UNIVERSITAT DE BARCELONA

Estudio de la hipotermia como factor protector frente a la lesión por hipoxia

Norma V. Alva Bocanegra

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.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

T/2006/ALV/est x

REGISTRE GENERAL
Facultat de Biologia
Secretaria d'Estudiants i Docència
Data: 23-NOV-2006
Entrada: 32674

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

ESTUDIO DE LA HIPOTERMIA COMO FACTOR PROTECTOR FRENTE A LA LESIÓN POR HIPOXIA

MEMORIA PRESENTADA POR

NORMA V. ALVA BOCANEGRA

PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Tesis realizada bajo la dirección de los Drs. Jesús Palomeque Rico y Teresa Carbonell Camos del Departamento de Fisiología, Facultad de Biología. Adscrita al Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, programa de Fisiología
(Bienio 1998-2000)

Dr. Jesús Palomeque R. Dra. Teresa Carbonell C. Norma Alva B.

Barcelona, noviembre del 2006

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA
0701297152

A mi familia,

a los amigos que dejé al otro lado del charco...

y a los que encontré aquí...

y a mi compañero en el camino

de la vida,

Carlos.

Agradecimientos.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directores de tesis el Dr. Jesús Palomeque y la Dra. Teresa Carbonell por haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis doctoral y haberme apoyado no solo a nivel científico sino a nivel humano.

También guardo una profunda gratitud a mis profesores de la Universidad de Trujillo, que me iniciaron en el camino de la investigación y fomentaron mi interés por la Fisiología, y que aún ahora continúan alentándome a pesar de la distancia.

Agradezco además a todo el personal del departamento, a los profesores, becarios, personal administrativo y técnico, y en especial a Juani, por haber estado abiertos a colaborar conmigo en todo momento.

De un modo especial quiero agradecer a Dani, Edu, Jordi, Roser, David y todos aquellos que han pasado por el laboratorio, por su amistad y todos las gratas experiencias vividas.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, y sobretodo a Carlos por haber confiado en mí y por su paciencia

INDICE

SUMARIO 1

1 INTRODUCCIÓN. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA 5

1.1 *LA HIPOTERMIA* 5

1.1.1 **DEFINICIÓN** .....

1.1.2 **HIPOTERMIA EN LA NATURALEZA: ECTOTERMOS VS HIBERNANTES** 5

1.1.3 **HIPOTERMIA ACCIDENTAL** 6

1.1.4 **HIPOTERMIA EXPERIMENTAL INDUCIDA** 7

1.1.4.1 MÉTODOS DE ENFRIAMIENTO 8

1.1.5 **NIVELES DE HIPOTERMIA:** 9

1.1.6 **EFECTOS DE LA HIPOTERMIA.** 10

1.1.7 **IMPORTANCIA TERAPÉUTICA: APLICACIONES EN CIRUGÍA** 16

1.1.8 **COMPLICACIONES DE LA HIPOTERMIA** 17

1.2 *HEMODINÁMICA Y APORTE DE OXÍGENO.* 19

1.2.1 **QUIMICA FÍSICA DE LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS** 19

1.2.1.1 NEUTRALIDAD, ALCALINIDAD Y ACIDEZ. 19

1.2.2 **INTERCAMBIO GASEOSO Y VENTILACIÓN** 22

1.2.2.1 PRESIÓN PARCIAL: 22

1.2.2.2 DIFUSIÓN DE GASES A TRAVÉS DE LÍQUIDOS. 23

1.2.3 **PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA OXIGENACIÓN.**

1.2.3.1 HEMOGLOBINA Y TRANSPORTE DE OXÍGENO. 24

1.2.3.2 CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y CURVA DE DISOCIACIÓN Hb-O_2 (CDO) 25

1.2.3.3 CONCENTRACIÓN DE HIDROGENIONES [H+] y pH EN SANGRE ARTERIAL 27

1.2.4 **PARÁMETRO METABÓLICOS: LACTATO** 32

1.2.5 **PRINCIPALES ELECTROLITOS. CONCEPTO DE SID**

1.2.5.1 ELECTROLITOS FUERTES 33

1.2.5.2 ELECTROLITOS DÉBILES 33

1.2.5.3 DIFERENCIA DE IONES FUERTES (SID) 33

1.2.6 **HIPOTERMIA Y REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE** 34

1.2.6.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL PH SOBRE LA CDO. 34

1.2.6.2 ALTERACIONES DE LAS CONSTANTES DE SOLUBILIDAD DE LOS GASES. 35

1.2.7 **PH Y SU RELACIÓN CON LA TEMPERATURA. ESTRATEGIAS DE ANIMALES ECTOTERMOS E HIBERNANTES** 36

1.2.8 **CONTROL DEL EQUILIBRIO ÁCIDO BASE EN PACIENTES HIPOTÉRMICOS:** 38

1.3 ***ESTRÉS OXIDATIVO:***..... 40

1.3.1 **CONCEPTO:** 40

1.3.2 **RADICALES LIBRES** 41

1.3.2.1 PRINCIPALES ESPECIES 43

1.3.2.2 OXIDO NÍTRICO 44

1.3.3 **ANTIOXIDANTES: TIPOS** 45

1.3.4 **MECANISMOS DE ACCION DE LOS ..... ANTIOXIDANTES:** 49

1.3.5 **PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR: APOTOSIS vs. NECROSIS** 50

1.3.5.1 NECROSIS. 51

1.3.5.2 APOPTOSIS 53

1.4 *HIPOXIA COMO MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO:*

1.4.1 **DEFINICIÓN.** 54

1.4.2 **TIPOS DE HIPOXIA:** 54

1.4.3 **EFECTOS SOBRE EL HÍGADO:** 55

2 MATERIAL Y METODOS 57

2.1 *PLANTEAMIIENTO EXPERIMENTAL* 57

2.1.1 **ANIMALES, DIETA Y ESTABULACIÓN** 57

2.1.2 **REGIMENES DE ANESTESIA** 57

2.1.2.1 GRUPO PENTOBARBITAL EN NORMOTERMIA 57

2.1.2.2 .GRUPO KETAMINA EN NORMOTERMIA 57

2.1.2.3 GRUPOS PENTOBARBITAL Y KETAMINA DURANTE LA HIPOTERMIA 59

2.1.3 **PROTOCOLOS QUIRÚRGICOS** 59

2.1.3.1 AISLAMIENTO Y CANULACIÓN DE ARTERIA CAROTIDA....59

2.1.3.2 TRAQUEOTOMIA Y VENTILACIÓN ASISTIDA 59

2.1.3.3 MONITORIZACIÓN DE LA TEMPERATURA 59

2.1.4 **MONITORIZACIÓN DEL FLUJO PORTAL** 59

2.1.5 **MONITORIZACIÓN DE OTROS PARÁMETROS DE INTERÉS FISIOLÓGICO** 61

2.1.5.1 FRECUENCIA CARDÍACA y PRESIÓN ARTERIAL 61

2.1.5.2 HEMATOCRITO 61

2.1.6 **MONTAJE DEL SISTEMA DE ENFRIAMIENTO/ RECALENTAMIENTO** 62

2.1.7 **VELOCIDAD DE RECALENTAMIENTO** 62

2.1.8 **INDUCCION DE HIPOXIA NORMOBÁRICA** 63

2.2 ***OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS*** 62

2.2.1 **EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA SANGRE** 63

2.2.2 **EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE HÍGADO** 64

2.2.3 **SACRIFICIO DE LOS ANIMALES** 64

2.3 ***DETERMINACION DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO***

2.3.1 **DETERMINACIONES EN HIGADO** 64

2.3.1.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA 64

2.3.1.2 CATALASA 65

2.3.1.3 GLUTATION 66

2.3.1.4 GLUTATION PEROXIDASA 68

2.3.1.5 LACTATO 70

2.3.1.6 OXIDO NITRICO 71

2.3.1.7 MALONDIALDEHIDO 72

2.3.1.8 MARCADORES PROAPOPTOTICOS: CASPASA 3 73

2.3.1.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 74

2.3.2 **DETERMINACIONES EN SANGRE** 75

2.3.2.1 HEMOXIMETRIA 75

2.3.2.2 GASOMETRIA 75

2.3.2.3 CONCENTRACIÓN DE IONES 76

2.3.2.4 LACTATO.....77

2.3.3 **DETERMINACIONES EN PLASMA** 78

2.3.3.1 GRUPOS SH (THIOLES) 78

2.3.3.2 OXIDO NITRICO 78

2.3.3.3 MALONDIALDEHIDO 79

2.3.3.4 TRANSAMINASAS 80

2.3.4 **DETERMINACIONES EN ERITROCITOS** 81

2.3.4.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA 81

2.3.4.2 CATALASA 81

2.3.4.3 GLUTATION PEROXIDASA 82

2.3.4.4 HEMOGLOBINA 82

2.3.5 **ESTADÍSTICA** 83

3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN 85

3.1 *BLOQUE I: IMPLICACIONES DE LA ANESTESIA EN LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOTERMIA: KETAMINA vs. PENTOBARBITAL* 85

3.1.1 **PROTOCOLO A: ANESTESIA EN NORMOTERMIA** 85

3.1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 85

3.1.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES 85

3.1.2 **PROTOCOLO B: ANESTESIA EN HIPOTERMIA**

3.1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 86

3.1.2.2 GRUPOS EXPERIMENTALES 86

3.1.3 **PROTOCOLO C: VELOCIDAD EN EL RECALENTAMIENTO**

3.1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 87

3.1.3.2 GRUPOS EXPERIMENTALES 87

3.1.4 **PARÁMETROS EVALUADOS** 87

3.1.5 **RESULTADOS DEL BLOQUE I** 88

3.1.6 **DISCUSIÓN DEL BLOQUE I.** 99

3.2 ***BLOQUE II: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA HEMODINÁMICA, OXIDATIVA Y DEL EQUILIBRIO ÁCIDO BASE DURANTE LA HIPOTERMIA Y EL RECALENTAMIENTO.*** 104

3.2.1 **PROTOCOLO D: EFECTO DE LA TEMPERATURA..... SOBRE PARÁMETROS HEMODINAMICOS** 104

3.2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 104

3.2.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES 104

3.2.1.3 PARÁMETROS A EVALUAR 106

3.2.2 **RESULTADOS DEL BLOQUE II** 107

3.2.3 **DISCUSIÓN DEL BLOQUE II.** 122

3.3 ***BLOQUE III: EFECTO DE LA HIPOTERMIA PROFUNDA SOBRE LA HIPOXIA AGUDA NORMOBÁRICA.*** 127

3.3.1 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:** 127

3.3.2 **GRUPOS EXPERIMENTALES:.** 127

3.3.2.1 PARÁMETROS A EVALUAR 128

3.3.3 **RESULTADOS DEL BLOQUE III** 129

3.3.4 **DISCUSIÓN DEL BLOQUE III.** 143

4 CONCLUSIONES 149

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 151

6 ANEXO 165

6.1 *LISTA DE TABLAS Y FIGURAS* 165

6.2 *GLOSARIO* 171

6.3 *TRABAJOS PUBLICADOS* 173

SUMARIO

SUMARIO

La hipotermia es el estado en el cual la temperatura corporal se encuentra anormalmente baja. Es un fenómeno presente en la naturaleza y su uso terapéutico se remonta a la antigüedad. La disminución de la temperatura corporal altera la hemodinámica del organismo y afecta el intercambio gaseoso en los tejidos, limitando por un lado la disponibilidad de oxígeno de los tejidos y, por otro lado modificando la afinidad de la hemoglobina. En muchos casos estos procesos pueden someter al tejido a periodos de isquemia o hipoxia. En animales homeotermos la hipotermia puede llegar a ser nociva, como consecuencia de alcanzar temperaturas críticas (por debajo de 20° C), o su duración prolongada (mas de 3 horas), o incluso a la velocidad del recalentamiento.

La delicada frontera entre los efectos protectores y nocivos de la hipotermia nos recuerdan el de otro fenómeno, ampliamente estudiado, la isquemia/ reperfusión, en donde se señalan a los radicales libres de oxígeno como los principales responsables de la lesión, pero al mismo tiempo se ha demostrado que son el origen de su efecto protector (actuando como reguladores de complejos procesos celulares). También en la hipotermia profunda se encuentra la implicación de los radicales libres de oxígeno. Pueso que ya que ésta tiene aplicaciones médicas ampliamente reconocidas, y es el protocolo obligado en las cirugías cardiovasculares y de cerebro, la mejor comprensión de los mecanismos que la regulan cobra gran interés.

En líneas generales, la hipotermia disminuye el flujo sanguíneo, y por ende la oxigenación tisular, a la par que induce la disminución del metabolismo basal, partiendo de estos hechos nos planteamos estudiar si la hipotermia profunda (siguiendo el manejo ventilatorio alfa-stat)

provoca un suficiente aporte de oxígeno a los tejidos, y cuáles serían las alteraciones hemodinámicas y, por consiguiente, del equilibrio ácido-base, generados por ésta. A fin de dilucidar la participación de los radicales libres de oxígeno en los efectos atribuidos a la hipotermia nos pareció de gran interés la caracterización del estado oxidativo del animal (balance pro/ antioxidante), tanto a nivel sanguíneo como a nivel hepático. Centramos nuestra atención en el hígado por ser un órgano con una alta tasa metabólica (alto consumo de oxígeno y mayor susceptibilidad a al hipoxia), con una alta concentración de antioxidantes, además del gran interés que comporta su estudio en el campo de la cirugía de transplantes

Por todo lo expuesto y para la consecución de los **objetivos** planteados hemos dividido el trabajo en 3 bloques experimentales:

En el primer bloque se agrupan los estudios preliminares realizados con la finalidad de seleccionar el anestésico idóneo para el desarrollo del nuestro proyecto. Muchos anestésicos presentan efectos importantes en los animales que pocas veces se evalúan y que pueden interferir en los resultados. Los barbitúricos junto con la Ketamina han sido ampliamente estudiados en normotermia desde el punto de vista hemodinámico, pero pocos estudios han evaluado comparativamente su efecto sobre los parámetros de estrés oxidativo, o sobre el equilibrio ácido base en hipotermia profunda. Esto nos condujo a un estudio preliminar para delimitar las implicaciones de estos anestésicos en las variables de estudio, tales como el pH sanguíneo y el flujo que pueden afectar directamente la disponibilidad de oxígeno en los tejidos. Se ensayaron también diferentes velocidades de recalentamiento para analizar la influencia en la adecuación al modelo.

En el segundo apartado nos centramos en la caracterización de la respuesta hemodinámica y del equilibrio ácido base, y del estado oxidativo durante la hipotermia profunda (20° C) y el recalentamiento. Fue necesario el estudio detallado de las variables que afectan la oxigenación y el equilibrio ácido base, y el estudio de la presencia de indicadores de daño en sangre y hepáticos, así como la concentración e interrelación de los principales antioxidantes. El óxido nítrico que presenta una naturaleza dual fue estudiado con especial énfasis. Además se incluyó la medición de marcadores pro apoptóticos para delimitar el impacto del tratamiento sobre la muerte celular.

En el tercer bloque de experimentación se estudío el posible efecto protector de la hipotermia frente a una lesión por hipoxia aguda, para lo cual fue necesario someter tanto a animales normotérmicos como hipotérmicos a un período de hipoxia a fin de caracterizar la lesión y su efecto sobre las variables de estudio en los primeros, y al mismo tiempo discernir el nivel de protección que podría conferir la hipotermia a los animales hipóxicos

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que se extraen del presente trabajo apuntan a señalar por un lado que el aporte de oxígeno a los tejidos durante la hipotermia parece adecuado, y por otro se evidencia un leve incremento en la producción de radicales libres de oxígeno, incapaz de inducir lesión oxidativa, y menos aun daño tisular, pero que sin embargo desencadena un proceso de señalización celular. Asimismo, la hipotermia profunda ha sido capaz de limitar el daño en el modelo de hipoxia aguda ensayado.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1 *LA HIPOTERMIA*

1.1.1 DEFINICIÓN

La hipotermia es el estado anómalo en el cual la temperatura corporal se encuentra por debajo de su rango normal, en humanos por debajo de 37°C. Se produce cuando el cuerpo pierde calor más rápidamente de lo que tarda en quemar energía para reponerlo y conservarlo.

La piel, y los tejidos en un animal homeotermo que se encuentran bajo la misma, se mantienen a una temperatura constante gracias a la sangre que circula por ellos. La temperatura de la sangre se debe al calor proveniente de la energía liberada por las células cuando queman alimentos, un proceso que requiere un aporte estable de alimentos y de oxígeno, y está regulado por estructuras hipotalámicas.

1.1.2 HIPOTERMIA EN LA NATURALEZA: ECTOTERMOS VS HIBERNANTES

En la naturaleza existen dos grupos de animales que son capaces de soportar considerables cambios en su temperatura corporal: los ectotermos (o poiquilotermos) y dentro de los endodermos los mamíferos hibernantes son los únicos que la presentan.

Los ectotermos comprenden muchas especies de invertebrados y vertebrados (peces, anfibios y reptiles) que se caracterizan por una temperatura corporal lábil, fuertemente influenciada por la temperatura ambiente(1). Estos animales conservan sus reservas de CO_2 tisulares y el bicarbonato plasmático constantes mientras se enfrían, lo que se corresponde con un incremento del pH.

Los animales hibernantes mantienen el pH constante a medida que se enfrían, mientras que la PCO_2 y el bicarbonato se incrementan. Como se

verá más adelante esto conlleva a una acidosis relativa, que en algunas especies es compensada metabolicamente (2).

1.1.3 HIPOTERMIA ACCIDENTAL

La hipotermia accidental se define como la disminución no intencionada en la temperatura corporal por debajo de 35° C(3).

Se pueden distinguir dos tipos de hipotermia accidental :

HIPOTERMIA ACCIDENTAL PRIMARIA

Es el enfriamiento que se produce como consecuencia de la exposición accidental a bajas temperaturas ambientales. La zona de preferencia térmica en el hombre (28 °C) es definida como la temperatura ambiente a la cual la tasa basal de termogénesis es suficiente para contrarrestar las pérdidas de calor. Mantener la temperatura corporal cuando ésta está por debajo de este nivel, requiere un incremento en la producción de calor y, ya que éste únicamente puede ser producido por combustión, se necesita mayor disponibilidad de oxígeno. Cuando la temperatura ambiental está por debajo de la zona termoneutra y el consumo de oxígeno se halla limitado, la producción de calor no es capaz de contrarrestar su pérdida y se produce la hipotermia (4).

HIPOTERMIA ACCIDENTAL SECUNDARIA

Si bien la hipotermia primaria puede ocurrir en un individuo sano sometido a un ambiente extremadamente frío, en el caso de la hipotermia secundaria no ocurre por cuestiones ambientales sino debida a alteraciones en la termorregulación y la producción de calor asociadas a enfermedades o lesiones, por lo cual también se la conoce como "hipotermia patológica" o "hipotermia secundaria derivada de enfermedades agudas". La hipotermia secundaria se observa frecuentemente en pacientes con enfermedades neurológicas, sepsis, y,

en menor proporción, en casos de alteraciones metabólicas (coma hepático, hipotiroidismo) o intoxicación con fármacos. Este tipo de hipotermia es más común y más profunda en pacientes con lesiones graves, lo que la asocia con una elevada mortalidad. Es difícil establecer con certeza cuando un incremento en la mortalidad es consecuencia directa de la hipotermia, puesto que la temperatura desciende de manera natural durante el proceso de la muerte, la hipotermia entonces podría también interpretarse como un señal que simplemente identifica a los enfermos que sucumben frente sus lesiones (5).

1.1.4 HIPOTERMIA EXPERIMENTAL INDUCIDA

Existen muchas razones por las cuales, bajo ciertas circunstancias, se hace necesaria la inducción de hipotermia, ya sea por razones experimentales o terapéuticas.

La reducción de la temperatura corporal en roedores se ha demostrado que mejora la supervivencia frente a situaciones patológicas como hipoxia o intoxicación por sustancias químicas. En animales mayores, se observa protección hipotérmica cuando se recuperan, por ejemplo, de isquemia cerebral. Los roedores sometidos a esa lesión en cambio, desarrollan una respuesta *hipotérmica regulada* (es decir, disminuyen el valor de la variable controlada de su temperatura), caracterizada por preferir temperaturas ambientales más frías. Sin embargo la *hipotermia forzada*, (cuando la temperatura corporal es forzada a situarse por debajo del valor de la variable controlada de su temperatura) es el único método usado en el estudio y tratamiento de patologías en humanos (6).

La hipotermia inducida no es una práctica novedosa, figura desde tiempos muy antiguos como una herramienta terapéutica. Hipócrates, por ejemplo usaba el hielo para controlar hemorragias,y el Baron Larry, cirujano de Napoleón, utilizó la enfriamiento para operaciones quirúrgicas en soldados.

El uso potencial de la hipotermia como un tratamiento terapéutico ha promovido la búsqueda de fármacos que puedan disminuir la temperatura corporal, una posible vía podría ser la reducción de la variable controlada para la regulación de la temperatura corporal. Un ejemplo es el análogo de la Neurotensina NT77 capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y que induce hipotermia mediante una reducción en el mecanismo de producción de calor(7).

1.1.4.1 MÉTODOS DE ENFRIAMIENTO

En la práctica clínica y experimental son variados los métodos usados para causar una disminución en temperatura en algún miembro, o en todo el cuerpo.

A mediados del S XVII era muy común el uso del éter, para conseguir un enfriamiento local, un principio que aun se utiliza en la actualidad en forma de spray de cloruro de etilo.

También es muy popular la inmersión de un miembro en agua helada, por ejemplo, durante la reanimación cardiopulmonar (CPR) se consigue disminuir la temperatura timpánca (temperatura cerebral de 38 a 34 ° C en alrededor de 20 minutos). La inclusión via intravenosa o intraperitoneal de soluciones frías también se usa para enfriamientos rápidos (inoculando intracarotídeamente una solución Ringer a 4 °C se puede llegar hasta 30 °C en menos de 5 minutos).

En experimentación animal algunos investigadores inducen la hipotermia incluyendo al espécimen anestesiado en un ambiente frio, aunque no es fácil controlar la velocidad de enfriamiento.

El método de Tveita y col.(1996)(8) es a nuestro entender el más adecuado de entre los descritos en la literatura, para la inducción de la hipotermia en animales de laboratorio. Se insertan dos tubos de polietileno en forma de U uno en el esófago y otro en el intestino, por el interior de los cuales circula agua fría o caliente. Además se usa una mesa de operación de alumnio por debajo de la cual también circula agua Se obtiene un cambio en la temperatura de aproximadamete 1 °C/2,7 minutos

1.1.5 NIVELES DE HIPOTERMIA

Safar (9)propuso una primera clasificación que ha sido de gran importancia para la interpretación de los fenómenos observados durante la importancia ya que existe amplio consenso en el hecho de que el efecto de la hipotermia depende, en principio, de su magnitud.

Posteriormente Gentilello (1995)(4) propuso ordenar las zonas de severidad de estos niveles teniendo en cuenta los cambios fisiológicos que ocurren cuando la temperatura corporal disminuye. Se sabe que durante la hipotermia suave, se producen adaptaciones cardiovasculares para mantener constante la temperatura, sin que se produzcan desequilibrios importantes. A 32 °C aparecen alteraciones en la conductibilidad cardiaca, y a 28 °C aparecen severas arritmias. Por debajo de 28° C los mecanismos de producción y conservación de calor comienzan a fallar, y a 20° C prácticamente todos los pacientes se vuelven virtualmente asistólicos (Gentilello(5)).

Tabla 1.1. Niveles de hipotermia de acuerdo con su intensidad. Clasificaciones propuestos en la literatura por Safar (9) y Gentilello(4)

Niveles	*Según Safar*	*Según Gentilello*
suave	34-36° C	32-35° C
moderada	28-32° C	28-32° C
aguda		20-28° C
profunda	15-24° C	14-20° C
extrema	por debajo de 15° C	por debajo de 14° C

1.1.6 EFECTOS DE LA HIPOTERMIA

EFECTOS FISIOLÓGICOS:

Por efecto de la disminución de la temperatura se producen una serie de perturbaciones en todos los sistemas fisiológicos del individuo que alteran el normal funcionamiento de los órganos. Aun cuando todos los sistemas se interrelacionan y son afectados en distinto grado trataremos de esquematizar cómo la hipotermia afecta a cada uno de ellos.

Ciertos mecanismos de protección específicos de la hipotermia son mejor entendidos si se analizan desde el punto de vista de la función celular.

Existe consenso en afirmar que el principal efecto de la hipotermia es la disminución del metabolismo, y por ende, del consumo de O_2. En humanos la Q_{10} (cambio relativo en la tasa metabólica por cada 10

grados de cambio en temperatura corporal) equivale a aproximadamente 2,3. (10). Para un análisis más claro citaremos a Prakash (11) que señala que el consumo de O_2 se reduce un 6% por cada °C de disminución en la temperatura corporal. Como consecuencia en la célula nerviosa de un cerebro normal se observa un descenso del consumo de la glucosa a medida que desciende la tasa metabólica, no obstante el contenido de ATP no se modifica en la hipotermia.

Se ha encontrado que muchos enzimas esenciales (como el lactato deshidrogenasa (LDH), o el citocromo c reductasa) son sensibles a la temperatura y muestran una actividad óptima a medida que el pH se incrementa durante la hipotermia (12).

Belke y col.(13) señalan que existe un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular pero disminuye la producción de hidrogeniones, lo cual podría significar una alteración del pH citosólico.

Por otro lado, la formación de edemas tisulares observada durante la hipotermia, hace sospechar de la pérdida de la regulación iónica durante los descensos bruscos de la temperatura. También se ha descrito durante las hipotermia una disminución transitoria de la concentración de potasio, posiblemente por "compartimentalización" del ion, mas que por pérdida renal del mismo (14)

En ratas la vulnerabilidad del Sistema Nervioso frente a la hipotermia ha sido ampliamente estudiada. Se sabe que el metabolismo se hace más lento a medida que disminuye la temperatura. La tasa metabólica activa y basal disminuyen entre 3-7 % por cada °C reducido, por lo tanto decrece la demanda tisular de oxígeno(9). Se reducen, asimismo las actividades de varios receptores periféricos (15) y la velocidad de conducción de las fibras nerviosas.), así como el flujo cerebral (un 6%/ °C). En sujetos conscientes aparecen dificultades en el razonamiento y confusión cuando se disminuye hasta 32° C. A los 30° C los reflejos desaparecen y las pupilas quedan fijas en midriasis. El coma aparece a

los 26° C y el electroencefalograma es plano a los 20° C. Sin embargo, todos estos cambios son reversibles

Aun cuando la hipotermia es frecuentemente utilizada en cirugía para prevenir el daño cerebral (se afirma que una hipotermia moderada de 30-33 °C durante 24 horas es inocua en pacientes con traumatismo cerebral) se ha cuestionado que los efectos protectores de la hipotermia frente a isquemia sean permanentes. Dietrich y col. (16) en un modelo de isquemia cerebral en ratas encontraron una protección de un 50% cuando se inducía la hipotermia después de la isquemia, pero al analizar estos animales 2 meses después dicha protección había desaparecido. Esto les hizo suponer que la hipotermia post isquémica sólo protegía temporalmente, y que estas células nerviosas morían aunque más lentamente. No obstante, un experimento análogo usando hipotermia dentro del periodo isquémico demostró encontró una protección más duradera, (17) incluso hasta dos meses después (18).
Por otro lado, La hipotermia leve o moderada ha sido asociada clásicamente con el incremento de la señal nerviosa simpática, vasoconstricción periférica e incremento de la frecuencia cardiaca y la presión sistólica (19) han descrito que la hipotermia profunda no sólo disminuye el gasto cardiaco (que cae un 32% en animales a 20° C) sino también el flujo sanguíneo a los tejidos que varía según el tejido (un 14 % en la cola, 24 % en el flujo subcutáneo y hasta un 42 % en las extremidades inferiores). Por este motivo se asocia a la hipotermia con una redistribución del flujo cardíaco(20).

