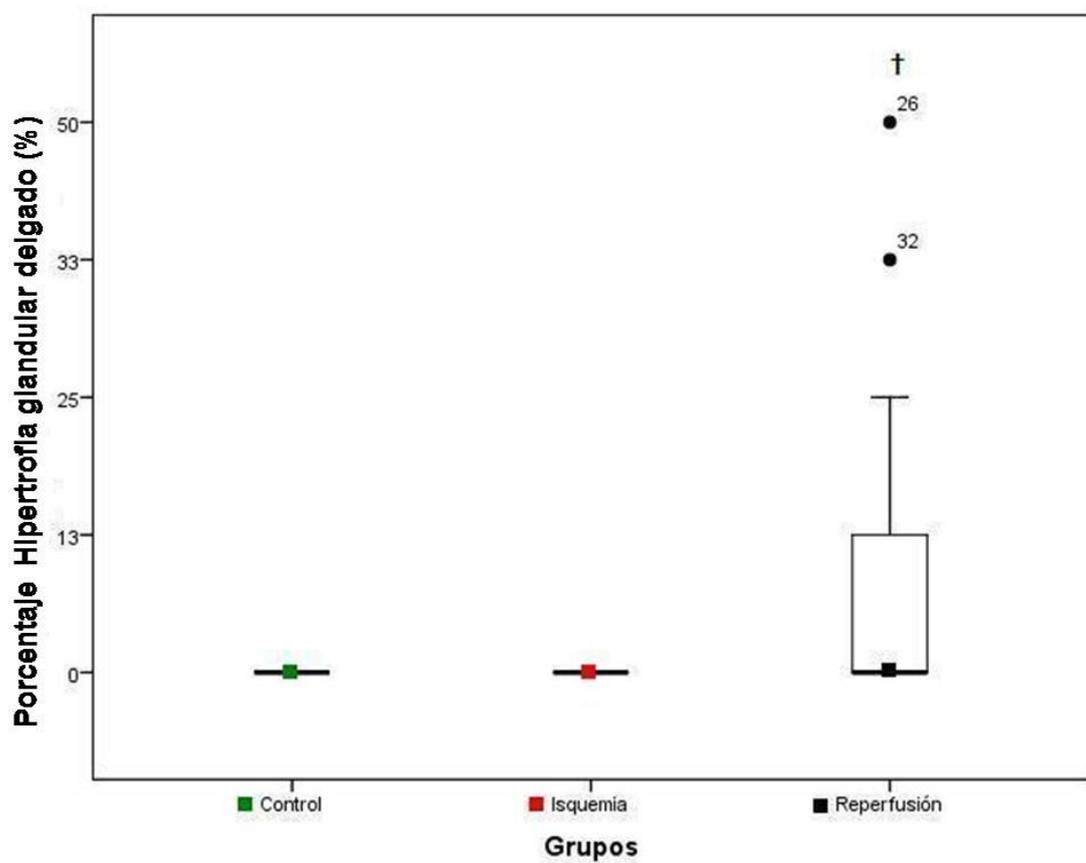
\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$  frente al grupo 1: control

$\delta p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

La pneumatosis tanto en el intestino delgado como en el grueso no fue observada en ningún grupo del estudio.

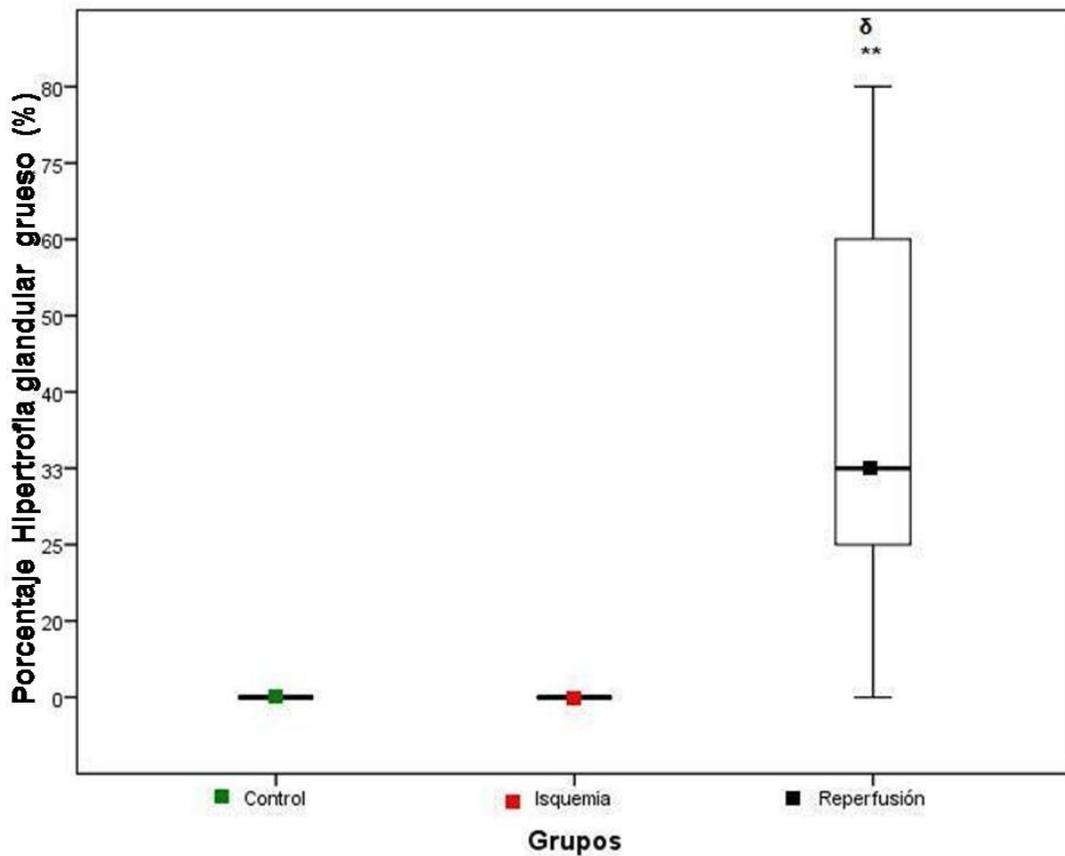
La hipertrofia glandular en el intestino delgado no encontró diferencias significativas ( $p > 0,01$ ) entre los los grupos. Mientras que en el intestino grueso estas las diferencias ( $p < 0,001$ ) estuvieron presentes en el grupo reperusión al comparar con los grupos isquemia y control. (Figura 33). Por lo tanto la hipertrofia glandular fue una características del grupo reperusión (Figura 34)

A



## Resultados

**B**



**Figura 33.** Hallazgos de lesión intestinal. **A)** Corresponde al porcentaje de hipertrofia glandular del *intestino delgado*, en el grupo 3: reperusión fue 0 (0-13) con casos aislados extremos (•26 y •32) comparados con 0 de los grupos 2 y 1: isquemia y control. **B)** Corresponde al porcentaje de hipertrofia glandular del *intestino grueso*, en el grupo 3: reperusión fue de 33 (25-60) comparados con 0 de los grupos isquemia y control.

RI: rango intercuartil I-III

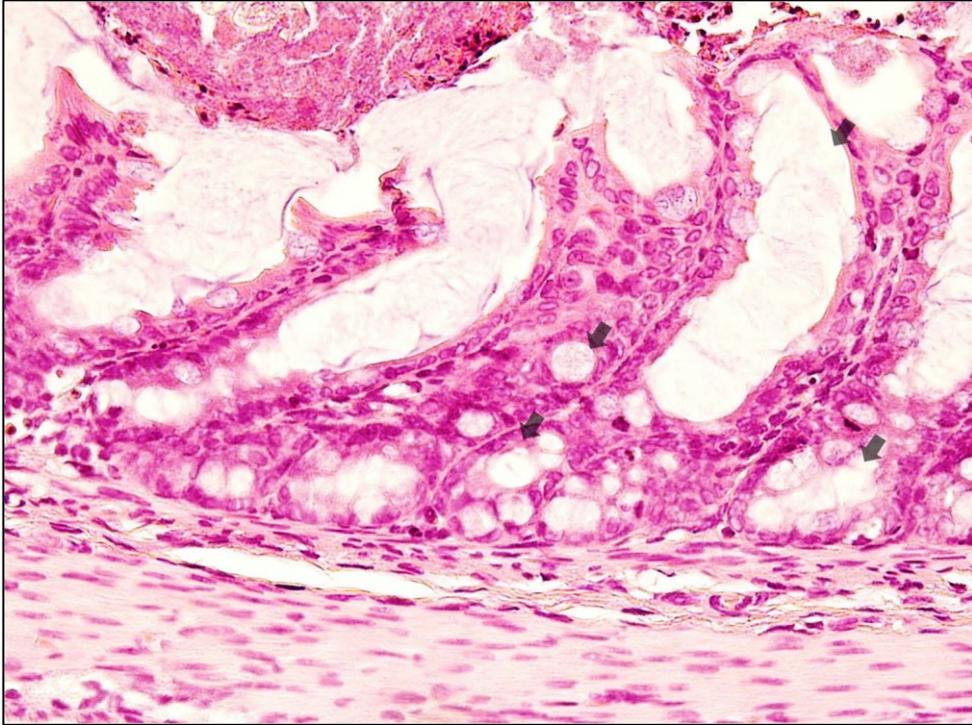
Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  frente al grupo 1: control

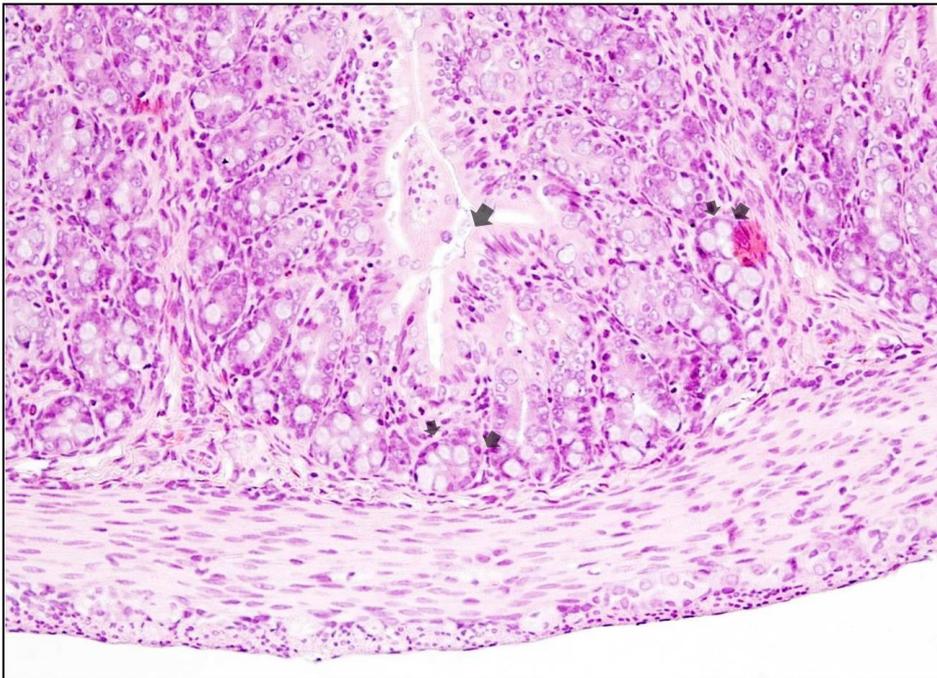
δ  $p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

†  $p < 0,05$  frente a los grupos 1 y 2

A

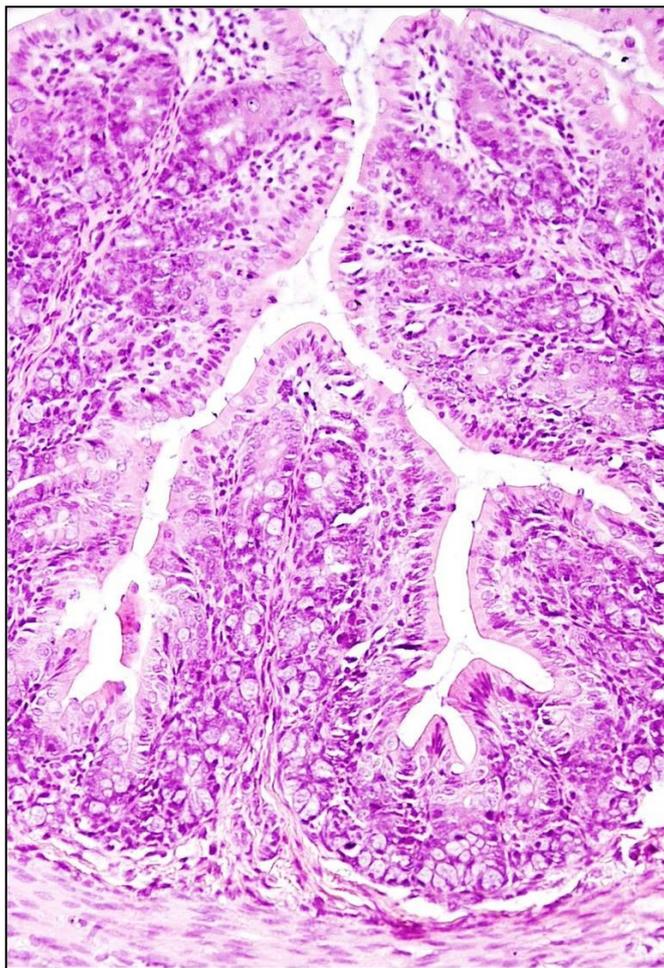


B



## Resultados

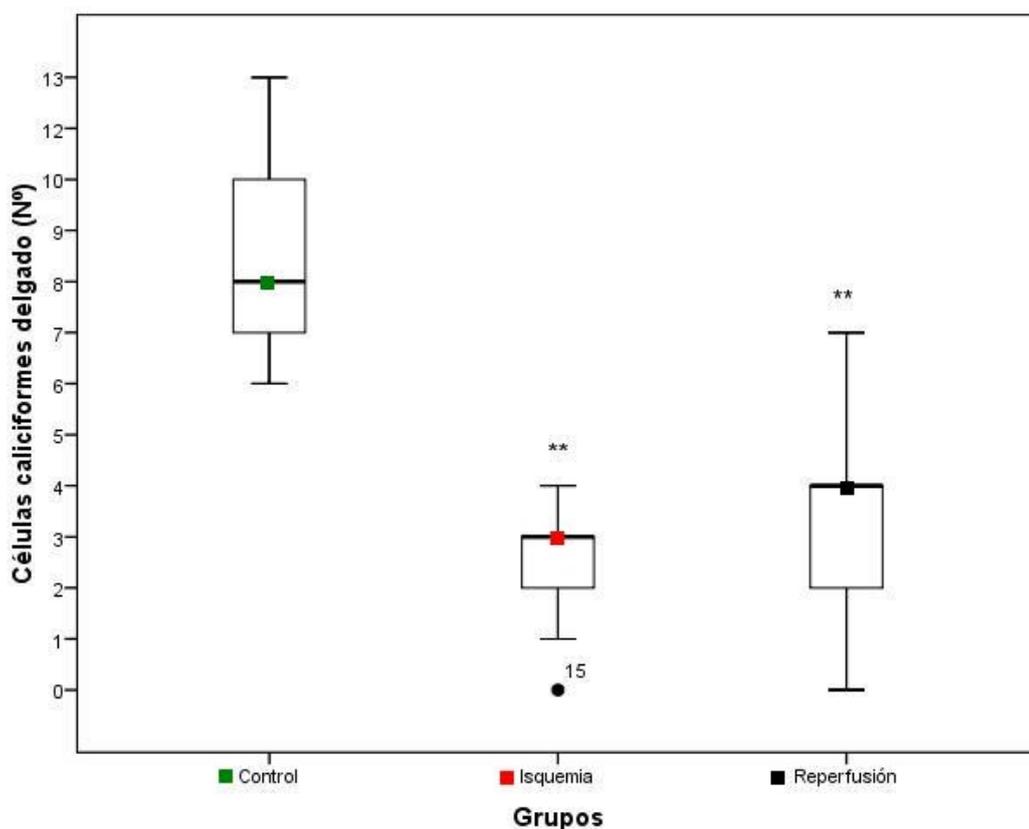
C



**Figura 34.** Hallazgos de lesión intestinal, hipertrofia glandular *intestino grueso*. **A)** Grupo 3: reperfusión se observa dilatación de glándulas, distorsión de criptas, aumento de tamaño de células caliciformes (flecha). **B)** Grupo 2: isquemia, se aprecia un agrupamiento de células caliciformes (flecha) con un ligero aumento de su volumen, pero hay conservación de las glándulas. **C)** Grupo 1: control, arquitectura normal de las glándulas.

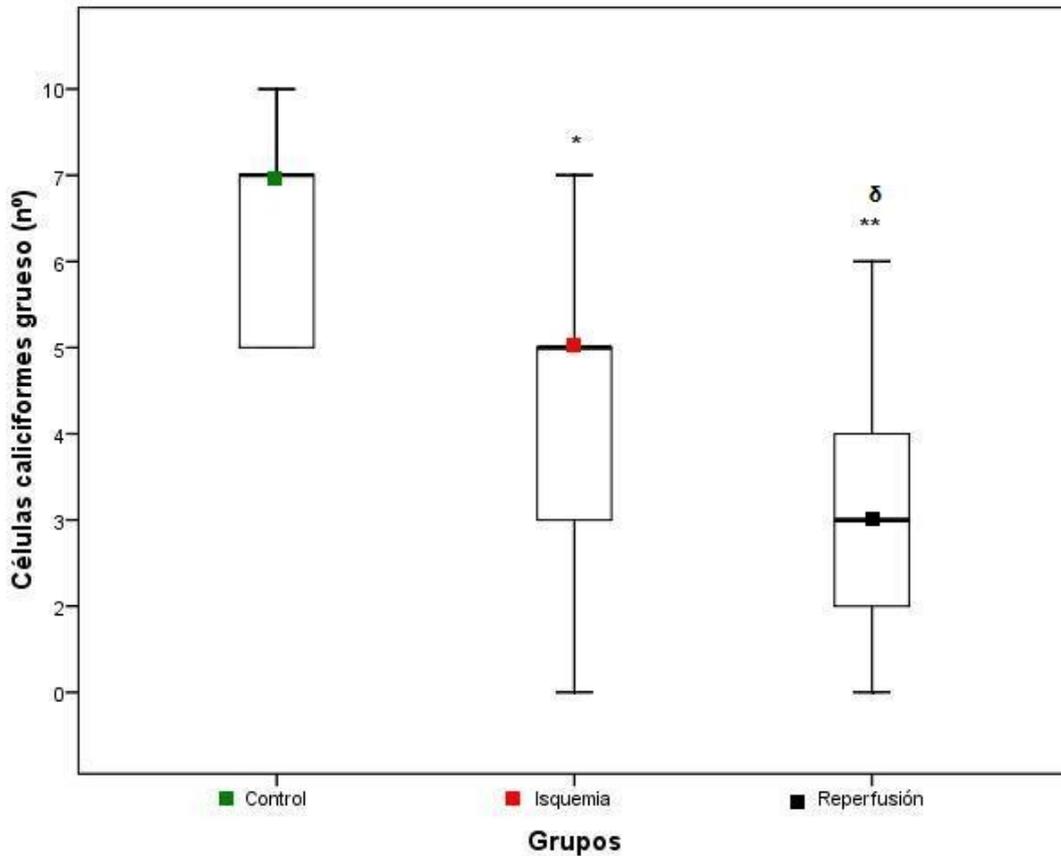
Las células que cuantificamos en vellosidades/criptas de Lieberkühn fueron: caliciformes, Paneth y mitosis. El número de células caliciformes en intestino delgado fue para el grupo reperusión de 3,5 (2-4), comparado con 2,5 (2-4) de grupo isquemia y 8 (7-10) del grupo control ( $p < 0,001$ ). No existieron diferencias significativas al comparar el grupo reperusión con el grupo isquemia. Mientras que en el intestino grueso el número de células caliciformes para el grupo reperusión fue de 3 (2-4) comparado con 5 (3-7) del grupo isquemia y 7 (5-10) del grupo control ( $p < 0,001$ ). Además existió diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre el grupo reperusión al compararlo con el grupo isquemia, manifestando un claro descenso celular. (Figura 35).

A



## Resultados

### B



**Figura 35.** Células de vellosidades/ criptas de Lieberkühn. **A)** Corresponde al número de células caliciformes del **intestino delgado**, en el grupo3: reperusión fue 3,5 (2-4) comparado con 2,5 (2-4) más un caso aislado (•15) del grupo 2: isquemia y 8 (7-10) del grupo 1: control. **B)** Corresponde al número de células caliciformes del **intestino grueso**, en el grupo 3: reperusión fue 3 (2-4) comparado con 5 (3-7) del grupo 2: isquemia y 7 (5-10) del grupo1: control.

RI: rango intercuartil I-III

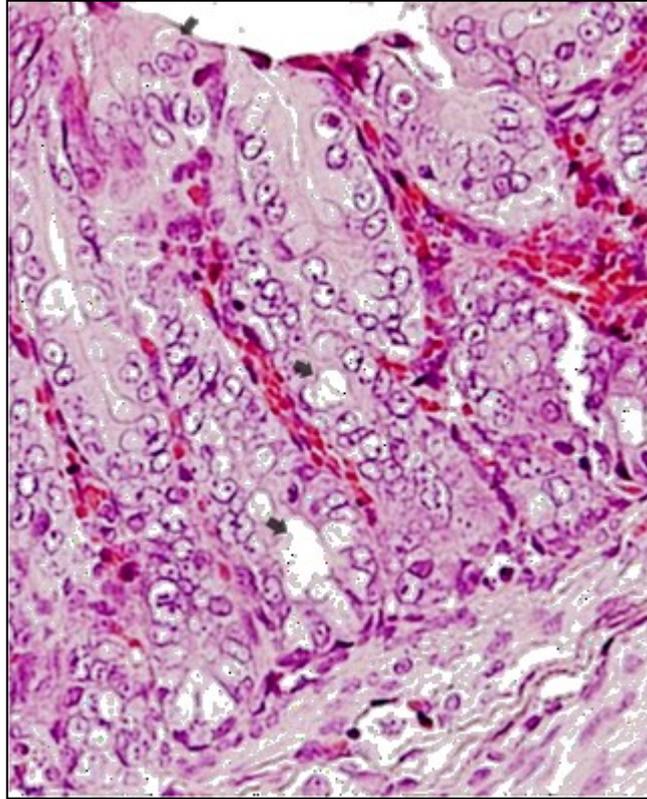
Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$  frente al grupo 1: control

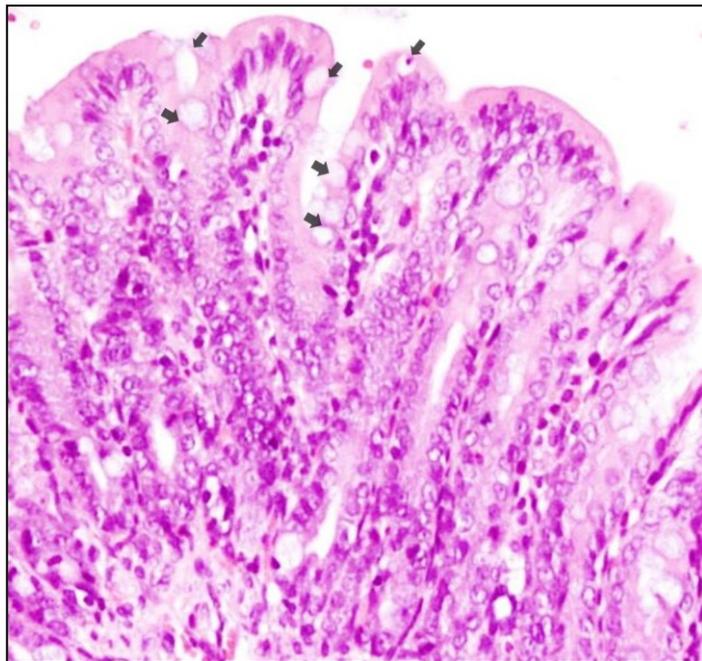
δ  $p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

En el intestino grueso en resumen se observó entre los grupos un descenso significativo de la población de células caliciformes del grupo reperusión, respecto a los grupos isquemia y control (Figura 36)

A

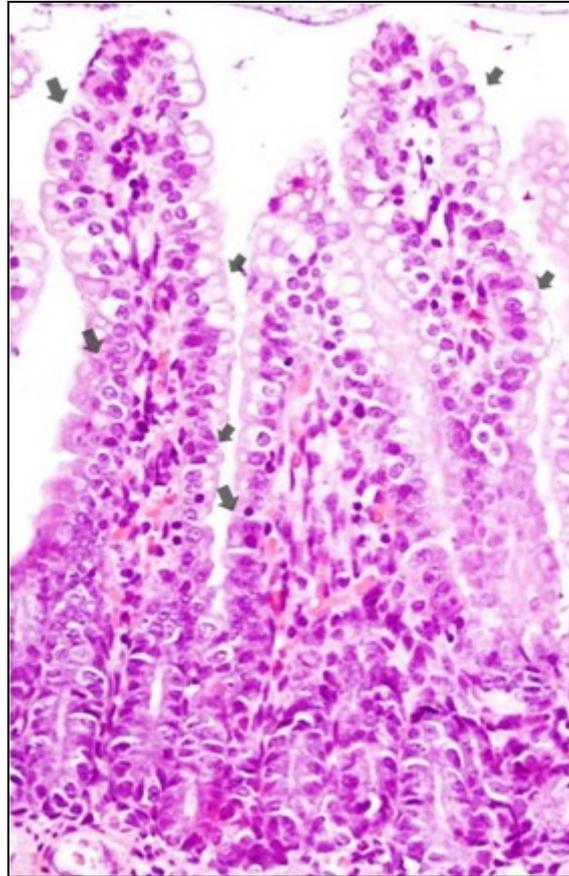


B



## Resultados

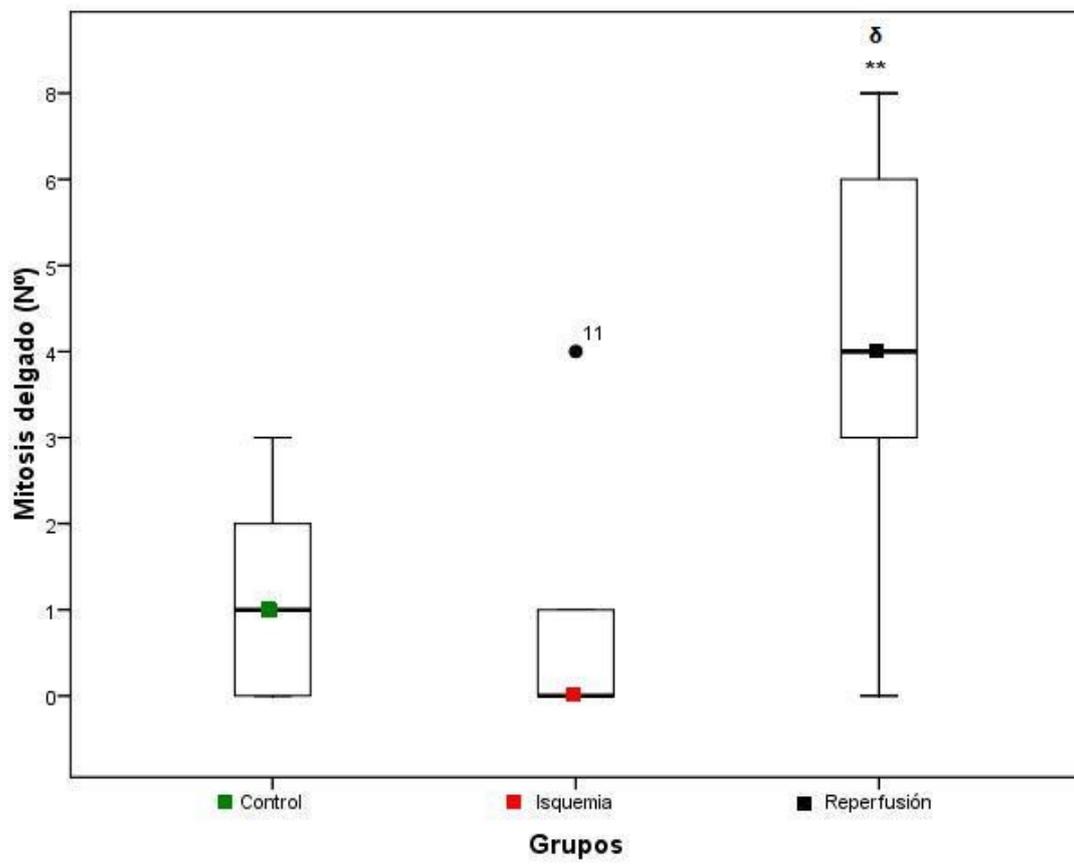
C



**Figura 36.** Células caliciformes (flecha) del **intestino grueso** presente en los grupos 3: *reperusión (A)*, 2: *isquemia (B)* y 1: *control (C)*.

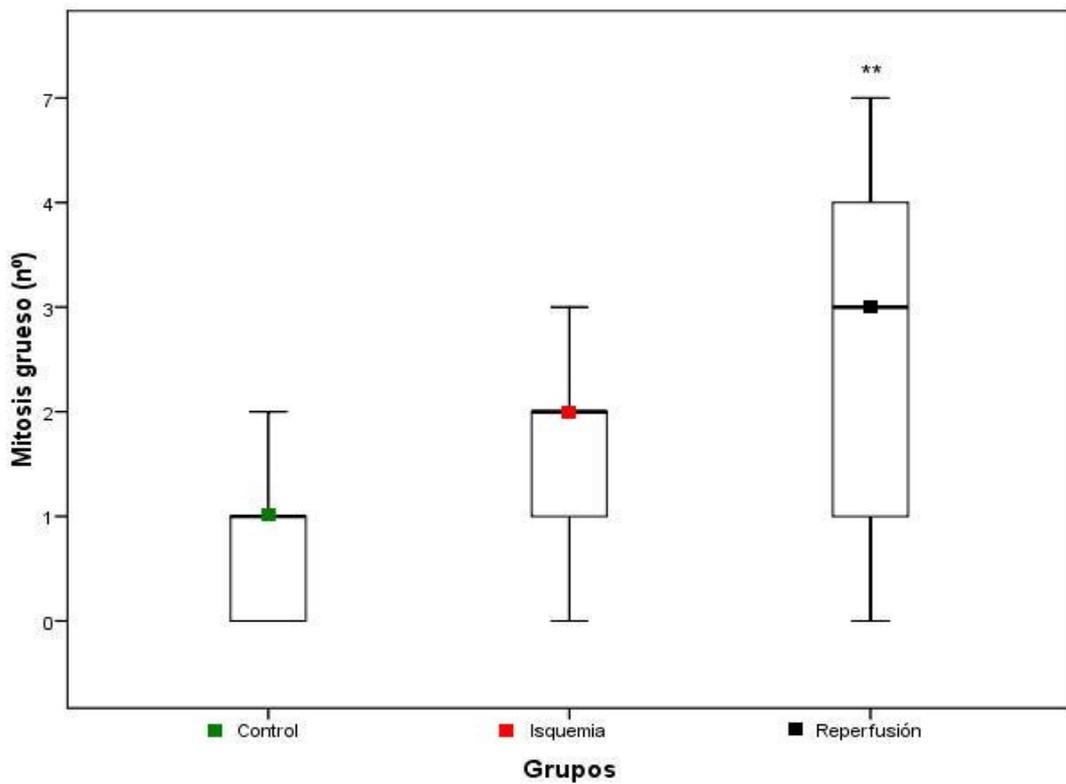
En lo que concierne al número de células de Paneth tanto en intestino delgado como en intestino grueso no se hallaron diferencias significativas. Y respecto al número de mitosis tanto en el intestino delgado su presencia en el grupo *reperusión* fue significativamente ( $p < 0,001$ ) mayor al comprar con los grupos *isquemia* y *control*. En el intestino grueso las diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) fueron sólo con el grupo *control* (Figura 37).

A



## Resultados

### B



**Figura 37.** Células de vellosidades/criptas de Lieberkühn. **A)** Corresponde al número de mitosis en el **intestino delgado**, en el grupo3: reperusión fue 4 (3-6) comparado con 0 (0-1) más un caso aislado (•11) del grupo 2: isquemia y 0,5 (0-2) del grupo 1: control. **B)** Corresponde número de mitosis del **intestino grueso**, en el grupo 3: reperusión fue 2,5 (1-4) comparado con 2 (1-3) del grupo 2: isquemia y 0,5 (0-1) del grupo 1: control.

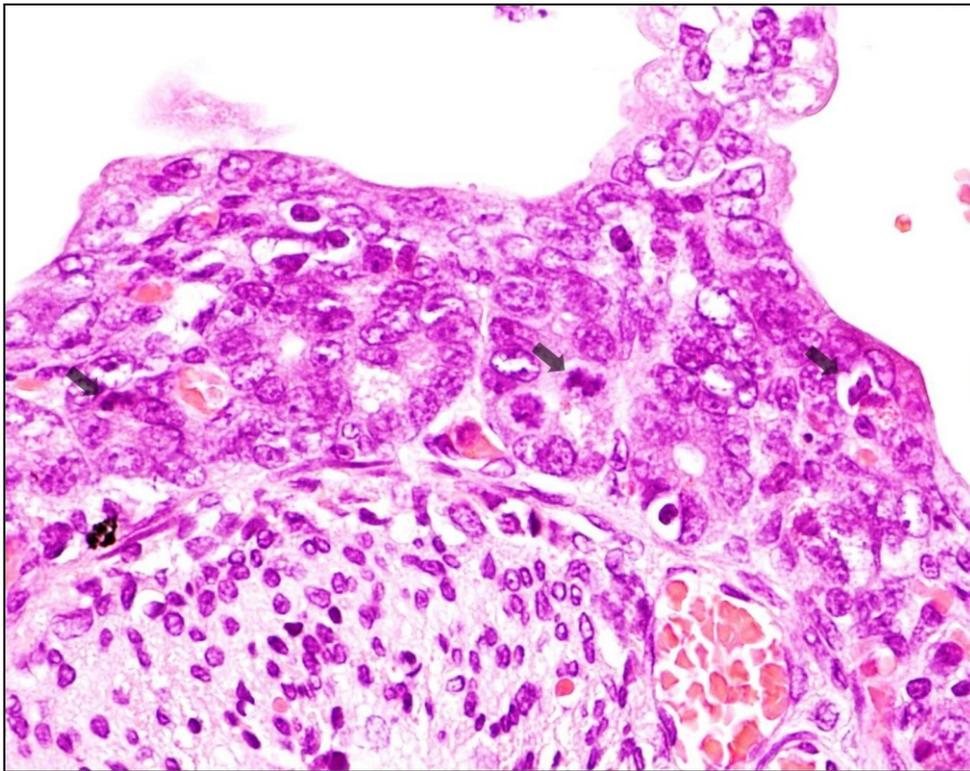
RI: rango intercuartil I-III

Los datos son expresados como mediana (RI)

\*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo 1: control

δ  $p < 0,001$  frente al grupo 2: isquemia

La mitosis fue una característica del grupo reperfusión y de la regeneración siendo significativa en el intestino delgado (Figura 38)



**Figura 38.** Mitosis (flecha) presente en el *intestino delgado* como característica de la regeneración presente en el grupo 3: reperfusión.

Después del análisis anterior de las variables de anatomía patológica (macro y microscópicas) y ecográficas, las que cumplieron con la condición de tener diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre el grupo reperfusión respecto al grupo isquemia y control, fueron: escala Wallace/Keenan, Chiu delgado, AMV, regeneración, hipertrofia glandular grueso, células caliciformes grueso, mitosis delgado, VSM, Vm, FD, IP, IR y S/D.

Resultados

### 6.3. Estudio de Correlación: Ecografía y Anatomía Patológica

#### - Ecografía Doppler color con la Anatomía Patológica (macro y microscópico):

La correlación estará expresada como positiva o directa y negativa o inversa tomando en consideración que el nivel de intensidad pudo ser débil (menor a 0,5), moderado (igual a 0,5) o fuerte (mayor a 0,5).

La asociación o correlación entre la ecografía Doppler color con el estudio macroscópico de anatomía patológica (Wallace/Keenan) determinó correlaciones ( $p < 0,01$ ) directas de intensidades fuerte (VSM/FD/Vm) y moderada (IP/IR/S/D) (Tabla 10).

Eco Doppler color	Escala de Wallace/Keenan
	Delgado/Grueso
VSM	0,665*
FD	0,796*
Vm	0,890*
IP	0,593*
IR	0,574*
S/D	0,630*

**Tabla 10.** Correlación entre la ecografía Doppler con el estudio macroscópico. La VSM ( $r_s = 0,665$ ), el FD ( $r_s = 0,796$ ), la Vm ( $r_s = 0,890$ ), el IP ( $r_s = 0,593$ ), IR ( $r_s = 0,574$ ) y S/D ( $r_s = 0,630$ ) tienen una correlación directa respecto a la escala de Wallace/Keenan.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Spearman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

VSM: velocidad sistólica máxima (cm/s)

Vm: velocidad media (cm/s)

FD: flujo diastólico (cm/s)

*IP: índice de pulsatilidad*  
*IR: índice de resistencia*  
*S/D: índice sístole/diástole*

La asociación entre la ecografía Doppler color con el estudio microscópico Chiu determino correlaciones directas ( $p < 0,01$ ) de intensidades fuerte (FD/Vm), moderada (VSM/IP) y débil (IR/S/D), solamente para el intestino delgado (Tabla 11).

Eco Doppler color	Chiu
	Delgado
VSM	0,569*
FD	0,765*
Vm	0,784*
IP	0,522*
IR	0,489*
S/D	0,470*

**Tabla 11.** Correlación entre la ecografía Doppler con Chiu. En el **intestino delgado** La VSM ( $r_s = 0,569$ ), el FD ( $r_s = 0,765$ ), la Vm ( $r_s = 0,784$ ), el IP ( $r_s = 0,522$ ), IR ( $r_s = 0,489$ ) y S/D ( $r_s = 0,470$ ) tienen una correlación directa respecto a la escala de Chiu.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Sperman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)

**Vm:** velocidad media (cm/s)

**FD:** flujo diastólico (cm/s)

**IP:** índice de pulsatilidad

**IR:** índice de resistencia

**S/D:** índice sístole/diástole

Continuando con el estudio microscópico (morfometría) la ecografía demostró tener una correlación ( $p > 0,01$ ) inversa de intensidades fuerte (FD/Vm) y débil (VSM/IP/IR/S/D) respecto a la AMV (Tabla 12).

## Resultados

Eco Doppler color	AMV
VSM	-0,495*
FD	-0,783*
Vm	-0,788*
IP	-0,452*
IR	-0,461*
S/D	-0,459*

**Tabla 12.** Correlación entre la ecografía Doppler con AMV. En el *intestino delgado* La VSM ( $r_s = -0,495$ ), el FD ( $r_s = -0,783$ ), la Vm ( $r_s = -0,788$ ), el IP ( $r_s = -0,452$ ), IR ( $r_s = -0,461$ ) y S/D ( $r_s = -0,459$ ) tienen una correlación inversa respecto a la AMV.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Spearman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

AMV: altura media de vellosidades ( $\mu\text{m}$ )

VSM: velocidad sistólica máxima (cm/s)

Vm: velocidad media (cm/s)

FD: flujo diastólico (cm/s)

IP: índice de pulsatilidad

IR: índice de resistencia

S/D: índice sístole/diástole

A nivel microscópico respecto la arquitectura de vellosidades, la regeneración encontró correlaciones ( $p < 0,01$ ) directas de intensidad débil (VSM/IP/IR/S/D) respecto a la ecografía (Tabla 13).