De otro lado las alteraciones en la microcirculación observadas en condiciones de hipotermia (reducción del flujo, incremento de la viscosidad, etc) también originan que exista una reducida disponibilidad de oxígeno por los tejidos (21).

Las arritmias constituyen otro efecto desfavorable, y se producen en enfermos cardíacos durante enfriamientos muy rápidos, acompañadas frecuentemente de fibrilación auricular. También se han descrito hemorragias y coagulopatías debidas al desajuste de la función plaquetaria (5)).

En animales conscientes el sistema cardiovascular resulta muy afectado, reaccionando con taquicardia e hipotensión por debajo de 26° C. En la microcirculación aparece sedimentación de los glóbulos rojos que originan hipoxia y acidosis a causa del aumento de la viscosidad de la sangre (un 2% por cada grado de temperatura). Por debajo de esa temperatura son comunes las arritmias, fibrilación auricular y bloqueos auriculo-ventriculares. A los 20°C aproximadamente aparece la asistolia que, junto con la fibrilación ventricular, suele constituir la causa específica de la muerte

Los efectos de la hipotermia sobre el sistema respiratorio son inhibidores. La hipotermia se asocia a un descenso de la frecuencia respiratoria (que puede llevar a un paro respiratorio),con la prolongación de los tiempos de inspiración y expiración. Sin embargo la presión parcial de oxígeno se mantiene estable indicando que el gasto cardíaco y el consumo de oxígeno disminuidos son los adecuados para las necesidades metabólicas

Entre otros efectos de la hipotermia sobre el medio interno se citan por ejemplo causar un retraso en la infiltración del neutrófilo y en la aparición del edema. en ratas inmaduras con traumatismo cerebral el tratamiento hipotérmico (22)mientras que en humanos se ha descrito que puede bloquear la producción de interleucina 1β (9).

EFECTOS FÍSICOS

Cambios en la viscosidad de la sangre.

Los efectos de la hipotermia sobre la viscosidad de la sangre se conocen desde hace mucho tiempo (23) describieron un incremento de hasta un 70% por encima del valor normotérmico en perros enfriados hasta 25° C. Las causas(24) que se señalan son, entre otras el efecto directo de la hipotermia sobre la viscosidad del plasma (y las proteínas), la hemoconcentración como resultado de una pérdida plasmática, así como la disminución del flujo. Poulos y col (1991) añaden además que la disminución de la temperatura conlleva un alteración de la deformabilidad celular en un estudio in vitro realizado a 30° C(24).

Aumenta la solubilidad de los gases

Cuando un gas se encuentra con un líquido, como el agua o el plasma, hay una tendencia natural del gas a disolverse. En el equilibrio la concentración del gas en el líquido está determinada por su presión parcial en el gas y por su solubilidad en el líquido, tal como lo describe la ecuación de Henry:

[Ec 1.1] $[Gas] = \beta_{gas} . P_{gas}$

Donde β es el coeficiente de Bunsen o de solubilidad (facilidad con la que un gas se disuelve en un líquido) que es específico del gas a una temperatura dada, y P es la presión parcial del gas. La solubilidad es pues inversamente proporcional a la temperatura del líquido.

DESPLAZAMIENTO DE LA CURVA DE DISOCIACIÓN DE LA HEMOGLOBINA.

El efecto de la disminución de temperatura sobre las propiedades de la proteína transportadora de oxígeno en la sangre se manifiestan en que la curva de disociación de la oxihemoglobina se desplaza hacia la izquierda.

El punto de neutralidad del agua (pN H_2O) se incrementa a medida que disminuye su temperatura. Recordemos que el punto de neutralidad del agua se alcanza cuando la concentración de ambos iones en los que se halla disociada igualan sus concentraciones:

[Ec 1.2] $H2O \Leftrightarrow H^+ + OH^-$

[Ec 1.2] $K'_w = [H^+] [OH^-]$

[Ec 1.3] $p K'_w = pH + pOH$

[Ec 1.4] $neutralidad pH = pOH$

[Ec 1.5] $\frac{1}{2} p K'_w = pN$ (de las ecuaciones 1.3 y 1.4)

Tabla 1.2. Valores del producto iónico y del pH neutro del agua (pK'w y pN respectivamente) a diferentes temperaturas. Adaptado de : West (1971)(25).

T (° C)	pK'w	pN	-dpN/dt
0	14,943	7,472	0,0210
5	14,734	7,367	0,0199
10	14,535	7,267	0,0191
15	14,344	7,172	0.0177
20	14,167	7,083	0,0171
25	13,996	6,998	0,0163
30	13,833	6,916	0,0153
35	13,680	6,840	

1.1.7 IMPORTANCIA TERAPÉUTICA: APLICACIONES EN CIRUGÍA

La hipotermia constituye inequívocamente una modalidad de tratamiento bien afianzada en el manejo clínico. La hipotermia intraoperativa se usa para limitar el daño celular durante las cirugías neurológicas y cardiovasculares. Asimismo se ha extendido su uso como tratamiento después de una lesión traumática o isquémica para inhibir el daño neuronal.

La importancia del estudio en este campo es evidente. Más aun los órganos destinados al transplante deben superar no sólo una hipotermia profunda, sino además condiciones de hipoxia e isquemia. En este estado se desencadena una secuencia de factores, la mayoría desfavorables, entre los que se cuenta la pérdida de carga energética, que conducen a la lesión celular y a comprometer la viabilidad de la célula y, a un nivel mayor del órgano. La optimización del estado de éste vendrá condicionado por la manipulación previa a su extracción y por las condiciones de almacenaje. Unas y otras deben minimizar los efectos negativos que la temperatura y las limitaciones de oxígeno y de nutrientes puedan producir sobre el estado fisiológico de los tejidos. A esto se ha de agregar los cambios debidos a la perfusión, recalentamiento y reoxigenación del órgano una vez transplantado.

Estudios en hipotermia intraisquémica (también llamada isquemia fria) señalan que este protocolo previene la insuficiencia en la perfusión microcirculatoria causada por los radicales libres en la fase de reperfusión, y evita el incremento de la resistencia vascular. A nivel neuronal se ha descrito que el efecto protector de la hipotermia podría deberse a una disminución de la liberación de neurotransmisores, o bien, a una disminución de la entrada de Ca^{++} a las células, además de una disminución en la peroxidación lipídica y de la producción de

radicales libres de oxígeno (RLO) (26). Yager(27) sugiere además que el nivel de hipotermia es condicionante del nivel de protección y depende a su vez de la preservación del ATP, ADP y fosfocreatina. A 31°C se observa neuroprotección total con preservación total de las reservas de ATP y de fosfocreatinina, mientras que a 34 °C sólo existe protección parcial y se observa una disminución de la concentración de ATP, comparable al control normotérmico. La conservación del ATP parece indispensable para la recuperación del metabolismo en el recalentamiento (27).

Es por tanto necesario ahondar en el estudio de los efectos de la hipotermia. Si bien los diferentes estudios realizados en cultivos celulares y órganos in vitro pueden arrojar cierta luz sobre las incógnitas que encierra la hipotermia, el estudio del efecto de este modelo en un animal entero, de mayor complejidad, en el que se manifiesten las interacciones de los diferentes fluidos intra y extracelulares y de los diferentes tipos celulares integrados en sistemas, pueden reflejar más fielmente las consecuencias reales de la hipotermia profunda en un organismo

1.1.8 COMPLICACIONES DE LA HIPOTERMIA

Se han descrito efectos desfavorables inducidos por la hipotermia. Entre las complicaciones de la hipotermia más descritas se pueden señalar las siguientes: alteraciones del equilibrio ácido/básicos, coagulopatías, arritmias como fibrilación ventricular, más frecuentes cuando la temperatura corporal desciende por debajo de 30° C (especialmente si además hay hipercapnia), e hipoxia tisular. Durante la hipotermia en todos los casos se desarrolla una infiltración grasa en el miocardio, los tubulos renales, las glándulas suprarrenales y el hígado. En muchos órganos aparecen infartos múltiples debidos, presumiblemente, a hipoxia, acidosis o coagulación intravascular. Algunos efectos nocivos se

deben mas frecuentemente a la fase de recalentamiento que a la hipotermia. Se ha encontrado que tras exposiciones muy prolongadas al frío, se produce un colapso circulatorio durante el recalentamiento, posiblemente relacionado con el incremento de los ácidos grasos descrito en la fase de hipotermia que interfiere con la recuperación del metabolismo en la fase de recalentamiento.

1.2 *HEMODINÁMICA Y APORTE DE OXÍGENO.*

1.2.1 QUIMICA FÍSICA DE LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS

Los fluidos biológicos incluyen 3 componentes fundamentales: **agua, electrolitos fuertes y electrolitos débiles.(28)** Los electrolitos fuertes se encuentran siempre disociados completamente (ionizados), mientras que los electrolitos débiles sólo están ionizados parcialmente, en estados de equilibrio caracterizados por sus constantes de disociación (Kd). Los electrolitos débiles de mayor interés son sin duda las proteínas, el sistema ácido carbónico/bicarbonato, y el agua, mientras que los iones fuertes inorgánicos más importantes y presentes en mayores concentraciones, aunque muy variables, son el sodio y el cloruro. También existen "iones fuertes" orgánicos como el lactato.

TRES LEYES FUNDAMENTALES:

1. Las constantes de disociación de todos los electrolitos en una solución deben cumplirse simultáneamente.
2. Se debe cumplir siempre la electroneutralidad, esto es que la suma de todas las cargas positivas debe ser equivalente a la suma de todas las cargas negativas: $\Sigma+=\Sigma-$.
3. La masa se mantiene constante.

1.2.1.1 NEUTRALIDAD, ALCALINIDAD Y ACIDEZ.

En el agua pura los únicos iones presentes son H^+ y OH^-. La electroneutralidad requiere que

[Ec 1.6] $[H^+] = [OH^-]$

Recordemos que el agua es un electrolito débil, apenas disociado. El producto de $[H^+]$ $[OH^-]$ es la constante K'_w que expresa el equilibrio de

disociación del agua que además varia con la temperatura; así tenemos que a 25 ºC la K'_w es igual a 1,008* X 10^{-14}.(*se aproxima a 1)

[Ec 1.7] $K'_w = [H^+][OH^-] = 1x\ 10^{-14}$ (mol/L)

Usando las ecuaciones 1 y 2 podemos despejar cualquiera de las dos variables que como ya dijimos, para el presente caso son iguales, y tenemos:

[Ec 1.8] $\sqrt{[H^+]^2} = \sqrt{(1\times10^{-14})}$

[Ec 1.9] $[H^+] = 1X10^{-7}$mol/L

De esta última ecuación obtenemos que a 25ºC el antilogaritmo negativo de $[H^+]$ es 7, Recordemos que pH = -log $[H^+]$) de lo cual se deduce que el agua es, además de eléctricamente, químicamente neutra. Sin embargo el agua se disocia un poco más a 37° C, en este caso es igual a K'_w =2.5X10^{-14}. Ahora la $[H^+]$ es un poco más alta 1,58X10^{-7} mol/L, y el pH es 6,8, pero el agua continua siendo químicamente neutra.

PH Y CONCEPTO DE NEUTRALIDAD

Rhan en 1974 señaló que el valor de referencia para el pH parece ser la neutralidad electroquímica, esto es cuando pH=pOH(11).

Dicho de otro modo, en condiciones no isotérmicas, para un sistema ácido base acuoso como el intracelular, el valor de pH por sí mismo no es un criterio de neutralidad, acidez o alcalinidad. Austin y Cullen en 1925 fueron los primeros en señalar el marcado efecto de la temperatura sobre la constante de disociación del agua, y por ende sobre la neutralidad y que para definir el estado ácido-base se hacia necesario tener en cuenta las actividades de los iones H^+ y OH^-. Experimentos posteriores demostraron que el pH plasmático (pHp), siempre más alcalino que el agua (pN), varía de forma paralela con la

temperatura. Esto permite comprender la definición de la alcalinidad "relativa" del medio extracelular en relación con el agua (y en particular con el plasma) y la de su constancia a temperatura variable desarrollada por Rahn (29)Cualquiera que sea la temperatura, la diferencia pHp –pN permanece igual a 0,6 y traduce esta alcalinidad relativa

Recordemos que :

[Ec 1.10] $\log [OH^-]/[H^+] = pH - pOH$

[Ec 1.11] $pOH = 2\,pN - pH$

Ec 1.12] $\log [OH^-]/[H^+] = 2\,pN - pH$; ó

[Ec 1.13] $[OH^-]/[H^+] = 10^{2(pH-pN)}$

La neutralidad equivale entonces :

pH = pN

pH – pN = 0

Reeves y Rahn (30)()(29) encontraron que las alteraciones en el pH sanguíneo de peces, anfibios y tortugas variaban en el rango de 0,016-0,018U/° C (para una temperatura corporal de entre 5 y 35°C). De otro lado, estudios comparativos demostraron que, tanto in vivo como in vitro el ratio $[OH^-]/[H^+]$ se mantenían constante en la sangre de muchos animales ectotérmicos a diferentes temperaturas(30).

Basados en estas observaciones dejaremos de lado los términos clásicos de acidez y basicidad cuando se trate de animales mantenidos a temperaturas diferentes de 37° C, ya que como hemos visto es más adecuado referirnos a la relación $[OH^-]/[H^+]$.

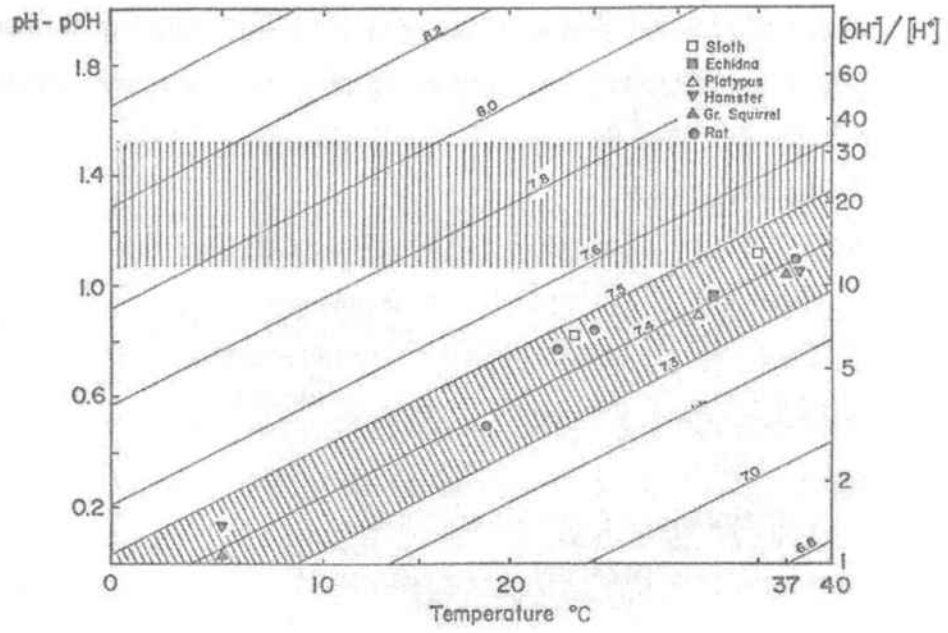


Figura 1.1. Comparación de los valores de pH de sangre de mamíferos y poiquilotermos como una función de la temperatura corporal. Zona sombreada superior representa a los animales de sangre fría mientras que la zona inferior (oblicua) representa a los valores de la sangre de mamíferos Fuente(30)

1.2.2 INTERCAMBIO GASEOSO Y VENTILACIÓN. PRINCIPIOS FÍSICOS

1.2.2.1 PRESIÓN PARCIAL:

A nivel del mar la presión atmosférica es 760 mmHg. Analizando su composición obtenemos que el aire seco esta compuesto de :

Nitrógeno (N_2)	.....	78,08 %
Oxígeno (O_2	.....	20,95 %
Argón	.....	0,93 %
CO_2	.....	0,03 %

Además de trazas de Neón, Helio, Kriptón, Xenón, Hidrógeno, Oxido Nítrico y metano.

La presión parcial de un gas se define como el aporte de la fricción de las moléculas de éste sobre la presión total ejercida por la mezcla. Así tenemos que la presión parcial del Oxígeno, el "aporte" de tensión de sus moléculas en la presión del aire atmosférico viene dado por:

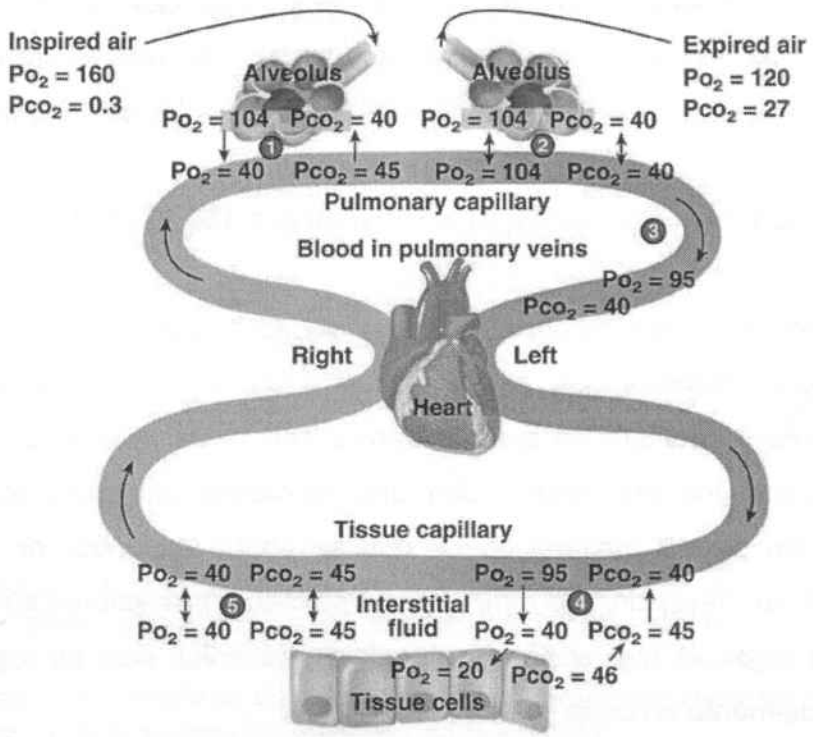
[Ec 1.14] (20,95/100) X 760 mmHg = **159,22** mmHg

El aire que entra en el sistema respiratorio difunde del alvéolo hacia la sangre, mientras que el CO_2 difunde desde los capilares hacia el alveolo y equilibra su presión parcial con la del aire alveolar cuando atraviesa los pulmones.. Con una hipotética eficiencia absoluta, la presión parcial máxima de O_2 que se podría encontrar en el alveolo seria no mayor de 160 mmHg pero realmente sus valores son bastante más bajos ya que el aire dentro de los alvéolos sólo es reemplazado parcialmente en cada inspiración.

Como ya se indicó arriba los gases se disuelven fácilmente en los líquidos obedeciendo la ley de Henry.

Siendo el coeficiente de solubilidad específico para cada gas tenemos que en la mezcla acuosa, el CO_2 es aproximadamente 24 veces mas soluble que el O_2 de ahí que viaje principalmente disuelto en el sangre mientras que el oxígeno necesite ir ligado a la hemoglobina

Figura 1.2. .Esquema del intercambio gaseoso arterio-venoso. Las presiones parciales de oxígeno (PO_2) y dióxido de carbono (PCO_2) en mmHg se muestran tanto a nivel de vasos principales, como a nivel alveolar (arriba) y tisular (abajo).



1.2.2.2 DIFUSIÓN DE GASES A TRAVÉS DE LÍQUIDOS.

1.2.3 PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA OXIGENACIÓN.

1.2.3.1 HEMOGLOBINA Y TRANSPORTE DE OXÍGENO

El O_2 es transportado en sangre básicamente por dos vías, la mayoría se encuentra unido a la hemoglobina (Hb,, 98.5%) mientras que sólo una pequeña fracción viaja disuelto en el plasma (1.5%).

La curva de disociación hemoglobina- oxígeno (CDO) muestra que la Hb se encuentra casi totalmente saturada cuando la PO_2 es de 80 mm Hg o superior mientras que a presiones más bajas la Hb libera el oxígeno.(ver 1.6.1.1.6)

Fracción de la oxihemoglobina (F O_2Hb)(31)

La F O_2Hb: se define como la relación entre las concentraciones de la oxihemoglobina (O_2Hb) y la Hb total. Generalmente se expresa en porcentaje: La F O_2Hb puede encontrarse disminuída en casos de captación de oxígeno deficiente, por la presencia de dishemoglobinas, o por la desviación a la derecha de la CDO.

Fracción de la carboxihemoglobina (F COHb)

La F COHb en cambio, describe la relación entre las concentraciones de COHb y el contenido total de Hb. Normalmente se encuentran valores por debajo del 2% pero se puede encontrar más elevada, por ejemplo, en los fumadores crónicos que pueden presentar hasta el 10%.

Fracción de la metahemoglobina (F MetHb)

La metahemoglobina se forma cuando el ion ferroso (Fe^{2+}) del grupo hemo se oxida a férrico (Fe^{3+}). La MetHb es incapaz de conbinarse con el oxígeno,

1.2.3.2 CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y CURVA DE DISOCIACIÓN Hb-O_2 (CDO)

Oxígeno disuelto

El coeficiente de Bunsen del oxígeno en la sangre a 37° C es de 2,4 ml de O_2 por 100 ml de sangre por atmósfera de presión de oxígeno. Si consideramos una presion parcial de oxígeno de 95 mmHg tendremos que :

2,4 x 95/ 760 = 0,3 ml O_2/ 100 ml de sangre.

Esto es sólo el 0,3 % vol O_2 se encuentra en forma de oxígeno disuelto (veáse también 1.9.2).

Saturación de O_2 (SO_2)

La saturación de oxígeno se define como la relación entre las concentraciones de O_2Hb.y la suma de oxihemoglobina + la dishemoglobina presente, si la hay. La sO_2 nos indica la proporción de hemoglobina oxigenada en relación con la cantidada de Hb capaz de transportar O_2.

Concentración de oxígeno (ct O_2) y Curva de disociación Hb-O_2 (CDO).

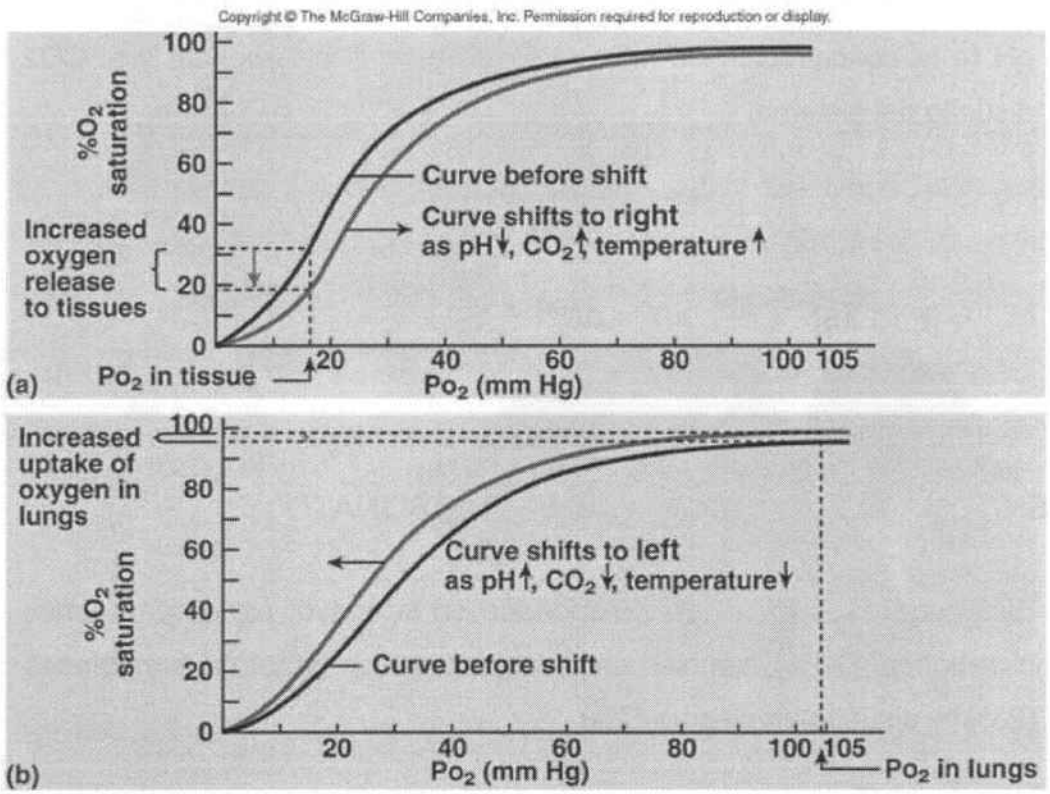
La ct O_2 es una expresión de la capacidad de transporte de O_2 de la sangre. Integra los efectos tanto de los cambios en la PO_2 arterial, así Una desviación hacia la derecha de la CDO, (causada por ejemplo por acidosis) facilita la cesión de oxígeno a los tejidos.

Una desviación a la izquierda de la CDO, facilita la captación de oxígeno en los pulmones, especialmente en situaciones con una PO_2 baja.

Si representamos los cambios en la PO_2 vs. el porcentaje de saturación de O_2 obtenemos la curva de disociación Hb-O_2 (figura 1.3)

Las reglas generales para la interpretación de la CDO se resumen en la figura 1.3.

Figura 1.3. Esquema representativo de los desplazamientos de la CDO de oxígeno cuando varían las concentraciones de CO_2, el pH y la temperatura.



1.2.4 CONCENTRACIÓN DE HIDROGENIONES [H+] y pH EN SANGRE ARTERIAL

Los hidrogeniones son producidos y excretados continuamente. La mayor acumulación se debe en principio a la producción metabólica del CO_2 que reacciona con el agua formando H^+ y iones bicarbonato, También se producen hidrogeniones como resultado de la formación de ácidos orgánicos, como el ácido láctico (al final del metabolismo

anaerobio), el cual se disocia casi por completo en condiciones de pH fisiológico. Tras el catabolismo de algunas proteínas se pueden producir además ácidos inorgánicos como el sulfúrico y fosfórico.

Ecuación de Henderson y Hasselbach: Es la ecuacuón que relaciona el pH (o la concetración de hidrogeniones) con el bicarbonato y el CO2 disuelto del sistema.

[Ec 1.15] $$pH = pK' + \frac{\log\left(HCO_3^-\right)}{(\beta CO_2)(PCO_2)}$$

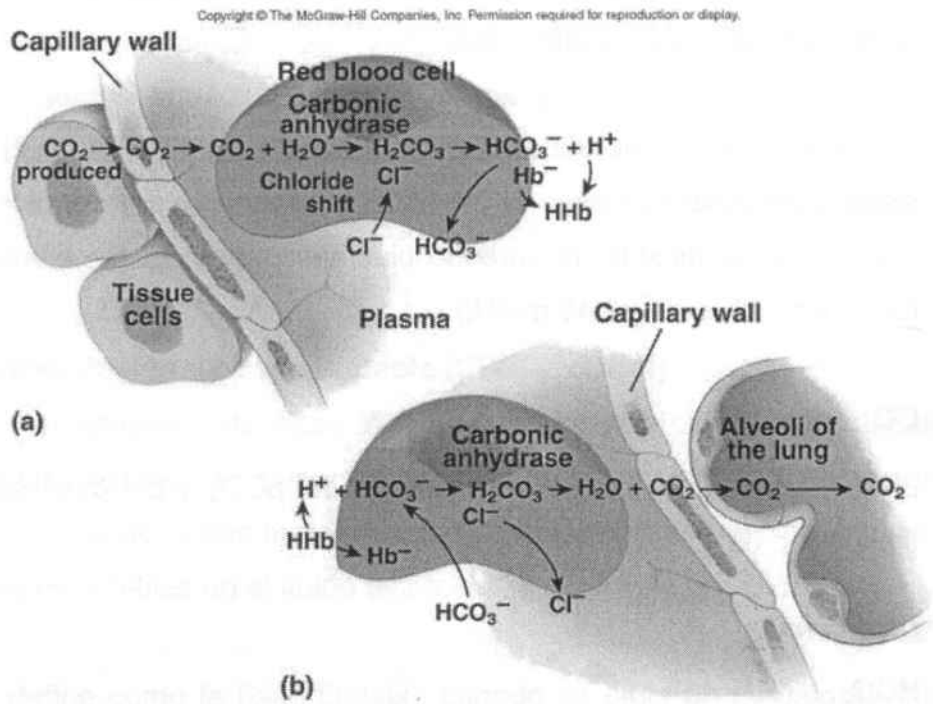
.SISTEMA ÁCIDO CARBÓNICO/ BICARBONATO :

El dióxido de carbono es transportado en su mayor parte como iones bicarbonato (70%), también en combinación con proteínas sanguíneas (23%) y disuelto en plasma (7%)

El CO_2 es producido en las células y difunde desde los tejidos hacia la sangre, es transportado por la circulación hasta alcanzar los alvéolos en donde difunde nuevamente a través de la superficie respiratoria hasta el medio ambiente.

El dióxido de carbono reacciona con el agua al interior de los eritrocitos para formar ácido carbónico, un ácido débil que se disocia formando bicarbonato y carbonato

Figura 1.4. Representación del intercambio gaseoso entre las células y el eritrocito (a) donde se realizan las reacciones del sistema CO_2. En la parte inferior se representa el intercambio gaseoso del eritrocito y el alveolo pulmonar(b).



La proporción de CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-} en solución depende del pH, la temperatura y la fuerza iónica de la solución. En la sangre la relación de estos iones es 1000:20000:1 respectivamente, de lo cual se deduce que el bicarbonato es la forma predominante del CO_2 en sangre.

•La hemoglobina que ha liberado O_2 se une más fácilmente al CO_2 que la hemoglobina que tiene el oxígeno aún unido a ella (efecto Haldane)(32)

•En los capilares tisulares, el dióxido de carbono se combina con agua del interior de eritrocito para formar el ácido carbónico el cual se disocia para formar iones bicarbonato y H^+.

•En los capilares pulmonares, los iones bicarbonato y H^+ se mueven al interior de los eritrocitos y los iones Cl. se mueven hacia fuera. Los iones bicarbonato se combinan con los H^+ para formar ácido carbónico. Este se convierte a dióxido de carbono y agua. El dióxido de carbono se difunde fuera de los eritrocitos.

•El incremento del dióxido de carbono hace caer el pH sanguíneo. El sistema respiratorio regula el pH sanguíneo mediante la regulación de los niveles de dióxido de carbono plasmáticos. pCO_2: En humanos el rango normal es de 35-48 mmHg

CO_2 disuelto:

El CO_2 disuelto en el plasma depende del pCO_2 y del coeficiente de solubilidad del CO_2

Bicarbonato.

HCO_3^-

La concentración de bicarbonato en plasma se calcula utilizando los valores de pH y pCO_2.(ver la ecuación de Henderson- Hasselbalch Ec 1.15) Aun cuando algunas veces se usa para medir indirectamente la acumulación de ácido o base, como se verá más adelante, el cBEcf es una medida mucho más directa. Su determinación tiene importancia porque pertenece al grupo de los electrolitos, junto con Na^+, K^+, etc.

Bicarbonato estándar (SBC)

El bicarbonato estándar fue definido por Jørgensen y Astrup como la concentración de bicarbonato de sangre equilibrada con una mezcla de gas a pCO_2 de 40 mmHg (5,33 kPa) mantenida a 37° C ($pO_2 \geq 100$), según Sigaard-Andersen, (1995)(33) este valor se puede considerar

obsoleto, aun cuando todavía aparece reflejado en las mediciones de la mayoría de analizadores de gases.

Exceso de base (**ABE o BE)** (Rango normal ± 2 mmol/L)
En la práctica el exceso de base, se calcula a partir de pH, pCO_2 y ctHb usando la ecuación de Van Slyke (34). Durante los cambios respiratorios agudos el exceso de base de la sangre entera, o del plasma cambia suavemente debido a una redistribución de los iones H^+ mientras que el exceso de base extracelular (ver más adelante) permanece constante.

Concentración de base titulable (SBE, o cBEcf):
La concentración de base titulable en el fluido extracelular, también llamado exceso de base extracelular es la medida de alteraciones ácido-base de origen metabólicos tales como la acumulación de ácido o base no volátiles en el fluido extracelular.

Se define como la base titulable cuando se titula un modelo de fluido extracelular hasta pH 7,40 a pCO_2 = 5,33 kPa y 37° C (sin cambios en la concentración de O_2 total). El modelo de fluido extracelular se define como la sangre diluida 3 veces (una parte de sangre con dos partes de plasma). La cBEcf es el exceso de base en el líquido extracelular total, donde la sangre representa ⅓. Las capacidades tamponadoras varían en los compartimentos extracelulares, lo cual hace que esta variable sea más representativa del exceso de base *in vivo* que el EB (o ABE). El exceso de base extracelular es el indicador más relevante de la acidosis o la alcalosis metabólica (35) y se debe interpretar siempre en relación con la pCO_2 y el pH.

Compuesto Carbámicos.

Una pequeña cantidad de CO_2 reacciona con los grupos —NH_2 de las proteínas, especialmente de la Hb y forma compuestos carbámicos, (proteína—NHCOOH).

Concentración total de CO_2

La suma de todas las formas de CO_2 en sangre, es decir el CO_2 molecular, $H_2CO_3^-$, HCO_3^-, CO_3^{2-} y compuestos carbámicos se considera como la concentración total del CO_2 en sangre.

1.2.5 PARÁMETRO METABÓLICOS: LACTATO

El lactato se forma a partir del piruvato cuando la cantidad de oxígeno disponible por la célula es limitada, como ocurre en el músculo durante el ejercicio intenso. La reducción de piruvato por el NADH para formar lactato está catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH).

[Ec 1.16] $\text{Piruvato} + NADH^+ + H^+ \longrightarrow \text{L-Lactato} + NAD^+$

La reacción global de la conversión de glucosa a lactato es:

[Ec 1.17] $\text{Glucosa} + 2\,P_i + 2ADP \longrightarrow 2\ \text{Lactato} + 2ATP + 2H_2O$

1.2.6 PRINCIPALES ELECTROLITOS. CONCEPTO DE SID

1.2.6.1 ELECTROLITOS FUERTES

Retomemos los conceptos introducidos brevemente en el apartado 1.4.1. Los electrolitos fuertes son aquellos que están completamente disociados y químicamente no reactivos, tales como el Sodio (Na^+), Potasio (K^+), Calcio (Ca^{2+}), Magnesio (Mg^{2+}), Cloro (Cl^-), y sulfatos (SO_4^{2-})

1.2.6.2 ELECTROLITOS DÉBILES

Son aquellos que no se encuentran disociados completamente, y se pueden dividir a su vez en:

Volátiles:

- El sistema CO_2 (CO_2 molecular disuelto en equilibrio con H_2CO_3, y sus productos de disociación)
- El sistema amonio (NH3 + H+ ↔ NH4+).

No volátiles:

- H_3PO_4 y sus productos de disociación.
- Proteínas: HP ↔ H+ + P-

1.2.6.3 DIFERENCIA DE IONES FUERTES (SID)

En un flluído parecido al plasma sanguíneo la electroneutralidad se puede representar de la siguiente manera:

[Ec 1.18] $$[Na^+] + [K^+] + [Ca^{2+}] + [Mg^{2+}] + [H^+] = [OH^-] + [Cl^-] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] + [Alb^{x-}] + [Pi^{y-}]$$

Donde $[Alb^{x-}]$ y $[Pi^{y-}]$ son la albúmina y el fosfato inorgánico respectivamente (ambos de carga negativa).

De aquí surge el concepto de la "diferencia de iones fuertes" (strong ion diference" o SID) que representa la diferencia entre la suma de todos los aniones fuertes y la suma de todos los cationes fuertes. De aquí tenemos que:

[Ec 1.19] **SID** = ($[Na^+] + [K^+] + [Ca^{2+}] + [Mg^{2+}]$) – ($[Cl^-] + [HCO_3^-]$ + [otros aniones fuertes, ejemplo Lactato])

1.2.7 HIPOTERMIA Y REGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE

El equilibrio ácido base y, sobre todo el pH, son los valores determinantes fundamentales de la homeostasis. Cuando la temperatura central del individuo cambia, el pH y el equilibrio ácido base también. Estos cambios son consecuencia por una parte de las modificaciones fisicoquímicas ligadas a la temperatura y a efectos sobre los sistemas tampón y sobre las proteínas y, por otra parte, a las adaptaciones fisiológicas de las diferentes funciones esenciales, por ejemplo el metabolismo, la frecuencia y el rendimiento cardíaco, o la actividad endocrina(36).

1.2.7.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL PH SOBRE LA CDO.

Como ya se dijo la afinidad de la Hb por el O_2 depende de las condiciones al interior de eritrocito. La curva CDO se desviará hacia la izquierda si hay un incremento en el pH, una disminución en la concentración de CO_2, o por una disminución en la temperatura, en la concentración de fosfatos o de ATP al interior celular, (ver Figura 1.3) Todos estos factores originan por tanto un incremento en la habilidad de la hemoglobina para retener el oxígeno. Por otro lado, la desviación de la curva hacia la derecha se presentará como consecuencia de una

disminución del pH, un aumento del CO_2, o un incremento en la temperatura causando una disminución de la capacidad de la hemoglobina para retener el oxígeno.

1.2.7.2 ALTERACIONES DE LAS CONSTANTES DE SOLUBILIDAD DE LOS GASES.

La constante de solubilidad es una medida de la facilidad con la que un gas se disuelve en un líquido. Es específica para el gas y el líquido y varía con la temperatura a la cual se encuentre. Por ejemplo, a la misma temperatura, el CO_2 es aproximadamente 24 veces más soluble en el agua que el O_2. (Coeficiente de solubilidad del O_2 es 0,00364 a 20° C, y 0,00282 a 37° C)

Tabla 1.3: Variaciones del Coeficiente de solubilidad del CO_2 en plasma en ml gas/ml fluido a 760 mmHg a diferentes temperaturas

T°	Coeficiente	mM/mmHg
19	0,810	0,047686
20	0,787	0.04675
21	0,767	0,04556
37	0,515	0,03052

DIOXIDO DE CARBONO (CO_2): (11)

Ya que, como ya se mencionó anteriormente la mayor proporción de CO_2 se haya disuelto en el plasma analicemos que sucede con éste durante la hipotermia. Cuando un animal se enfría, la producción de CO_2 del organismo disminuye. Si la ventilación se mantiene fija, entonces la tasa de eliminación de CO_2 será la misma, de ahí que el volumen de CO_2 disuelto en la sangre empezará a bajar ya que la eliminación excede a su

producción. Pero a medida que el volumen cae, la presión parcial del gas (pCO_2), y por consecuencia, el gradiente de concentración que causa la eliminación del CO_2, también caerán lo cual originará una disminución en el volumen de CO_2 eliminado. Estos dos procesos continuarán desarrollándose hasta que la temperatura, y por ende la tasa de producción de CO_2 , se estabilice, y la tasa de eliminación se equilibre con ella.

El panorama es aun más complejo, porque a estos fenómenos se suman los cambios en la solubilidad del CO_2 inducidos por la hipotermia. Como ya se ha mencionado la solubilidad del CO_2 aumenta casi linealmente conforme disminuye la temperatura.

El resultado neto de estos factores opuestos es que a menos temperatura las tasas de producción y eliminación de CO_2 caen, así como la presión arterial del CO_2, pero a esta presión disminuída el volumen de CO_2 disuelto en la sangre es mayor, de hecho, es aproximadamente el mismo que en normotermia y con una Pa CO_2 más alta. De esta manera las reservas de CO_2 no varían en volumen, mientras que la concentración de HCO_3^- plasmático permanece constante aun cuando como consecuencia de la hipotermia la Pa CO_2 descienda y el pH suba.

1.2.8 PH Y SU RELACIÓN CON LA TEMPERATURA. ESTRATEGIAS DE ANIMALES ECTOTERMOS E HIBERNANTES

A medida que los ectotermos se enfrían o calientan, ciertas propiedades de la sangre y tejidos se mantienen constantes y presumiblemente reguladas, mientras que el pH y la pCO_2 quedan modificados para mantener la homeostasia. Muchos años de observación y análisis de las estrategias empleadas por estos animales durante los períodos en los cuales sufren una disminución de su temperatura corporal han llevado a

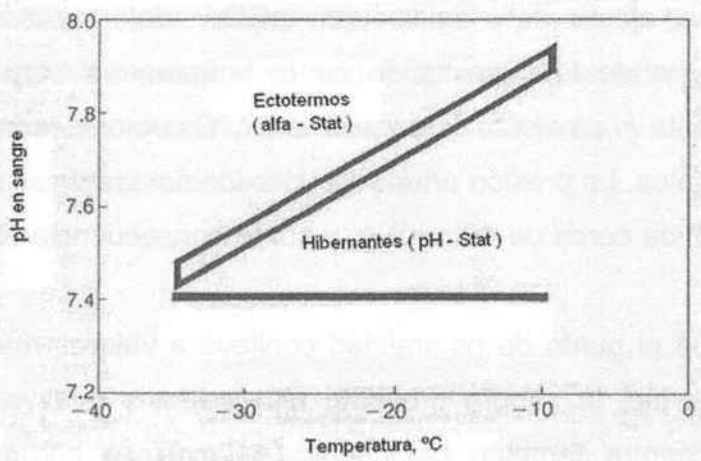
los científicos a intentar simular estos mecanismos en el control del equilibrio ácido-base en sujetos hipotérmicos. Éstas estrategias se describen a continuación.

Ectotermos: Su temperatura corporal depende de la de su entorno, en un ambiente frío se observa que el pH sanguíneo varía inversamente con la temperatura, del mismo modo que la PCO_2 se incrementa con la temperatura, por ejemplo en tortugas. La relación entre el pH y la temperatura se puede obedece en la siguiente relación:

[Ec 1.17]. $dpH/dT = -0.015\text{-}0.018$ U/ °C (dependiendo de la especie)

Hibernantes: mamíferos que de modo espontáneo sufren una hipotermia profunda (Tc menor a 10° C). La variación del pH en relación con la temperatura no es evidente.

Figura1.15: Variaciones del pH durante el enfriamiento en animales ectodermos e hibernantes



1.2.9 CONTROL DEL EQUILIBRIO ÁCIDO BASE EN PACIENTES HIPOTÉRMICOS.

La PCO_2 y el pH están interrelacionadas, y sus valores dependen del tipo de estrategia usada para el mantenimiento del balance ácido base en pacientes hipotérmicos(30). El mantenimiento de un equilibrio ácido base apropiado es particularmente importante cuando la temperatura corporal desciende mas de 3° C a 5° C en homeotermos.

Existen 3 posibles vías de manejo del equilibrio acido-base de acuerdo con (Becker, 1981)(37):

1. Mantener el pH en 7,4 independientemente de la temperatura del paciente: pH stat:
2. Mantener el pH en 7,4 tal como se mide únicamente a 37 °C: alfa-stat:
3. Estrategia alcalina.

PH STAT:

Esta estrategia ajusta el valor de pCO_2 de manera que independientemente de la disminución de la temperatura corporal se mantenga constante *in vivo* cuando se mida a 37 °C como sucede en los animales hibernantes. La presión arterial del dióxido de carbono ($pCO_{2(a)}$) ha de ser mantenida cerca de 40 mmHg, y como consecuencia el pH se mantiene a 7,4.

Considerando que el punto de neutralidad conlleva a valores más altos de pH en hipotermia, la sangre presenta una acidosis relativa (pH < 7,40), y se encuentra también hipocápnica cuando se corrige a la temperatura real (pH < 35-40 mm Hg). Con ello se pretende compensar el desplazamiento de la CDO a la izquierda inducido por la hipotermia, mejorando la oxigenación.

ALFA STAT:

Esta estrategia de otro lado consiste en ajustar la $pCO_{2(a)}$ de modo que el pH se mantenga a 7,40 independientemente de la temperatura del paciente (y de la sangre). En pacientes hipotérmicos se consigue mediante la adición de CO_2 en el aire inspirado durante el enfriamiento a fin de conseguir ese aumento en la presión de CO_2. Esta misma sangre está acidótica e hipercápnica si se mide a 37° C (pH < 7,35-7,40; pCO_2 > 40 mm Hg).

De acuerdo a esta estrategia el pH sanguíneo y el pCO_2 cambian con la temperatura en la misma medida que los animales ectotermos (38), (39), (40), (41), (42) .

ESTRATEGIA ALCALINA:

Esta estrategia es menos popular en la literatura y se basa en mantener el pH siempre superior a 7,4 tal y como se mide a 37 °C.

Los defensores de la estrategia alpha stat, critican la regulación pH stat por causar estrés ya que induce una acidosis de tipo respiratorio. Los más recientes estudios coinciden en señalar la estrategia alfa stat como la que mejor preserva las funciones celulares, y de algunos sistemas como por ejemplo el cardiovascular.

1.3 *ESTRÉS OXIDATIVO*

1.3.1 CONCEPTO:

Clásicamente se defina el estrés como la respuesta del organismo desarrollada a lo largo de la filogenia ante aquellos agentes que ponen en peligro su integridad.

La célula es también susceptible al estrés ya que se encuentra sometida a diferentes estímulos físicos y químicos provenientes del medio extracelular, o de células adyacentes, de los mecanismos de respuesta frente a éste dependerá su supervivencia. Los mecanismos celulares puestos en marcha dependerán del tipo e intensidad del estímulo así como del tipo celular.

Existen ciertas características que pueden hacer que este microambiente suponga un estrés para la célula: factores xenobióticos como radiaciones ionizantes (UV, rayos X), tabaco, alcohol y, factores endógenos como alteraciones del balance redox, perturbaciones del ciclo celular o el **oxígeno**. Aunque hace mas de 200 años que se sabe que el oxígeno es tóxico, la importancia clínica de la toxicidad del oxígeno no fue valorada sino hasta la aparición de la fibroplasia retrolenticular epidémica descrita a finales del siglo XX (43). El oxígeno a altas presiones parciales es pues tóxico para los sistemas respiratorio, cardiovascular, nervioso y gastrointestinal. Esta toxicidad se debe a la formación de los *radicales libres de oxígeno (RLO)*.

La peroxidación lipídica es una oxidación en cadena iniciada por los radicales libres sobre lípidos no saturados. Debido a que estos lípidos son elementos constitutivos de las membranas celulares este daño oxidativo tiene el peligro potencial de afectar muchas funciones celulares. Algunos de los productos de la lipoperoxidación se difunden fácilmente más allá del punto inicial del ataque de los radicales.

La producción de lipoperóxidos interfiere en la regulación de muchas vías metabólicas (Wilhelm, 1990(44))

1.3.2 RADICALES LIBRES

Los radicales libres son moléculas que poseen uno o más electrones desapareados y altamente reactivos, lo que se refleja claramente en su tiempo de vida media que puede ir desde 10^{-8} hasta 10 segundos (45). Los radicales libres de oxígeno (RLO) son producidos continuamente en el interior de las células, por reacciones de oxido-reducción. Hasta un 10% del oxígeno disponible en el cuerpo se encuentra en forma de radicales libres producidos por la transferencia de electrones durante la reducción del agua.

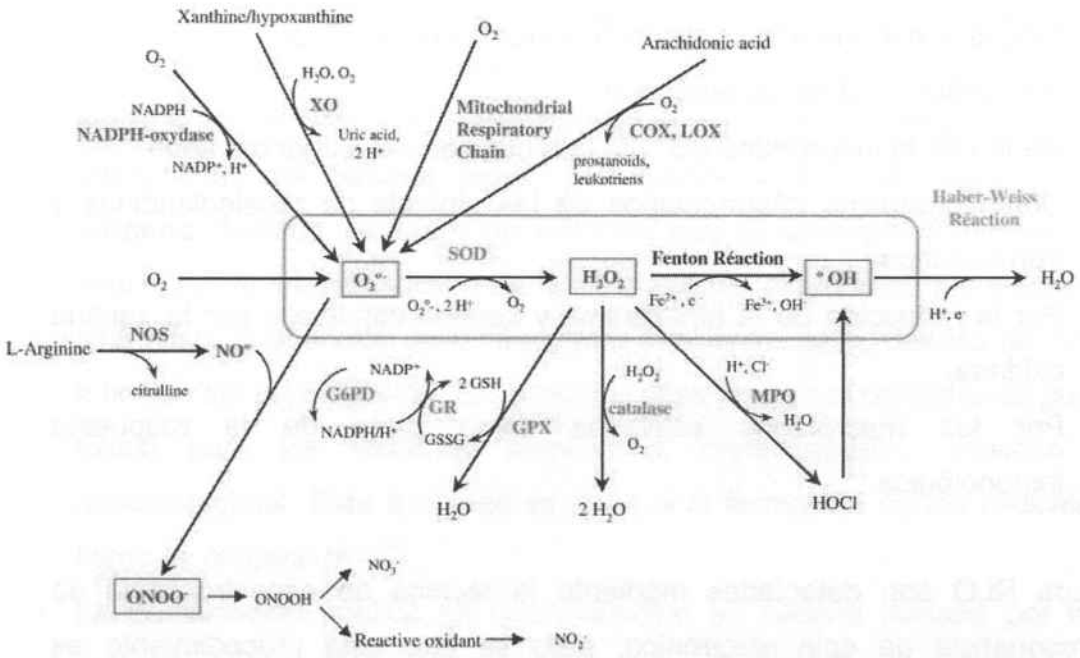
La generación de los radicales libres de oxígeno puede desencadenarse por mecanismos no enzimáticos en los cuales el hierro juega el papel principal, o por una amplia gama de sistemas enzimáticos.

Estos radicales libres se producen:

- Dentro de la mitocondria durante la reducción del oxígeno a agua.
- Como productos intermediarios de las síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.
- Por la reducción de la hipoxantina y xantina catalizada por la xantina oxidasa.
- Por los macrófagos activados como parte de la respuesta inmunológica.

Los RLO son detectados mediante la técnica de espectroscopia de resonancia de spin electrónico, pero ya que este procedimiento es complejo se hace difícil su uso para el estudio de la participación de éstos en sistemas biológicos, por lo cual los investigadores optan mayormente por determinar su presencia de modo indirecto mediante la identificación de los productos de las reacciones de las ROS sobre moléculas como los fosfolípidos o el DNA.

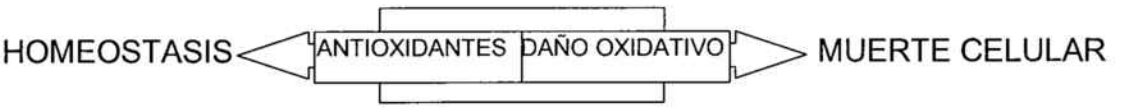
Figura 1.5. Principales fuentes de radicales libres. Los aniones superóxido altamente reactivos son producidos principalmente por (1) la ruta del ácido araquidónico, (2) la cadena respiratoria mitocondrial, (3) la oxidación de la xanthina e hipoxanthina por la xantina oxidasa, y (4) NADPH-oxidasas. Los aniones superóxido pueden reaccionar tanto con el óxido nítrico, producido por las oxido nítrico sintasas, para generar un potente oxidante: el peroxinitrito, o bien pueden ser degradados por la superoxido dismutasa en una especie menos reactiva: el peroxido de hidrógeno. El peróxido puede ser luego (1) catabolizado por su reacción con la glutation peroxidasa o con la catalasa, (2) puede reaccionar con el Fe^{2+} para formar radicales hidroxilo vía la reacción de Fenton, o (3) puede ser degradado por mieloperoxidasa, otra fuente de radicales hidroxilo. Abreviaciones: COX, ciclooxygenasa; G6PD, glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa; GSH, glutation reducido; GR, glutation reductasa; GPX, glutation peroxidasa; GSSG, glutation oxidado; HOCl, ácido hipoclórico; H_2O_2; LOx lipoxigenasa; MPO, mieloperoxidasa; NADPH, nicotinamida adenina difosfato; NO, óxido nítrico; NO_3^-; NO_2^-, nitrato y nitrito; NOS, NO sintasa; $O_2^{\bullet-}$ anion superóxido; $OH^{\bullet}$, radical hidroxilo; $ONOO^-$, anion peroxinitrito; ONOOH, ácido peroxinitroso; SOD, superóxido dismutasa; XO, xanthina oxidasa.(Fuente: Margaill, 2005(46))



1.3.2.1 PRINCIPALES ESPECIES

La reducción univalente secuencial del oxígeno molecular forma inicialmente el radical anion superóxido ($O^{\bullet -}$), que es convertido, producto de la dismutación a cardo de la SOD, en H_2O_2, el cual es capaz de difundir a través de las membranas lipídicas, aquí en presencia de iones metálicos de transición, se convierte en el radical altamente reactivo hidroxilo ($HO^{\bullet}$) o en el radical alkoxi ($RO^{\bullet}$). Estos radicales y sus productos intermediarios (oxígeno molecular, peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos) son generados constantemente *in vivo* bien por "accidentes de la bioquímica" y también deliberadamente con objetivos metabólicos específicos, como por ejemplo durante la fagocitosis por macrófagos. La reactividad de los diferentes RLO varía pero algunos son capaces de causar daños severos a moléculas biológicas, especialmente al DNA, lípidos y proteínas, principalmente a altas concentraciones (47). Abundante evidencia los señala como responsables del desarrollo de diferentes patologías tales como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, y el envejecimiento (48).

Debido a su afinidad química los RLO pueden reaccionar espontáneamente con cualquier molécula, atacando al DNA, proteínas, lípidos y membranas celulares. La acumulación de productos de degradación del DNA, membranas, proteínas u otros compuestos, estimulan múltiples sistemas enzimáticos a fin de reparar las moléculas o estructuras dañadas, para lo cual se activan o silencian genes específicos, codificando factores de transcripción reguladores, proteínas estructurales y enzimas de defensa antioxidante. Esto refuerza la tesis quienes atribuyen a los radicales libres funciones en la regulación génica cuando éstos se encuentran en concentraciones bajas. La aparición de lesiones debidas a RLO depende del balance entre el tipo y la cantidad producidos, así como de la cantidad de mecanismos antioxidantes presentes en el microambiente (49).