Eco Doppler color	Regeneración
VSM	0,412*
IP	0,434*
IR	0,422*
S/D	0,471*

**Tabla 13.** Correlación entre la ecografía Doppler con Regeneración. En el *intestino delgado* La VSM ( $r_s = 0,412$ ), el IP ( $r_s = 0,434$ ), IR ( $r_s = 0,422$ ) y S/D ( $r_s = 0,471$ ) tienen una correlación directa respecto al porcentaje de regeneración de vellosidades.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Spearman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)

**IP:** índice de pulsatilidad

**IR:** índice de resistencia

**S/D:** índice sístole/diástole

En el *intestino delgado* al asociar el recuento celular de vellosidades/criptas de Lieberkühn solamente la mitosis presentó correlaciones ( $p < 0,01$ ) directas con la ecografía de intensidades fuerte (IR | S/D), moderada (VSM/IP) y débil (FD/Vm) (Tabla 14).

Eco Doppler color	Mitosis
	Delgado
VSM	0,571*
FD	0,303*
Vm	0,330*
IP	0,567*
IR	0,615*
S/D	0,611*

## Resultados

**Tabla 14.** Correlación entre la ecografía Doppler con Mitosis. En el **intestino delgado** La VSM ( $r_s = 0,571$ ), el FD ( $r_s = 0,303$ ), la Vm ( $r_s = 0,330$ ), el IP ( $r_s = 0,567$ ), IR ( $r_s = 0,615$ ) y S/D ( $r_s = 0,611$ ) tiene una correlación directa respecto al número de mitosis.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Sperman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)

**Vm:** velocidad media (cm/s)

**FD:** flujo diastólico (cm/s)

**IP:** índice de pulsatilidad

**IR:** índice de resistencia

**S/D:** índice sistole/diástole

En el intestino grueso en relación con otros hallazgos de lesión intestinal se encontraron correlaciones ( $p < 0,01$ ) directas de intensidades moderada (IR | S/D) y débil (VSM/IP) respecto a la hipertrofia glandular. (Tabla 15).

Eco Doppler color	Hipertrofia glandular
	Grueso
VSM	0,443*
IP	0,493*
IR	0,566*
S/D	0,526*

**Tabla 15.** Correlación entre la ecografía Doppler con Hipertrofia glandular. En el **intestino grueso** La VSM ( $r_s = 0,443$ ), el IP ( $r_s = 0,493$ ), IR ( $r_s = 0,566$ ) y S/D ( $r_s = 0,526$ ) tienen una correlación directa respecto al porcentaje de hipertrofia glandular.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Sperman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)

**IP:** índice de pulsatilidad

**IR:** índice de resistencia

**S/D:** índice sistole/diástole

Prosiguiendo en esta misma línea de análisis, al asociar el recuento celular criptas de Lieberkühn en el intestino grueso se encontraron correlaciones ( $p < 0,01$ ) inversas de

intensidades moderada (VSM|S/D) y débil (IP/IR) respecto al número de células caliciformes (Tabla 16).

Eco Doppler color	Células caliciformes
	Grueso
VSM	-0,525*
IP	-0,450*
IR	-0,451*
S/D	-0,518*

**Tabla 16.** Correlación entre la ecografía Doppler con células caliciformes. En el **intestino grueso** La VSM ( $r_s = -0,525$ ), el IP ( $r_s = -0,450$ ), IR ( $r_s = -0,451$ ) y S/D ( $r_s = -0,518$ ) tienen una correlación inversa respecto al número de células caliciformes.

$r_s$  : coeficiente de correlación de Spearman

Los datos son expresados como  $r_s$

\* $p < 0,01$

**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)

**IP:** índice de pulsatilidad

**IR:** índice de resistencia

**S/D:** índice sístole/diástole

En resumen las correlaciones significativas ( $p < 0,01$ ) entre las variables ecográficas y de anatomía patológicas (macro y microscópicas) fueron: VSM, Vm, FD, IP, IR y S/D respecto a escala de Wallece/Keenan, Chiu delgado, AMV y mitosis delgado.

Y por otro lado fueron: VSM, IP, IR y S/D respecto a regeneración, hipertrofia glandular grueso y células caliciformes grueso (colon).

Resultados

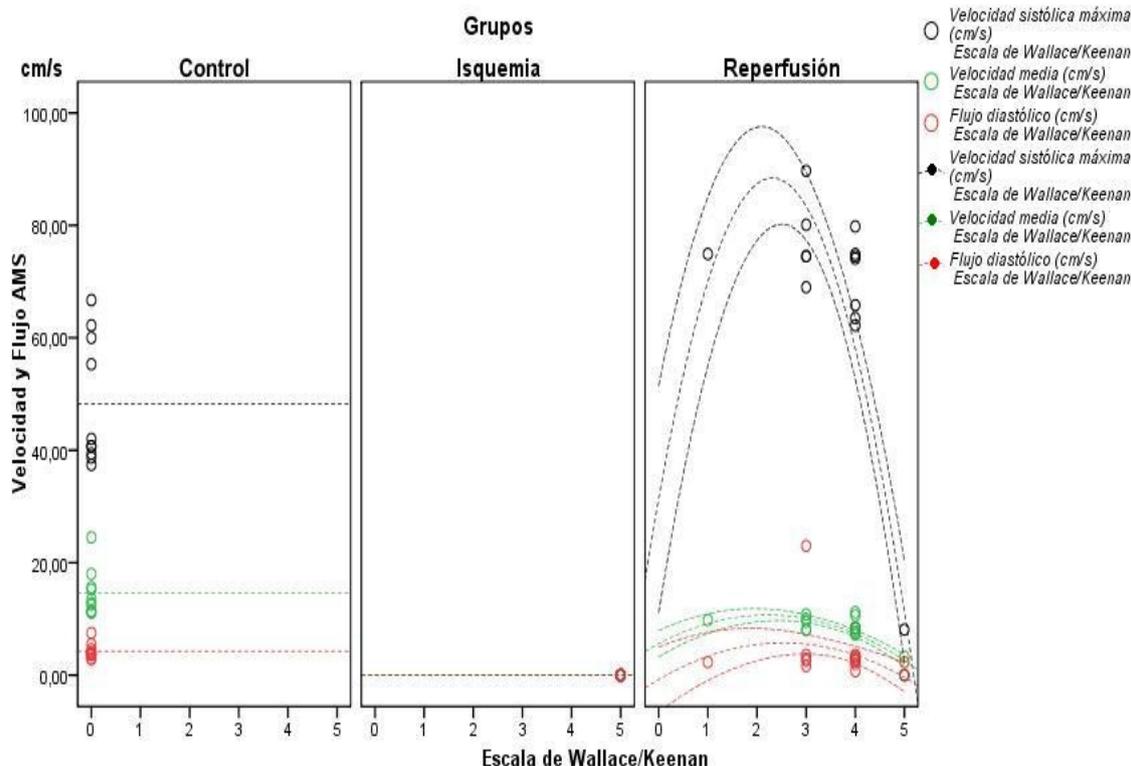
## 6.4. Estudio de Regresión: Ecografía y Anatomía Patológica

### - *Ecografía Doppler color con la Anatomía Patológica (macro y microscópica):*

De las correlaciones significativas ( $p < 0,01$ ) entre las variables ecográficas y de anatomía patológica (macro y microscópicas) descritas en la anterior sección (Tablas 10 a 16), se procedió a realizar un análisis de predicción (curva de regresión). La curva de dispersión entre la ecografía sobre la de anatomía patológica no fue lineal (cuadrática) y su expresión numérica fue el coeficiente de determinación ajustado o corregido ( ).

En todos los análisis de regresión, el IR respecto a las variables de anatomía patológica y las variables (regeneración de vellosidades/ mitosis delgado) respecto los parámetros ecográficos, el coeficiente ( $p > 0,05$ ) no fue significativo en los tres grupos (1, 2 y 3).

A nivel *macroscópico* al estimar la relación funcional entre la escala de Wallace/Keenan con la ecografía Doppler color encontró una variabilidad del 63,1% para la VSM ( $p < 0,001$ ), 12,1% para el FD ( $p < 0,01$ ) y 27,8% para la Vm ( $p < 0,01$ ) que son explicadas por las observaciones de Wallace/Keenan en el grupo reperfusión. Respecto a los índices de resistencia vascular encontramos una variabilidad del 51,6% para el IP ( $p < 0,01$ ) y 57,5% para S/D ( $p < 0,001$ ) que se explican por las observaciones realizadas en escala de Wallace/Keenan del grupo reperfusión. En el grupo isquemia este modelo no establece curvas de regresión y en el grupo control la regresión no fue significativa (Figuras 39 y 40).



**Figura 39.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre la velocidad y flujo de la AMS con la escala de Wallace/Keenan. En el grupo 3:reperusión 63,12% ( $r^2 = 0,631$ ) de VSM ( $p < 0,001$ ), 12,1% ( $r^2 = 0,121$ ) de FD ( $p < 0,01$ ) y 27,8% ( $r^2 = 0,278$ ) de Vm ( $p < 0,01$ ) son explicados por lo observado en la escala de Wallace/Keenan. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para la VSM ( $r^2 = 2,22E^{-16}$ ), FD y Vm ( $r^2 = 0$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

Los datos son expresados como

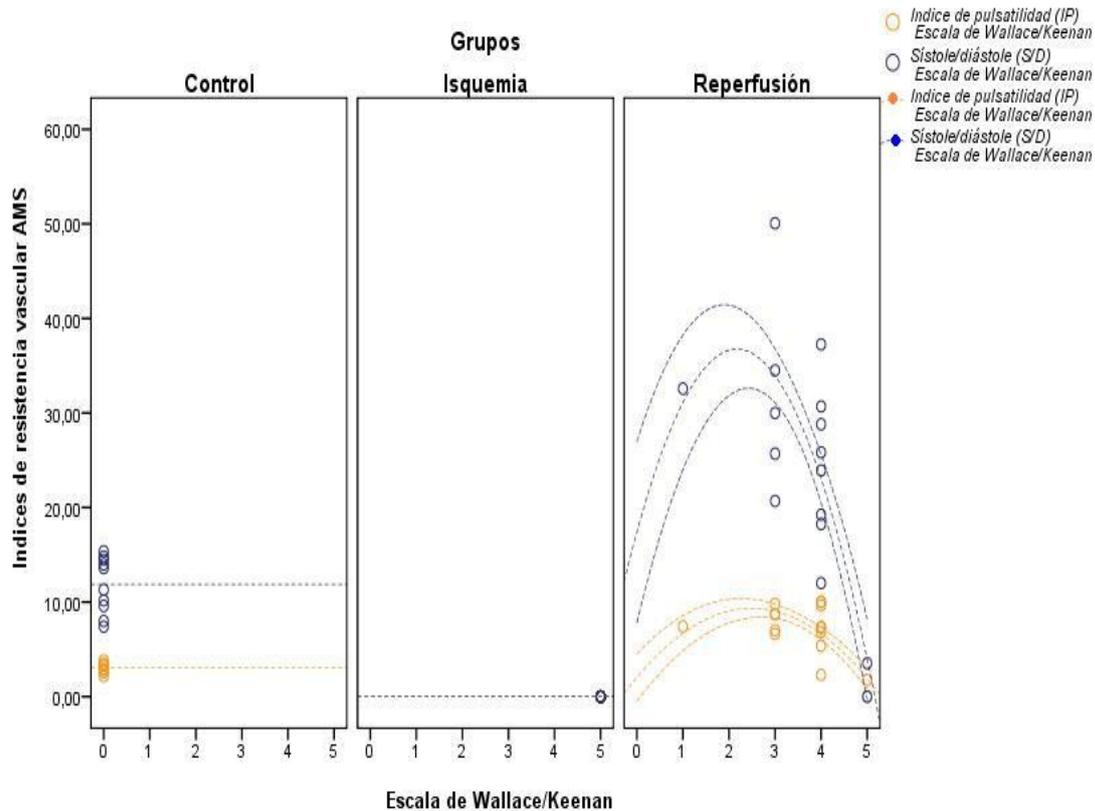
AMS: arteria mesentérica superior

VSM: velocidad sistólica máxima (cm/s)

FD: flujo diastólico (cm/s)

Vm: velocidad media (cm/s)

## Resultados



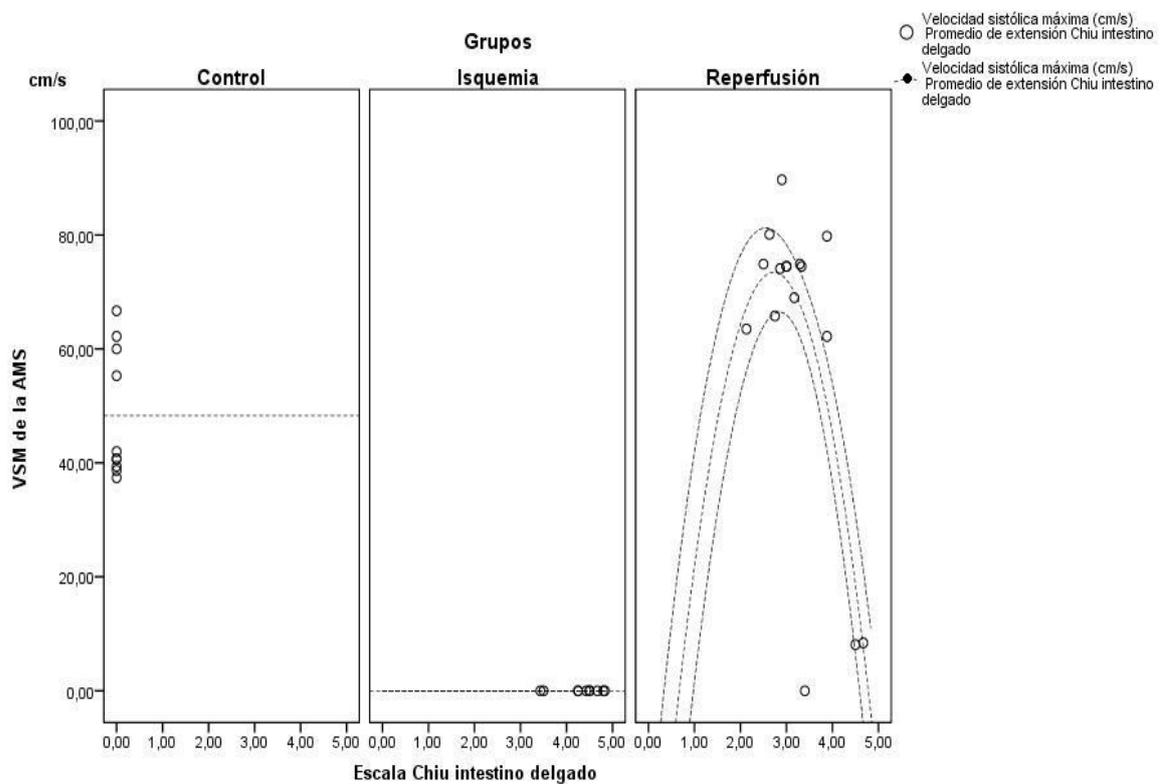
**Figura 40.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre los índices de resistencia vascular de la AMS con la escala de Wallace/Keenan. En el grupo 3:reperusión 51,6% ( $r^2 = 0,516$ ) de IP ( $p < 0,01$ ) y 57,5% ( $r^2 = 0,575$ ) de S/D ( $p < 0,001$ ) son explicados por lo observado en la escala de Wallace/Keenan. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para el IP ( $r^2 = 0$ ) y la S/D ( $r^2 = 2,22E^{-16}$ )

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

Los datos son expresados como  
**AMS:** arteria mesentérica superior  
**IP:** índice de pulsatilidad  
**S/D:** índice sístole/diástole

En el *intestino delgado* a nivel *microscópico*, la relación predictora de la escala de Chiu influyó en los resultados de la VSM. Encontrando una variabilidad del 50,6% ( $p < 0,001$ ) en el grupo reperusión. Respecto al FD y Vm la variabilidad no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Para los índices de resistencia vascular encontramos una variabilidad del

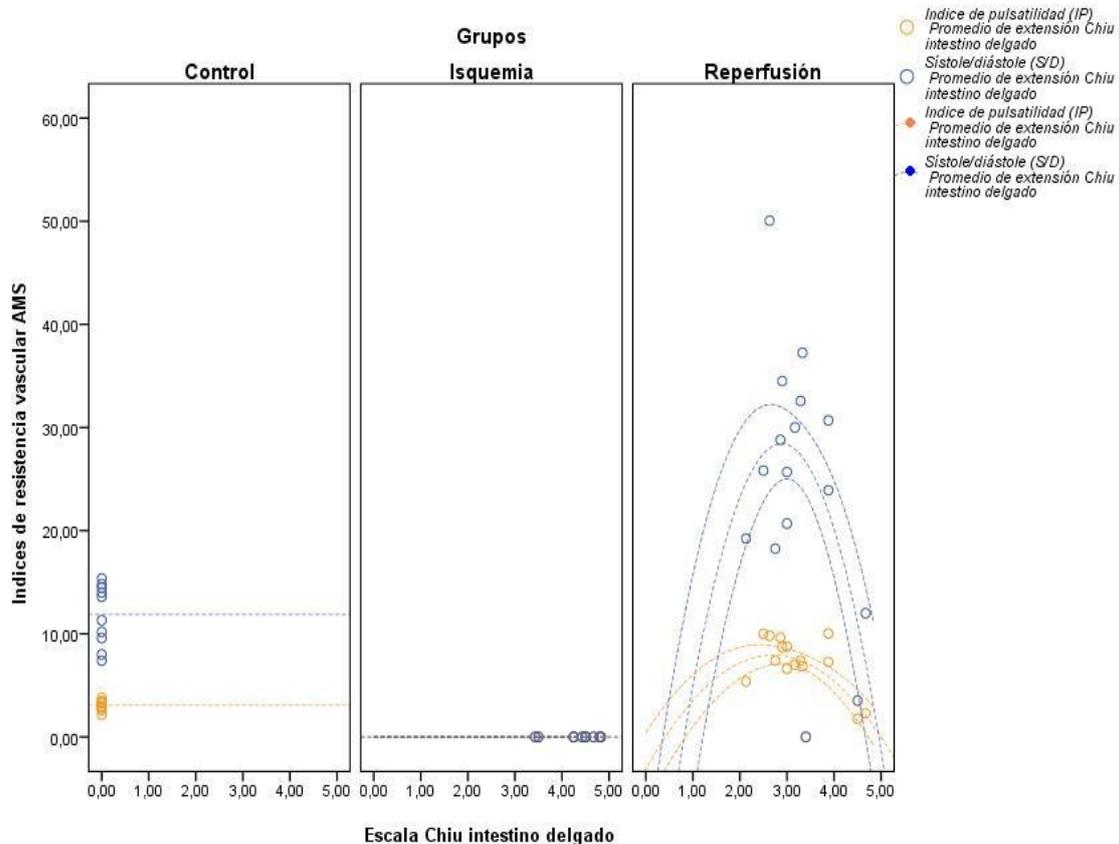
39,3% para el IP ( $p < 0,01$ ) y 26% para S/D ( $p < 0,01$ ) que son atribuidos a los hallazgos de Chiu del grupo reperfusión. En el grupo isquemia este modelo no establece curvas de regresión y en el grupo control la regresión no fue significativa (Figuras 41 y 42).



**Figura 41.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre la VSM de la AMS con la escala Chiu delgado. En el grupo 3:reperfusión 50,6% ( $r^2 = 0,506$ ) de VSM ( $p < 0,001$ ) es explicado por lo observado en la escala de Chiu. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para la VSM ( $r^2 = 2,22E^{-16}$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado  
 Los datos son expresados como  
**AMS:** arteria mesentérica superior  
**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)

## Resultados



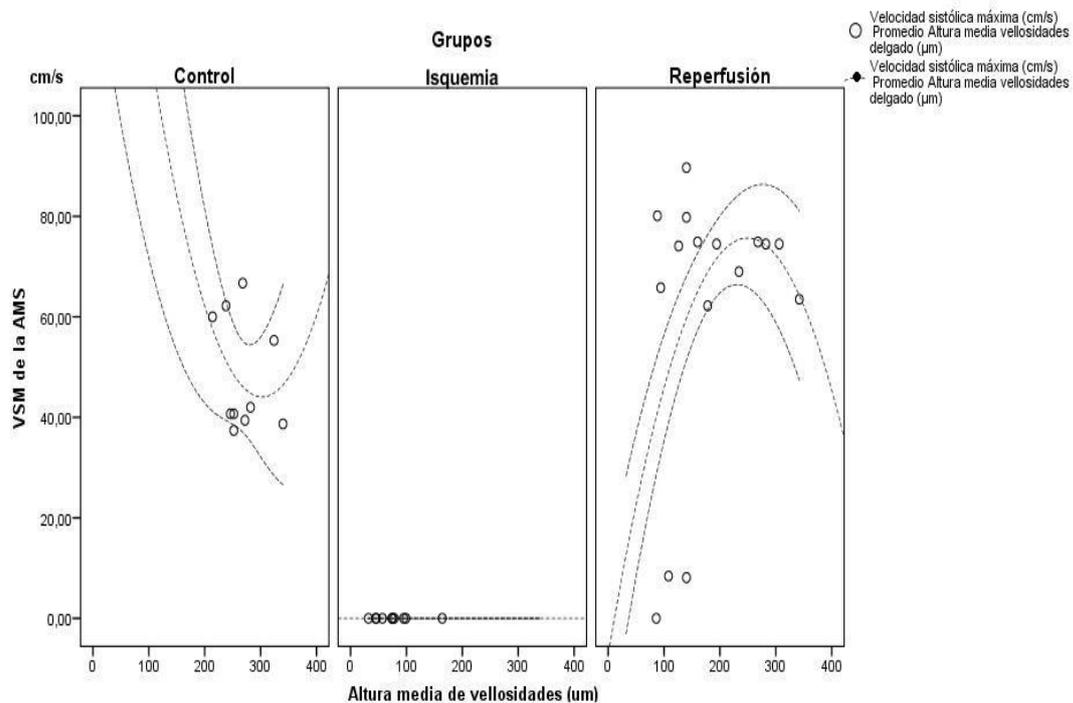
**Figura 42.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre los índices de resistencia vascular de la AMS con la escala de Chiu delgado. En el grupo 3:reperusión 33,9% ( $r^2 = 0,339$ ) de IP ( $p < 0,01$ ) y 26% ( $r^2 = 0,260$ ) de S/D ( $p < 0,01$ ) son explicados por lo observado en la escala de Chiu. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para el IP ( $r^2 = 0$ ) y la S/D ( $r^2 = 2,22E^{-16}$ )

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

Los datos son expresados como  
**AMS:** arteria mesentérica superior  
**IP:** índice de pulsatilidad  
**S/D:** índice sístole/díastole

En el *intestino delgado* a nivel *microscópico* (morfometría) la relación predictora de la AMV, influyó en los resultados de la VSM, encontrando una variabilidad del 18,3% ( $p < 0,01$ ) en el grupo reperusión. Respecto al FD y Vm la variabilidad no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Para los índices de flujo mesentérico encontramos una

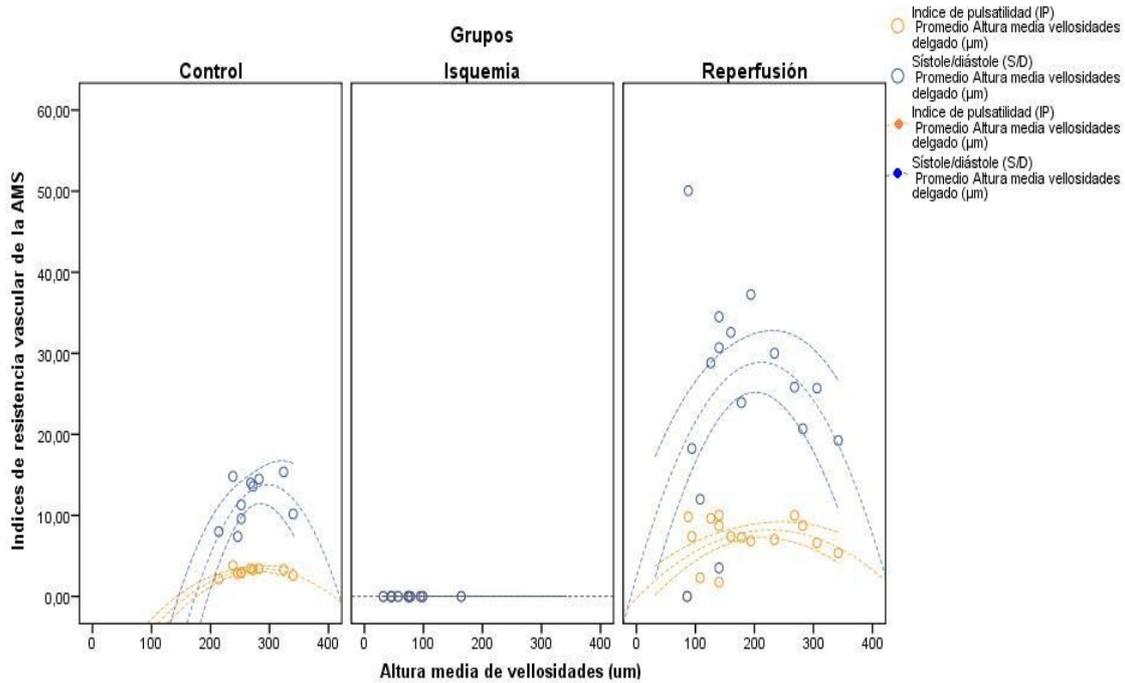
variabilidad del 12,4% para el IP ( $p < 0,01$ ) y 7,1% para S/D ( $p < 0,01$ ) que fueron atribuidos a la AMV del grupo reperfusión. En el grupo isquemia este modelo no establece curvas de regresión y en el grupo control la regresión no fue significativa (Figuras 43 y 44).



**Figura 43.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre la VSM de la AMS con la AMV. En el grupo 3:reperfusión 18,3% ( $r^2 = 0,183$ ) de VSM ( $p < 0,01$ ) se debe a la AMV. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para la VSM ( $r^2 = 0,002$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado  
 Los datos son expresados como  
**AMS:** arteria mesentérica superior  
**VSM:** velocidad sistólica máxima (cm/s)  
**AMV:** altura media de vellosidades (µm)

## Resultados



**Figura 44.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre los índices de resistencia vascular de la AMS con la AMV. En el grupo 3:reperusión 12,4% ( $r^2 = 0,124$ ) de IP ( $p < 0,01$ ) y 7,1% ( $r^2 = 0,071$ ) de S/D ( $p < 0,01$ ) son debido a la AMV. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para el IP ( $r^2 = 0,483$ ) y la S/D ( $r^2 = 0,357$ )

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

Los datos son expresados como

**AMS:** arteria mesentérica superior

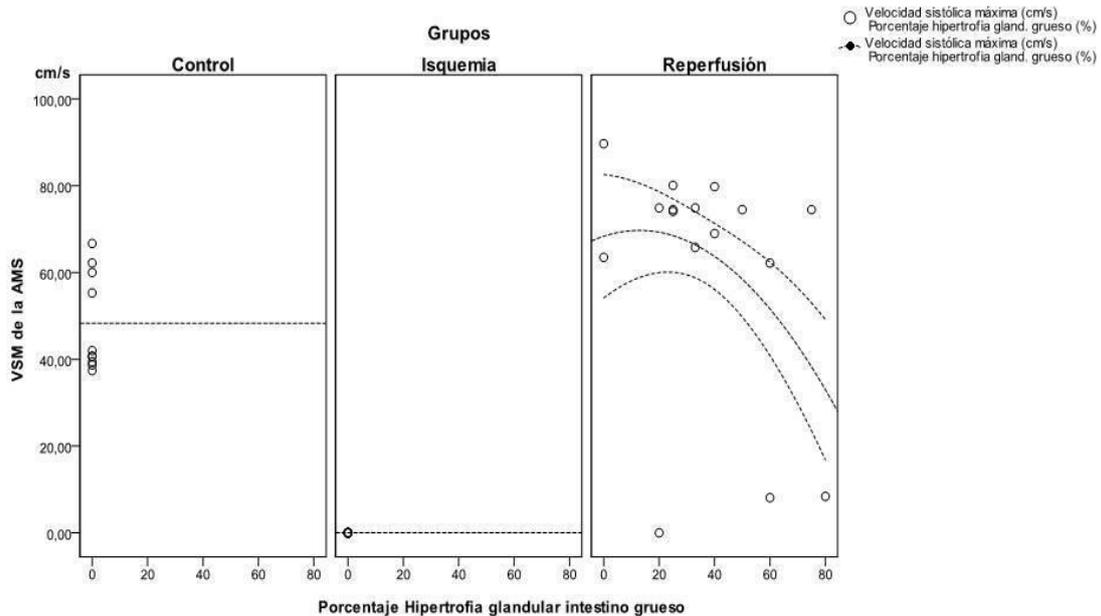
**IP:** índice de pulsatilidad

**S/D:** índice sístole/díastole

**AMV:** altura media de vellosidades ( $\mu m$ )

Continuando con el estudio *microscópico* en el *intestino grueso* la presencia de hipertrofia glandular influyó en los resultados de la VSM, encontrando una variabilidad del 16,4% ( $p < 0,01$ ) en el grupo reperusión. Para los índices encontramos una variabilidad del 18,6% para el IP ( $p < 0,01$ ) y 2,8% para S/D ( $p < 0,05$ ) que fueron atribuidos a la hipertrofia glandular del grupo reperusión. En el grupo isquemia este

modelo no establece curvas de regresión y en el grupo control la regresión no fue significativa (Figuras 45 y 46). Se debe recordar que la hipertrofia glandular fue un hallazgo exclusivo del grupo reperfusión



**Figura 45.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre la VSM de la AMS con la Hipertrofia glandular del intestino grueso. En el grupo 3:reperfusión 16,4% ( $r^2 = 0,164$ ) de VSM ( $p < 0,01$ ) se debe a la hipertrofia glandular<sup>#</sup>. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para la VSM ( $r^2 = 2,22E^{-16}$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

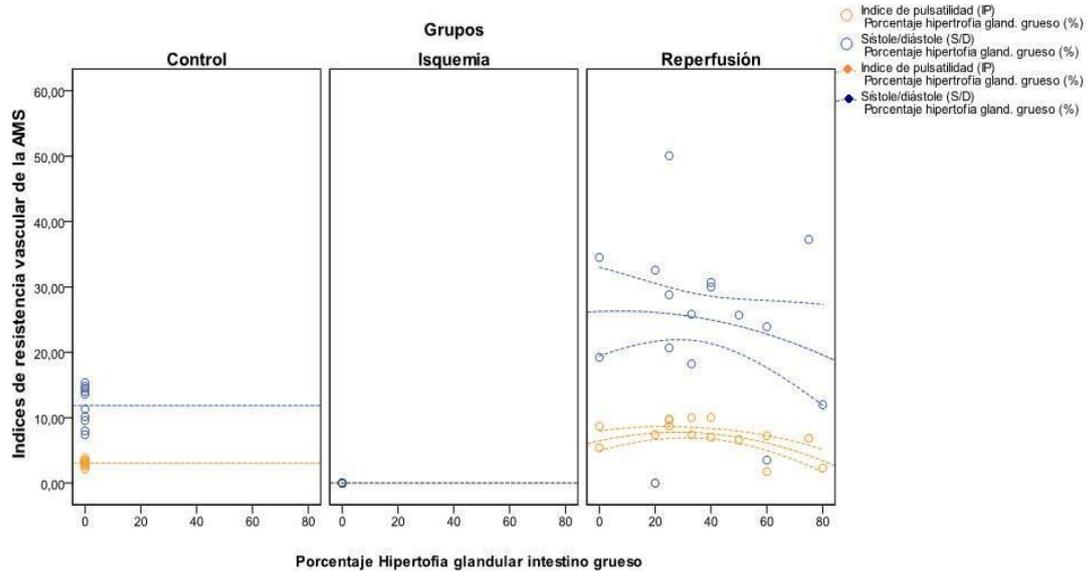
Los datos son expresados como

AMS: arteria mesentérica superior

VSM: velocidad sistólica máxima (cm/s)

#: hallazgo exclusivo del grupo 3

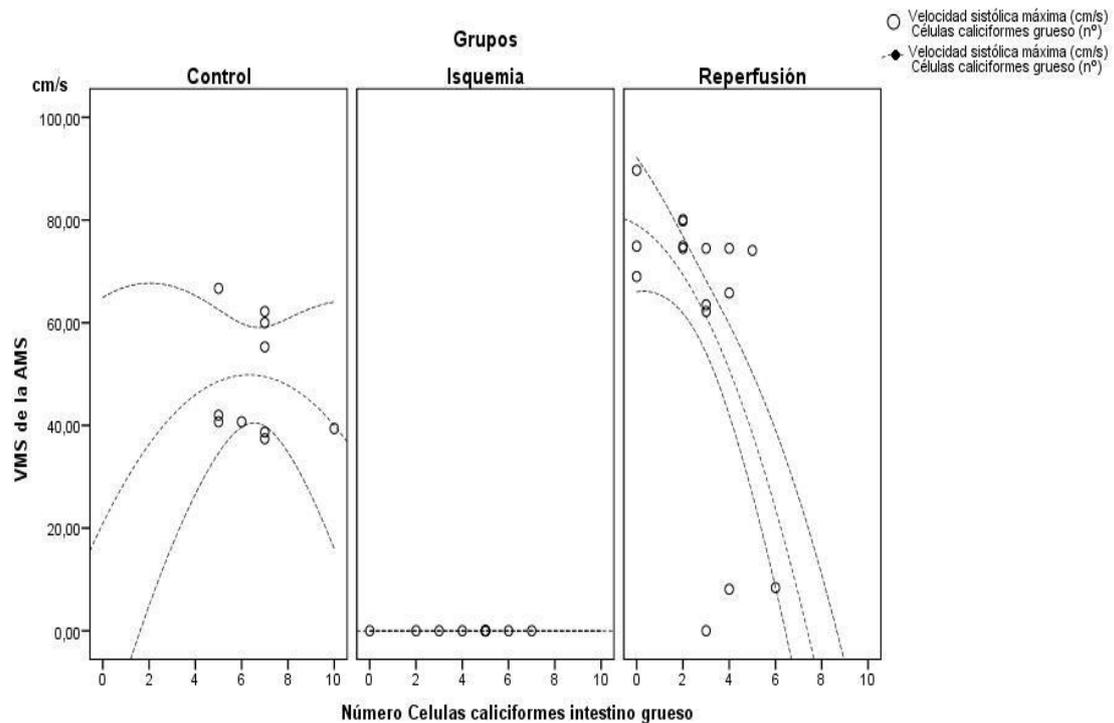
## Resultados



**Figura 46.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre los índices de resistencia vascular de la AMS con la hipertrofia glandular del intestino grueso. En el grupo 3:reperusión 18,6% ( $r^2 = 0,186$ ) de IP ( $p < 0,01$ ) y 2,8% ( $r^2 = 0,028$ ) de S/D ( $p < 0,05$ ) son explicados por la hipertrofia glandular. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para el IP y S/D ( $r^2 = 0$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado  
 Los datos son expresados como  
**AMS:** arteria mesentérica superior  
**IP:** índice de pulsatilidad  
**S/D:** índice sístole/diástole

En el intestino grueso el estudio *microscópico* la relación predictora de células caliciformes influyó en los resultados de la VSM, encontrando una variabilidad del 28.8% ( $p < 0,001$ ) en el grupo reperusión. Para los índices encontramos una variabilidad del 17% para el IP ( $p < 0,01$ ) y 21,8% para S/D ( $p < 0,001$ ) que son explicados por el número de células caliciformes del intestino grueso encontrado en el grupo reperusión. En el grupo isquemia este modelo no establece curvas de regresión y en el grupo control la regresión no fue significativa (Figuras 47 y 48).



**Figura 47.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre la VMS de la AMS con células calciformes del colon. En el grupo 3:reperfusion 28,8% ( $r^2 = 0,288$ ) de VSM ( $p < 0,001$ ) se debe al número de células calciformes. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para la VSM ( $r^2 = 0,067$ ).

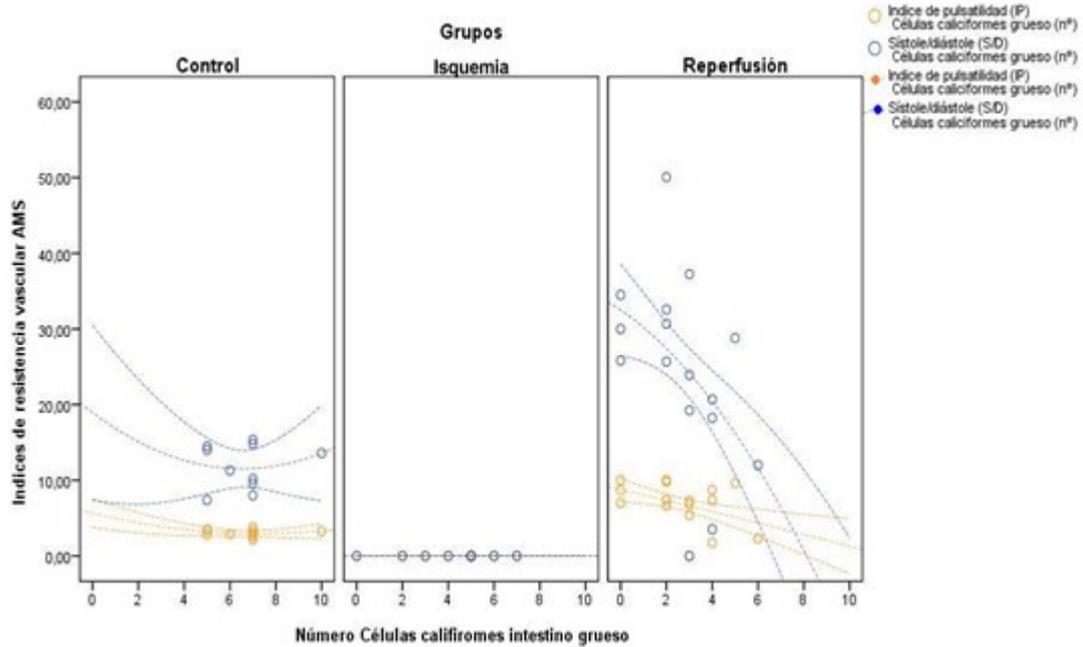
$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

Los datos son expresados como

AMS: arteria mesentérica superior

VSM: velocidad sistólica máxima (cm/s)

## Resultados



**Figura 48.** Curva de regresión no lineal (cuadrática) por grupos entre los índices de resistencia vascular de la AMS con células califiromes del intestino grueso. En el grupo 3:reperusión 17% ( $r^2 = 0,170$ ) de IP ( $p < 0,01$ ) y 21,8% ( $r^2 = 0,281$ ) de S/D ( $p < 0,001$ ) son explicados por las células califiromes. En el grupo 2: isquemia no hay curva de regresión. En el grupo 1: control el modelo de regresión no fue significativo ( $p > 0,05$ ) para el IP ( $r^2 = 0,09$ ) y S/D ( $r^2 = 0,045$ ).