1.3.2.2 OXIDO NÍTRICO

CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El óxido nítrico (NO) es una molécula muy compleja y capaz de desempeñar múltiples papeles no sólo a nivel fisiológico sino patofisiológico.

Existen tres formas de óxido nítrico agrupadas bajo las siglas NO: el ion nitroso (NO^+), el radical libre neutro ($NO^•$), y el ion nitroxilo (NO^-), y tienen diferentes propiedades y reactividades biológicas. La forma producida por la NOS no ha sido bien establecida pero se asume generalmente que es el radical libre.

SÍNTESIS..

El NO se forma a partir del O_2 y de un aminoácido, la L-arginina que se convierte en L-citrulina, durante la reacción catalizada por la NO sintasa (NOS). La actividad esta última depende de otra proteína, la calmodulina, sensible a su vez a la concentración intracelular de calcio

La NOS puede ser de dos tipos, principalmente:

La **NOS constitutiva (cNOS)** que a su vez presenta dos formas. Se trata de la eNOS si se encuentra en el endotelio vascular, también se la conoce como NOS-tipo III, NOS3 o ecNOS,). Cuando se trata de la nNOS la enzima se encuentra en el sistema nervioso, (también es llamada NOS tipo I o bNOS).

La **NOS inducible, (iNOS)** por otro lado, se localiza en el citosol de macrófagsos, así como en plaquetas humanas, hepatocitos, células tumorales, endoteliales, etc. Otros nombres que se le atribuyen son NOS tipo II, NOS-2, macNOS, o hepNOS.

ROL FISIOLÓGICO:

El NO tiene roles opuestos en un organismo, puede desarrollar tanto funciones fisiológicos que van desde la regulación del tono vascular, y efectos patológicos tales como el shock endotoxémico o desordenes inflamatorios. Esto ha llevado a confusiones con respecto a su verdadero papel biológico. Mas aun no se ha podido aclarar si la superproducción de NO observada en los procesos patológicos es una consecuencia o la causa de dicha patología.

No obstante se ha podido determinar la participación del NO en la distribución de oxígeno en el organismo, regulando el tono vascular e interactuando con la hemoglobina, además de estar implicado en el mantenimiento del balance térmico (50).

PAPEL DEL NO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO:

Niveles altos de $NO^{\bullet}$, como resultado de un aumento de su síntesis, pueden jugar un papel muy significativo en el daño asociado a radicales libres durante el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Si bien el NO no reacciona con la mayoría de moléculas biológicas sí es capaz de interactuar con una variedad de oxidantes biológicos para formar especies nitrógeno reactivas (RSN) como el peroxinitrito ($ONOO^-$), o el dióxido de nitrógeno ($^{\bullet}NO_2$). Novedosos estudios han señalado además un papel antioxidante del NO mientras se mantenga el delicado balance, presente en condiciones fisiológicas, entre el NO endotelial y la concentración de otras especies oxígeno reactivas prooxidantes

1.3.3 ANTIOXIDANTES: TIPOS

El organismo posee un elaborado sistema de defensa antioxidante que actúa para neutralizar a los radicales libres y a otras especies altamente reactivas.

Un antioxidante es una sustancia que presente a bajas concentraciones fisiológicas (comparado con las del sustrato oxidable) disminuye o previene la oxidación de éste. Todos los organismos aeróbicos poseen sustancias antioxidantes.

Todo antioxidante biológico mantiene sus propiedades en un rango de concentraciones fisiológicas, su velocidad de reacción con los radicales libres de oxígeno es superior a la de otras moléculas, y el producto de tal reacción es menos tóxico. Cada uno de los nutrientes antioxidantes son específicos y actúan sinérgicamente para fortalecer la capacidad antioxidante total del organismo.

En condiciones de elevada producción de radicales libres de oxígeno, la concentración de la mayoría de antioxidantes biológicos (vitamina C, ácido úrico, etc.) disminuye, sin embargo existen otros cuyos niveles pueden resultar poco afectados (vitamina E).

Si el delicado equilibrio entre los prooxidantes y las sustancias antioxidantes se rompe en favor de los primeros el resultado es el ataque de los radicales a las biomoléculas que puede conducir a una lesión, que de ser irreversible conlleva la muerte de la célula.

En situaciones de homeostasia, la producción de especies oxígeno-reactivas (ROS), tales como el $O^{\bullet -}$, o el H_2O_2, se encuentra balanceada con defensas antioxidantes de origen no enzimático como las vitaminas, o el glutation , o bien por enzimas de origen endógeno como la Superóxido Dismutasa o la Catalasa.

1.3.3.1 NO ENZIMÁTICOS.

Glutation:

El glutation reducido (GSH) que se consume es convertido en una mínima parte a su forma oxidada, GSSG y principalmente pasa a GSSP acompañado de una pérdida de proteínas thioles (51); (52).

El papel desempeñado por la producción de GSSP en las células es diverso y se resume en:

- protección de grupos PSH específicos de reacciones indeseadas.
- generación de GSH extra a partir de GSSP.
- modulación de varios enzimas (como la fosfofructoquinasa, fructosa 1, 6-bifosfatasa, glucosa 6-fosfato dehidrogenasa) et al. (53).

En los hepatocitos del 10-15% del GSH celular reside en la mitocondria (10-12 versus 7,0 mM en citosol) (54).

1.3.3.2 ENZIMÁTICOS.

Son enzimas cuya función principal es eliminar a los radicales libres. Las más importantes son:

Superóxido Dismutasa (SOD):

La SOD es un enzima que contiene cobre y zinc (CuZnSOD) y que está presente en el citosol de todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta las plantas y los animales. Los iones de cobre actúan durante la reacción de dismutación , en la que sufre procesos alternativos de oxidación y reducción. El zinc estabiliza la estructura enzimática.

Cataliza la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$

[Ec 1.19]. $2\ O_2^{\bullet-} + 2H+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

Existe además otra forma de SOD que contiene manganeso (MnSOD) y que cataliza la misma reacción, sin embargo no se encuentra en eritrocitos de mamíferos sino localizada en las mitocondrias y constituye apenas el 10% de la actividad de la SOD del hígado de rata.

Catalasa (CAT).

La catalasa es el enzima que se encarga de eliminar el H_2O_2 mediante la siguiente reacción:

[Ec 1.20] $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

En los animales la CAT se encuentra en los peroxisomas de todos los órganos, pero se acumula particularmente en el hígado y en los eritrocitos.

Este enzima consta de cuatro subunidades, cada una de las cuales posee un grupo hemo unido a su dominio catalítico. Cada subunidad contiene también una molécula de NADPH que estabiliza el enzima.

Glutation Peroxidasa (GSH-Px):

También elimina el H_2O_2 mediante la oxidación del glutation reducido (GSH) a glutation oxidado (GSSG).

[Ec 1.21] $H2O2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H2O$

Se han descrito cuatro isoformas de GSH-Px. La glutation peroxidasa citosólica (c- GSH-Px) fue la primera en ser identificada. Se trata de un enzima ubicuo cuya función principal es la de combatir el estrés oxidativo. Esta constituida por cuatro subunidades proteícas, cada una de las cuales posee un átomo se selenio en el dominio catalítico.

Presenta una elevada actividad en el hígado, riñón y pulmón, moderada en el corazón, eritrocitos y cerebro y baja en el músculo.

Existe también una isoforma plasmática (*p*- GSH-Px), otra gastrointestinal (*GI*- GSH-Px)y otra denominada *PH* GSH-Px (Fosfolípido Hidroperóxido -Glutation peroxidasa, que se halla principalmente en los testículos.

A pesar de que todas las isoformas son eficientes peroxidasas pueden realizar funciones específicas en la regulación metabólica, más allá de la función antioxidante.

1.3.3.3 MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIOXIDANTES:

Los antioxidantes pueden actuar a distintos niveles en la secuencia oxidativa de la lipoperoxidación:

- Decreciendo la concentración local de oxígeno (flavonoides).
- Previniendo el proceso de iniciación de la lipoperoxidaxión por la captación de radicales libres de oxígeno por acción de enzimas intracelulares tales como la SOD, CAT y GSH-Px, y de otras moléculas como la vitamina C, ácido úrico, y los grupos -SH de proteínas, así como la bilirrubina, la glucosa, la hipotaurina y su precursor cisteamina, lamcafeína y un gran número de flavonoides.
- Fijando al hierro (transferrina, lactoferrina y ferritina) o cobre (metaloproteínas y albúmina), así como moléculas con capacidad para mantener el hierro en un estado redox en el cual no sea capaz de catalizar la reacción de Haber-Weiss (ceruloplasmina).
- Descomponiendo los hidroperóxidos (ROOH), implicados en los procesos de estimulación de la lipoperoxidación, convirtiéndolos en alcoholes (ROH) que son moléculas mucho menos reactivas, como por ejemplo la glutation peroxidasa.
- Bloqueando de la cadena de lipoperoxidación. Son capaces de reducir el radical peroxilo (ROO) y el radical alkoxilo (RO) evitando de esta forma la propagación de la lipoperoxidación. Entre ellos se

encuentran los diversos fenoles o aminas aromáticas como la vitamina E y el βcaroteno.

Los antioxidantes descritos en los cuatro primeros puntos se denominan preventivos los y el último grupo se denomina 'rompe cadenas' (55).

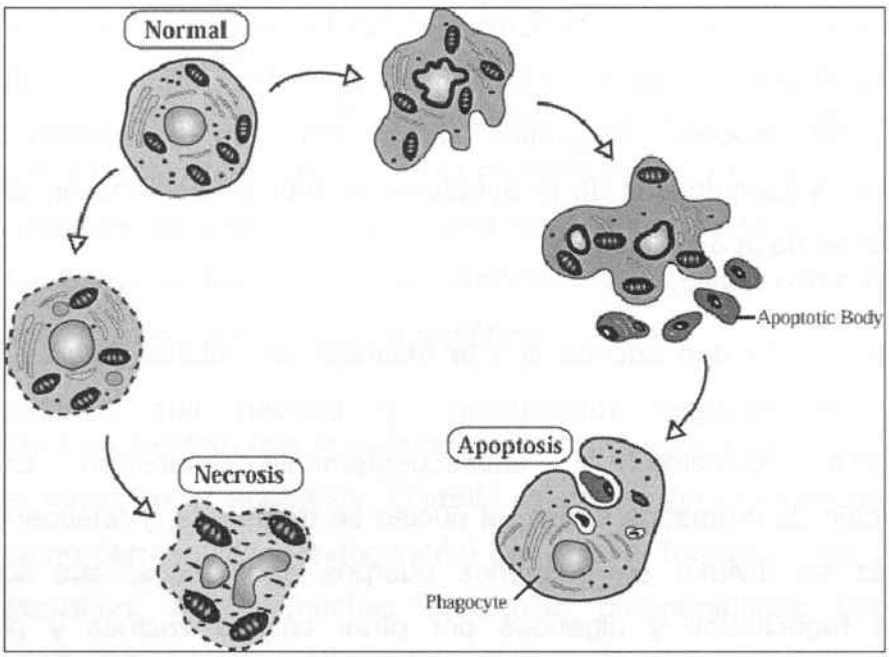
1.3.4 PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR: APOTOSIS vs. NECROSIS.

Las células de los organismos multicelulares generalmente mueren siguiendo uno de 2 caminos, bien caracterizados, dependiendo del contexto y la causa de la muerte, cuando la lesión es grave (como por ejemplo si ha sido expuesta a tóxicos químicos), la célula muere tras un proceso más bien anárquico llamado ***necrosis***, a diferencia de éste, existe otro tipo de muerte celular cuidadosamente regulada conocida como ***apoptosis***.

1.3.4.1 NECROSIS.

La necrosis ocurre tras lesiones "no fisiológicas" agudas, como por ejemplo en el centro de tejidos isquémicos o en el sitio de acción de toxinas. Las células necróticas se hinchan y se lisan, liberando su contenido citoplasmático y nuclear en el medio intercelular, diseminando la inflamación. Hasta 1970 la necrosis fue el único tipo de muerte celular claramente identificado, lo cual hacia aparecer a la muerte celular como un proceso no- fisiológico y nocivo(56). Aunque es importante en las lesiones graves y en algunas respuestas inflamatorias, la necrosis no es el mecanismo por el cual las células normalmente mueren.

Figura 1.6. Esquema de las vías de muerte celular: a la derecha la muerte apoptótica que termina con la formación de cuerpos apoptóticos rodeados de membrana y que son fácilmente fagocitados; a la izquierda muerte por necrosis, con la fragmentación del núcleo y la perdida de la integridad de la membrana como rasgos característicos.



1.3.4.2 APOPTOSIS.

En 1972, Kerr y col. publicaron un artículo describiendo un proceso novedoso de muerte denominado apoptosis (en griego significa "apo" y "ptosis", " disminuir"(57)). La apoptosis o también llamada "muerte celular programada", es esencial para el normal funcionamiento de la mayoría de organismos multicelulares. La reabsorción de la cola durante la metamorfosis de la rana, o la formación de los dedos del feto, que requiere eliminar la células que los unen son ejemplos claros de lo útil y cotidiano del proceso apoptótico. Mas aun, las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis se han conservado en alto grado a través de la evolución.

A diferencia de lo que sucede con la necrosis las células durante la apoptosis se encogen rápidamente, y pierden sus contactos intercelulares normales, y subsecuentemente muestran una condensación de cromatina densa, el núcleo se fragmenta, y finalmente las células se dividen en pequeños cuerpos apoptóticos, que son fácilmente fagocitados y digeridos por otras células vecinas y por macrófagos. Ya que durante la apoptosis no se liberan contenidos citoplasmáticos, no se desencadena la inflamación, es decir, la célula muere en forma silenciosa y sin perturbar a las células vecinas.

Se puede dividir este proceso en tres fases distintas funcionalmente: (1)inducción, cuya naturaleza depende de las señales inductoras de muerte específicas; (2) la fase efectora, durante la cual se activan los "ejecutores centrales" y la célula es empujada a morir, y (3) la fase de ejecución, donde la célula adquiere las características morfológicas y bioquímicas típicas del estadío final de la apoptosis.(58). Las 3 fases funcionales de la apoptosis se encuentran reguladas estrechamente.

Si nosotros definimos la apoptosis como un tipo de muerte celular con una morfología específica, no hay duda de que la activación de las caspasas es indispensable para que ésta se lleve a cabo. Las caspasas se encuentran en forma inactiva en el citosol de la mayoría de las células como un polipéptido de cadena única (pro-caspasa) que se activa por clivaje (¿)para producir la proteasa activa. El hecho de que este clivaje lo realicen caspasas (la misma, u otras) ha hecho pensar que la apoptosis ocurre como consecuencia de una cascada de activación de caspasas. Más recientemente se ha encontrado que la inhibición de caspasas no siempre inhibe la apoptosis. D.Green y col. señalan que las caspasas ejercen una doble función en el proceso apoptótico: primero, como una molécula de traducción de señal que se comporta como un inductor facultativo de los cambios de membrana, y, segundo, como enzimas que conducen hacia el fenotipo apoptótico.

Muchos señalan que la membrana mitocondrial juega un papel clave en el inicio de la apoptosis. Durante la disfunción mitocondrial, conocida como permeabilidad mitocondrial transicional (*mitochondrial permeability transition, MPT),* muchas moléculas proapoptóticas (pro-caspasas, citocromo C , APAF-1), son liberadas al citosol.
El hecho de que antioxidantes como los thioles, o MnSOD pueden bloquear o retrasar este proceso pone de manifiesto el papel de los radicales libres en la apoptosis. Se señala que los RLO y el consecuente cambio en el estado redox de la célula juegan un papel fundamental en la vía de trasducción de la señal apoptótica. Mas aun, el estrés oxidativo y la apoptosis son fenómenos fisiológicos estrechamente ligados, y están implicados en la fisiopatología de algunas enfermedades crónicas incluidas la autoinmunidad, el SIDA, el cáncer, la diabetes mellitus, el Alzheimer, el Parkinson, así como isquemias cardíacas o cerebrales.

1.4 *HIPOXIA COMO MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO:*

1.4.1 DEFINICIÓN.

Literalmente la hipoxia se puede definir como "déficit en oxígeno". La hipoxia es una condición patológica en la cual el cuerpo en su totalidad (*hipoxia generalizada*) o una región de él (*hipoxia tisular*) tiene un deficiente suministro de oxígeno. La *hipoxemia* , por otro lado, es un término que alude a un bajo contenido de oxígeno específicamente en la sangre. Cuando la hipoxia es de tal magnitud que se ha agotado todo el suministro de oxígeno, entonces se usa el término *anoxia*.

La hipoxia es una experiencia común en muchos vertebrados, especialmente en los que viven en medios acuáticos. Muchos de los animales de respiración aérea, por ejemplo de hábitos acuáticos acostumbran bucear, para lo cual detienen su respiración. Estas condiciones hipóxicas tienen consecuencias sobre el potencial ácido-base. La interrupción de la respiración detiene la captación de oxígeno por el pulmón, y también la excreción de CO_2. La distribución inadecuada de oxígeno a todos los tejidos conduce a la producción obligada de lactato y protones.

1.4.2 TIPOS DE HIPOXIA

La hipoxia se puede clasificar de la siguiente manera:

POR LA PRESIÓN DE LA MEZCLA DE AIRE QUE SE RESPIRA:

Hipoxia normobárica : cuando el aire que se respira tiene la presión equivalente a 760 mmHg, esto es 1 atmósfera (peso del aire a nivel del mar)

Hipoxia hipobárica: Cuando la mezcla de aire es menor de 760 mmHg, lo que afecta la presión parcial de O_2, que será menor, y menos eficiente el intercambio gaseoso.

POR EL ORIGEN DE LA HIPOXIA:

Hipoxia hipóxica: Se da como cuando disminuye la cantidad de oxígeno que pasa a la sangre. Se observa en casos de exposiciones a grandes alturas, cuando existe una enfermedad pulmonar que origina una ventilación insuficiente, o por respirar una mezcla enrarecida de O_2

Hipoxia por estancamiento: Es una deficiencia de oxígeno originada por una circulación deficiente o por una disminución del flujo sanguíneo. Se presenta en casos especiales de inmovilidad prolongada de un individuo, o por un miembro estrangulado,

Hipoxia hipémica: Se define como una reducción en la capacidad de carga de oxígeno de la sangre. Es causada por una reducción de la concentración de Hb en sangre, o por una disminución del número de hematíes.

Hipoxia Citotóxica: Se define como la imposibilidad de los tejidos de usar el oxígeno. Un claro ejemplo es el caso de intoxicación con monóxido de carbono, o por envenamiento con cianuro.

1.4.3 EFECTOS SOBRE EL HÍGADO:

Existen numerosos trabajos realizados principalmente en cerebro pero existen algunas ventajas para preferir el hígado, y no el estudio de un tejido nervioso, como modelo de experimentación en hipotermia, por ejemplo el hecho de que es un tejido que no se despolariza y, en

consecuencia, presenta un medio ionicamente más constante, además no existe excitotoxicidad. De otro lado, el hígado es uno de los órganos que contiene una mayor concentración de antioxidantes. Estas características nos permiten separar los efectos de los radicales libres de oxígeno de otros procesos que ocurren por ejemplo, en el cerebro. Más aun existe un hecho que sugiere una interrelación entre el hígado y la protección hipotérmica del resto del organismo: la enfermedad hepática conocida como "insuficiencia hepática aguda" (acute liver failure o ALF) presenta complicaciones serias en el sistema nervioso central, las mismas que disminuyen con la hipotermia. Aun cuando al investigar este fenómeno no se ha encontrado aun el mecanismo fisiopatológico responsable del desarrollo del daño cerebral, en lo que existe consenso es en afirmar que la hipotermia alarga la supervivencia y evita el desarrollo del edema cerebral en ratas con ALF (59). Por todo esto nos planteamos la observación del hígado como un medio útil para aclarar el origen de los efectos beneficiosos generales de la hipotermia.

MATERIAL Y MÉTODOS

2 MATERIAL Y METODOS

2.1 *PLANTEAMIIENTO EXPERIMENTAL*

2.1.1 ANIMALES, DIETA Y ESTABULACIÓN

El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de la Facultad de Biología, de acuerdo con la Normativa vigente.

Se usaron ratas Sprague- Dawley adultas machos de entre 200- 275 g de peso. Los animales fueron estabulados en grupos de 4 individuos en jaulas de plástico (22 x 48 x 15 cm), cubiertas con una rejilla de acero inoxidable, sobre la cual se depositó el pienso y provistas de un biberón con agua, dentro de una habitación del Edificio del Estabulario de la Facultad de Biología. Estas habitaciones contaban con un sistema insonorizado de extracción de aire, además de un control del ciclo de horas de luz y oscuridad totalmente automático (la luz se enciende de 8:00 h a 20:00h). La temperatura y humedad relativa se mantuvieron constantes (23 ± 2ºC y, 50 ± 5 % respectivamente). Durante el período de estabulación los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum* de una dieta estándar compuesta de: 58,7 % de carbohidratos, 17% de proteína, 12% de agua, 4,3 % de celulosa, y 3 % de lípidos, un 5% de vitaminas y minerales (Panlab URA A.04, Barcelona).

A ultima hora de la tarde del día anterior al experimento se colocó a los animales en jaulas de ayuno acondicionadas con una rejilla en la base que mantenía al animal a un par de centímetros por encima del suelo recubierto de pienso, de esta manera se consiguió evitar que el especimen ingiriera sus propios excrementos y se garantizó la inanición. Por lo mismo se colocó sólo un animal por jaula. En ningún momento se restringió el acceso libre al agua.

2.1.2 REGIMENES DE ANESTESIA

2.1.2.1 GRUPO PENTOBARBITAL EN NORMOTERMIA

El uso de barbitúricos como el pentobarbital sódico está ampliamente documentado en cuanto a sus efectos sobre parámetros hemodinámicos pero existe muy escasa información respecto a su efecto sobre la producción de ROS. Para la inducción de anestesia a nivel quirúrgico se usó una dosis vip de 60 mg/ kg peso disueltos en agua destilada. A fin de garantizar que este efecto anestésico se consiguiera en el menor tiempo posible (5 minutos aproximadamente) se preparó el anestésico a una concentración de 40 mg/ml justo antes de la inyección.

El nivel de anestesia óptimo para la cirugía se alcanzó cuando los reflejos corneal y podal estuvieron bilateralmente anulados en el animal (60).

2.1.2.2 .GRUPO KETAMINA EN NORMOTERMIA

La ketamina es un anestésico disociativo, inhibidor no competitivo de N-metil-D-Aspartato (NMDA), que bloquea así la neurotransmisión del dolor (61). Últimamente se promueve su uso en la experimentación animal y en la práctica veterinaria, alternativo al de los barbitúricos, y siempre asociado con algún agente sedante. En nuestro experimento elegimos el uso de la ketamina combinada con Xylacina.

Para la inducción de anestesia a nivel quirúrgico usando ketamina y xylacina se preparó una mezcla justo antes de la inyección (68 y 4,5 mg/kg peso corporal, respectivamente), que fue administrada intraperitonealmente.

Fue necesario inyectar una dosis de recuerdo equivalente a un tercio de la dosis inicial cada intervalos de 30 minutos cuando la temperatura corporal del animal era de 37° C.

2.1.2.3 GRUPOS PENTOBARBITAL Y KETAMINA DURANTE LA HIPOTERMIA

En los casos en los que el animal había de mantenerse anestesiado durante más de una hora fue necesaria la inyección de una dosis de recuerdo equivalente a un tercio de la dosis inicial transcurridos 60 minutos en el grupo Pentobarbital, o 30 minutos en el grupo Ketamina, si la temperatura era de 37° C. Para el mantenimiento de los efectos de la anestesia en los animales hipotérmicos no fueron necesarias las dosis de mantenimiento arriba indicados en ninguno de los regímenes de anestesia probados cuando la temperatura del animal descendió por debajo de 26 °C , debido al efecto anestésico intrínseco de la hipotermia.

2.1.3 PROTOCOLOS QUIRÚRGICOS

2.1.3.1 AISLAMIENTO Y CANULACIÓN DE ARTERIA CAROTIDA

Con el animal en posición de decúbito dorsal se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 3 cm justo por debajo de la mandíbula. Por debajo de la piel se separaron primero los paquetes musculares y luego las prominentes glándulas submaxilares que se hallan por encima de la tráquea. Una vez ubicada la arteria carótida, íntimamente unida al nervio vago, se la aisló cuidadosamente. Seguidamente se ligó el tramo ascendente de la arteria, y luego se insertó una cánula (PE 50) en la arteria con dirección a la aorta. Esta cánula estaba conectada por su otro extremo con una jeringa llena de solución salina heparinizada (libre de burbujas de aire). En el momento de insertar la cánula se inyectó un pequeño volumen de SSF por la vía para evitar, de este modo, que el roce de la cánula con las paredes internas del vaso desencadenara el proceso de coagulación (Heparina Litio: 10 gotas/ ml SSF).

2.1.3.2 TRAQUEOTOMIA Y VENTILACIÓN ASISTIDA

De manera análoga al protocolo descrito en el punto anterior se realizó una incisión longitudinal en la cara ventral del cuello. Usando unas pinzas se separaron los músculos esternohioideos para exponer la tráquea, se practicó un pequeño corte para introducir una cánula PE240, que se fijó anudando un hilo por

encima del cartílago. Luego de la intubación traqueal se conectó al animal a un bomba de respiración de volumen controlado, (Harvard Apparatus Limited) circulando aire atmosférico.

2.1.3.3 MONITORIZACIÓN DE LA TEMPERATURA

La monitorización de la temperatura se realizó usando un termopar (Kane May Ltd.), (margen de error ± 0,01° C). Tras la laparatomia del animal se insertaron dos termopares, uno por debajo de la carótida y el otro en la cavidad visceral, próximo al hígado (temperaturas carotídea y abdominal). La diferencia óptima entre ambas lecturas durante los procesos de enfriamiento y recalentamiento no superó los 0,5° C lo que garantizó una distribución homogénea de la temperatura en el animal.

Finalmente se cosió la capa muscular primero, y la piel por separado para evitar así que el animal perdiera calor por evaporación o por convección. Con el mismo propósito se mantuvo una lámpara de 100 W a 30 cm justo por encima del animal

2.1.4 MONITORIZACIÓN DEL FLUJO PORTAL

Para el registro continuo del flujo en la vena porta hepática se uso un Reómetro de Flujo (T 106 Transonic Systems Inc.) capaz de medir el flujo de un líquido en un vaso independientemente de las turbulencias, el hematocrito o cambios en el calibre del vaso. Este sistema usa el principio básico de "tiempo de tránsito" mediante una tecnología de ultrasonido. La sonda consta de dos trasductores que se sitúan lateralmente al vaso emitiendo una señal de ultrasonido que rebota en el reflector de la sonda que la envía de vuelta al trasductor del lado opuesto, atravesando de este modo el vaso (y el liquido que fluye dentro de él) en dos puntos, modificando su frecuencia. El proceso se repite luego invirtiendo los trasductores de salida y llegada. De este modo, la diferencia en ambos" tiempos de tránsito" se usa para calcular el flujo.

El día del experimento se calibró el aparato manteniendo la sonda sumergida en SSF a temperatura ambiente.