$r^2$ : coeficiente de determinación cuadrático ajustado

Los datos son expresados como  
**AMS:** arteria mesentérica superior

**IP:** índice de pulsatilidad

**S/D:** índice sístole/diástole

## **7. DISCUSIÓN**

## Discusión

Aún no existe una claridad absoluta respecto a la patogénesis de la lesión intestinal en la ECN, es por lo que existe una gran variedad de modelos experimentales en animales que tratan de reproducir tal fenómeno, sin existir un modelo ideal<sup>84</sup>.

El modelo de isquemia - reperfusión refleja los cambios histológicos<sup>68</sup> de la mucosa que van desde la conformación de un espacio subepitelial con edema submucoso seguido de la separación y denudación de las vellosidades y finalmente la necrosis transmural. Estos hallazgos predominan en el intestino delgado y se presentan a demás de forma segmentaria. El modelo reproduce cambios muy similares a los observados en ECN humana.

A nivel celular la isquemia-reperfusión produce hipoxia celular debido a una respuesta inflamatoria exagerada. El resultado es un incremento de la resistencia vascular con mayor daño tisular favoreciendo la invasión y translocación bacteriana. También sabemos que altera la regulación de ON, iONS, endotelina -1, Guanosín Monofosfato cíclico (GMPc) y sustancia P<sup>70</sup>.

La rata neonatal presenta una ventaja adicional a este modelo y es la inmadurez intestinal semejante a la que presenta el prematuro. Estudios con ratas recién destetadas (90 g) en los que la oclusión mesentérica duró sólo 1 minuto causó una mortalidad del 63%, necrosis en el 46% y perforación en el 17% de los animales al cabo de una semana<sup>240</sup>. Otras especies animales han demostrado que el tiempo de isquemia necesario para reproducir lesiones similares a las de ECN disminuye con la utilización de animales de pocos días de vida<sup>77,78</sup>. Estudios previos sobre la mucosa intestinal en ratas de 18 días de vida en fase de destete, demostró ser más vulnerable a los efectos de la isquemia de tan solo 30 minutos de oclusión de la AMS y reperfusión inmediata, produciendo una

## Discusión

denudación del epitelio intestinal y necrosis focal en más del 50% de los animales <sup>3</sup>. Cuando se incrementó el tiempo de oclusión de la AMS a 60 minutos seguida de 3 horas de reperfusión, se ocasionó lesiones más extensas en el 100% de los animales <sup>3</sup>. Nuestro trabajo en ratas de 17 días de vida manteniendo en 60 minutos el tiempo de oclusión sobre la AMS y aumentando en 21 horas el tiempo de reperfusión, logra resultados similares de lesión intestinal sin pneumatosis con la particularidad de observar hipertrofia glandular hallazgo que no se obtuvo en las investigaciones de Carrasco y colaboradores. La presencia de hipertrofia glandular en nuestro modelo experimental creemos que fue debida a un mayor tiempo de reperfusión sin poder explicar la trascendencia de este hallazgo. El modelo con intestino inmaduro garantiza que algunos agentes involucrados en la ECN como: alteración de la inmunidad innata y de barrera del epitelio intestinal, pobre motilidad intestinal y respuesta inflamatoria exagerada, se encuentren presentes en el estudio experimental. Todos estos motivos justifican la elección de este modelo experimental de isquemia-reperfusión en rata neonatal como el más idóneo.

Los principios y aplicaciones de las imágenes ecográficas para determinar la velocidad y el movimiento (flujo/tejidos) nos permiten analizar una información cuantitativa de carácter estructural y funcional. Una de las razones por la cual escogimos el uso de esta técnica para ser aplicada en el modelo de isquemia-reperfusión fue la gran variedad de trabajos previos en animales de experimentación (rata o ratón) que nos informaban sobre flujos (renal, cardiaco, ocular y periférico) <sup>231</sup>. La ecografía es una técnica que nos ofrece grandes ventajas: no es invasiva, nos da imágenes en tiempo real, es versátil y segura. Estas características las vemos reflejadas en nuestro trabajo experimental. Sin

embargo una de las limitaciones conocidas -“operador-dependiente”- que influyen en la calidad, precisión y reproducción de las imágenes, fue solventada en nuestro trabajo con: la capacitación del operador, el empleo de un equipo ecográfico de alta resolución (Siemens Sonoline Antares™) y la estandarización de los parámetros ecográficos (Abd Freud) ajustados a un animal de experimentación (rata) de 17 días de vida, con el fin de corregir efectos como: aliasing, ángulo Doppler, blooming o duplicación especular<sup>198</sup>.

Es importante mencionar la adecuada elección del transductor. La resolución temporal está determinada por el número de fotogramas de imagen que pueden ser adquiridas por segundo, generalmente expresadas en Hertzios (Hz) o ciclos por segundo. La resolución temporal como capacidad de distinguir dos eventos en el tiempo (frecuencia y velocidad de flujo) es una consideración importante en cuanto a la obtención de la imagen cardíaca de ratón o rata debido a que su frecuencia es muy rápida (400-600 latidos por minuto para el ratón y 300-500 pulsaciones por minuto para la rata) obteniendo según el transductor mayor o menor número de imágenes por ciclo cardíaco.<sup>231</sup> Teniendo en cuenta dichas consideraciones nuestro trabajo valoró el flujo de la *arteria mesentérica superior* (resolución temporal menor que el ciclo cardíaco) con una sonda P10-4 (5 a 10 MHz) que identifica estructuras abdominales (7,27 MHz) y vasos mesentéricos (Doppler color 5 MHz) ofreciéndonos una adecuada calidad de imágenes a pesar de que Merrit aconseja utilizar sondas entre 12 a 15 MHz para obtener dichas imágenes<sup>241</sup>.

Por otro lado conocemos que el pelo es un factor de transmisión negativo sobre las ondas ecográficas. Nuestro estudio piloto procedió a eliminar el pelo abdominal guardando un margen de 2 cm a cada lado de línea media, logrando resultados discretos en lo que concierne a la calidad de imagen ecográfica. Teniendo en cuenta esta

## Discusión

limitación modificamos la transmisión de ondas colocando el transductor después de practicar la laparotomía, en contacto directo con las asas intestinales y el recorrido de la arteria mesentérica superior, esto nos permitió mejorar notablemente la calidad de las imágenes. Este factor podría ser discutido, al pensar que el contacto directo de la sonda con la cavidad abdominal modifica el estado de las asas y flujo intestinal, sin embargo estudios acerca del uso de sondas intra-operatorias no observan tales modificaciones<sup>242, 243, 244</sup>. En nuestro trabajo el transductor P10-4 ajustado al tamaño de la cavidad abdominal, no causó interferencias o modificaciones sobre el flujo mesentérico o el aspecto de las asas intestinales (movimiento, presión o sobreestimación de resultados).

El estudio eco-Doppler del flujo mesentérico en el conejo aunque tenga la microcirculación intestinal muy similar a la del ser humano constituye un modelo inadecuado por su baja resistencia a las condiciones experimentales<sup>178</sup>. En rata adulta existen experiencias acerca del uso Doppler sobre la *arteria mesentérica superior* (AMS), por medio de un implante cutáneo que registra ondas Doppler (kilohertz). Se ha empleado para conocer las variaciones en el porcentaje de flujo mesentérico en estados post-anestésicos (Ketamina)<sup>232</sup>. Otros estudios empleando sistemas duales de ultrasonido observan que el flujo basal de la AMS de rata fue de  $13,2 \pm 2,8$  ml/min<sup>233</sup>. Solo existe un trabajo en rata adulta (consciente) que al igual que el nuestro mide la velocidad de la AMS en centímetros por segundo (cm/s)<sup>235</sup>. En nuestro trabajo en rata neonatal anestesiada con isoflorano hemos conseguido registrar en la AMS la velocidad media de 13,15 (11,4-15,22) cm/s y la velocidad sistólica máxima de 41,35 (39,4-60) cm/s.

Nosotros creemos al igual que otros autores que la ecografía Doppler desempeña un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de la ECN. Las investigaciones sobre la AMS, en el periodo prenatal acerca de la utilidad de ciertos parámetros ecográficos como indicadores pronósticos de ECN neonatal, son aún muy discutidos. Varios autores han observado que el incremento de la velocidad sistólica y el aumento de los índices de resistencia vascular (pulsatilidad, resistencia y sístole/diástole) están relacionados con el desarrollo post-natal de ECN <sup>205, 207, 216, 229</sup>. Sin embargo Rhee y colaboradores concluyen en su trabajo que el aumento del índice de pulsatilidad (IP) no guardó ninguna relación con el desarrollo de ECN neonatal (3 de 12 casos) <sup>215</sup>.

Otro parámetro Doppler prenatal, que despertó gran interés fue el pico de flujo diastólico reverso o ausente (PFDR) medidos en la arteria umbilical, uterina, aorta, cerebral media y mesentérica superior fetal como indicador de enterocolitis neonatal tanto en niños sanos como en neonatos con patologías asociadas. A pesar de la gran expectación no se encontraron resultados significativos <sup>206, 208, 211, 215</sup>.

Numerosos estudios en humanos nos hablan de signos con relativos valores pronósticos, elevada especificidad y baja sensibilidad. Entre estos están: la detección de gas venoso portal, pneumatosis intestinal, baja perfusión de la pared intestinal, fluido intra-abdominal, gas libre en abdomen y gas intramural <sup>114, 217, 218, 219, 245, 246</sup>. Sin embargo existen limitaciones descritas por otros autores como son: el error que puede ocasionar la impedancia acústica del aire al momento del diagnóstico, la limitación metodológica en la valoración (operador/interpretación de la imagen) o la subjetividad de las señales en color al momento de valorarlas <sup>114, 247</sup>.

## Discusión

Faingold y Epelman correlacionan los hallazgos ecográficos de ECN neonatal y para superar las limitaciones anteriormente mencionadas recomiendan: incorporar la ecografía como prueba de rutina, trabajar con escala de grises (5-8 MHz), usar Doppler color y sondas lineales de alta frecuencia (8-15 MHz)<sup>217, 218</sup>, similares a las utilizadas en nuestro trabajo. Estas modificaciones permiten a Faingold obtener una mayor sensibilidad y especificidad de la ecografía, al momento de valorar la ausencia de flujo en la pared intestinal como signo de necrosis que puede o no correlacionarse con la presencia de pneumoperitoneo presente en una radiografía<sup>218</sup> simple de abdomen.

La valoración ecográfica de la perfusión intestinal mediante tres patrones de hiperemia (en anillo sobre la pared intestinal, en “Y” sobre el mesenterio distal y en “Cebra” sobre las válvulas conniventes) permitieron a Epelman y colaboradores comprobar que los hallazgos ecográficos guardan una estrecha relación con los hallazgos macroscópicos intra-operatorios (zonas de úlceras o necrosis) y microscópicos (necrosis de mucosa-submucosa-mucularis) en la ECN<sup>217</sup>. Estos estudios nos abren un abanico de posibilidades en la investigación acerca del uso ecográfico y el valor de flujo intestinal. Por tales razones creemos justificado el diseño de nuestra línea experimental sobre el valor del flujo mesentérico (velocidades e índices de resistencia) en el modelo de isquemia - reperfusión correlacionado con los hallazgos de anatomía patológica.

Continuando con los estudios en neonatos sabemos por Bernoulli<sup>248</sup> que los fluidos en movimiento a lo largo de una corriente, sufren una reducción en el área transversa (de un vaso) y causan un incremento de la velocidad de flujo<sup>228</sup>.

Estudios Eco-Doppler efectuados por Kempley (prematuros de bajo peso) y Deeg (neonatos a término) asociaron un incremento de la velocidad sistólica máxima (VSM) en la AMS con ECN<sup>227, 228</sup>. Sin embargo Murdoch y colaboradores al ajustar los

resultados del estudio post-natal a la edad gestacional no hallaron tal asociación <sup>230</sup>. Nuestra investigación experimental al igual que Kempley y Deeg registró un incremento de la VSM (41,35 cm/s a 74,3 cm/s) y además registró un descenso de la velocidad media (13,15 cm/s a 8,15 cm/s) y del flujo diastólico (3,8 cm/s a 2,6 cm/s) en el grupo de animales reperusión. Estos estudios indican que tanto la VSM como la velocidad media y el flujo diastólico pueden ser útiles para identificar a los prematuros de bajo peso con elevado riesgo de presentar ECN, al ser reflejos de los componentes: inflamatorio, infeccioso y de reperusión <sup>228</sup>.

A pesar del gran interés que ha despertado el estudio prenatal del pico de flujo diastólico reverso (PFDR) en las investigaciones obstétricas como demuestra Kamoji y colaboradores <sup>212</sup> en su estudio al correlacionar significativamente el PFDR o ausente de la arteria umbilical con ECN en los primeros días de vida independientemente de la edad gestacional o peso al nacer, los estudios postnatales de Harrison y colaboradores en 10 neonatos con síndrome de corazón izquierdo hipoplásico antes y después de un procedimiento modificado de Norwood al valorar el PFDR sobre la AMS no encuentran riesgo de ECN en estos pacientes <sup>222</sup>. Sin embargo Carlo y colaboradores corroboran dicha asociación con ECN al medir el flujo reverso en la aorta abdominal en neonatos con cardiopatías congénitas <sup>220</sup>. Recogiendo toda la información publicada prenatal y post-natal acerca del PFDR por sus posibles implicaciones clínicas, nuestra investigación en un modelo experimental no encuentra en el grupo de animales de reperusión resultados significativos coincidiendo con Harrison. El escaso número de registros (cuatro) y la valoración sobre la AMS quizás condicionaron nuestras expectativas sobre el valor del PFDR.

## Discusión

Existen pocos estudios post-natales sobre la AMS que busquen una asociación entre los índices de resistencia vascular (pulsatilidad, resistencia y sístole/diástole) con ECN. En cuanto al índice de pulsatiliad (IP) los primeros estudios en la AMS neonatal no reportaron resultados alentadores <sup>227</sup>. Sin embargo al ajustarlo a la edad gestacional este índice marco un valor significativo importante en el pronóstico de ECN <sup>230</sup>. Robel-Tillig y colaboradores en sus investigaciones sonográficas encontraron a las 24 horas de vida, IP más altos ( $2,7\pm 0,6$ ) en niños con antecedentes prenatales de trastornos hemodinámicos al comparar con unos neonatos sin antecedentes prenatales ( $1,5\pm 0,5$ ) <sup>229</sup>. Los estudios acerca del índice de resistencia (IR) no registran una relación con ECN <sup>222, 228</sup>. Respecto a la asociación postnatal en la AMS del índice sístole/diástole (S/D) con ECN hasta la actualidad no hay un mayor interés por su investigación. Consta un trabajo de Byun y colaboradores que reportan un incremento de este índice en la arteria umbilical con morbilidad y mortalidad neonatal importante como: ECN, distress respiratorio, displasia broncopulmonar o hemorragia intaventricular <sup>205</sup>.

En nuestro trabajo encontramos resultados más claros de estos índices de resistencia vascular. Hemos observado un incremento importante del IP y S/D con un aumento discreto del IR en el grupo de animales reperusión. Estos índices suministran información de la resistencia vascular distal la cual se considera un factor regulador del flujo sanguíneo. La Ley de Poiseuille <sup>249</sup> observa que el principal factor regulador del flujo laminar en un vaso sanguíneo es el radio, pues es el único factor no lineal independiente de la velocidad del fluido. El radio por tal razón es el único determinante de la resistencia al flujo de la sangre <sup>178</sup>. Por eso al modificarse el radio de la AMS por el proceso de isquemia – reperusión los índices de resistencia aumentan.

Podemos resumir que el patrón flujométrico registrado mediante ecografía Doppler color en nuestro modelo experimental de ratas de 17 días de vida, en el grupo reperusión se caracterizó por el aumento de la VSM, IP, IR y S/D acompañados del descenso de la Vm y FD.

Los hallazgos de anatomía patológica (macroscópico y microscópico) recomendados por ciertos autores como indicadores de afectación intestinal son: la morfometría de las vellosidades y el grado de lesión intestinal <sup>79, 250</sup> (escalas de Wallace/Keenan y Chiu). Nuestra investigación a demás de estudiar los indicadores anteriormente citadas, pretende proporcionar una idea cuantitativa y cualitativa más completa acerca de la isquemia – reperusión a través del estudio histológico de otras variables involucradas en el proceso de ECN como: atrofia, regeneración, pneumatosis, perforación, hipertrofia glandular y, recuento de celular (caliciformes, Paneth y mitosis). Con el fin de evitar estimaciones erróneas y sesgos que influyan en los resultados, contamos con la ayuda de un médico patólogo, el cual desconocía la procedencia de las muestras objeto del estudio microscópico.

Macroscópicamente en ratas de 18 días de vida Carrasco y colaboradores a los 60 minutos de isquemia y 3 horas de reperusión guiados por la escala modificada de Wallace y Keenan, observaron en íleon un mayor grado de afectación intestinal y en el colon derecho una afectación más ligera, sin hallar ascitis o perforación <sup>79</sup>. Nosotros obtuvimos resultados muy similares matizando que el grupo de animales isquemia presentó una mayor intensidad y extensión de las lesiones como producto de la estricta isquemia.

## Discusión

Puglisi y Carrasco en sus estudios microscópicos en grupos experimentales con ECN <sup>79</sup>, <sup>250</sup> encontraron que la altura media de vellosidades (AMV), el espesor medio de vellosidades (EMV) y el índice de superficie (IS) sufrían una clara reducción. Nuestra investigación observó resultados muy similares en el grupo reperfusión sólo para la AMV, mientras que para el EMV la reducción no fue lo suficientemente significativa y por otro lado empleamos la superficie media de vellosidades (SMV) como indicador en lugar del IS, que presentó una reducción no tan significativa. Un hallazgo interesante encontrado en el grupo isquemia (60 minutos) fue un acortamiento de la AMV de forma muy intensa (74,5  $\mu\text{m}$ ) con respecto al grupo reperfusión (150  $\mu\text{m}$ ) y control (260  $\mu\text{m}$ ). Estos hallazgos nos invitan a considerar que a pesar del daño intestinal agudo (isquemia) quizás pueda existir un proceso de autoregeneración activo (reperfusión), sin que sea lo suficientemente importante como para frenar el proceso de ECN desencadenado. Sin embargo no ha sido objeto de nuestra línea, investigar la calidad regeneradora (angiogénesis) que puede presentar el epitelio intestinal <sup>251</sup>.

Continuando con el estudio microscópico el sistema de puntuación de Chiu proporciona una descripción cualitativa fiable del espectro de lesiones intestinales. Estudios previos han demostrado que este sistema de puntuación es un buen indicador de lesión isquémica correlacionándose con la AMV y el índice de superficie <sup>250</sup>.

En estudios de isquemia en que se pinza la arteria mesentérica superior es habitual encontrar la muscularis propia casi sana cuando la túnica mucosa esta completamente necrosada, esta susceptibilidad de la mucosa a la isquemia se debe a que la circulación que discurre por ella es de tipo terminal y transporta el flujo sanguíneo apenas necesario para ejecutar las funciones de esta capa <sup>178</sup>. Nuestra investigación experimental observó que Chiu cumple con las características ideales para valorar el daño intestinal y que

establece una correlación moderada de tipo inversa con la AMV, siendo más intensa en la isquemia estricta. Es explicable esta disminución morfométrica de vellosidades cuando se considera que todas las funciones intestinales se realizan en la mucosa, con excepción de la actividad motora. Es patente su importante irrigación, pero también su mayor predisposición a la isquemia respecto a las demás capas <sup>178</sup>.

La atrofia y regeneración de vellosidades son hallazgos comunes en ECN, procesos de isquemia intestinal y desnutrición. Trabajos realizados en roedores comentan que la restitución epitelial se produce entre 4 y 5 días en neonatos y a los 2 días en adultos <sup>42</sup>. Los cambios reparativos representados por fibrosis, granulación y regeneración aparecen en las dos terceras partes de los casos diagnosticados de ECN <sup>92</sup>. La regeneración se caracteriza por la capacidad de presentar en células lábiles sin necrosis un estado importante de mitosis sin producción de mucina <sup>95, 96</sup>. Nuestra investigación contraria a los hallazgos sobre el tiempo de regeneración encontró en un grupo de animales reperusión (24 horas) una certeza real de regeneración (25%) acompañada de una discreta atrofia. Mientras que en la estricta isquemia la ausencia de regeneración y la atrofia muy intensa de vellosidades fue su patrón arquitectónico. Consideramos que la atrofia y la regeneración son hallazgos prácticos y representativos para el médico patólogo al momento de efectuar un diagnóstico diferencial acerca estados iniciales de isquemia intestinal aguda y ECN.

Un hallazgo novedoso característico del grupo reperusión fue la hipertrofia glandular (aumento exagerado de la glándula intestinal más depleción de moco con aumento del

## Discusión

tamaño de la célula caliciforme). En los estudios histológicos sobre ECN, no se menciona con claridad este hallazgo, las observaciones apuntan a la existencia de una distorsión glandular como característica del proceso de ECN que podría semejarse a nuestro descubrimiento microscópico <sup>92, 94</sup>. Durante el estudio de la carcinogénesis realizados por Piñols observaron en la mucosa colónica de ratas un incremento del tamaño de la célula caliciforme con alargamiento (hipertrofia) glandular y distorsión arquitectónica de las criptas, aunque su interpretación fue ambigua para el proceso estudiado <sup>252</sup>. La hipertrofia glandular en nuestro estudio se halló, con un rango significativo (25% a 60%) para el colon derecho y aunque se encontró, el rango no fue significativo para el intestino delgado (0% y 13%). La hipertrofia puede ser explicada por el proceso de regeneración epitelial como respuesta específica a cualquier factor irritante o como una evolución de la enfermedad debida a la alteración de la integridad de las uniones herméticas del epitelio y las deficiencias del revestimiento mucoso.

La perforación es el resultado de una secuencia lógica de etapas que van desde la congestión hasta la necrosis. Es un signo que esta presente en los estados más avanzados de ECN y que no siempre es visible para el cirujano <sup>90, 92, 94</sup>. En nuestro estudio, no hubo evidencia macroscópica, pero sí en el análisis microscópico a pesar de su poca significancia (3 casos).

La pneumatosis intestinal en humanos es una lesión característica de la ECN que en algunas series se han descrito en el 53% de los casos <sup>253</sup>. En algunos estudios experimentales y en el nuestro este hallazgo no fue demostrado <sup>79</sup>. Por las observaciones realizadas en ratas de 18 días de vida por Carrasco y colaboradores podemos considerar que la pneumatosis intestinal necesita un tiempo post-isquemia mayor <sup>79</sup> para dar paso la acción de bacterias productoras de gas y fermentación de productos bacterianos <sup>24</sup>.

Debido a la ausencia de pneumatosis en nuestro modelo experimental, no se pudo pronosticar el valor clínico al relacionarlo con los parámetros ecográficos estudiados. Quizás en futuras investigaciones donde se demuestre la presencia de pneumatosis intestinal conoceremos la real aplicación clínica del flujo mesentérico.

Las células caliciformes que intervienen en el sistema de barrera intestinal y las células de Paneth que actúan en la respuesta inflamatoria exagerada cumplen un rol en el desarrollo de ECN<sup>1</sup>. Schaart y colaboradores en sus estudios sobre ratas observan que la disminución de células caliciformes fue propia de la ECN<sup>254</sup> y que la conservación de estas células constituye un factor protector en un modelo experimental de colitis ulcerosa en rata adulta<sup>255</sup>. Respecto al moco intestinal (mucina) secretado por las células caliciformes se conocen por estudios en ratas neonatales que la producción fue mayor que en la edad adulta<sup>38</sup> y que su maduración se ha visto acelerada en ratas prematuras al ser tratadas con factor de crecimiento endotelial<sup>164</sup>. Nuestra investigación reveló un menor número de células caliciformes en el colon e intestino delgado en el grupo reperusión coincidiendo con Sharart. Contrastando la opinión de varios autores podemos decir que las células caliciformes al estar afectadas contribuyen a acelerar el proceso de daño intestinal en favor de estadios más avanzados de ECN, pues el mecanismo de barrera ha dejado de ser efectivo.

Se sabe por Joshi y DeSa que la mitosis es una característica de la regeneración<sup>95,96</sup> y nuestra investigación confirmó este hallazgo. Respecto al recuento de células de Paneth, no encontramos en nuestra investigación relaciones significativas, quizás debidas al escaso número identificado.

## Discusión

El estudio de anatomía patológica de nuestro modelo experimental de isquemia – reperusión representado por el grupo reperusión (isquemia de 60 minutos más reperusión de 24 horas) nos permitió visualizar un patrón de ECN más detallado. Macroscópicamente aparece ulceración con hiperemia en dos o más sitios. Y microscópicamente en el intestino delgado aparece denudación múltiple de vellosidades con exposición de la lámina propia y capilares dilatados. La AMV se encontró muy afectada (importante acortamiento) y en las vellosidades se observaron signos de regeneración con incremento de la actividad mitótica. En el colon, separación masiva del epitelio que se extendió hacia la base de la glándula con pérdida de la arquitectura epitelial, además de hipertrofia glandular con reducción de la población de células caliciformes. Por lo tanto a este grupo de animales (reperusión) le denominaremos grupo ECN.

Numerosos estudios investigan por separado el valor pronóstico que puede ofrecer la ecografía como diagnóstico prenatal y postnatal de ECN, sin embargo sus resultados llegan a ser cuestionados por que no siempre coinciden con la realidad y por otro lado los prematuros de muy bajo peso al nacer están expuestos a una infinidad de factores que no permiten clarificar cual puede ser el mejor parámetro Doppler. El parámetro más valorado por varios autores es el IP<sup>206, 212, 215, 216, 229</sup>. Otro de valor pronóstico ha sido la VSM relacionado su incremento con riesgo de presentar ECN<sup>227, 228, 230</sup>.

Gindes y colaboradores utilizando ecografía en tres dimensiones describen anatómicamente y protocolizan los parámetros para localizar la mayoría de arterias y venas abdominales fetales, con particular interés en la AMS por sus aplicaciones clínicas en diagnóstico precoz de malrotación intestinal<sup>197, 256</sup>. Un reciente estudio de

Papacci obtiene parámetros Doppler postnatales de normalidad en población sana y prematura entre 26 a 41 semanas de gestación para el flujo de la AMS (VSM, FD, Vm, IP y S/D) en los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 <sup>196</sup>. La ecografía actualmente trata de aportar signos y parámetros del flujo mesentérico neonatales. Nuestro estudio generó una serie de los datos flujométricos válidos (VSM, Vm, FD, IP, IR y S/D), a la hora de correlacionarlos con los hallazgos histopatológicos. La VSM y los índices de resistencia vascular (IP y S/D) fueron sin embargo los parámetros más constantes (regresiones significativas) de nuestra investigación.

Un estudio realizado por Chiu y colaboradores en perros estableció una relación entre estados de bajo flujo mesentérico con grados más intensos de isquemia intestinal <sup>68</sup> y Puglisi demostró en ratas que el tiempo de isquemia afectaba la altura media de vellosidades (AMV) <sup>250</sup>. Kim y colaboradores en conejos de 10 a 12 semanas de vida (2 Kg) en un modelo de ECN observó sobre la pared intestinal puntillados ecogénicos y granulaciones circunferenciales que tuvieron correlación con la congestión y la disminución de vellosidades, edema submucoso e infarto transmural de la serosa <sup>237</sup>. Choi y colaboradores en conejos de 4 semanas de vida (486,6 g) en un modelo de ECN (lipopolisacárico más hipoxia) observaron que los animales con ECN presentaron durante las dos primeras horas del modelo experimental un incremento de la VSM y del IR, insinuando que la isquemia intestinal puede ser un gatillo del proceso de ECN <sup>257</sup>. Las investigaciones de Kim y Choi quizás son las más parecidas a la nuestra en cuanto a valorar la asociación de la ecografía con la anatomía patológica, pero no hemos encontrado en la literatura una correlación tácita entre los parámetros Doppler con las

## Discusión

escalas de daño intestinal Wallace/Keenan (macroscópica) o Chiu (microscópica) y la AMV (morfometría). En nuestro estudio hemos observado que la VSM y los índices de resistencia vascular se incrementaron en el grupo de animales con ECN observando una relación directa entre estos registros Doppler con el nivel de afectación intestinal y una correlación inversa con la AMV.

Los últimos estudios de Kim y colaboradores han demostraron que la presencia de ecos con un patrón granular sobre la pared intestinal eran reflejo histológico de pneumatosis intestinal (submucosa y serosa) <sup>115</sup>. La experiencia en esta misma línea en humanos aún sigue siendo exclusiva de pocos grupos <sup>115, 217, 218, 219</sup>.

Se conoce que del total del flujo intestinal en reposo el 40% va a las criptas y células caliciformes <sup>179</sup>. Nuestra investigación al comparar parámetros de flujo mesentérico a través de la ecografía Doppler color, con otros datos microscópicos de anatomía patológica en un modelo experimental de isquemia – reperfusión pudo confirmar en el grupo ECN (grupo 3: definido por anatomía patológica) que: 1) El incremento de la VSM y los índices de resistencia se correlacionan positivamente con la regeneración epitelial y la actividad mitótica, producto de la reperfusión. 2) El aumento de la VSM y los índices de resistencia vascular tienen una relación directa con la presencia de hipertrofia glandular en el colon derecho y, 3) que los parámetros Doppler (VSM, IP; IR y S/D) como indicadores de ECN, observaron en nuestro estudio una correlación inversa respecto al número de células caliciformes de las criptas de Lieberkühn del colon indicando la mala perfusión en la mucosa. Estudios anteriores ya comentados, nos recuerdan el importante rol que juegan las células caliciformes como mecanismo de barrera intestinal <sup>164, 254</sup>.

Tenemos que referirnos a la importancia que tiene el pneumoperitoneo como signo de perforación intestinal y lo que representa para el cirujano. Indicación absoluta de cirugía<sup>8, 109</sup>. Faingold y colaboradores encontraron una relación entre ausencia de flujo (pared intestinal) con perforación, esta apreciación fue confirmada en 4 laparotomías y 2 autopsias. En el mismo estudio la radiografía simple de abdomen precisó con anterioridad pneumoperitoneo en 10 pacientes poniendo de manifiesto la superioridad de este método de imagen al momento de la toma de decisiones<sup>218</sup>, sin embargo Silva y colaboradores cuestionan la superioridad clara de la radiografía como método de diagnóstico al manifestar que Faingold utilizó una muestra muy pequeña. Silva por su parte sí logra demostrar en su trabajo que la ecografía tuvo alguna ventaja sobre la radiografía tradicional al momento de observar gas libre abdominal<sup>219</sup>. Nuestro trabajo en ratas neonatales no fue tan optimista al correlacionar los parámetros Doppler de flujo mesentérico con perforación intestinal, .quizás nuestros resultados se expliquen por las pocas horas de evolución del proceso de ECN (24 horas). En los pocos casos en que hemos identificado este hallazgo (3 casos con microperforación: 5,27% en el grupo de animales con ECN) la extensión histológica sólo afecta a una media del 28,26%. Un dato que llamo la atención es que en dos casos de los anteriores se registraron picos de flujo diastólico reverso y en uno de ellos un descenso de la VSM con índices de resistencia también bajos.

En nuestro modelo experimental, la influencia de ciertos hallazgos histopatológicos (Wallace/Keenan, Chiu, AMV, hipertrofia glandular y células caliciformes), pueden ser suficientemente capaces de registrar variabilidades (regresión) del flujo en AMS (VSM,

## Discusión

IP y S/D), esto nos orienta a sostener que el incremento de estos parámetros eco-Doppler color, pueden confirmar un proceso definido de ECN y la disminución de los mismos (debajo de los valores basales) un avance de la enfermedad. Tenemos que comentar que los resultados de regresión en nuestra investigación para las variables anteriormente mencionadas fueron de carácter moderado y débil. La discreción de nuestros resultados son perfectamente asumibles, ya que el proceso fisiopatológico de ECN como es conocido obedece a una causa multifactorial, y nuestra investigación abordó sólo algunas de ellas: isquemia-reperusión-inmadurez.

Para entender mejor los resultados de regresión es necesario explicar la variabilidad genética de Ronald Fisher. En 1930 demostró matemáticamente que cuantos más alelos existan para un gen, más probabilidad (variabilidad) hay de que uno de ellos se imponga al resto (se fije). Esto implica que cuanta más variabilidad genética exista en una población, mayor será el ritmo de la evolución o para nuestra investigación mayor ritmo de enfermedad <sup>258</sup>.

El flujo mesentérico en neonatos prematuros es muy sensible durante los primeros días de vida sufriendo una adaptación circulatoria transitoria como respuesta de los cambios hemodinámicos sistémicos y con el inicio de la alimentación enteral <sup>195</sup>. Estudios recientes <sup>196, 197</sup> nos invitan a profundizar en nuevas investigaciones y aportan que la ecografía Doppler color puede ayudar en el diagnóstico y la evolución de la ECN.

Resulta interesante una reciente publicación de Gordon donde se revisa el diagnóstico de ECN y se plantea la siguiente interrogante: ¿Debemos abandonar los criterios de Bell? <sup>259</sup>. Ya Walsh y Kliegman aportan en su trabajo modificaciones importantes a Bell, según Grave y otros autores plantear un nuevo consenso acerca del manejo de

ECN <sup>260</sup> agregando otros signos diagnósticos que la ecografía ha fundamentado con elevada rigurosidad científica hasta la actualidad. Sin duda es la oportunidad de iniciar estudios clínicos empleando la ecografía como una herramienta rutinaria de unidades de cuidados intensivos neonatales para la toma de decisiones clínicas.

Los resultados de este estudio demuestran una correlación entre el flujo de la *arteria mesentérica superior* (AMS) con las lesiones de anatomía patológica en un modelo animal de enterocolitis necrotizante (ECN). Esta investigación refuerza las evidencias descritas en la literatura y aporta información interesante a favor del rol que cumple la ecografía Doppler color en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad determinada por los estadios modificados de Bell. Además, nuestros resultados sugieren que el descenso de la velocidad y flujo (aumento de índices de resistencia vascular y velocidad sistólica máxima) podrían pronosticar de forma significativa el nivel de afectación intestinal en el recién nacido prematuro con ECN. También nuestro estudio histológico encontró un hallazgo novedoso como es la hipertrofia glandular con exagerado contenido de moco presente en la fase IIA de ECN.

## Discusión

## **8. CONCLUSIONES**

## Conclusiones

## Conclusiones

El modelo de isquemia – reperfusión intestinal en la rata de 17 días de vida logra unas lesiones histopatológicas similares a las de la enterocolitis necrotizante descritas en el recién nacido humano.

La velocidad sistólica máxima (VSM) y los índices de resistencia vascular (pulsatilidad [IP] - sístole/diástole [S/D]) medidos por Ecografía Doppler color en la *arteria mesentérica superior* de rata neonata se encuentran aumentados en la ECN.

Existe una correlación directa entre la VSM, el IP y S/D y el grado de lesión intestinal macroscópico (Wallace/Keenan) y microscópico (Chiu).

Existe una correlación inversa entre la VSM, el IP y S/D y la altura media de vellosidades (AMV).

Existe una correlación directa entre la VSM, el IP y S/D y la hipertrofia glandular en el colon.

Existe una correlación inversa entre la VSM, el IP y S/D y el número de células caliciformes del colon

No existe correlación entre los hallazgos del flujo mesentérico y perforación intestinal.

## Conclusiones

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografia

## Bibliografía

1. Neu J CM, Beierle E. Intestinal innate immunity: how does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(3):137-44.
2. Paltauf A. Die spontane dickdarm Ruptur der Neugeborenen. *Virchows Arch Pathol Anat* 1888; 111:461.
3. R, Carrasco. Análisis morfológico del efecto del péptido trefoil TFF3 en un modelo experimental de enterocolitis necrotizante. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2001.
4. Schmid O, Quaiser K. Uer eine besondere schwere verlaufende Form von Enteritis beim saugling. 1953; 8:114.
5. Berdon WE, Grossman H, Baker DH, Mizrahi A, Barlow O, Blanc WA. Necrotizing enterocolitis in the premature infant. *Radiology* 1964; 83:879-87.
6. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 1978; 187(1):1-7.
7. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986:179-201.
8. Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(4):349-55.
9. Moro M, Pérez-Rodríguez J, Figueras-Aloy J, Fernández C, Doménech E, Jiménez R, Pérez-Sheriff V, Quero J, Roques V. Pre-discharge Morbidities in Extremely and Very Low-Birth-Weight Infants in Spanish Neonatal Units. *Am J Perinatol* 2009; 26(5):335-43.
10. Stoll BJ, Kanto WP, Jr., Glass RI, Nahmias AJ, Brann AW, Jr. Epidemiology of necrotizing enterocolitis: a case control study. *J Pediatr* 1980; 96(3 Pt 1):447-51.
11. Maayan-Metzger A, Itzhak A, Mazkereth R, Kuint J. Necrotizing enterocolitis

## Bibliografia

- in full-term infants: case-control study and review of the literature. *J Perinatol* 2004; 24(8):494-99.
12. Henry MC, Moss RL. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17(2):98-109.
  13. Berseth CL. Feeding strategies and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2005; 17(2):170-73.
  14. Hunter CJ, Podd B, Ford HR. Evidence vs experience in the surgical management of necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation. *J Perinatol* 2008; 28(1):s14-17.
  15. McElhinney DB, Hedrick HL, Bush DM, Pereira GR, Stafford PW, Gaynor JW, Spray TL, Wernovsky G. Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease: risk factors and outcomes. *Pediatrics* 2000; 106(5):1080-87.
  16. Ryder RW, Shelton JD, Guinan ME. Necrotizing enterocolitis: a prospective multicenter investigation. *Am J Epidemiol* 1980; 112(1):113-23.
  17. Guner YS, Chokshi N, Petrosyan M, Upperman JS, Ford HR, Grikscheit TC. Necrotizing enterocolitis--bench to bedside: novel and emerging strategies. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17(4):255-65.
  18. Holman RC, Stoll BJ, Curns AT, Yorita KL, Steiner CA, Schonberger LB. Necrotising enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006; 20(6):498-506.
  19. Foglia RP. Necrotizing enterocolitis. *Curr Probl Surg* 1995; 32(9):757-823.
  20. Engum SA, Grosfeld JL. Necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 1998; 10(2):123-30.
  21. Caplan MS, Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis. *Curr Opin*

- Pediatr 2001; 13(2):111-15.
22. De Souza JC, Fraga JC. Is mortality rate influenced by the site of involvement in neonates undergoing laparotomy for necrotizing enterocolitis? J Pediatr Surg 2009; 44(8):1534-39.
  23. Stiskal JA, Kulin N, Koren G, Ho T, Ito S. Neonatal paroxetine withdrawal syndrome. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001; 84(2):F134-35.
  24. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. Pediatr Dev Pathol 2003; 6(1):6-23.
  25. Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. Drugs 2008; 68(9):1227-38.
  26. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. Lancet 2006; 368(9543):1271-83.
  27. Panigrahi P. Necrotizing enterocolitis: a practical guide to its prevention and management. Paediatr Drugs 2006; 8(3):151-65.
  28. Kliegman RM. Models of the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. J Pediatr 1990; 117(1 Pt 2):S2-5.
  29. Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. Semin Perinatol 2004; 28(3):221-33.
  30. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. Shock 2007; 27(2):124-33.
  31. Ross MH, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Traducido por Negrete J, Editorial Médica Panamericana. Quinta ed; Vol 17, Buenos Aires 2007, pag 585-600.
  32. Rubinstein E, Mark Z, Haspel J, Ben-Ari G, Dreznik Z, Mirelman D, et al.