Se accedió al peritoneo del animal por medio de una pequeña incisión longitudinal media en la pared abdominal (2-3 cm) y usando palillos de algodón se aisló cuidadosamente la vena porta hepática. Una vez libre de grasa, se colocó la sonda del reómetro de flujo alrededor del vaso. Se seleccionó el tamaño de la sonda de modo que la vena porta encajara perfectamente en su espacio acústico (1RB3196). La lectura del flujo se realizó de forma continua. El flujo máximo registrado fue de 13 ml/min

Los datos obtenidos fueron normalizados expresándose como porcentaje del valor máximo registrado para cada animal durante el experimento

2.1.5 MONITORIZACIÓN DE OTROS PARÁMETROS DE INTERÉS FISIOLÓGICO

2.1.5.1 FRECUENCIA CARDÍACA y PRESIÓN ARTERIAL

Para la monitorización de la frecuencia cardiaca se conectó la cánula carotídea a un trasductor de presión que a su vez se conectó a un polígrafo (LETICA Scientific Instruments).

La presión arterial se midió directamente conectando la cánula carotídea a un manómetro de mercurio registrándose el valor medio tras un minuto de observación.

Ambos equipos fueron colocados muy próximos al animal lo que permitió que se pudieran realizar registros alternativos de forma rápida.

2.1.5.2 HEMATOCRITO

Se extrajeron pequeñas muestras de sangre directamente de la cánula arterial a tubos capilares de microhematocrito (50uL) los cuales se centrifugaron a 10000

rpm durante 5 minutos. Se midió la fracción eritrocitaria expresándola en porcentaje del volumen total de sangre.

2.1.6 MONTAJE DEL SISTEMA DE ENFRIAMIENTO/ RECALENTAMIENTO

El sistema de enfriamiento y recalentamiento fue diseñado usando dos baños de agua a diferente temperatura. Las entradas y salidas de ambos baños se conectaron a una línea única de entrada y una de salida, cada una provista de una llave que permitía conmutar instantáneamente entre ambos baños. Estas dos líneas se bifurcaban y conectaban luego con dos circuitos en paralelo de diferente calibre, el de calibre menor (0.7 mm de diámetro interno) dispuesto para ser colocado dentro de la cavidad peritoneal, y el segundo, mucho mas grueso (6 mm de diámetro interno) se encontraba adherido a la cara inferior de la placa de metal que constituía la base de la mesa de operación. Este sistema, una vez colocado el animal, permitía controlar con precisión los procesos de enfriamiento y recalentamiento sin alterar la concentración de los fluidos corporales del animal y su homeostasis.

Se realizaron ensayos hasta establecer la temperatura adecuada de los baños de agua fría y caliente a fin de conseguir las velocidades de enfriamiento y recalentamiento deseadas. Se establecieron las siguientes temperaturas: 14° C para el baño frío mientras que el baño caliente se fijó a 39°C y 44° C dependiendo de la velocidad de recalentamiento que se pretendía alcanzar.

2.1.7 VELOCIDAD DE RECALENTAMIENTO .

Estos animales fueron enfriados hasta 20° C, durante aproximadamente 2 horas (contados desde el final del protocolo quirúrgico).Seguidamente los especimenes se distribuyeron en dos grupos que fueron recalentados a una velocidad de

0,25°C/ min ó 0,35°C/ min hasta alcanzar 37°C (recalentamiento moderado: RC_M, o rápido: RC_R, respectivamente).
A estos animales se les extrajo sangre al inicio y final del experimento

2.1.8 INDUCCION DE HIPOXIA NORMOBÁRICA

Los animales fueron anestesiados, intubados vía cánula traqueal y conectados a un respirador, tal como se describió arriba. La entrada de aire de la bomba que en las condiciones de normoxia tomaba el aire directamente de la atmósfera y lo enviaba al animal, durante la inducción de la hipoxia aguda se conectó esta entrada a un balón inflable de goma (reservorio transitorio que amortiguaba la presión de salida del gas) que a su vez estaba conectado a la botella de gas conteniendo una mezcla hipóxica de aire (O_2 10%, N_2 90%). Para preservar la integridad del pulmón se reguló en todo momento la presión de salida de la bomba hacia el animal de manera que no fuese mayor a 1,5 cm H_20.

2.2 *OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS* .

2.2.1 EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA SANGRE

Las extracciones de pequeños volúmenes de sangre que se realizaron a intervalos de aproximadamente 30 minutos se tomaron directamente 2 muestras en capilares de 200 uL (Radiometer), la primera destinada al control de la oxigenación y el equilibrio ácido base, la segunda para el análisis de NOx en plasma.

Al final del experimento y previo al sacrificio se extrajeron mayores volúmenes de sangre en jeringas heparinizadas (2 ml) para el análisis de los demás parámetros de interés. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y el plasma y los eritrocitos se conservaron a – 80° C.

2.2.2 EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE HÍGADO

Una vez terminado el experimento y procurando mantener constante la temperatura del animal, se abrió la cavidad abdominal retirando las suturas. Se retiró cuidadosamente la sonda del reómetro que rodeaba la vena porta, con la ayuda de unas pinzas se canuló esta vena insertando una cánula intravenosa de FEP (14G 2"/ 2,2 x 50mm), que se fijó a la vena con hilo de sutura. Se inició la perfusión retrógrada del hígado primero inyectando SSF fría, cuando el hígado se volvió turgente debido a la presión acumulada al interior se cortó la vena cava inferior forzando a la sangre a ir en esa dirección. Se continuó prefundiendo hasta observar una decoloración homogénea del órgano. Rápidamente se separó el hígado y se congeló instantáneamente incluyéndolo en nitrógeno líquido, Se guardó el órgano a –80° C para su conservación.

2.2.3 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Al final del experimento los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia. Se usó la cánula de la carótida para inyectar el anestésico directamente al corazón por lo que la muerte sobrevino de forma inmediata.

2.3 *DETERMINACION DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO*

2.3.1 DETERMINACIONES EN HIGADO

2.3.1.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA

La técnica para la determinación de la actividad de la CuZn-SOD se basa en la inhibición de la autooxidación del pirogallol por la SOD presente en las células (62)

.

Se pesó un gramo de hígado y se homogenizó en 10 mL de buffer isotónico (NaCl 0.14 M, $NaH_2PO_2 \cdot 2H_2O$ 1.59 mM, $Na_2HPO_2 \cdot 2H_2O$, 8.8 mM a pH 7.4) .

Se centrifugó este homogenizado a 440 xg por 10 minutos a 4º CEl sobrenadante obtenido se empleó para la valoración de la Cu Zn-SOD .

En pocillos de microplaca se mezclaron 25 uL de Tris- EDTA (1 mM mM) a pH 8.0 con diferentes volúmenes de sobrenadante: 0, 25, 50, 75, 100, 125 uL. A continuación se enrasó a 255 uL. Las microplacas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cual en cada pocillo se añadieron 20 uL de pirogallol 24 mM (en HCl 10mM). La absorbancia de las muestras se valoró cada 30 segundos, durante 5 minutos, a 414 nm y a temperatura ambiente en el lector de microplacas iEMS (Labsystems, UK).

La recta ascendente que resulta corresponde a la autooxidación del pirogallol. En presencia de SOD esta autooxidación se inhibe por ello que para cada volumen de muestra empleado se debe calcular la pendiente de la recta. Con los valores de pendientes obtenidos se construyó una nueva recta patrón tal que **X** corresponde a los microlitros del sobrenadante e **Y** corresponde a la pendiente de la recta de autooxidación. Se considera que 1 U de SOD está presente en el volumen que corresponde al 50% de inhibición de la autooxidación del pirogallol.

El resultado final se expresó en Unidades de SOD por gramo de proteína

2.3.1.2 CATALASA

La actividad de la CAT fue determinada de acuerdo al protocolo de Cohen (63) expresadas como K. mg^{-1}proteína.

El homogenizado hepático de la muestra se procesó del mismo modo que se describe en el protocolo de determinación de SOD en hígado.

La muestra (sobrenadante) se incubó con etanol absoluto (1:100) enterrada en hielo durante 30 minutos, al final de lo cual se le añadió Titron X-100 al 10% (concentración final 1%). La muestra así procesada se diluyó en tampón fosfato 50 mM (pH 7.0) (dilución 1:500).

En cubetas de cuarzo se mezclaron, por este orden, 1 mL de H_2O_2 30 mM (preparada el mismo día) y 2 mL de hemolisado diluido (1/500). Para el blanco se utilizó 1 mL de H_2O_2 30mM con 2 mL de tampón fosfato. En el espectrofotómetro se realizaron lecturas cada 5 segundos durante 30 segundos a una longitud de

onda de 240nm y a temperatura ambiente. La actividad de la muestra se calculó mediante la siguiente relación:

[Ecuac 2.1] $K = 0.153 \times \log (A1/A2)$

Donde A1 es la absorbancia a tiempo leída a los 5 segundos y A2 es la absorbancia a los 20 segundos, ya que se considera que durante este intervalo la cinética de la reacción es recta.

Los resultados se expresaron como K. mg^{-1}proteína.

2.3.1.3 GLUTATION

La determinación del glutation se basó en la técnica descrita por Hissin 1976 (64).

Debido a la falta de cromóforos fuertes o fluoróforos en la estructura química del GSH y GSSG, es necesario introducir en la molécula marcadores apropiados que incrementen el límite de detección con UV-vis permitiendo una detección basada en la fluorescencia. Este proceso se conoce como derivatización. En esta técnica se usa el *o*-phthaldehido (OPA) como agente derivatizador. El OPA no es fluorescente hasta que no reacciona con los grupos amino y tiol, y es un proceso dependiente del pH, que obtiene la máxima fluorescencia a pH alcalino (entre 9,5 y 12) (ver figura 2.1).

El primer paso en este protocolo es la desproteinización del homogenizado para inactivar las enzimas, para lo cual se usa ácido metafosfórico (MPA). El medio ácido ayuda además a evitar la autooxidación del GSH, Justo antes de su derivatización se eleva el pH gracias a la dilución de la muestra en un tampón alcalino.

El GSSG se encuentra, como ya se ha indicado en concentraciones muy bajas en los tejidos, y debido a que el GSH que lo acompaña es fácilmente autooxidable (lo que conduciría a una sobreestimación de GSSG) es necesario proteger los grupos SH de la muestra antes de la derivatización evitando que el GSH presente

se una también al fluoróforo. Esta función la desempeña el NEM que se une al GSH formando un complejo muy estable. En el protocolo de determinación del GSSG el sobrenadante se diluye en NaOH lo que lleva a un pH muy alcalino. Cuando el pH es 12 todo el GSSG se hidroliza y es entonces cuando el GSH recién liberado reacciona con el fluoróforo OPA.

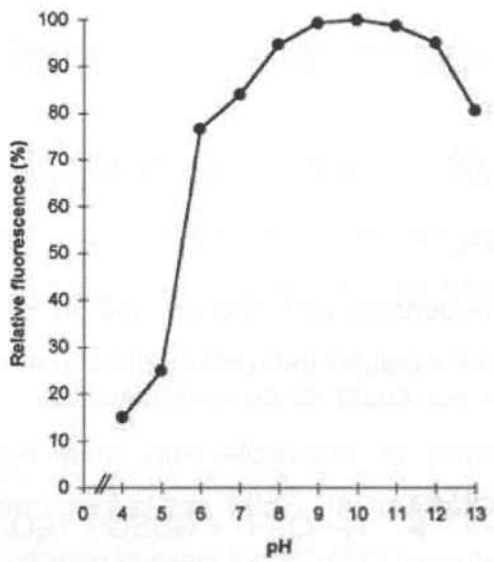


Figura 2.1
Effecto del pH sobre la formación del derivado GSH-OPA. El GSH standard fue incubado con OPA y el pH de la reacción se ajustó al deseado usando NaOH. La intensidad de la fluorescencia obtenida a pH 10.0 se tomó como el 100%.

Se realizó una mezcla de tampón EDTA-fosfato (0.1 M fostato de sodio, 0.005M EDTA, pH 8.0) y la solución de ácido Fosfórico(HPO_3 25 %) en la proporción 3,75: 1 (v:v). Se preparó el homogenado hepático en esta mezcla (0,1 g/2 ml, p/v). El homogenado se ultrafiltró a 100 000 xg durante 30 minutos y el sobrenadante se alícuotó y se conservó a –80 °C hasta el día del ensayo.

Glutation reducido (GSH):

El primer paso fue la neutralización por la dilución de la muestra (dilución final 1/200) en el tampón frío, con los tubos enterrados en hielo. El fluoróforo (OPA, 1 mg/ ml en metanol) fue añadido a la muestra y se incubó a temperatura ambiente durante exactamente 15 minutos hasta su lectura en el espectrofluorímetro

(longitudes de onda de excitación 350nm, emisión 420 nm, ancho de banda 10 nm)

Glutatión oxidado (GSSG):

A la muestra enterrada en hielo se le agregó $NEM_{40\ mM}$ y se agitó bien. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se realizó una dilución en $NaOH_{0.1N}$ (dilución final 1/200) y se añadío el fluoróforo. Nuevamente, los tubos fueron incubados durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente, hasta su determinación. Las condiciones de lecturas son las mismas que para el GSH.

El día del ensayo se prepararon las soluciones estándar de GSH y GSSG en tampón a una concentración final de 4 ug/ ml.
Los resultados se expresaron en n moles de GSH o GSSG por gramo de tejido.

2.3.1.4 GLUTATION PEROXIDASA (GSH-Px)

Para la determinación de GSH-Px en homogenado hepático se usó el kit de Calbiochem que mide la actividad de la GSH-Px celular indirectamente a partir de las siguientes reacciones:

[Ecuac 2.2] $R—O—O—H + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} R—O—H + GSSG + H_2O.$

[Ecuac 2.3] $GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH\text{-}R} 2GSH + NADP^+$

El glutation oxidado (GSSG), producido tras la reducción de un peróxido orgánico por acción de la GSH-Px, es reciclado a su estado reducido por la glutation reductasa (GSH-R).

La técnica se basa en medir el descenso de la absorbancia a 340 nn que marca la transformación de NADPH en NADP+. La muestra conteniendo GSH-Px se agrega a una solución conteniendo GSH, GSH-R y NADPH. La reacción se desencadena por la adición de un peróxido orgánico (tert-butil hidroperóxido,TBH) y se lee la absorbancia a 340 nm. La tasa de descenso de la absorbancia a esta longitud de

onda es directamente proporcional a la actividad de la GSH-Px presente en la muestra.

Se realizaron homogenizados de hígado en el tampón de homogenización (Tris HCl (50 mM), EDTA 5mM, DTT 1mM, pH 7,5) en una proporción de 1/8 (p/v). Se centrifugaron las muestras a 10000 xg durante 10 minutos en frío (4° C) Del sobrenadante obtenido se separó una alícuota para la determinación de proteínas y el resto se conservó a –80° C (la actividad de la enzima se mantiene hasta 6 meses). El día del ensayo se adecuó la concentración del sobrenadante diluyendo hasta que la concentración de proteínas de la muestra en la placa fuera entre 0,1-1.0 mg. (10ul sobrenadante en 240 ul volumen final del pocillo)

Se modificó la técnica de los fabricantes para ajustarla a su lectura en, para los cual se adaptaron los volúmenes de la reacción recomendados cuando se usa cubeta, y se recalculó el factor de extinción del NADPH para la microplaca.

Una vez añadidos en la placa los reactivos (excepto el peróxido) se incubó la placa para que alcanzara la temperatura de reacción de 37° C. Una vez atemperados se inició la reacción añadiendo el tert-butil-hidroperóxido. Se monitorizó la reacción a 37° C durante 3 minutos a 340 nm.
Se usó el vial conteniendo el extracto de GPx del kit como solución patrón. La actividad de este estándar no es constante y varía con el lote por lo cual fue necesario consultar con el fabricante (Ej. 4374 U/ml).

Debido a que el coeficiente de extinción del NADPH proporcionado por el fabricante del kit estaba calculado para una reacción en espectro usando cubetas de metacrilato de 1 cm de paso se calculó un nuevo factor para las condiciones de nuestro ensayo. Resumiendo, siguiendo las indicaciones del fabricante se calculó la actividad de la GSH-Px, el valor obtenido se dividió entre 0,0078 (que fue el factor de corrección obtenido usando un extracto de GSH-Px mediante la lectura en placa,) para corregir el resultado.

2.3.1.5 LACTATO

El lactato es un importante indicador del metabolismo anaeróbico en la célula. Desde donde es producido el lactato es recogido por la sangre y su concentración junto con la de SBE en sangre (veáse más adelante) nos indican la presencia de acidosis metabólica, específicamente acidosis láctica. Para su determinación en hígado se usó el kit de la casa BOEHRINGER MANNHEIM/ R-BIOPHARM (Método UV) basado en la siguiente reacción:

[Ecuac 2.4] $$\text{L-Lactato} + NAD^+ \xrightarrow{\text{L-LDH}} \text{piruvato} + NADH^+ + H^+$$

El método se basa en la oxidación del ácido L- Láctico a piruvato catalizado por la nicotinamida- adenina- dicluneótido (NAD) en presencia de L-Lactato deshidrogenasa (L-LDH).

El piruvato por efecto de la glutamato- piruvato transaminasa (GTP) y en presencia de L-glutamato se convierte en L-alanina y oxoglutarato

La correspondencia estequiométrica entre la cantidad de lactato y la cantidad de NADH formado nos permitió determinar aquél de manera indirecta. El incremento de NADH de la muestra se determinó por medio de su absorbancia a 340 nm.

Los homogenizados hepáticos se prepararon en una mezcla de acetona: agua (1:1,2; v:v) en una proporción de 1:10 (p:v). Estos homogenizados se centrifugaron a 15 000 xg durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron primero evaporados con N_2, y luego liofilizados al vacío (Liofilizador.TELSTAR). Los residuos secos se mantuvieron a 4º C hasta el día del ensayo.

Los residuos secos fueron resuspendidos en 250 ul de agua bidestilada y se procedió según lo recomendado por los fabricantes del kit. Brevemente, se realizó una lectura inicial de las muestras procesadas, incluidas el blanco y el estándar. Una vez añadida la enzima L-LDH se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se realizó la segunda lectura.

Se usó el ácido láctico contenido en el kit como patrón.
Al incremento en las D.O. leídas antes y después de la incubación corregidos por el blanco se les multiplicó por el factor que resultó de la siguiente fórmula:

[Ecuac 2.5] g lactato/L muestra = $(V_f \times MW)/(\varepsilon \times d \times V_m \times 1000)$

Donde: Vf: Volumen final; Vm: volumen de la muestra, d: light path; ε: coeficiente de extinción del NADH, que a 340 nm equivale a 6,3 ($L.mmol^{-1}.cm^{-1}$)
Los resultados se expresaron en mmol Lactato/ g tejido.

2.3.1.6 OXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico producido por la NOS en medio acuático es convertido rápidamente en NO_2 y NO_3.

[Ecuac 2.6] $\mathbf{2\,NO^{\bullet} + O_2 \Longrightarrow N_2O_4 + H_2O \Longrightarrow NO_2^- + NO_3^-}$

Para una estimación total del NO producido es necesario valorar ambas formas (NO_3 y NO_2) presentes en la célula. La valoración de nitrato/nitrito se fundamenta en la técnica descrita por Griess (1879).

El nitrato presente en la muestra se redujo a nitrito mediante la incubación con el enzima nitrato reductasa, en presencia de su cofactor, el NADPH. El nitrato total final se mide tras su reacción con el reactivo de Griess.
La reacción se puede resumir en dos pasos:

[Ecuac 2.7] $\mathbf{NO_3^-} \xrightarrow{\text{Nitrato Reductasa}} \mathbf{NO_2^- + (Griess\ 1)}$

[Ecuac 2.8] $\mathbf{2NO_2^- + Griess\ 2 \longrightarrow R1—N{=}N—R2}$ **(Complejo liláceo)**
max absorbancia a 540 nm

El homogenizado hepático se preparó en el tampón $PBS_{10\ mM}$ + $NaCl_{0,15M}$, pH 7,4 en la proporción 1/10 (p/v). Se centrífugo a 10 000 xg durante 20 minutos (4° C) y del sobrenadante obtenido se destinó una alícuota para la determinación de proteínas. El sobrenadante restante se ultrafiltró (filtro 10 000 KD, Millipore) a 14000 xg durante 80' (4°C). El ultrafiltrado se conservó a –20° C hasta su análisis.

Se usó como estandar una solución de nitrato sódico 100 uM. Se construyó una recta patrón cuyas concentraciones en los pocillos iban de 0 a 32 nmol de nitrito

La concentración fue corregida por el factor de dilución del pocillo y se expresó en nmoles /mg proteina.

2.3.1.7 MALONDIALDEHIDO

El MDA es un subproducto de la peroxidación lipídica, cuya valoración es uno de los parámetros más frecuentemente utilizado para medir el grado de lipoperoxidación de una muestra, sometida a estrés oxidativo. El MDA se mide generalmente por reacción con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) ya que éste reacciona estequiométricamente con el MDA formando un complejo que se puede leer por espectofotometría (longitud de onda de 540 y 620 nm).

El método usado para la determinación de MDA en tejidos se basó en la técnica desarrollada por Uchiyama en 1978 (65) con ligeras modificaciones.
Se prepararon homogenizados hepáticos en $KCl_{1,15\%}$ en la proporción 7:50 (p:v). Se tomaron 2 alicuotas (1 ml cada una) y se destinó el homogenizado sobrante para la determinación de proteínas. Ambas alícuotas fueron desproteinizadas con $TCA_{28\%}$ en la proporción 1: 0,25 (v:v). Una de las alícuotas se destinó para la determinación del MDA total y la otra se centrifugó para buscar el contenido de MDA del sobrenadante.

Se colocó la muestra procesada (total o sobrenadante) en tubos de cristal y por duplicado. Para evitar la autooxidación de la muestra durante el proceso de ebullición se añadió $EDTA_{0.14\ mM}$, $BHT_{0.1\ mM}$. Se añadió además ácido fosfórico, y la

solución de TBA (porcentajes finales de H_3PO_4, y TBA fueron 1,5 y 38,1% respectivamente) y se mantuvo en ebullición durante 45 minutos. Se detuvo la reacción enterrando los tubos en hielo. Una vez frio se mezcló el producto con butanol (proporción 1:1, v:v) y luego se centrifugaron los eppendorfs a 2000 xg durante 15 minutos. Se leyeron las absorbancias en el lector de placas a 540-620 nm frente a un blanco de agua destilada.

Se construyó una recta patrón usando TEP (1mM en $HCl_{0.001N}$) equivalente a una concentración de MDA de entre 0 y 2,0 nM. Los tubos conteniendo la patrón fueron llevados a ebullición junto con las muestras (ver arriba).
Los resultados obtenidos tras extrapolar la patrón fueron de nmoles de MDA por ml de muestra. De la diferencia de los niveles de MDA total y de su fracción medida en el sobrenadante se obtuvo el valor de MDA del precipitado, que representa al MDA ligado a proteínas. Por otro lado el MDA medido en el sobrenadante equivale a la fracción de MDA libre encontrado. Una vez determinada la concentración de proteínas los resultados se expresaron en nmoles de MDA por mg de proteína.

2.3.1.8 MARCADORES PROAPOPTOTICOS: CASPASA 3

Las caspasas activas reconocen secuencias de 4 a 5 aminoácidos en una molécula sustrato, la mayoría el residuo aspartato del extremo C-terminal. Para la caspasa 3 esta secuencia es el DEVD al cual la caspasa rompe inmediatamente detrás de su segundo residuo aspartato.

La determinación de la caspasa 3 se realizó usando un Kit de Chemicon International para determinación de Caspasa por colorimetría (Ref APT 165) que contiene un sustrato sintético provisto de la secuencia DEVD y que está marcado con *p*- nitroanilina (pNA) en su extremo terminal. Cuando este pNA queda libre por acción de la caspasa activa, es detectado por espectrofotometría (absorbancia a 405 nm). Ya que la cantidad de pNA libre es proporcional a la concentración de

enzima activa presente en la muestra, la actividad de la caspasa 3 se puede calcular monitoreando la D.O. de pNA libre a una longitud de onda de 405 nm.

El día del ensayo se hizo una mezcla del tampón de homogenización (Hepes 25 mM, MgCl2 5mM. EDTA 5mM, DTT 2mM, glicerol 10%, pH 7,5)(66).y el cóctel de inhibidores de proteasas (Aprotinin 80 uM, Leupeptin 2 mM, Bestatin 4 mM, Pepstatin A 1.5 mM, E-64, AEBSF 104 mM, Sigma).
En esta mezcla se prepararon los homogenizados de hígado en la proporción de 1/3 (p/v).

Las muestras se centrifugaron a 12 000 xg durante 10 minutos(4° C). Se reservó una alícuota del sobrenadante para la determinación de proteínas y el resto se alicuotó y se mantuvo a –80° C hasta el día del ensayo.

Para la determinación de la actividad de la caspasa3 se siguieron las indicaciones del fabricante del kit. La placa con los reactivos y la muestra se incubó a 37° C durante una hora, transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 405 nm.

Usando el estándar pNA incluido en el kit se hizo un banco de diluciones que fue desde 0 a 1000 uM. que fueron incluidos en la placa sin incubar justo antes de su lectura.

La densidad óptica obtenida en las muestras fue extrapolada a la recta patrón de pNA obteniéndose la concentración en nmol/ml. Una vez determinada la concentración de proteínas se expresó los resultados en nmoles de pNA/ mg de proteína.

2.3.1.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El contenido de proteína de los homogenizados de tejido hepático se calculó mediante la técnica de Bradford(67) usando γ globulina como patrón .

Se realizó una dilución del homogenizado (o del sobrenadante según el caso) de 1:40 en tampón correspondiente. Se realizó una solución estándar de gamma globulina (Sigma) en PBS. La reacción de la muestra diluida en Azul Brillante de Coomasie (ABC) $_{0.01\%}$ se realizó a temperatura ambiente y se leyó en el lector de placas a 620 nm después de 15 minutos.

2.3.2 **DETERMINACIONES EN SANGRE:**

2.3.2.1 HEMOXIMETRIA:

La Hb normal no debe presentar COHb, o MetHb y la presencia de cualquier derivado puede causar una disminución significativa de la carga de oxígeno en los pulmones.

Para la determinación de la Hb y sus derivados se usó un Hemoxímetro OSM3 (Radiometer, Copenhagen, Denmark) que emplea un avanzado sistema de espectofotometria (reverse optic gratind/ diode) provisto de un fotodiodo termostatado con una lámpara halógena (6V/20W) que tras calentar la muestra (35 ul) hasta 37° C la hemoliza ligeramente por ultrasonido (aproximadamente 1 ul) y mide la muestra en seis longitudes de onda (535, 560, 577, 622, 636, y 670 nm).

Se puso en marcha el equipo media hora antes de iniciar el experimento, tiempo suficiente para el calentamiento del equipo y rellenado de sus circuitos.

2.3.2.2 GASOMETRIA :

Se analizaron parámetros fisiológicos en las muestras de sangre arterial de todos los grupos. Estos parámetros incluyeron gases arteriales PaO_2, $PaCO_2$ y pH de la sangre determinados que se determinaron usando el analizador de gases ABL 5 (Radiometer, Copenhagen, Denmark) y la satutración de O_2 de la hemoglobina, el Hemoxímetro (OSM3) multilongitud de onda, usando el modo animal para hemoglobina de rata.

El ABL 5 se calibró usando los niveles de CO_2 producidos por dos botellas de gas de diferente concentración de CO_2 y usando 2 tampones fosfatos (Radiometer pH 7,383 y 6,841).

Debido a que el sistema del equipo se mantuvo a temperatura constante (37° C) fue necesario realizar una corrección de parámetros dependientes de la temperatura real del animal especialmente para todas aquellas muestras de animales hipotérmicos o durante la fase de recalentamiento. Así tenemos las siguientes fórmulas:

- Corrección pH versus temperatura

  Se usó la ecuación de Alfaro(68):

[Ecuac 2..9] $\Delta pH/.\Delta T = -0,0141.....$

- Corrección de PaO_2 versus temperatura:

[Ecuac 2.10] $\Delta \text{ Ln } PaO_2/ \Delta T= 0,058 [0,243 X (PaO2 /100)^{3,88} +1] ^{-1} +0,013$

- Corrección de pCO_2 versus temperatura

  Se usó el nomograma de Kelman & Nunn(69), que fue transformado matemáticamente a la siguiente ecuación:

[Ecuac 2.11] $Y = 0,0006453380x^2 - 0,0060743310x + 0,3414673134$

$(R^2 = 0,99985)$

Donde Y: coeficiente para de la presión parcial de CO_2 leída a 37° C, mientras que X es la temperatura real del animal en grados Celsius.

- Corrección de PaO_2 a pH 7,4 (Efecto de Bohr) .

[Ecuac 2.12] $\Delta \text{Ln } PaO_2 /\Delta pH = (PaO_2 /26,7)^{0,184} -2,2+ 0,003 BE$

2.3.2.3 CONCENTRACIÓN DE IONES

Se usó el analizador de iones EML100 (Radiometer) para la determinación de las concentraciones de los iones Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, provisto de cinco electrodos, uno de referencia y otros distintos por cada ion a determinar. Estos electrodos eran específicos para cada ion, conteniendo en su interior soluciones electrolíticas con una concentración conocida para ese ion. Por esta razón cuando la muestra (con una concentración desconocida del ion) se ponía en contacto con la membrana del electrodo se genera una diferencia de potencial debido a la diferentes concentraciones (mejor dicho actividades) del ion a ambos lados de la membrana.

Se puso en marcha el equipo dos horas antes de iniciar el experimento, tiempo requerido para el calentamiento y rellenado de los circuitos, así como la realización de sucesivas calibraciones para afinar la sensibilidad de los electrodos.

Las muestras de sangre (125 uL) fueron inyectadas en el equipo inmediatamente después de haber sido extraídas del animal. Los datos obtenidos se procesaron directamente.

Al final del experimento se realizó el protocolo de limpieza del equipo. También se realizó el protocolo de desproteinización semanalmente (sol S5362, Radiometer) a fin de evitar la acumulación de restos que interfirieran en el buen funcionamiento del equipo. Cuando la sensibilidad de los electrodos no era la adecuadase reemplazó la membrana por otra nueva, de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes.

2.3.2.4 LACTATO

El principio de la reacción es el mismo que el expuesto en la determinación de lactato en hígado (ver 2.3.1.5).

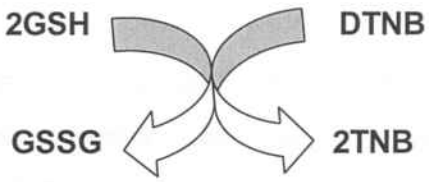
Previamente se desproteinizó la muestra de sangre añadiendo Ac perclórico$_{0.5\ N}$ (1/10 v/v) y agitando vigorosamente. Se centrífugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se usó el sobrenadante para la determinación de lactato siguiendo las indicaciones del fabricante, de la misma forma que se ha descrito para la determinación de lactato en hígado.

Se usó el ácido láctico contenido en el kit como referencia.
El resultado se expresó en mmol de Lactato / litro

2.3.3 DETERMINACIONES EN PLASMA:

2.3.3.1 GRUPOS SH (THIOLES).

Para la medida de los grupos SH en plasma se usó el reactivo de Ellman, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). El GSH y otros thioles reaccionan con el DTNB formando un producto amarillento detectable por espectrofotometría a 412 nm, cuya máxima absorbancia se obtiene a pH 8,0.



Los reactivos se pusieron directamente en los pocillos de la microplaca y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La concentración en los pocillos fue aproximadamente la siguiente:
Plasma, 5%; Tampón Tris Base, 37,2 mM; DTNB, 0,1 mM y metanol, 79,2%.
Se leyó la absorbancia a 412 nm

Se usó una solución de GSH 1mM como estándar. La concentración en los pocillos se estableció en el rango de 0 a 1mM.

Los resultados se expresaron en mmoles de thioles por ml de plasma.

2.3.3.2 OXIDO NITRICO:

Los principios básicos de las reacciones se han descrito ya en el correspondiente apartado de determinación de NO en hígado.

Las muestras de plasma fueron ultrafiltradas del mismo modo que lo descrito para las muestras de hígado (ver 2.3.1.6). Este sobrenadante ultrafiltrado se congeló a –20ºC.

Se trabajó siguiendo las especificaciones del Kit de Cayman y Chemical para la determinación colorimétrica de Nitrato + Nitrito.
.Se construyó una recta patrón cuyas concentraciones en los pocillos iban de 0 a 32 nmol de NOx.

La concentración obtenida fue corregida por el factor de dilución del pocillo y expresada en nmoles/ ml de plasma

2.3.3.3 MALONDIALDEHIDO:

El MDA plasmático se determinó según la técnica descrita por Yagi (1984)(70) que incluye una precipitación ácida de los lípidos junto con las proteínas séricas, eliminándose así las sustancias hidrosolubles que pueden también interferir con el TBA. Debido a que durante el calentamiento al que se somete a la muestra la presencia de hierro contenido en ésta puede incidir en una sobrevaloración del MDA, se usaron quelantes de hierro (EDTA) y antioxidantes (BHT).

La muestra de plasma se desproteinizó por la adición de H_2SO_4 1/12N (1/4 v/v) y de ácido fosfotúngstico al 10% (1/6 v/v). Se agitó fuertemente y se centrífugó a 3000 rpm (10 minutos, 4º C). Se eliminó el sobrenadante (donde se encuentran las TBARS hidrosolubles). El precipitado se resuspendió en agua bidestilada.
Al pellet resuspendido se le añadieron EDTA, y BHT $_{0,2\% \text{ en etanol}}$ para evitar la lipoperoxidación durante el proceso de valoración. Se añadió el TBA $_{1\%}$ y las muestras se mantuvieron en un baño a 95 °C durante 1 hora. Las interferencias por turbulencia en la lectura se eliminaron por extracción del color con el mismo volumen de butanol. Después de centrifugar 15 minutos a 450 xg, se tomó la fase butanólica superior para cargar en la microplaca. Se leyó en el Lector de microplacas iEMS (Labsystems, UK) a 540 y 620 nm. La absorbancia final resultó de la diferencia entre las densidades ópticas leídas a 620 nm y 540nm.

La curva estandar de MDA se obtuvo por hidrólisis ácida del 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Por hidrólisis de cada mol de TEP se obtienen 2 moles de MDA. A partir de TEP se preparó una solución estándar equivalente a una

concentración de MDA 5mM. Esta solución se conservó en frio (4° C) y oscuridad por un máximo de 3 meses. El día del ensayo se preparó una recta patrón de MDA de entre 0 a 2 nM que se procesó junto con las muestras.

Los resultados se expresaron en nmoles de MDA por ml de plasma.

2.3.3.4 TRANSAMINASAS:

El hígado posee una gran variedad de transaminasas o aminotrasferasas encargadas de sintetizar o hidrolizar aminoácidos. La concentración de estas enzimas en el plasma suele ser normalmente bajas. Sin embargo en caso de daño hepático, la membrana de los hepatocitos se hace permeable y algunas de estas enzimas son liberadas al plasma. Las más medidas son la alanina amino transferasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST).

Aspartato amino transferasa (ASAT)

La técnica que permite valorar la actividad de la ASAT se basa en las siguientes reacciones:

[Ecuac 2. 13] α-cetoglutarato + L- aspartato $\xleftrightarrow{\text{ASAT}}$ L- glutamato + oxalacetato

[Ecuac 2.14] oxalacetato + NADH + H^+ $\xleftrightarrow{\text{MDH}}$ L- malato + NAD^+

Concentraciones finales en la reacción: Tampón Tris pH 7,8 (80 mM), L-aspartato (240mM), α- cetoglutarato (12,0 mM), MDH (≥0,42 U/L), LDH (≥0,60 U/L), NADH (0,18 mM)

Alanina amino transferasa (ALAT).

Por otro lado la técnica que permite valorar la actividad de la ALAT es similar a la anterior:

[Ecuac 2.15] α-cetoglutarato + L- alanina $\xleftrightarrow{\text{ALAT}}$ glutamato + piruvato

[Ecuac 2.16] piruvato + NADH + H^+ $\xleftrightarrow{\text{MDH}}$ L- lactato + NAD^+

La velocidad con la que disminuye el NADH se mide espectrofotometricamente a 37° C, a una longitud de onda de 340 nm, y es directamente proporcional a la actividad de AST o ALT presente en la muestra

2.3.4 DETERMINACIONES EN ERITROCITOS:

2.3.4.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA

La técnica para la determinación de la actividad de la CuZn-SOD se basa en la inhibición de la autooxidación del pirogallol por la SOD presente en las células (62).

Los eritrocitos se hemolisaron con agua destilada. Al hemolisado se le añadió una mezcla de etanol: cloroformo fríos (proporción 62.5:37.5 v/v) en tubos de cristal (que habían sido previamente limpiados con HCl, para retirar cualquier traza de Fe^{2+}). Tras agitar vigorosamente la mezcla durante 30 segundos se centrifugó a 1770 xg a 4° C durante 5 minutos. En el sobrenadante obtenido se valoró la actividad de la SOD tal como ya se describió para el hígado (ver 2.3.1.1).

El resultado final se expresó en Unidades de SOD por gramo de hemoglobina..

2.3.4.2 CATALASA

La actividad de la catalasa fue determinada siguiendo el método descrito por Aebi(71)

Se hemolisaron los eritrocitos, al igual que para la determinación de la SOD. Las muestras fueron agitadas vigorosamente y se diluyeron 20 uL del hemolisado en 10 mL de tampón fosfato 50 mM (pH 7.0) (dilución 1:500). Las muestras se procesaron de manera análoga a lo descrito para la determinación de esta enzima en el hígado (ver apartado.2.3.1.2).

El resultado final se expresó en K por gramo de hemoglobina.

2.3.4.3 GLUTATION PEROXIDASA

Se utilizó el kit para la determinación de Glutation Peroxidasa de la casa RANSEL (Randox Laboratories Ltd. Ardmore, UK). La GSH-Px cataliza la oxidación del glutation (GSH) por el hidropeóxido de cumeno. En presencia de glutation reductasa (GSH-R) y NADPH el glutation oxidado (GSSG) es inmediatamente convertido a la forma reducida con la oxidación concomitante de NADPH a $NADP^+$. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm.

Los eritrocitos fueron lisados por congelación y diluidos 1:1 en agua destilada. La muestra fue rediluida luego en el tampón diluidor del kit. Se colocaron los siguientes reactivos directamente en los pocillos de la microplaca: la solución reactiva, la muestra rediluída y el hidroperóxido de cumeno en la proporcion 150:6:10 respectivamente. Se realizó la lectura de la cinética de la reacción a una longitud de onda de 340nm durante 3 minutos a 37° C.

- La pendiente de la recta obtenida durante la cinética viene dada en DO/min. Este resultado se aplica a la patrón en memoria, obteniéndose las U GPx/ ml.

[Ecuac 2.17] $DO/\ min = 0.085952\ [U/mL] + 0.000076$

(coeficde regresión: 0,9997)

2.3.4.4 HEMOGLOBINA

Se determinó mediante el método espectrofotométrico de Drabkin y Austin, que se fundamenta en la oxidación dela hemoglobina a cianometahemoglobina,

Se mezclaron el reactivo de Drabkin con la suspensión de eritrocitos en proporción 1/5 se agitaron fuertemente y se centrifugaron a 3000 rpm durante

10 minutos. Finalmente se leyeron las muestras a 540 nm. La curva patrón de hemoglobina se obtuvo usando un estándar de hemoglobina bovina.

2.3.5 ESTADÍSTICA

Los resultados se expresaron como los promedios ± error estandard de media (SEM). Los datos fueron analizados tanto por el test de la t de student como por el ANOVA de dos variables, usando el test Student-Newman-Keuls para identificar las diferencias significativas ($p < 0.05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

3.1 *BLOQUE I: IMPLICACIONES DE LA ANESTESIA EN LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOTERMIA: KETAMINA vs. PENTOBARBITAL.*

3.1.1 PROTOCOLO A: ANESTESIA EN NORMOTERMIA

3.1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Valorar la implicancia de los regímenes anestésicos de uso más común experimentación: ketamina y pentobarbital, sobre el equilibrio ácido base.*
- *Estudiar el efecto de estos anestésicos sobre los parámetros de estrés oxidativo en normotermia.*

3.1.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

- Pentobarbital:

Los animales fueron anestesiados con Pentobarbital, tal como se describe en el apartado 2.1.2.1. Se canuló la carótida y se les extrajo muestras de sangre arterial a intervalos de 15 minutos durante una hora

- Ketamina:

Los animales fueron anestesiados con Ketamina, tal como se describe en el apartado 2.1.2.2. Se canuló la carótida y se les extrajo muestras de sangre arterial a intervalos de 15 minutos durante una hora

3.1.2 PROTOCOLO B: ANESTESIA EN HIPOTERMIA.

3.1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un sistema que permita la inducción de hipotermia profunda controlando de una manera fácil y eficaz las velocidades de enfriamiento y recalentamiento.
- Caracterizar las fluctuaciones en parámetros hemodinámicos (flujo, frecuencia cardiaca, y presión arterial) inducidos por ketamina y/o pentobarbital durante el enfriamiento.

3.1.2.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.

- *Pentobarbital + HT*
- *Ketamina + HT*

Los animales de ambos grupos fueron anestesiados de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.1.2.3. Se les canuló la carótida, y se les monitorizó el flujo portal durante el enfriamiento, transcurrido una hora del cual se les sacrificó. Las muestras de sangre se extrajeron al inicio y final del experimento.

3.1.3 PROTOCOLO C: VELOCIDAD EN EL RECALENTAMIENTO

3.1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Establecer las velocidades adecuadas de enfriamiento y recalentamiento que garanticen su supervivencia para nuestro modelo.*

3.1.3.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Estos animales fueron anestesiados con Pentobarbital. A todos los animales se les canuló la carótida, se monitorizó el flujo portal y se incluyó el sistema intra abdominal de enfriamiento y recalentamiento.

Los animales fueron enfriados hasta una temperatura corporal de 20° C, mantenidos durante 1 hora a ese nivel de hipotermia y luego fueron repartidos aleatoriamente en dos grupos de acuerdo a las diferentes velocidades de recalentamiento.

- *Recalentamiento Rápido (RCR)*

  El grupo RC_R fue recalentado a una velocidad de 0,25°C/ minuto, durante aproximadamente una hora hasta alcanzar los 37°C

- *Recalentamiento Moderado (RCM)*

  El grupo RC_M se recalentó a una mayor velocidad, 0,35°C/ min, hasta alcanzar los 37°C.

3.1.4 PARÁMETROS EVALUADOS.

En el primer protocolo se evaluaron por un lado el nivel de oxigenación, y los principales indicadores del equilibrio ácido base. Se analizó el perfil iónico de las diferentes anestesias, y se calculó el valor de SID. También se analizó los TBARS como indicadores de daño oxidativo, además del estudio de los tioles en plasma. Finalmente se analizó la concentración de óxido nítrico en plasma en ratas normotérmicas. En el protocolo B se monitorizó las fluctuaciones del flujo venoso portal durante la inducción de hipotermia profunda. También se

midieron la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca a diferentes temperaturas, durante el proceso de enfriamiento. Finalmente en el protocolo C se analizó la incidencia de las diferentes velocidades de recalentamiento en el índice de mortalidad.

3.1.5 **RESULTADOS DEL BLOQUE**

3.1.5.1 PROTOCOLO A: ANESTESIA EN NORMOTERMIA.

La tabla 3.1 muestra los resultados de la saturación de hemoglobina, presiones arteriales de O_2 y CO_2, pH, y otras variables de relevancia para el estado ácido base medidos a intervalos de 15 minutos en el grupo de ketamina, hasta los 60 minutos, mientras que el grupo de pentobarbital sólo se reportan los valores obtenidos al inicio y tras 60 minutos post anestesia debido a que los valores intermedios no mostraron variaciones significativas.

Al inicio del experimento los animales anestesiados con Pentobarbital muestran una mayor depresión respiratoria: la PO_2 disminuída y la PCO_2 aumentada, a pesar de lo cual los valores de pH, ratio $[Na^+]/[Cl^-]$ y SID son mayores cuando se comparan con los valores de las ratas anestesiadas con Ketamina.

En el grupo Ketamina las muestras obtenidas a los 15 y 45 minutos son similares entre sí: pH, PO_2, HbO_2 más bajos y PCO_2 más altos comparados con las otras muestras del mismo grupo, una acidosis plamática que parece suavisarse en las lecturas a 30 y 60, esto coincide con el descenso de la concentración del anestésico en sangre en esos puntos (la primera muestra se extrajo 15 minutos después de la inyección del anestésico y K45 aproximadamente 15 minutos después de la dosis de recuerdo). A nivel iónico en el grupo Ketamina se encontró un incremento en la concentración del K^+ que se hace significativo al final del experimento.

TABLA 3.1:
Cambios en los gases arteriales y parámetros relacionados con el equilibrio ácido base en ratas normotérmicas.

	P15	P60	K15	K30	K45	K60
Hb O_2 (%)	89.26 ± 1.02	89.20 ± 1.76	87.26 ± 2.20	95.80 ± 0.42^{++}	90.43 ± 1.82	93.18 ± 1.58^{+}
Hb CO (%)	0.25 ± 0.08	0.00 ± 0.20	-0.36 ± 0.12	-0.59 ± 0.36	-0.11 ± 0.09	-0.30 ± 0.12
Met Hb (%)	1.21 ± 0.05	1.12 ± 0.06	0.60 ± 0.12	0.61 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.72 ± 0.10
$P_{(a)\,O2}$ mmHg	82.50 ± 3.93	78.25 ± 8.00	74.67 ± 3.86	94.71 ± 4.99^{+}	82.29 ± 6.53	88.00 ± 4.19
$pH_{(a)}$	7.269 ± 0.009	7.270 ± 0.026	7.220 ± 0.021	7.286 ± 0.018^{+}	7.240 ± 0.020	7.281 ± 0.023^{+}
$P_{(a)\,CO2}$ mmHg	54.25 ± 1.31	50.75 ± 3.88	41.11 ± 1.64***	30.29 ± 1.76^{+++}	37.00 ± 1.98	30.14 ± 2.27^{++***}
HCO_3^- mM	24.00 ± 0.68	22.25 ± 0.48	16.33 ± 0.55	13.86 ± 0.59	15.14 ± 0.77	15.00 ± 0.89
SBC mM	21.63 ± 0.60	20.25 ± 0.25	15.00 ± 0.71	16.40 ± 0.68	15.25 ± 0.95	15.80 ± 0.37
tCO_2	57.75 ± 1.60	53.00 ± 1.22	36.25 ± 3.38	34.20 ± 1.36	35.25 ± 1.03	33.00 ± 1.41
SBE mM	-2.11 ± 0.63	-3.50 ± 0.29	-11.50 ± 0.96	-11.0 ± 0.84	-11.50 ± 0.87	-11.60 ± 0.51
Hct(%)	46.73 ± 0.96	42.07 ± 4.83	45.57 ± 0.94	44.67 ± 0.85	43.67 ± 0.90	44.08 ± 1.17

En el grupo Ketamina (K) se aplicó una dosis extra de anestesia a la mitad del experimento. Se incluyeron medidas de antes y después de esta dosis (30 y 45 min). En el grupo Pentobarbital (P) solo se muestran los valores inicial y final.(15 y 60 min). + $p<0.05$, ++ $p<0.01$ and +++$p<0.001$ son estadísticamente diferentes de sus valores iniciales dentro del mismo grupo (n=6) usando ANOVA y (Student-Newman-Keuls). * $p<0.05$ y ***$p<0.001$son estadísticamente diferentes del grupo Pentobarbital.

Por contraposición, en el grupo Pentobarbital las muestras extraídas a inicio y final no muestran diferencias en ninguno de los parámetros analizados. Debido a su efecto más persistente en el tiempo no fue necesaria ninguna dosis de recuerdo por lo cual los parámetros se mantuvieron más estables

TABLA 3.2:

Cambios en las concentraciones de los principales iones en ratas normotérmicas. En el grupo Ketamina (K) se aplicó una dosis extra de anestesia a la mitad del experimento. Se incluyeron medidas de antes y después de esta dosis (30 y 45 min).

	P15	P60	K15	K30	K45	K60
K^+	3.61 ± 0.20	3.66 ± 0.22	4.125 ± 0.13	4.729 ± 0.21	4.750 ± 0.27	4.950 ± 0.15+***
Na^+	138.93 ± 2.34	139.33 ± 0.70	141.33 ± 0.55	140.29 ± 0.61	136.71 ± 2.76	139.57 ± 0.61
Cl^-	103.83 ± 2.34	106.73 ± 0.37	115.0 ± 4.06*	111.29 ± 2.61	110.33 ± 5.00	113.83 ± 4.49
Na^+/Cl^-	1.34 ± 0.03	1.31 ± 0.01	1.241 ± 0.04	1.256 ± 0.03	1.166 ± 0.10	1.231 ± 0.04
SID	36.11 ± 1.08	34.27 ± 0.88	28.29 ± 3.78	31.09 ± 1.59	29.63 ± 3.48	25.91 ± 3.69

En el grupo Pentobarbital (P) solo se muestran los valores inicial y final (15 y 60 min). + $p<0.05$, ++ $p<0.01$ and +++$p<0.001$ son estadísticamente diferentes de sus valores iniciales dentro del mismo grupo (n=6) usando ANOVA y (Student-Newman-Keuls). * $p<0.05$ and ***$p<0.001$ son estadísticamente diferentes comparado con Pentobarbital en el mismo punto.

En la tabla 3.3 podemos observar las variaciones en la concentración de indicadores plasmáticos de daño oxidativo como las TBARs (medidas con la técnica de MDA), y de daño tisular, AST, así como del metabolismo anaerobio, Lactato y, por contrapartida, los niveles de antioxidantes no enzimáticos medidos en términos de niveles de thioles plasmáticos (Grupos SH).

En este caso se tomaron muestras al inicio (15 minutos) y al final del experimento (60 minutos). Si bien los niveles de MDA se mantienen constantes en ambos grupos, se encontró una disminución significativa de los niveles de thioles plasmáticos en el grupo de Ketamina. El nivel estable de transaminasas nos indica que no hay evidencia de daño tisular. El lactato tampoco se incrementa significativamente en ninguno de los tratamientos descartando el aumento de anaerobiosis

TABLA 3.3:

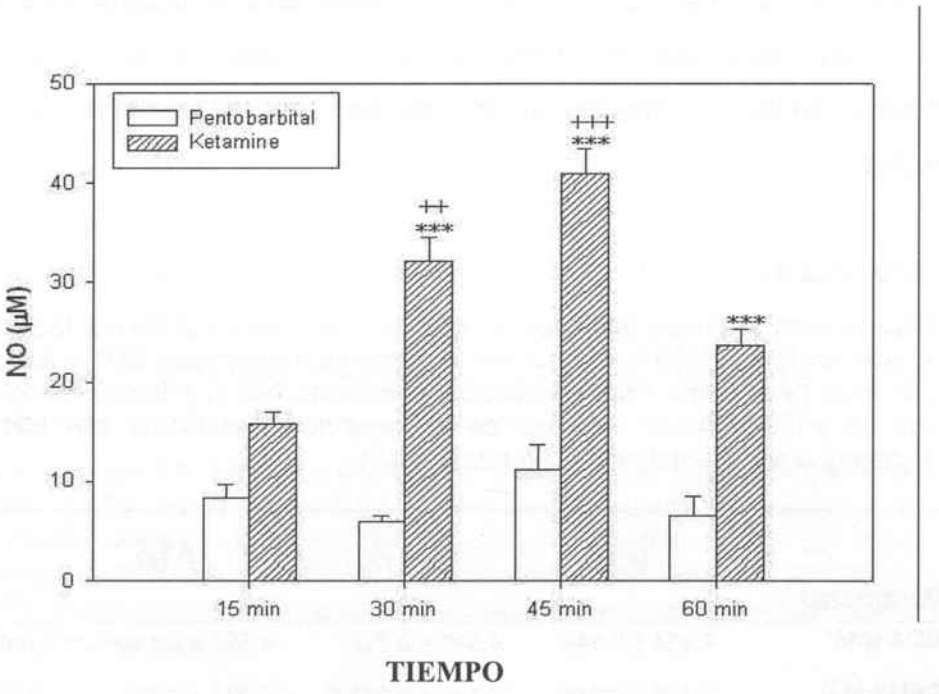
Cambios en el estado oxidativo: efectos prooxidante medidos por la técnica de malondialdehido (MDA); concentración antioxidante (grupos SH); e indicadores de daño tales como transaminasas plasmáticas (AST) y lactato sanguíneo a los 15 y 60 minutos después de la inducción anestésica con Ketamina+ Xylacina o con Pentobarbital en ratas. (n=6).

Parámetro	P 15	K 15	P 60	K 60
MDA (nM)	4.432 ± 0.446	4.540 ± 0.212	4.597 ± 0.146	4.222 ± 0.166
GSH (mM)	0.229 ± 0.018	0.186 ± 0.012 *	0.221 ± 0.021	0.138 ± 0.009 *
AST (UI/L)	41.613 ± 7.286	39.767 ± 8.815	42.905 ± 3.290	32.367 ± 0.933
Lactato (mM)	1.838 ± 0.221	2.070 ± 0.242	2.843 ± 0.360	1.941 ± 0.349

Diferencias significativas comparado con Pentobarbital en el mismo punto. * $p<0.05$ usando ANOVA y el test *Student-Newman-Keuls*.

Los niveles plasmáticos de oxido nítrico (determinado a partir de sus productos nitratos y nitritos) fueron medidos a intervalos de 15 minutos en ambos grupos y se muestran en la figura 3.1. Se encontraron incrementos significativos de NOx en el plasma de animales anestesiados con Ketamina, comparados con los animales anestesiados con Pentobarbital, alcanzándose hasta el 300% de incremento 45 minutos después de la inducción de anestesia.

Figura 3.1: Niveles de NOx plasmático a 15, 30, 45, and 60 minutos después de la inducción anestésica con Ketamina o Pentobarbital.



Los valores son la media ± SEM (n=6). Diferencias significativas comparado con Pentobarbital (en cada punto) por análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *post hoc* (Student-Newman-Keuls): ***p<0.001. Diferencias significativas comparado con ketamina a los 15 minutos (únicamente en grupo Ketamina): +++ p<0.001

3.1.5.2 PROTOCOLO B: ANESTESIA EN HIPOTERMIA

Se comparó la respuesta hemodinámica frente al enfriamiento en ambos grupos. La figura 3.2 muestra la relación de la disminución de la temperatura corporal comparada con la variación del flujo de la vena porta expresada en porcentaje del basal.