## Bibliografia

- Antibacterial activity of the pancreatic fluid. *Gastroenterology* 1985; 88(4):927-32.
33. Lebenthal E, Lee PC. Development of functional responses in human exocrine pancreas. *Pediatrics* 1980; 66(4):556-60.
34. Beck-Sague CM, Azimi P, Fonseca SN, Baltimore RS, Powell DA, Bland LA, et al. Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13(12):1110-16.
35. Basaran UN, Celayir S, Eray N, Ozturk R, Senyuz OF. The effect of an H2-receptor antagonist on small-bowel colonization and bacterial translocation in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 1998; 13(2-3):118-20.
36. Clamp JR, Creeth JM. Some non-mucin components of mucus and their possible biological roles. *Ciba Found Symp* 1984; 109:121-36.
37. Laboisse CL. Structure of gastrointestinal mucins: searching for the Rosetta stone. *Biochimie* 1986; 68(5):611-17.
38. Shub MD, Pang KY, Swann DA, Walker WA. Age-related changes in chemical composition and physical properties of mucus glycoproteins from rat small intestine. *Biochem J* 1983; 215(2):405-11.
39. Sherman P, Forstner J, Roomi N, Khatri I, Forstner G. Mucin depletion in the intestine of malnourished rats. *Am J Physiol* 1985; 248(4 Pt 1):G418-23.
40. Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 1972; 177(50):697-99.
41. Warner BW, Warner BB. Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(3):175-80.
42. Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, et al. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and

- increased focal adhesions. *J Biol Chem* 2004; 279(23):24592-600.
43. Ittmann PI, Amarnath R, Berseth CL. Maturation of antroduodenal motor activity in preterm and term infants. *Dig Dis Sci* 1992; 37(1):14-19.
  44. Berseth CL. Gut motility and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994; 21(2):263-70.
  45. Sase M, Miwa I, Sumie M, Nakata M, Sugino N, Ross MG. Ontogeny of gastric emptying patterns in the human fetus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 17(3):213-17.
  46. Schnabl KL, Van Aerde JE, Thomson AB, Clandinin MT. Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure. *World J Gastroenterol* 2008; 14(14):2142-61.
  47. Neu J. Arginine supplementation and the prevention of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr* 2002; 140(4):389-91.
  48. Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142(3):775-82.
  49. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(1):49-57.
  50. Upperman JS, Potoka D, Grishin A, Hackam D, Zamora R, Ford HR. Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(3):159-66.
  51. Ford HR. Mechanism of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure: insight into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2006; 41(2):294-99.

## Bibliografia

52. Hutcheson IR, Whittle BJ, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101(4):815-20.
53. Zamora R, Bryan NS, Boyle P, Wong C, Milsom AB, Jaffe R, et al. Nitrosative stress in an animal model of necrotizing enterocolitis. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(11):1428-37.
54. Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 1995; 34:17-43.
55. Grosfeld JL, Chaet M, Molinari F, Engle W, Engum SA, West KW, et al. Increased risk of necrotizing enterocolitis in premature infants with patent ductus arteriosus treated with indomethacin. *Ann Surg* 1996; 224(3):350-5; discussion 355-7.
56. Grishin AV, Wang J, Potoka DA, Hackam DJ, Upperman JS, Boyle P, et al. Lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 in intestinal epithelium via a noncanonical p38 MAPK pathway. *J Immunol* 2006; 176(1):580-88.
57. Lugo B, Ford HR, Grishin A. Molecular signaling in necrotizing enterocolitis: regulation of intestinal COX-2 expression. *J Pediatr Surg* 2007; 42(7):1165-71.
58. Ahrens P, Kattner E, Kohler B, Hartel C, Seidenberg J, Segerer H, et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2004; 55(4):652-56.
59. Szebeni B, Szekeres R, Rusai K, Vannay A, Veres G, Treszl A, et al. Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42(1):27-31.

60. Treszl A, Tulassay T, Vasarhelyi B. Genetic basis for necrotizing enterocolitis-- risk factors and their relations to genetic polymorphisms. *Front Biosci* 2006; 11:570-80.
61. Halpern MD, Clark JA, Saunders TA, Doelle SM, Hosseini DM, Stagner AM, et al. Reduction of experimental necrotizing enterocolitis with anti-TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(4):G757-64.
62. Treszl A, Kocsis I, Szathmari M, Schuler A, Tulassay T, Vasarhelyi B. Genetic variants of the tumour necrosis factor-alpha promoter gene do not influence the development of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 2001; 90(10):1182-85.
63. Venkatraman A, Ramakrishna BS, Pulimood AB. Butyrate hastens restoration of barrier function after thermal and detergent injury to rat distal colon in vitro. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(11):1087-92.
64. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24):15451-55.
65. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003; 4(3):269-73.
66. Scholander PF. THE MASTER SWITCH OF LIFE. *Sci Am* 1963; 209:92-106.
67. Alward CT, Hook JB, Helmrath TA, Mattson JC, Bailie MD. Effects of asphyxia on cardiac output and organ blood flow in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1978; 12(8):824-27.
68. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101(4):478-83.

## Bibliografia

69. Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. *Surgery* 1975; 77(5):687-90.
70. Nowicki PT. Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14(3):152-58.
71. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5):1124-36.
72. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250(6 Pt 1):G749-53.
73. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(2):H579-88.
74. Santos CH, Gomes OM, Pontes JC, Mijji LN, Bispo MA. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. *Acta Cir Bras* 2008; 23(1):22-28.
75. Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *J Pediatr Surg* 1974; 9(5):587-95.
76. Boros M, Takaichi S, Hatanaka K. Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 1995; 59(2):311-20.
77. Sibbons PD, Spitz L, van Velzen D. Necrotizing enterocolitis induced by local

- circulatory interruption in the ileum of neonatal piglets. *Pediatr Pathol* 1992; 12(1):1-14.
78. Krasna IH, Howell C, Vega A, Ziegler M, Koop CE. A mouse model for the study of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1986; 21(1):26-29.
79. Carrasco R, Pera M, May FE, Westley BR, Martinez A, Morales L. Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. *J Pediatr Surg* 2004; 39(11):1693-700.
80. Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Fed Proc* 1983; 42(14):3120-22.
81. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995; 374(6522):549-53.
82. Clark DA, Thompson JE, Weiner LB, McMillan JA, Schneider AJ, Rokahr JE. Necrotizing enterocolitis: intraluminal biochemistry in human neonates and a rabbit model. *Pediatr Res* 1985; 19(9):919-21.
83. Clark DA, Fornabaio DM, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Miller MJ. Contribution of oxygen-derived free radicals to experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Pathol* 1988; 130(3):537-42.
84. Crissinger KD. Animal models of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20(1):17-22.
85. Di Lorenzo M, Bass J, Krantis A. An intraluminal model of necrotizing enterocolitis in the developing neonatal piglet. *J Pediatr Surg* 1995; 30(8):1138-42.
86. Ito Y, Doelle SM, Clark JA, Halpern MD, McCuskey RS, Dvorak B. Intestinal

## Bibliografía

- microcirculatory dysfunction during the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2007; 61(2):180-84.
87. Torimoto K, Sato N, Okubo M, Yagihashi A, Wada Y, Hara I, et al. Development of multiple necrotizing enteritis induced by a tumor necrosis factor-like cytokine from lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages in rats. *Am J Pathol* 1990; 137(5):1103-11.
88. Chung DH, Ethridge RT, Kim S, Owens-Stovall S, Hernandez A, Kelly DR, et al. Molecular mechanisms contributing to necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 2001; 233(6):835-42.
89. Caplan MS, Kelly A, Hsueh W. Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: the role of platelet activating factor. *Pediatr Res* 1992; 31(5):428-34.
90. Shawn D. St. P OD. Necrotizing Enterocolitis. In: Ashcraft K HG, Murphy J., editor. *Pediatric Surgery*. 4th ed. United States of America: Elsevier Saunders; 2005. p. 461.
91. Sangild PT, Siggers RH, Schmidt M, Elnif J, Bjornvad CR, Thymann T, et al. Diet- and colonization-dependent intestinal dysfunction predisposes to necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *Gastroenterology* 2006; 130(6):1776-92.
92. Drucilla J. Roberts AMG, Fiona Graeme-Cook and Beverly Barrett Danhms. Gastrointestinal Tract and Pancrea. In: Elsevier M, editor. *Potter's Pathology of the Fetus, infant and Child*. Second ed. Philadelphia; 2007. p. 1188.
93. F, Fuertes. Oclusión e isquemia intestinal agudas: Estudio fisiopatológico y efectos del SMS 201-995 sobre las variaciones morfológicas, bioquímicas y de supervivencia en un modelo experimental [Experimental. En línea]. Lleida: Universitat de Lleida; 2001. p. 4.

94. Rosai J. Surgical Pathology. Ninth ed. London: Mosby Elsevier; 2004. p 791-793.
95. Joshi VV, Winston YE, Kay S. Neonatal necrotizing enterocolitis. Histologic evidence of healing. *Am J Dis Child* 1973; 126(1):113-16.
96. DeSa DJ. The spectrum of ischemic bowel disease in the newborn. *Pediatr Pathol* 1976; 3:273-309.
97. Hunter CJ, Podd B, Ford HR, Camerini V. Evidence vs experience in neonatal practices in necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 2008; 28(1):s9-13.
98. Kliegman RM, Walsh MC. Neonatal necrotizing enterocolitis: pathogenesis, classification, and spectrum of illness. *Curr Probl Pediatr* 1987; 17(4):213-88.
99. Yost CC. Neonatal necrotizing enterocolitis: diagnosis, management, and pathogenesis. *J Infus Nurs* 2005; 28(2):130-34.
100. Pourcyrous M, Korones SB, Yang W, Boulden TF, Bada HS. C-reactive protein in the diagnosis, management, and prognosis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 2005; 116(5):1064-69.
101. Kessler U, Mungnirandr A, Nelle M, Nimmo AF, Zachariou Z, Berger S. A simple presurgical necrotizing enterocolitis-mortality scoring system. *J Perinatol* 2006; 26(12):764-68.
102. Amer MD, Hedlund E, Rochester J, Caplan MS. Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborns: effects of enteral feeding and neonatal necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 2004; 85(3):159-66.
103. Jurges ES, Henderson DC. Inflammatory and immunological markers in preterm infants: correlation with disease. *Clin Exp Immunol* 1996; 105(3):551-55.
104. Harris MC, D'Angio CT, Gallagher PR, Kaufman D, Evans J, Kilpatrick L.

## Bibliografía

- Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr* 2005; 147(4):462-68.
105. Guthmann F, Borchers T, Wolfrum C, Wustrack T, Bartholomaeus S, Spener F. Plasma concentration of intestinal- and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy preterm neonates. *Mol Cell Biochem* 2002; 239(1-2):227-34.
106. Patole S. Prevention of necrotising enterocolitis: year 2004 and beyond. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 17(1):69-80.
107. Hall N, Ong EG, Ade-Ajayi N, Fasoli L, Ververidis M, Kiely EM, et al. T cryptantigen activation is associated with advanced necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2002; 37(5):791-93.
108. Castagnaro MC, López M. Julio, Góngora AM, Nishihara Hun ML. Radiografía directa de abdomen y correlación clínica en la enterocolitis necrotizante. *Revista Argentina de Radiología* 2009; 73(1):65-70.
109. McAlister WH, Kronemer KA. Emergency gastrointestinal radiology of the newborn. *Radiol Clin North Am* 1996; 34(4):819-44.
110. Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 1984; 310(17):1093-103.
111. Merritt CR, Goldsmith JP, Sharp MJ. Sonographic detection of portal venous gas in infants with necrotizing enterocolitis. *AJR Am J Roentgenol* 1984; 143(5):1059-62.
112. Miller SF, Seibert JJ, Kinder DL, Wilson AR. Use of ultrasound in the detection of occult bowel perforation in neonates. *J Ultrasound Med* 1993; 12(9):531-35.

113. Azarow K, Connolly B, Babyn P, Shemie SD, Ein S, Pearl R. Multidisciplinary evaluation of the distended abdomen in critically ill infants and children: the role of bedside sonography. *Pediatr Surg Int* 1998; 13(5-6):355-59.
114. Dördelmann M, Rau G, Bartels D, Linke M, Derichs N, Behrens C, Bohnhorst B. Evaluation of portal venous gas detected by ultrasound examination for diagnosis of NEC. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009; 94(3):183-87.
115. Kim WY, Kim WS, Kim IO, Kwon TH, Chang W, Lee EK. Sonographic evaluation of neonates with early-stage necrotizing enterocolitis. *Pediatr Radiol* 2005; 35(11):1056-61.
116. Lindley S, Mollitt DL, Seibert JJ, Golladay ES. Portal vein ultrasonography in the early diagnosis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1986; 21(6):530-32.
117. Chandler JC, Hebra A. Necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *Semin Pediatr Surg* 2000; 9(2):63-72.
118. Patton WL, Willmann JK, Lutz AM, Rencken IO, Gooding CA. Worsening enterocolitis in neonates: diagnosis by CT examination of urine after enteral administration of iohexol. *Pediatr Radiol* 1999; 29(2):95-99.
119. Rencken IO, Sola A, al-Ali F, Solano JP, Goldberg HI, Cohen PA, et al. Necrotizing enterocolitis: diagnosis with CT examination of urine after enteral administration of iodinated water-soluble contrast material. *Radiology* 1997; 205(1):87-90.
120. Bell MJ. Emerging trends in neonatal intestinal disease. *J Perinatol* 2008; 28(5):383; author reply 38-34.
121. Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003; 8(6):449-59.

## Bibliografia

122. Blakely ML, Lally KP, McDonald S, Brown RL, Barnhart DC, Ricketts RR, et al. Postoperative outcomes of extremely low birth-weight infants with necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation: a prospective cohort study by the NICHD Neonatal Research Network. *Ann Surg* 2005; 241(6):984-; discussion 989-94.
123. Kosloske AM, Papile LA, Burstein J. Indications for operation in acute necrotizing enterocolitis of the neonate. *Surgery* 1980; 87(5):502-08.
124. Sharma R, Tepas JJ 3r, Hudak ML, Wludyka PS, Mollitt DL, Garrison RD, et al. Portal venous gas and surgical outcome of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005; 40(2):371-76.
125. Ricketts RR. The role of paracentesis in the management of infants with necrotizing enterocolitis. *Am Surg* 1986; 52(2):61-65.
126. Ein SH, Marshall DG, Girvan D. Peritoneal drainage under local anesthesia for perforations from necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1977; 12(6):963-67.
127. Moss RL, Dimmitt RA, Henry MC, Geraghty N, Efron B. A meta-analysis of peritoneal drainage versus laparotomy for perforated necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2001; 36(8):1210-13.
128. Demestre X, Ginovart G, Figueras-Aloy J, Porta R, Krauel X, Garcia-Alix A, et al. Peritoneal drainage as primary management in necrotizing enterocolitis: a prospective study. *J Pediatr Surg* 2002; 37(11):1534-39.
129. Pierro A, Hall N. Surgical treatments of infants with necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003; 8(3):223-32.
130. Rees CM, Eaton S, Kiely EM, Wade AM, McHugh K, Pierro A. Peritoneal drainage or laparotomy for neonatal bowel perforation? A randomized controlled

- trial. *Ann Surg* 2008; 248(1):44-51.
131. Hall NJ, Curry J, Drake DP, Spitz L, Kiely EM, Pierro A. Resection and primary anastomosis is a valid surgical option for infants with necrotizing enterocolitis who weigh less than 1000 g. *Arch Surg* 2005; 140(12):1149-51.
132. Singh M, Owen A, Gull S, Morabito A, Bianchi A. Surgery for intestinal perforation in preterm neonates: anastomosis vs stoma. *J Pediatr Surg* 2006; 41(4):725-9; discussion 725-9.
133. Rovin JD, Rodgers BM, Burns RC, McGahren ED. The role of peritoneal drainage for intestinal perforation in infants with and without necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1999; 34(1):143-47.
134. Pumberger W, Mayr M, Kohlhauser C, Weninger M. Spontaneous localized intestinal perforation in very-low-birth-weight infants: a distinct clinical entity different from necrotizing enterocolitis. *J Am Coll Surg* 2002; 195(6):796-803.
135. Horwitz JR, Lally KP, Cheu HW, Vazquez WD, Grosfeld JL, Ziegler MM. Complications after surgical intervention for necrotizing enterocolitis: a multicenter review. *J Pediatr Surg* 1995; 30(7):994-8; discussion 998-9.
136. Moore TC. Successful use of the "patch, drain, and wait" laparotomy approach to perforated necrotizing enterocolitis: is hypoxia-triggered "good angiogenesis" involved? *Pediatr Surg Int* 2000; 16(5-6):356-63.
137. Vaughan WG, Grosfeld JL, West K, Scherer LR 3r, Villamizar E, Rescorla FJ. Avoidance of stomas and delayed anastomosis for bowel necrosis: the 'clip and drop-back' technique. *J Pediatr Surg* 1996; 31(4):542-45.
138. Molik KA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL. Portal venous air: the poor prognosis persists. *J Pediatr Surg* 2001; 36(8):1143-45.

## Bibliografia

139. Pierro A. The surgical management of necrotising enterocolitis. *Early Hum Dev* 2005; 81(1):79-85.
140. Lucas A, Fewtrell MS, Morley R, Lucas PJ, Baker BA, Lister G, et al. Randomized outcome trial of human milk fortification and developmental outcome in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(2):142-51.
141. McClure RJ, Newell SJ. Randomised controlled trial of trophic feeding and gut motility. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 80(1):F54-58.
142. Berseth CL, Bisquera JA, Paje VU. Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003; 111(3):529-34.
143. Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97(1):11-25.
144. Buchmiller TL, Shaw KS, Lam ML, Stokes R, Diamond JS, Fonkalsrud EW. Effect of prenatal dexamethasone administration: fetal rabbit intestinal nutrient uptake and disaccharidase development. *J Surg Res* 1994; 57(2):274-79.
145. Bury RG, Tudehope D. Enteral antibiotics for preventing necrotizing enterocolitis in low birthweight or preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(1).
146. Ouwehand AC, Derrien M, de Vos W, Tiihonen K, Rautonen N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16(2):212-17.
147. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight

- neonates. *J Pediatr* 2005; 147(2):192-96.
148. Wallace TD, Bradley S, Buckley ND, Green-Johnson JM. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J Food Prot* 2003; 66(3):466-72.
149. Neish AS. Bacterial inhibition of eukaryotic pro-inflammatory pathways. *Immunol Res* 2004; 29(1-3):175-86.
150. Lin HC, Su BH, Oh W. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2006; 148(6):849.
151. Scheppach W, Weiler F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7(5):563-67.
152. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126(2):520-28.
153. Zamora SA, Amin HJ, McMillan DD, Kubes P, Fick GH, Butzner JD, et al. Plasma L-arginine concentrations in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1997; 131(2):226-32.
154. Suresh GK, Davis JM, Soll RF. Superoxide dismutase for preventing chronic lung disease in mechanically ventilated preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(1).
155. Tamaki T, Konoeda Y, Yasuhara M, Tanaka M, Yokota N, Hayashi T, et al. Glutamine-induced heme oxygenase-1 protects intestines and hearts from warm ischemic injury. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2):1018-19.
156. Neu J, DeMarco V, Li N. Glutamine: clinical applications and mechanisms of action. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5(1):69-75.