Durante la primera fase del enfriamiento, esto es cuando la temperatura corporal desciende hasta el nivel que se considerada de hipotermia moderada (30 °C), no se observa dependencia lineal entre ambas variables. Sin embargo más allá de ese límite se observa una clara relación dentro del grupo Pentobarbital ($p=0.992$): el FVP disminuye a medida que desciende la temperatura hasta situarse en por debajo del 40% del flujo inicial. Por el contrario, el grupo Ketamina no muestra esta dependencia ($p= -0.50$).

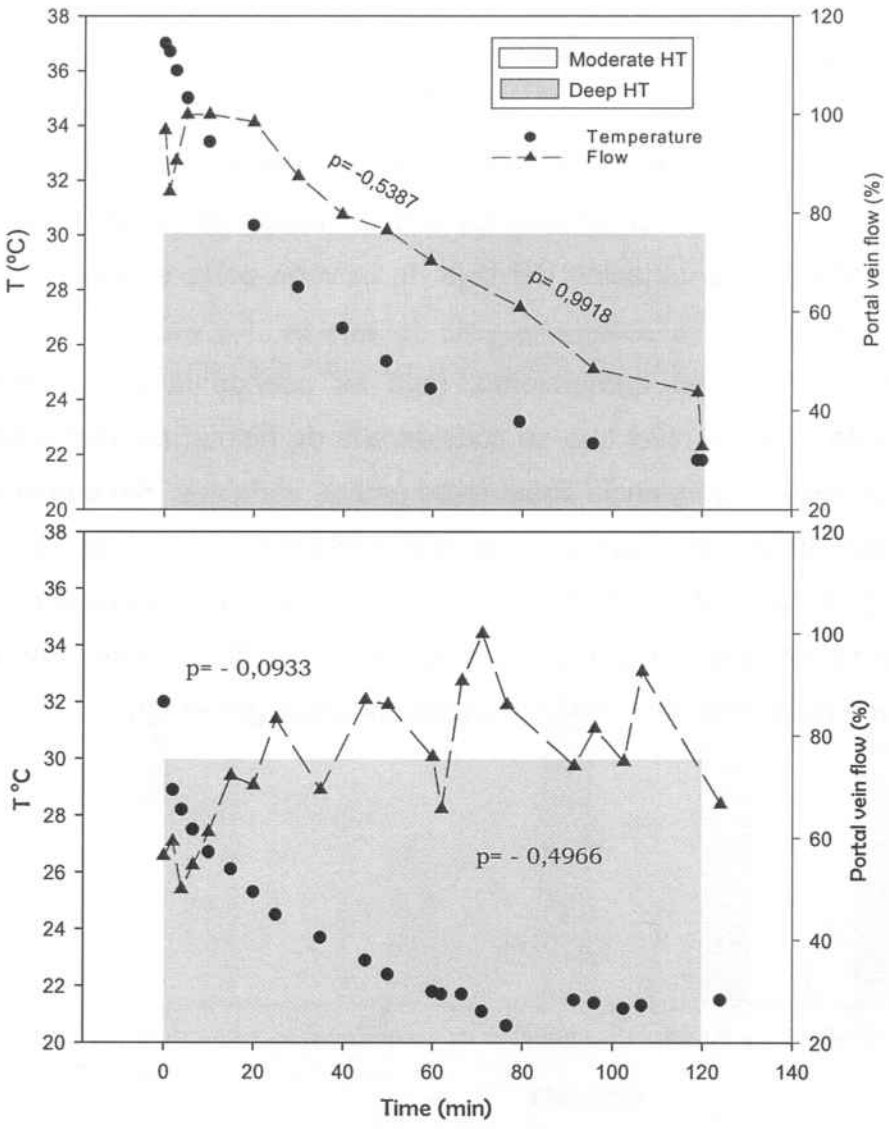


Figura 3.2: Temperatura corporal y flujo venoso portal durante el periodo de enfriamiento. Variaciones durante la hipotermia moderada (37 a 30° C) y profunda (área sombreada) en los grupos Pentobarbital (2A) y Ketamina (2B) (n=6). p: valores de dependencia lineal de ambas variables.

La tabla 3.4 nos muestra los valores de la frecuencia cardiaca y la presión arterial media (PAM) a diferentes temperaturas en ambos grupos. Las diferencias se hacen más evidentes cuando la temperatura disminuye por debajo de 30° C, observándose una mejor conservación de la presión arterial y frecuencia cardíaca en los animales anestesiados con Ketamina, En hipotermia profunda (24° C) se observa claramente que la hipotensión inducida por la hipotermia es significativamente mayor en el grupo Pentobarbital, que se corresponde con una mayor disminución de la frecuencia cardiaca, comparado con ratas tratadas con Ketamina a esa misma temperatura. Las diferencias se hacen más evidentes cuando la temperatura disminuye por debajo de 30° C donde se observa la conservación de MAP y FC en los animales anestesiados con Ketamina.

TABLA 3.4:
Cambios en la frecuencia cardiaca (FC) y la presión arterial media (PA) a diferentes temperaturas.

(°C)	37		32		27		24	
	K	P	K	P	K	P	K	P
FC	447.1 ± 3.7	431.3± 6.5	275.6 ± 9.7+++	300.9 ± 23.4+++	213.8 ± 13.1+++	199.2 ± 12.5+++	182.7 ± 1.5+++	131.4± 14.5+++*
PAM	129.0 ± 14.1	138.1 ± 1.0	116.5 ± 10.2	116.0 ± 2.1	101.8 ± 5.2+	80.3 ± 3.3	98.9 ± 2.4+++	68.8 ± 0.8+++**

Los valores son la media ± SEM (n=4). Son estadísticamente diferentes entre tratamientos usando ANOVA y (Student-Newman-Keuls): * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Son estadísticamente diferentes de sus valores basales (37° C) dentro del mismo grupo: $p<0.05$, ++ $p<0.01$ and +++$p<0.001$. FC en latidos por minuto. MAP en mmHg.

3.1.5.3 PROTOCOLO C: VELOCIDAD EN EL RECALENTAMIENTO

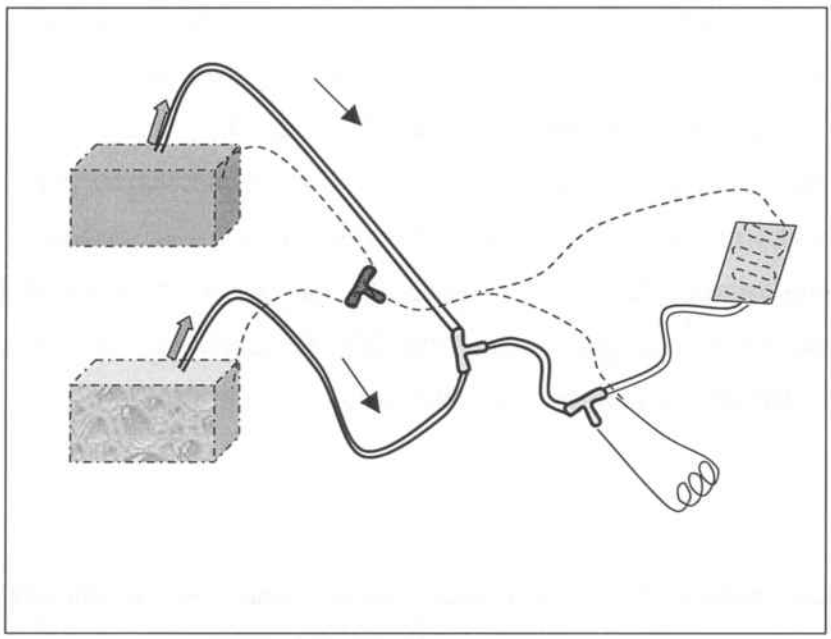
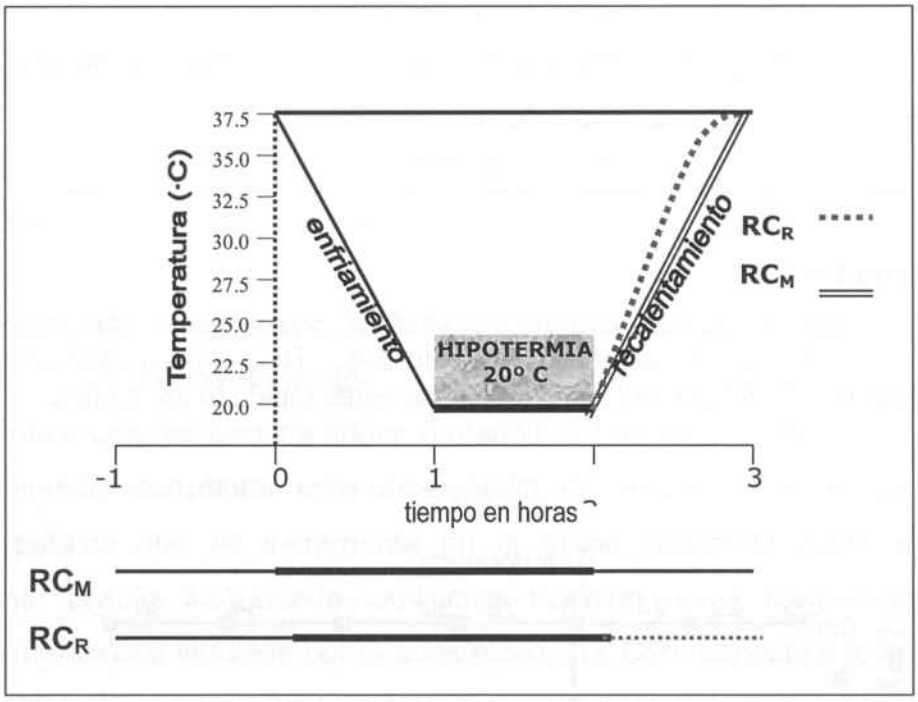


Figura 3.3: Esquema del sistema de enfriamiento y recalentamiento. Las flechas indican el sentido de circulación del agua. Las llaves de tres vías permiten conmutar instantáneamente entre los dos baños. La línea punteada indica el retorno del agua al baño.

En la figura 3.3 se presenta el diseño del sistema empleado para enfriar y recalentar a los animales. Los baños de agua fría y caliente (a la derecha), se comunicaban entre sí, y el flujo se podía conmutar fácilmente gracias a la llave de 3 vías. A la derecha (parte superior se encuentra la placa de metal, que constituía la mesa de operación, También se muestran el tubo enrollado que se incluía en la cavidad peritoneal del animal.

La figura 3.4 presenta esquematizado el protocolo seguido durante este experimento. Se muestran claramente las diferentes fases y el tiempo tras el cual se sacrificaron las ratas de los diferentes grupos experimentales

Figura 3.4: Esquema del Protocolo Experimental C.



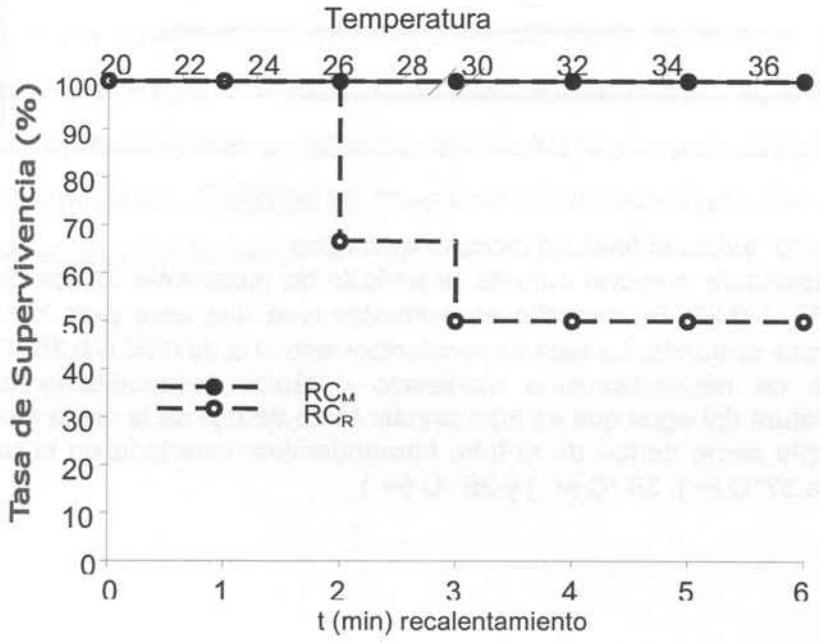
Tiempo "0" indica el final del proceso quirúrgico.
La temperatura corporal durante el período de hipotermia estable fue de 20,85 °C ± 0,25. Se necesitó aproximadamente una hora para inducir la hipotermia profunda. La tasa de recalentamiento fue de 0.25 ó 0.35 °C/ min (grupos de recalentamiento moderado y rápido respectivamente). La temperatura del agua que se hizo circular tanto debajo de la mesa metálica de cirugía como dentro de el tubo intraabdominal insertado en la rata se ajustó a 37°C (—), 38 °C (▪) y 20 °C (▬).

En la figura 3.5 observamos la incidencia de la velocidad de recalentamiento en animales sometidos a una hipotermia profunda sobre viabilidad del modelo. Partiendo de animales que habían sido enfriados hasta la misma temperatura se obtuvo diferencias en la tasa de supervivencia cuando se les recalentó a diferentes velocidades.

La tasa de mortalidad se incrementó en el grupo RC_R comparado con RC_M a medida que se incrementaba la temperatura corporal. Este mayor índice de mortalidad en el grupo RC_R parecía asociado a una deficiente recuperación del flujo venoso portal (datos no mostrados).

Figura 3.5:

Porcentaje de Supervivencia vs. temperatura corporal en ºC durante el recalentamiento a diferentes velocidades. RC_M, recalentamiento moderado (0.25 °C/ min); RC_R, recalentamiento rápido (0.35 °C/min).



3.1.6 DISCUSIÓN DEL BLOQUE I.

De la comparación de las variaciones de las presiones parciales de gases respiratorios y del pH en sangre de ambos grupos al inicio del experimento (Basal) se deduce que aunque ambos presentan acidosis, no tienen el mismo origen. Las ratas anestesiadas con Pentobarbital muestran un perfil de acidosis claramente distinto: la presión arterial de anhídrido carbónico se halla aumentada, el SBE se aproxima a cero, mientras que el valor de SID se mantiene más alto. Esto nos señala por tanto que en este grupo el principal componente de la acidosis es respiratorio, como consecuencia directa de la depresión de la frecuencia ventilatoria inducida por la anestesia.

En el grupo anestesiado con Ketamina la presión de anhídrido carbónico se acerca a los rangos de normalidad y el valor de SBE es claramente más alto lo cual apunta a una acidosis de origen metabólico. Los valores del ratio Na^+/Cl^- y de SID disminuidos corroboran esta observación. Del mismo modo, la concentración del ion potasio que se incrementa en el grupo Ketamina hacia el final del tratamiento (Tabla 3.2) puede explicarse también como consecuencia de la acidosis metabólica inducida por el anestésico(31). Con respecto a los metabolitos responsables de la carga ácida del plasma solo podemos excluir la participación del ácido láctico que no varía significativamente cuando se le compara con el grupo Pentobarbital (Tabla 3.2).

Por otro lado, si se analizan los indicadores de lipoperoxidación y antioxidantes en plasma se puede ver que a pesar de no encontrarse incremento en las TBARS en ninguno de los grupos, si existe una disminución de la concentración de grupos SH en las ratas anestesiadas con Ketamina a los 60 minutos, lo cual evidencia un ataque de radicales que ha sido amortiguado por el sistema antioxidante, que se consume (oxidándose) en el proceso (Tabla 3.3).

Los efectos de la Ketamina y el Pentobarbital (a las dosis recomendadas) sobre la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca son similares en normotermia lo que concuerda con observaciones de otros autores (60). De otro lado nuestras observaciones en hipotermia muestran, como es lógico, que la FC y la presión arterial disminuyen a medida que el animal se enfría, ya que junto con la temperatura disminuyen el metabolismo y los requerimientos energéticos. Sin embargo ambos parámetros se conservan más elevados en el grupo Ketamina, diferencia que se hace significativa en hipotermia profunda (24° C)

Si bien la FC y la presión arterial decaen sensiblemente por debajo de 27 °C independientemente del anestésico usado, lo que concuerda con los reportes de otros autores(72) los resultados de este bloque demuestran que la anestesia inducida por Ketamina además de conservar la FC y la presiñon arterial ayuda también a preservar el flujo hepático durante la hipotermia profunda experimental, lo que implica una mejor conservación del metabolismo hepático. De acuerdo con los resultados podemos intuir la participación del óxido nítrico en estos efectos beneficiosos observados con el uso de Ketamina ya que se ha demostrado el incremento de NOx en los animales de este grupo. Siendo estrictos hemos de señalar que se administró una mezcla de Ketamina + Xylacina, tal como lo recomiendan los protocolos de anestesia aprobados. Sin embargo la Xylacina es un agonista del receptor α_2 adrenérgico de efecto sedante y relajante muscular, usado para asegurar el bienestar del animal, y hasta donde se sabe la Xylacina (al igual que el Pentobarbital) no afecta el metabolismo del NO, ni tiene implicancias sobre el flujo sanguíneo, mientras que en el caso de la Ketamina se ha demostrado su participación de la vía del NO en el sistema nervioso central (73).

Como ya se ha estudiado el NO juega un rol importante en la regulación del tono vasomotor(74). Los efectos vasodilatadores del NO pueden limitar la resistencia vascular. Sin embargo, debido a su naturaleza radical, NO se ha visto implicado como causante de hipertensión pulmonar (75; 76), (76). Otros autores han estudiado un efecto vasodilatador en el músculo cremáster de rata inducido por

mecanismos dependientes e independientes del NO, en animales anestesiados con Ketamina(77). Se ha encontrado también una fuerte señal paramagnética (EPR) en extractos de hígado de ratas anestesiadas con Ketamina. Los autores de este estudio sugieren que un grupo amino secundario de la ketamina podría oxidarse hasta convertirse en el radical nitróxido detectado. Estos hechos señalan que el NO juega un rol clave en la regulación del flujo sanguíneo cuando se usa ketamina. Es por tanto recomendable y beneficioso el uso de la ketamina en pacientes hipotérmicos.

El efecto de la ketamina y el pentobarbital (en las dosis recomendadas) sobre la presion sanguínea y el gasto cardíaco no difiere en condiciones normotérmicas (60). Sin embargo, nuestros resultados en condiciones de hipotermia demostraron una reducción moderada en la frecuencia cardiaca y la presión arterial en el grupo ketamina. En el grupo pentobarbital, la reducción en ambos parámetros fue mayor a lo largo del experimento.

En el presente trabajo el uso de la ketamina como anestésico indujo un incremento en los niveles de NO plasmático además de una acidosis metabólica en ratas. No pudimos deducir el origen de este incremento de protones, aunque descartamos la participación del ácido láctico.

De otro lado durante la hipotermia profunda nos sorprendió la preservación del flujo portal hepático que presentaron las ratas anestesiadas con ketamina. Este efecto se podría atribuir a la vasodilatación inducida por el NO, o también a un efecto directo de la acidosis. ya que se ha descrito que el descenso del pH al igual que el incremento de la presión arterial de CO_2, pueden incrementar el flujo sanguíneo coronario en humanos (78). Más recientemente Heintz y col. (79)ha demostrado que la producción de oxido nítrico es necesaria para la respuesta del flujo inducida por la acidosis. En nuestro modelo posiblemente operen ambos mecanismos pero son necesarios más estudios confirmarlo. Nuestros datos prueban además, que la anestesia ketamina induce cierto nivel de estrés

oxidativo, que genera modificaciones en los grupos -SH de las proteínas, pero sin la presencia de productos de lipoperoxidación en plasma. Los valores de AST obtenidos en el grupo ketamina descartan del mismo modo el riesgo de daño hepático. En realidad estos resultados confirman que si se forman radicales nitróxido durante la inducción anestésica con ketamina, no alcanzan niveles de significancia toxicológica.

La ketamina se usa frecuentemente en la práctica veterinaria y para efectos experimentales. En este primer apartado hemos demostrado que la ketamina induce un incremento en los niveles plasmáticos del óxido nítrico, con cambios en el equilibrio ácido base que conduce a una acidosis metabólica a lo que se suma un descenso en la carga antioxidante de los grupos SH, a pesar de lo cual no existe riesgo de toxicidad hepática. Este NO podría afectar el flujo hepático sanguíneo. Recomendamos por tanto tomar en consideración estos factores cuando se planifique usar la ketamina como anestésico en protocolos experimentales.

Para el último protocolo de este bloque se seleccionó el uso de pentobarbital como anestésico debido a que si bien quedó demostrado que induce una acidosis de tipo respiratorio, ésta se corrige fácilmente por medio de ventilación asistida, De este modo conseguimos anular la intervención del $NO^{\bullet}$ (la ketamina induce el incremento de sus niveles plasmáticos), además de obtener una curva de disminución de flujo portal correlacionada con el enfriamiento, lo cual nos ayuda a limitar el flujo sanguíneo en la zona hepática, durante la hipotermia.

El incremento en la mortalidad de las ratas recalentadas a mayor velocidad coincide con lo encontrado en la literatura. La naturaleza de los resultados nos permite realizar una valoración cualitativa, el hecho de que la muerte sobreviniera tan intempestivamente nos hace sospechar de un fallo a nivel cardiopulmonar, posiblemente tras un episodio de fibrilación cardiaca. A esto hemos de agregar el hecho de que se observara una pobre respuesta del flujo portal al iniciar el

recalentamiento lo cual sugiere además alteraciones en el equilibrio hemodinámico, bien por edema de las células vasculares, o por problemas para revertir el proceso de redistribución del flujo sanguíneo iniciado en la hipotermia. Desgraciadamente no tenemos datos que nos aclaren estas dudas.

3.2 *BLOQUE II: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA HEMODINÁMICA, OXIDATIVA Y DEL EQUILIBRIO ÁCIDO BASE DURANTE LA HIPOTERMIA Y EL RECALENTAMIENTO.*

3.2.1 PROTOCOLO D: EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE PARÁMETROS HEMODINAMICOS

3.2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar las alteraciones de parámetros hemodinámicos tales como el flujo venoso portal, la presión arterial o la frecuencia cardiaca, durante la hipotermia y el recalentamiento.

- Adecuar la frecuencia ventilatoria siguiendo la estrategia de alpha stat y describir su respuesta equilibrio ácido-base, durante el enfriamiento y el recalentamiento

- Valorar la concentración de indicadores de daño tisular o sistémico, así como el estado antioxidante del animal, con un mayor énfasis en el hígado, que en su análisis conjunto nos permita un diagnóstico de la viabilidad del modelo.

3.2.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Basal (B)

A los animales se les anestesió con pentobarbital via intraperitoneal (vip), se canuló la carótida y se extrajo una muestra de sangre arterial (aproximadamente 15 minutos después de la inducción anestésica), inmediatamente después se realizó una laparatomía y se perfundió el hígado, sacrificando a los animales por sobredosis de anestesia.

Control (C)

A estos animales se les canularon la arteria carótida y la traquea, y se completó todo el protocolo quirúrgico: ventilación asistida, laparotomía, conexión de la sonda del reómetro alrededor de la vena porta, e inclusión del sistema de enfriamiento y recalentamiento en la cavidad abdominal, realizado en un tiempo máximo de sesenta minutos.

Se les extrajo muestras de sangre al inicio y final de la cirugía (basal y tiempo cero)

Hipotermia (HT)

Estos animales, además de lo descrito para las ratas control, se les enfrió a una velocidad aproximada de 1°C/ 4 minutos. Cuando los animales alcanzaron aproximadamente 20°C fueron mantenidos a esta temperatura durante una hora y sacrificados. La duración aproximada del proceso fue de 2 horas.

Se les extrajo muestras de sangre al inicio y final del experimento (tiempo cero y dos horas)

Recalentamiento (RC)

Estos animales fueron enfriados de la misma manera que el grupo HT y fueron recalentados a una velocidad de 0,25°C/ min hasta alcanzar 37°C.

Se les extrajo tres muestras de sangre a lo largo del experimento: una a tiempo cero, a las dos horas y al final del experimento.

Normotermia (NT)

A estos animales también se les realizó la cirugía descrita para las ratas control, además se les mantuvo a una temperatura constante de 37 ° C durante 3 horas. A estos animales se les extrajo sangre a intervalos similares a los del grupo RC.

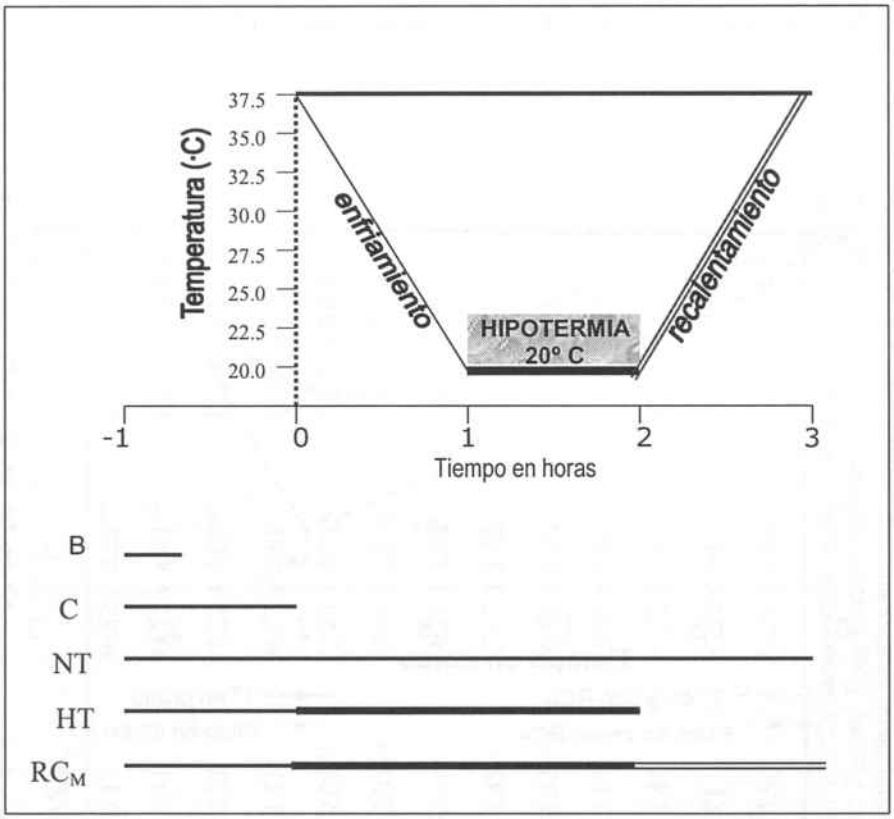
3.2.1.3 PARÁMETROS A EVALUAR

Se monitorizaron los cambios en el equilibrio ácido base siguiendo la estrategia alfa-stat. Se analizaron las concentraciones de los diferentes iones en sangre y se evaluaron las concentraciones de lactato, en sangre y tejido hepático. También se analizaron indicadores de lesión oxidativa, TBARS en hígado y plasma, asi como la presencia de los principales antioxidantes, también en hígado, plasma y eritrocitos. Se valoró la actividad del marcador apoptótico: caspasa3.

3.2.2 RESULTADOS DEL BLOQUE II

En la Fig 3.6 se esquematiza el diseño experimental y se muestran los diferentes grupos experimentales.