## Bibliografia

157. Carrion V, Egan EA. Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 11(3):317-23.
158. Carlson SE, Montalto MB, Ponder DL, Werkman SH, Korones SB. Lower incidence of necrotizing enterocolitis in infants fed a preterm formula with egg phospholipids. *Pediatr Res* 1998; 44(4):491-98.
159. Caplan MS, Jilling T. The role of polyunsaturated fatty acid supplementation in intestinal inflammation and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lipids* 2001; 36(9):1053-57.
160. Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz H, Rosenkranz A. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. *N Engl J Med* 1988; 319(1):1-7.
161. Foster J, Cole M. Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth-weight neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(1).
162. Wong WM, Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth, and adaptation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23(5 Suppl):S83-88.
163. Shin CE, Falcone RA, Jr., Stuart L, Erwin CR, Warner BW. Diminished epidermal growth factor levels in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2000; 35(2):173-6; discussion 177.
164. Clark JA, Doelle SM, Halpern MD, Saunders TA, Holubec H, Dvorak K, et al. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291(5):G938-49.
165. Guglietta A, Sullivan PB. Clinical applications of epidermal growth factor. *Eur J*

- Gastroenterol Hepatol 1995; 7(10):945-50.
166. Ledbetter DJ, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg* 2000; 35(2):178-81; discussion 182.
167. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, et al. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut* 2001; 49(2):182-89.
168. Akisu M, Kullahcioglu Girgin F, Baka M, Husseyinov A, Kultursay N. The role of recombinant human erythropoietin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2001; 11(3):167-72.
169. Kumral A, Baskin H, Duman N, Yilmaz O, Tatli M, Ozer E, et al. Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation. *Biol Neonate* 2003; 84(4):325-29.
170. Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regul Pept* 2003; 116(1-3):53-60.
171. Hartman GE, Drugas GT, Shochat SJ. Post-necrotizing enterocolitis strictures presenting with sepsis or perforation: risk of clinical observation. *J Pediatr Surg* 1988; 23(6):562-66.
172. Schimpl G, Hollwarth ME, Fötter R, Becker H. Late intestinal strictures following successful treatment of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 396:80-83.
173. Rees CM, Pierro A, Eaton S. Neurodevelopmental outcomes of neonates with

## Bibliografía

- medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92(3):F193-98.
174. Schulzke SM, Deshpande GC, Patole SK. Neurodevelopmental outcomes of very low-birth-weight infants with necrotizing enterocolitis: a systematic review of observational studies. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161(6):583-90.
175. Johnson-Delaney C. *Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians*. Florida: ZEN Publishing, Lake Worth; 1996, p 585.
176. Popesko P, Rajtová V, Horak J. *A Colour Atlas of Anatomy of small Laboratory animals*. Vol 2: rat, mouse, hamster. Ed. Saunders, 2002. p 57-58,62.
177. Rat- Circulatory 2010. Available from URL: [http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat\\_circulatory.html](http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat_circulatory.html).
178. Narváez-Sánchez R, Chuaire L, Sánchez MC, Bonilla J. Circulación intestinal: Su organización, control y papel del paciente crítico. *Colomb Med* 2004; 35(4):231-44.
179. Gore RM, Yaghmai V, Thakrar KH, Berlin JW, Mehta UK, Newmark GM, et al. Imaging in intestinal ischemic disorders. *Radiol Clin North Am* 2008; 46(5):845-75, v.
180. Lockhart RD, Hamilton GF, Fyfe FW. Arterias y venas. In: Lockhart RD HG, Fyfe FW, editor. *Anatomía Humana*. Primera ed. México: Interamericana, S.A.; 1965. p. 624.
181. Nebesar RA, Kornblith PL, Pollard JJ. Celiac and superior mesenteric arteries: a correlation of angiograms and dissections. Boston: Little, Brown; 1969. p. 48
182. Marston A, Clarke JM, Garcia Garcia J, Miller AL. Intestinal function and intestinal blood supply: a 20 year surgical study. *Gut* 1985; 26(7):656-66.

183. Mall J. M. Die blut und lymphwege in dunndarm des hundes. *Abh Sachs Ges Wiss* 1888; 14:153-89.
184. E, Hernández-Andrade. Ecografía bidimensional (2D) y Doppler: principios físicos y aspectos prácticos de utilización. In: Gratacós E GR, Romero R, Nicolaides K, Cabero L, editor. *Medicina Fetal*. Primera ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007. p.32-33.
185. Figueras F, Coll O, Eixarch E. y Gratacós E. Evaluación del bienestar fetal: frecuencia cardíaca, perfil biofísico y Doppler. In: Gratacós E, Gómez R, Romero R, editor. *Medicina Fetal*. Primera ed. Buenos Aires; 2007. p 59-62.
186. Gosling RG, Dunbar G, King DH, Newman DL, Side CD, Woodcock JP, Fitzgerald DE, Keates JS, MacMillan D. The quantitative analysis of occlusive peripheral arterial disease by a non-intrusive ultrasound technique. *Angiology* 1971; 22:52.
187. Gosling RG, King DH. Ultrasonic angiology. In: Marcus AW, Adamson L, editor. *Arteries and Veins* Edinburgh: Churchill Livingstone; 1975. p 61-98.
188. L, Pourcelot. Applications clinique de l'examen Doppler transcutane. In: Peroneau P, editor. *Velocimetric ultrasono Doppler* Paris; 1974. p. 213.
189. Erskine RL, Ritchie JW, Murnaghan GA. Antenatal diagnosis of placental anastomosis in a twin pregnancy using Doppler ultrasound. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93(9):955-59.
190. Hecher K, Jauniaux E, Campbell S, Deane C, Nicolaides K. Artery-to-artery anastomosis in monochorionic twins. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171(2):570-72.
191. Wee LY, Taylor MJ, Vanderheyden T, Talbert D, Fisk NM. Transmitted arterio-arterial anastomosis waveforms causing cyclically intermittent absent/reversed end-

## Bibliografia

- diastolic umbilical artery flow in monochorionic twins. *Placenta* 2003; 24(7):772-78.
192. Gratacos E, Lewi L, Carreras E, Becker J, Higuera T, Deprest J, et al. Incidence and characteristics of umbilical artery intermittent absent and/or reversed end-diastolic flow in complicated and uncomplicated monochorionic twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 23(5):456-60.
193. FitzGerald DE, Drumm JE. Non-invasive measurement of human fetal circulation using ultrasound: a new method. *Br Med J* 1977; 2(6100):1450-51.
194. Stuart B, Drumm J, FitzGerald DE, Duignan NM. Fetal blood velocity waveforms in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87(9):780-85.
195. Martinussen M, Brubakk AM, Vik T, Yao AC. Mesenteric blood flow velocity and its relation to transitional circulatory adaptation in appropriate for gestational age preterm infants. *Pediatr Res* 1996; 39(2):275-80.
196. Papacci P, Giannantonio C, Cota F, Latella C, Semeraro CM, Fioretti M, et al. Neonatal colour Doppler ultrasound study: normal values of abdominal blood flow velocities in the neonate during the first month of life. *Pediatr Radiol* 2009; 39(4):328-35.
197. Gindes L, Pretorius DH, Romine LE, Kfir M, D'Agostini D, Hull A, et al. Three-dimensional ultrasonographic depiction of fetal abdominal blood vessels. *J Ultrasound Med* 2009; 28(8):977-88.
198. Allan P, Dubbins P, Pozniak M, McDicken W.N, editor. *Clinical Doppler Ultrasound*. First ed. London: Churchill Livingstone; 2000.
199. Van Bel F, Van Zwieten PH, Guit GL, Schipper J. Superior mesenteric artery blood flow velocity and estimated volume flow: duplex Doppler US study of preterm and term neonates. *Radiology* 1990; 174(1):165-69.

200. Krimmel GA, Baker R, Yanowitz TD. Blood transfusion alters the superior mesenteric artery blood flow velocity response to feeding in premature infants. *Am J Perinatol* 2009; 26(2):99-105.
201. Romero Arauz JF, Ramos León JC, Rivera Velásquez P, Álvarez Jiménez G, Molina Pérez CJ. Velocimetría Doppler de la arteria umbilical y resultado perinatal adverso en preeclampsia severa. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76(8):440-49.
202. Gratacos E, Carreras E, Becker J, Lewi L, Enriquez G, Perapoch J, et al. Prevalence of neurological damage in monochorionic twins with selective intrauterine growth restriction and intermittent absent or reversed end-diastolic umbilical artery flow. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 24(2):159-63.
203. Mandruzzato GP, Bogatti P, Fischer L, Gigli C. The clinical significance of absent or reverse end-diastolic flow in the fetal aorta and umbilical artery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991; 1(3):192-96.
204. Del Río M, Martínez JM, Figueras F, Bennasar M, Olivella A, Palacio M, Coll O, Puerto B, Gratacós E. Doppler assessment of the aortic isthmus and perinatal outcome in preterm fetuses with severe intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31(1):41-47.
205. Byun YJ, Kim HS, Yang JI, Kim JH, Kim HY, Chang SJ. Umbilical artery Doppler study as a predictive marker of perinatal outcome in preterm small for gestational age infants. *Yonsei Med J* 2009; 50(1):39-44.
206. Baschat A. Doppler application in the delivery timing of the preterm growth-restricted fetus: another step in the right direction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 23(2):111-18.
207. Muller T, Nanan R, Rehn M, Kristen P, Dietl J. Arterial and ductus venosus

## Bibliografia

- Doppler in fetuses with absent or reverse end-diastolic flow in the umbilical artery: correlation with short-term perinatal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81(9):860-66.
208. Malcolm G, Ellwood D, Devonald K, Beilby R, Henderson-Smart D. Absent or reversed end diastolic flow velocity in the umbilical artery and necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child* 1991; 66(7 Spec No):805-07.
209. Baschat AA, Gembruch U, Reiss I, Gortner L, Weiner CP, Harman CR. Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16(5):407-13.
210. Ozcan T, Sbracia M, d'Ancona RL, Copel JA, Mari G. Arterial and venous Doppler velocimetry in the severely growth-restricted fetus and associations with adverse perinatal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12(1):39-44.
211. Valcamonico A, Accorsi P, Sanzeni C, Martelli P, La Boria P, Cavazza A, Frusca T. Mid- and long-term outcome of extremely low birth weight (ELBW) infants: an analysis of prognostic factors. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20(6):465-71.
212. Kamoji VM, Dorling JS, Manktelow B, Draper ES, Field DJ. Antenatal umbilical Doppler abnormalities: an independent risk factor for early onset neonatal necrotizing enterocolitis in premature infants. *Acta Paediatr* 2008; 97(3):327-31.
213. Müller-Egloff S, Strauss A, Spranger V, Genzel-Boroviczény O. Does chronic prenatal Doppler pathology predict feeding difficulties in neonates? *Acta Paediatr* 2005; 94(11):1632-37.
214. Manogura AC, Turan O, Kush ML, Berg C, Bhide A, Turan S, Moyano D, Bower S, Nicolaides KH, Galan HL, Müller T, Thilaganathan B, Gembruch U, Harman CR, Baschat AA. Predictors of necrotizing enterocolitis in preterm growth-

- restricted neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(6):638-e1-5.
215. Rhee E, Detti L, Mari G. Superior mesenteric artery flow velocity waveforms in small for gestational age fetuses. *J Matern Fetal Med* 1998; 7(3):120-23.
216. Korszun P, Dubiel M, Breborowicz G, Danska A, Gudmundsson S. Fetal superior mesenteric artery blood flow velocimetry in normal and high-risk pregnancy. *J Perinat Med* 2002; 30(3):235-41.
217. Epelman M, Daneman A, Navarro OM, Morag I, Moore AM, Kim JH, Faingold R, Taylor G, Gerstle JT. Necrotizing enterocolitis: review of state-of-the-art imaging findings with pathologic correlation. *Radiographics* 2007; 27(2):285-305.
218. Faingold R, Daneman A, Tomlinson G, Babyn PS, Manson DE, Mohanta A, Moore AM, Hellmann J, Smith C, Gerstle T, Kim JH. Necrotizing enterocolitis: assessment of bowel viability with color doppler US. *Radiology* 2005; 235(2):587-94.
219. Silva CT, Daneman A, Navarro OM, Moore AM, Moineddin R, Gerstle JT, Mittal A, Brindle M, Epelman M. Correlation of sonographic findings and outcome in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Radiol* 2007; 37(3):274-82.
220. Carlo WF, Kimball TR, Michelfelder EC, Border WL. Persistent diastolic flow reversal in abdominal aortic Doppler-flow profiles is associated with an increased risk of necrotizing enterocolitis in term infants with congenital heart disease. *Pediatrics* 2007; 119(2):330.
221. Dietrich CF, Hermann S, Klein S, Braden B. Sonographic signs of neutropenic enterocolitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12(9):1397-402.
222. Harrison AM, Davis S, Reid JR, Morrison SC, Arrigain S, Connor JT, Temple ME. Neonates with hypoplastic left heart syndrome have ultrasound evidence of

## Bibliografia

- abnormal superior mesenteric artery perfusion before and after modified Norwood procedure. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(4):445-47.
223. Shah JB, Bracero LA, Gewitz MH, Fish BG, Dweck HS. Umbilical artery catheters and blood flow velocities in the superior mesenteric artery: effect of insertion, removal, aspiration, and bolus infusion. *J Clin Ultrasound* 1998; 26(2):73-77.
224. Lane AJ, Coombs RC, Evans DH, Levin RJ. Effect of caffeine on neonatal splanchnic blood flow. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 80(2):F128-29.
225. Hoecker C, Nelle M, Poeschl J, Beedgen B, Linderkamp O. Caffeine impairs cerebral and intestinal blood flow velocity in preterm infants. *Pediatrics* 2002; 109(5):784-87.
226. Soraisham AS, Elliott D, Amin H. Effect of single loading dose of intravenous caffeine infusion on superior mesenteric artery blood flow velocities in preterm infants. *J Paediatr Child Health* 2008; 44(3):119-21.
227. Kempley ST, Gamsu HR. Superior mesenteric artery blood flow velocity in necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child* 1992; 67(7):793-96.
228. Deeg KH, Rupprecht T, Schmid E. Doppler sonographic detection of increased flow velocities in the celiac trunk and superior mesenteric artery in infants with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Radiol* 1993; 23(8):578-82.
229. Robel-Tillig E, Vogtmann C, Bennek J. Prenatal hemodynamic disturbances -- pathophysiological background of intestinal motility disturbances in small for gestational age infants. *Eur J Pediatr Surg* 2002; 12(3):175-79.
230. Murdoch EM, Sinha AK, Shanmugalingam ST, Smith GC, Kempley ST. Doppler flow velocimetry in the superior mesenteric artery on the first day of life in preterm

- infants and the risk of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 2006; 118(5):1999-2003.
231. Coatney RW. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR J* 2001; 42(3):233-47.
232. Colombato LA, Sabba C, Polio J, Groszmann RJ. Influence of anesthesia, postanesthetic state, and restraint on superior mesenteric arterial flow in normal rats. *Am J Physiol* 1991; 260(1 Pt 1):G1-G6.
233. D'Almeida MS, Gaudin C, Lebrec D. Validation of 1- and 2-mm transit-time ultrasound flow probes on mesenteric artery and aorta of rats. *Am J Physiol* 1995; 268(3 Pt 2):H1368-72.
234. Fenger-Gron J, Mulvany MJ, Christensen KL. Intestinal blood flow is controlled by both feed arteries and microcirculatory resistance vessels in freely moving rats. *J Physiol* 1997; 498 ( Pt 1):215-24.
235. Garcia JN, Pedersen NP, Nalivaiko E, Blessing WW. Tail artery blood flow measured by chronically implanted Doppler ultrasonic probes in unrestrained conscious rats. *J Neurosci Methods* 2001; 104(2):209-13.
236. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994; 74(2):336-43.
237. Kim WY, Kim IO, Kim WS, Yeon KM, Kim GI, Lee SW, Suh JS, Choi HY, Chang KJ. Sonographic findings in a model of ischemia-induced necrotizing enterocolitis with pathological correlations. *Invest Radiol* 2007; 42(5):312-18.
238. Wallace JL, Keenan CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis. *Am J Physiol* 1990; 258(4 Pt 1):G527-

## Bibliografía

- 34.
239. Ulrich Zollinger H, traducción J.D. Toledo-Ugarte. Anatomía patológica. Cuarta ed. Barcelona: Salvat Editors, S.A.; 1977. p 10, 109-110.
240. Dalsing MC, Grosfeld JL, Shiffler MA, Vane DW, Hull M, Baehner RL, et al. Superoxide dismutase: a cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res* 1983; 34(6):589-96.
241. Merritt CR. Physics of ultrasound. In: Rumack CM WS, Charboneau, editor. *Diagnostic Ultrasound* St. Louis: Mosby; 1998. p. 3-35.
242. Orland PJ, Cazi GA, Semmlow JL, Reddell MT, Brodin RE. Determination of small bowel viability using quantitative myoelectric and color analysis. *J Surg Res* 1993; 55(6):581-87.
243. Birth M, Lossin P, Brugmans F, Weiser HF. Vascular injuries within the hepatoduodenal ligament: recognition by laparoscopic color Doppler ultrasound. *Surg Endosc* 2000; 14(3):246-49.
244. Walter P. [Celiac trunk compression: angiographic phenomenon or cause of ischemic abdominal complaints?]. *Zentralbl Chir* 2005; 130(3):227-34.
245. Saxena A GR. Sonographic findings and outcome in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Radiol* 2007; 37(11):1180.
246. Dilli D, Oguz SS, Ulu HO, Dumanli H, Dilmen U. Sonographic findings in premature infants with necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009; 94(3):F232-33.
247. Hamada T, Yamauchi M, Tanaka M, Hashimoto Y, Nakai K, Suenaga K. Prospective evaluation of contrast-enhanced ultrasonography with advanced dynamic flow for the diagnosis of intestinal ischaemia. *Br J Radiol* 2007; 80(956):603-08.

248. Bernoulli D. *Hydrodynamica: sive de viribus et motibus fluidorum commentarii*; 1738.
249. Poiseuille JM. *Recherches experimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de tres-petits diametres*. 1846.
250. Puglisi RN, Whalen TV, Doolin EJ. Computer analyzed histology of ischemic injury to the gut. *J Pediatr Surg* 1995; 30(6):839-44.
251. Lerena J, Carrasco R, Pérez N, Alonso S, Pera M. El péptido TRFOIL TFF3 previene la lesión por isquemia reperfusión en un modelo de enterocolitis necrotizante mediante el aumento en la expresión VEGF. In: anonymous, editor. XXXVI Congreso Chile ed. Viña del Mar: Rev. Ped. Elec. Universidad de Chile; 2009.
252. C, Piñols. Estudio de los cambios en la mucosa colonica de rata y cinetica celular durante la carcinogenesis experimental inducida con 1, 2-Dimetilhidracina [Experimental. En línea]. Lleida: Universidad de Lleida; 1995. p 25, 169.
253. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J Pediatr* 1990; 117(1 Pt 2):S6-13.
254. Schaart MW, de Bruijn AC, Schierbeek H, Tibboel D, Renes IB, van Goudoever JB. Small intestinal MUC2 synthesis in human preterm infants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296(5):G1085-90.
255. Faure M, Moennoz D, Mettraux C, Montigon F, Schiffrin EJ, Obled C, et al. The chronic colitis developed by HLA-B27 transgenic rats is associated with altered in vivo mucin synthesis. *Dig Dis Sci* 2004; 49(2):339-46.
256. Chao HC, Kong MS, Chen JY, Lin SJ, Lin JN. Sonographic features related to volvulus in neonatal intestinal malrotation. *J Ultrasound Med* 2000; 19(6):371-76.

## Bibliografia

257. Choi YH, Kim IO, Cheon JE, Kim JE, Kim EK, Kim WS, Yeon KM. Doppler sonographic findings in an experimental rabbit model of necrotizing enterocolitis. *J Ultrasound Med.* 2010; 29(3):379-86.
258. Fisher R. *The Genetical Theory of Natural Selection*: Clarendon Press, Oxford; 1930.
259. Gordon PV, Swanson JR, Attridge JT, Clark R. Emerging trends in acquired neonatal intestinal disease: is it time to abandon Bell's criteria? *J Perinatol* 2007; 27(11):661-71.
260. Grave GD, Nelson SA, Walker WA, Moss RL, Dvorak B, Hamilton FA, et al. New therapies and preventive approaches for necrotizing enterocolitis: report of a research planning workshop. *Pediatr Res* 2007; 62(4):510-14.