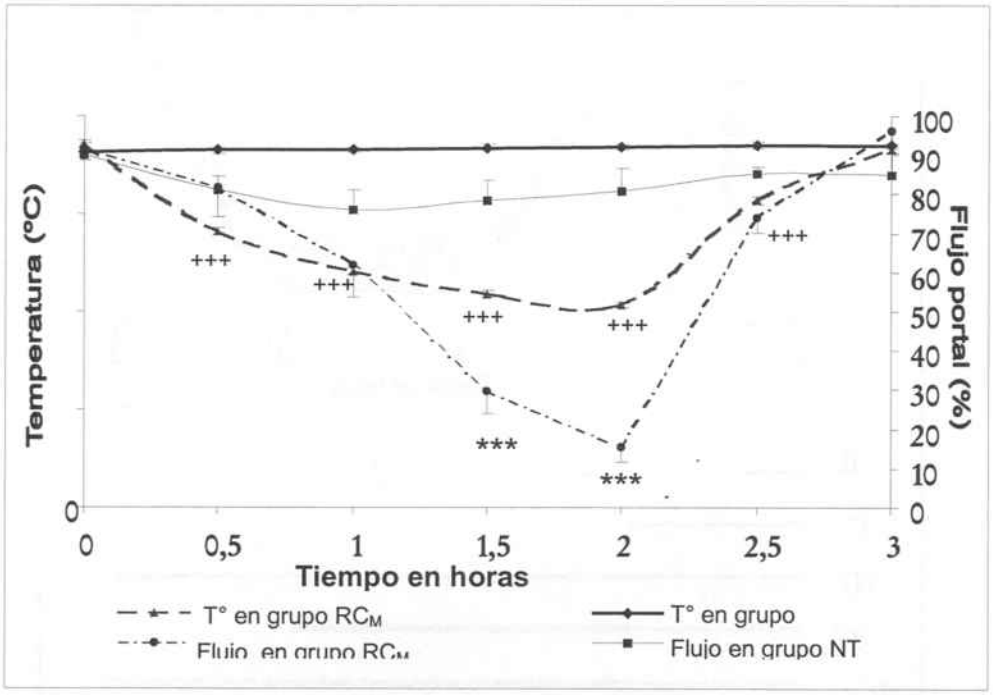
Figura 3.6: Esquema del Protocolo Experimental D.



Tiempo "0" indica el final del proceso quirúrgico.
La temperatura corporal durante el período de hipotermia estable fue de 20,85 °C ± 0,25. Se necesitó aproximadamente una hora para inducir la hipotermia profunda.
B, grupo basal; C: grupo control; NT: grupo normotérmico, HT: animales hipotérmicos; RC_M, grupos recalentados moderada.

Por otro lado en la figura 3.7 se muestra la variación de la temperatura corporal y el FVP (expresado en porcentaje del basal) en el grupo de Hipotermia recalentamiento (RC_M) comparado con el grupo normotérmico a intervalos de 30 minutos a lo largo del experimento.

Figura 3. 7
Temperatura corporal y flujo venoso portal en los grupos de Hipotermia/ recalentamiento moderado (RC_M) y normotérmico (NT).



Se incluyeron registros a intervalos de 30 minutos: media ± CME. $^{+++}$ $p< 0.001$ vs. temperatura en NT; *** $p< 0.001$ vs. flujo en NT.

TABLA 3.6:
Cambios en los gases arteriales y los indicadores del equilibrio ácido base en los grupos Basal (sólo canulados), Control(después de la cirugía), 3 horas de normotermia NT), hipotermia (HT), y recalentadas (RC_M) + $p< 0.05$ and +++ $p< 0.001$, vs. C; * $p< 0.05$ and *** $p< 0.001$ vs. HT; † $p< 0.05$ vs. RC_M.

GRUPO	BASAL	C	HT	NT	RC_M
Tc(°C)	36.83 ± 0.17	36.82 ± 0.22***	20.85 ± 0.22+++	37.44 ± 0.12	36.66 ± 0.09***
P_{O2} mmHg$_{(37°C)}$	81.17 ± 4.31	97.17 ± 4.48***	182.5.± 5.94+++	90.0 ± 4.16	91.40 ± 6.62***
P_{O2} mmHg real	80.00 ± 4.52	95.23 ± 3.05**	115.42 ± 5.89	92.54 ± 4.67	96.65 ± 3.81
Hb O_2 (%)	89.06 ± 1.33+	94.77 ± 0.61	97.68 ± 0.66	90.67 ± 2.17	91.80 ± 1.91
pH $_{(37°C)}$	7.276 ± 0.007+	7.388 ± 0.015	7.372 ± 0.032	7.387 ± 0.024†	7.273 ± 0.028
pH real	7.276 ± 0.011+	7.391 ± 0.015	7.602 ± 0.036	7. 380 ± 0.024†	7.280 ± 0.028
$[OH^-]/[H^+]$	8.57 ± 0.26+	14.71 ± 1.05	13.78 ± 1.59	14.33 ± 1.59†	9.57 ± 1.58*
P_{CO2} mmHg$_{(37°C)}$	53.17 ± 1.45+++	37.00 ± 2.42	32.60 ± 2.04	34.43 ± 3.23	40.0 ± 2.41
P_{CO2} real	52.63 ± 1.33+++	36.56 ± 2.26	16.52± 1.02	35.30 ± 3.35	39.24 ± 2.39
HCO_3^- mmol/L	23.33 ± 0.67	20.00 ± 1.32	17.14 ± 1.47	20.33 ± 1.61	18.00 ± 1.63
tCO_2	56.00 ± 1.44	47.22 ± 2.56	40.50 ± 3.84	51.50 ± 4.79	43.40 ± 4.46
SBE mmol/L	-2.7 ± 0.71	-4.5 ± 0.94	-6.33 ± 1.67	-2.5 ± 1.85	-7.4 ± 2.25
Hto (%)	46.73 ± 0.96	46.73 ± 0.96	41.99 ± 3.38	41.43 ± 1.67	44.68 ± 1.58

Los valores son la media ± CME. Tc (°C), temperatura corporal en grados C; $P_{O2\ (37°C)}$, $P_{CO2\ (37°C)}$, pH $_{(37°C)}$ son presiones arteriales de O_2 y CO_2, y pH medidos a 37 °C. P_{O2} real, P_{CO2} real , pH real son las presiones de O_2 y CO_2 y el pH corregidos a la temperatura real del animal, $[OH^-]/[H^+]$, HCO_3^-, concentración de bicarbonato; ratio de alcalinidad relativa; tCO_2, contenido total de CO_2; SBE, exceso estándar de base tampón; Hto, hematocrito.

La tabla 3.6 muestra las presiones parciales de gases arteriales como O_2, CO_2, el pH, y el ratio $[OH^-]/[H^+]$, la concentración de bicarbonato, el contenido total de CO_2, el exceso base estándar, la saturación de oxígeno de la hemoglobina y el hematocrito, entre otros, en los grupos basal, control , normotermia, hipotermia, e hipotermia/ recalentamiento.

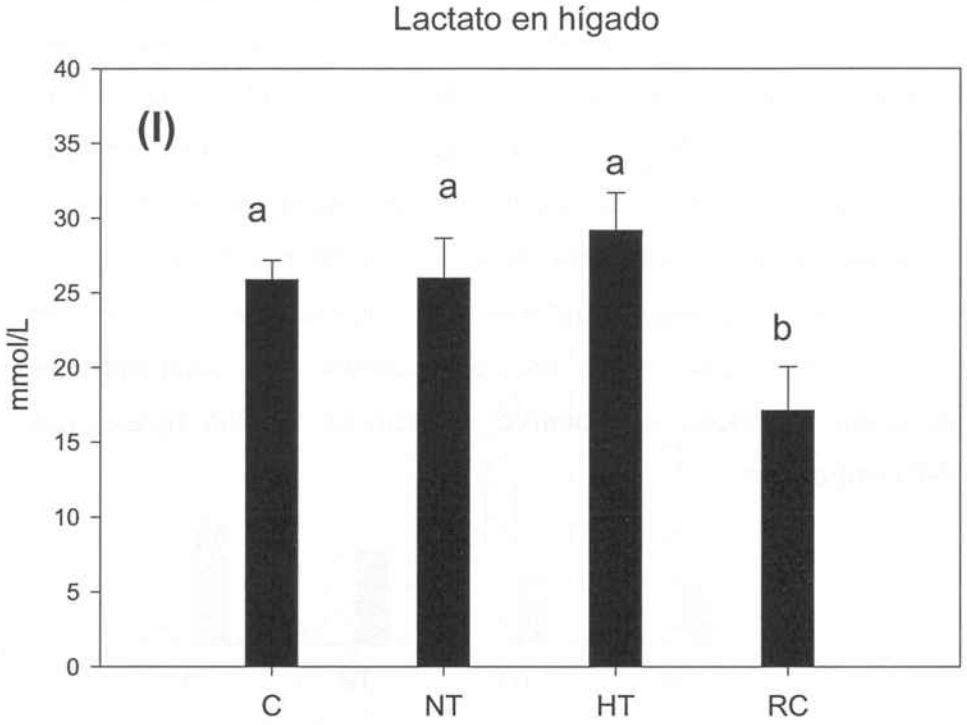
En el grupo basal, cuya extracción de sangre se realizó dentro de los primeros 15 minutos después de la inducción anestésica, se encontró un pH sanguíneo ácido acompañado por una presión parcial de CO_2 elevada, sin grandes cambios en el SBE lo que indica que esta acidosis es de tipo respiratorio.

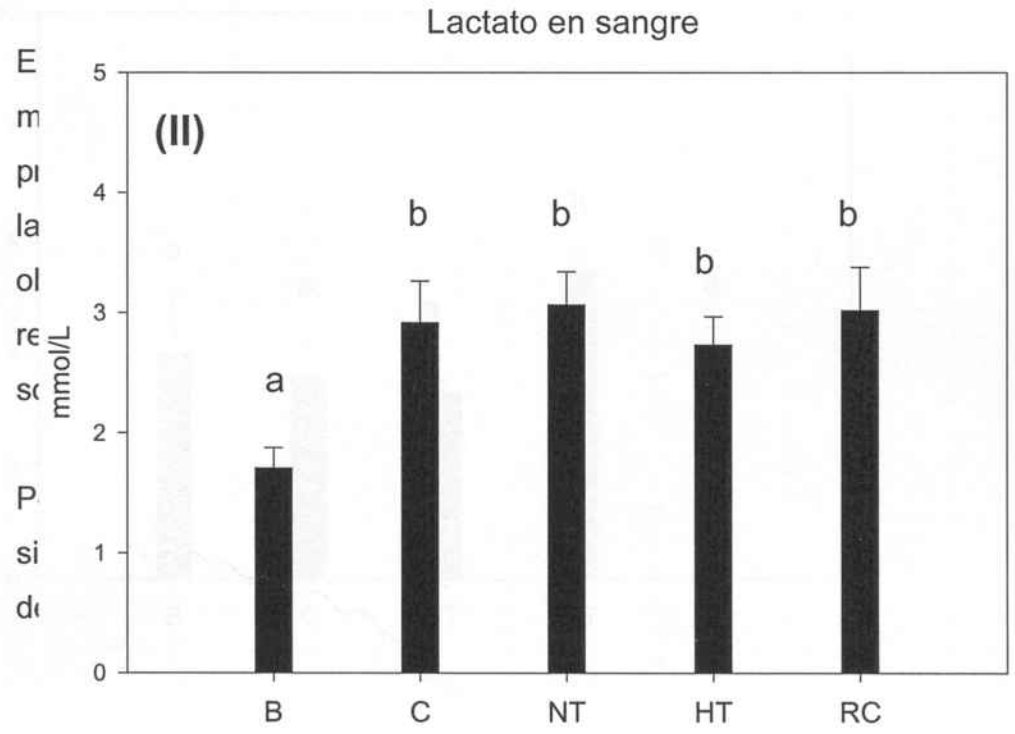
En el grupo Control, sin embargo se observaron valores normales en los principales parámetros. Este estado de normalidad se mantuvo incluso en los animales enfriados hasta 20° C, (con un ratio [OH+]/[H+] cercano al del grupo de normotermia).

Las ratas recalentadas de otro lado, desarrollaron también acidosis, junto con un aumento en el valor de SBE asociado a una presión de CO_2 normal.

La concentración de lactato en hígado tiende a incrementarse durante la hipotermia y disminuye significativamente durante el recalentamiento (Figura 3.8-I).
El lactato en sangre sin embargo parece mantenerse estable en todos los animales operados(Figura 3.8-II).

Figura 3.8:
Niveles de lactato hepático (I) y sanguíneo (II) en los grupos basal (B), control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC_M) Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes.





En el hígado ni la hipotermia ni el recalentamiento parecen alterar las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px tal como se aprecia en la tabla 3.6. En el grupo NT aun cuando la Cu-Zn Superóxido Dismutasa hepática se mantiene constante, la SOD eritrocitaria disminuyó significativamente al inicio del experimento comparado con los niveles del grupo Basal o Control. La hipotermia también indujo una actividad disminuída de SOD en los hematíes que se recupera ligeramente durante el recalentamiento, sin alcanzar los valores basales. Asimismo, la catalasa de los glóbulos rojos disminuye su actividad durante la hipotermia y tras el recalentamiento, pero no es un cambio estadísticamente significativo. Tampoco se observó variaciones en los niveles de GSH-Px eritrocitaria.

Figura 3.9

Niveles de TBARS en hígado (ligado a proteína, y libre) y plasma en los grupos basal (B), control (C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC_M). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes.

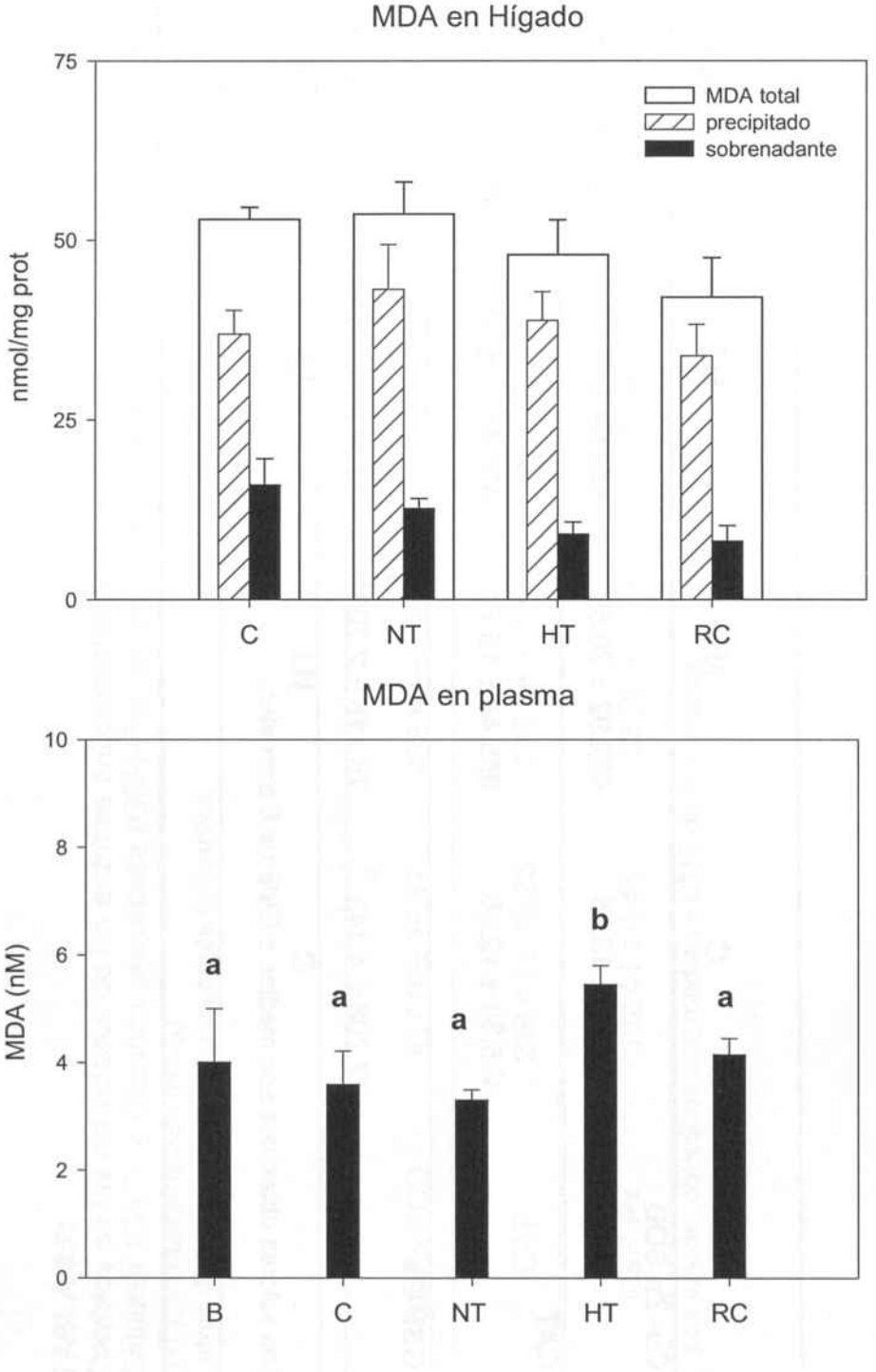


TABLA 3.6:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas Cu- Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos Control (C), normotermia (NT), hipotermia (HT), y recalentadas (RC_M)

	C	NT	HT	RC_M
Cu- Zn SOD				
	438.55 ± 13.65	462.92 ± 20.50	451.04 ± 15.73	441.85 ± 25.14
CAT				
	435.38 ± 12.66	385.48 ± 15.77	433.60 ± 29.90	401.71 ± 9.42
GSH-Px				
	77.708 ± 4.148	75.116 ± 2.703	70.341 ± 4.833	70.199 ± 2.252

Los valores obtenidos son medias ± CME de 6 animales.

TABLA 3.7:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes eritrocitarias Cu- Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos Control (C), normotermia (NT), hipotermia (HT), y recalentadas (RC_M)
Letras distintas son estadísticamente diferentes

	C	NT	HT	RCM
	a	b	b	b
Cu-Zn SOD	617.96± 15.17	476.66 ± 18.04	430.48 ± 32.36	497.72 ± 21.87
CAT	238.41 ± 18.23	216.38 ± 5.54	175.66 ± 11.22	189.10 ± 37.64
GSH-Px	102.44 ± 4.46	95.25 ± 4.18	100.18 ± 4.41	96.97 ± 9.15

Los valores obtenidos son medias ± CME de 6 animales.

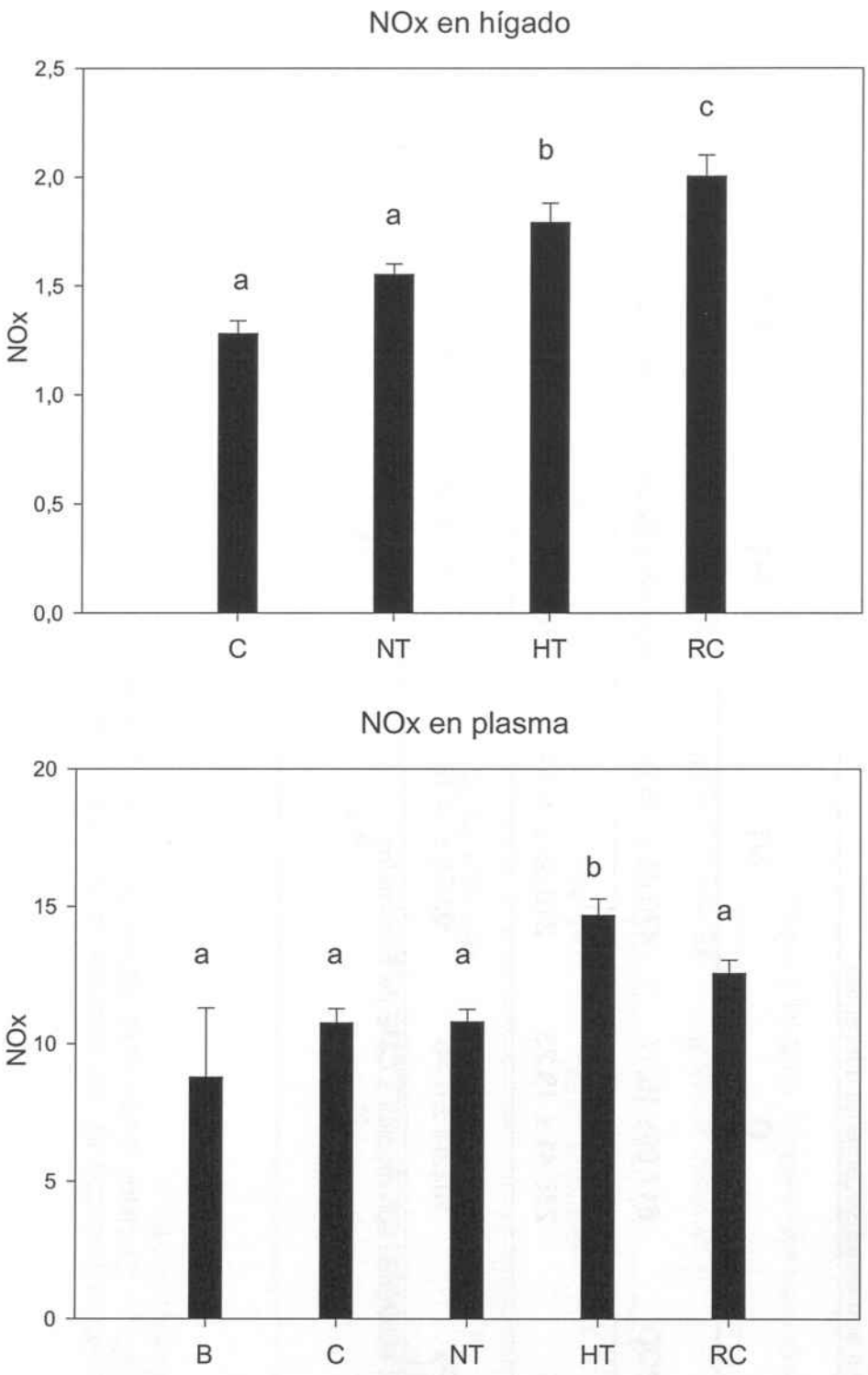
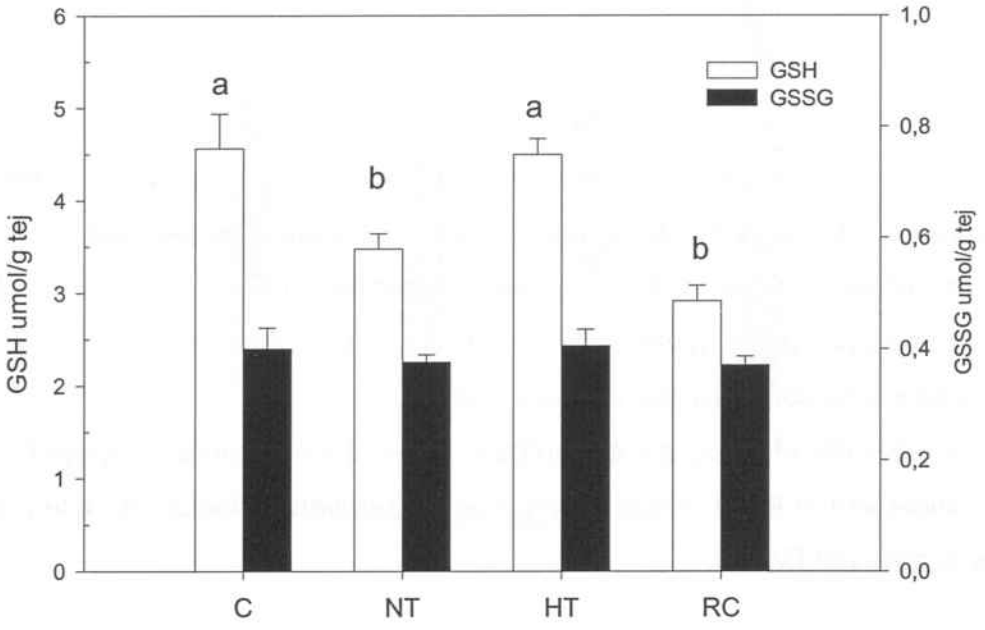


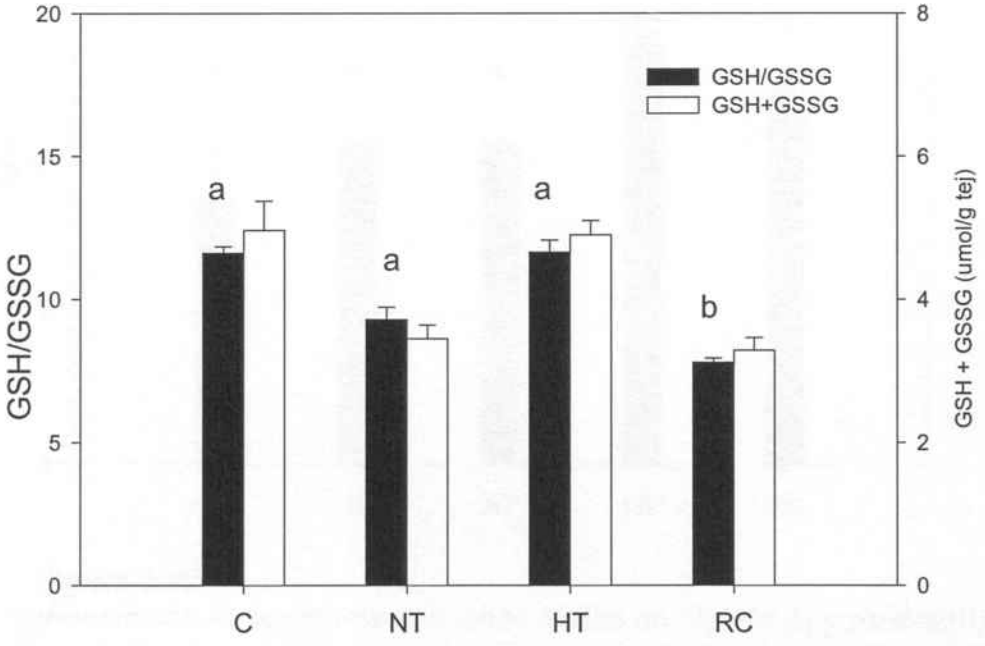
Figura 3.10
Variaciones de los niveles de oxido nítrico en hígado (I) y plasma(II) en los grupos basal (B), control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes.

Los niveles hepáticos de NOx se hallan incrementados durante la hipotermia y continúa incrementándose durante el recalentamiento. Esto se corresponde con el nivel de NOx en plasma que aparece incrementado en hipotermia, y aunque durante el recalentamiento su nivel permanecen alto no es significativo comparado con los animales normotérmicos.

El glutation reducido hepático al igual que el ratio GSH/ GSSG se conservan dentro de los niveles basales durante la hipotermia pero ambos parámetros disminuyen en las ratas recalentadas, señal de un ataque de radicales libres. Las ratas normotérmicas también parecen presentar un ligero nivel de estrés oxidativo, a juzgar por el nivel de GSH que disminuye ligeramente junto con el ratio cuando se compara con el grupo control.
Los grupos SH del plasma, por el contrario disminuyen durante la hipotermia, (no significativamente) y mucho más tras el recalentamiento (su nivel es apenas el 50% del Basal).

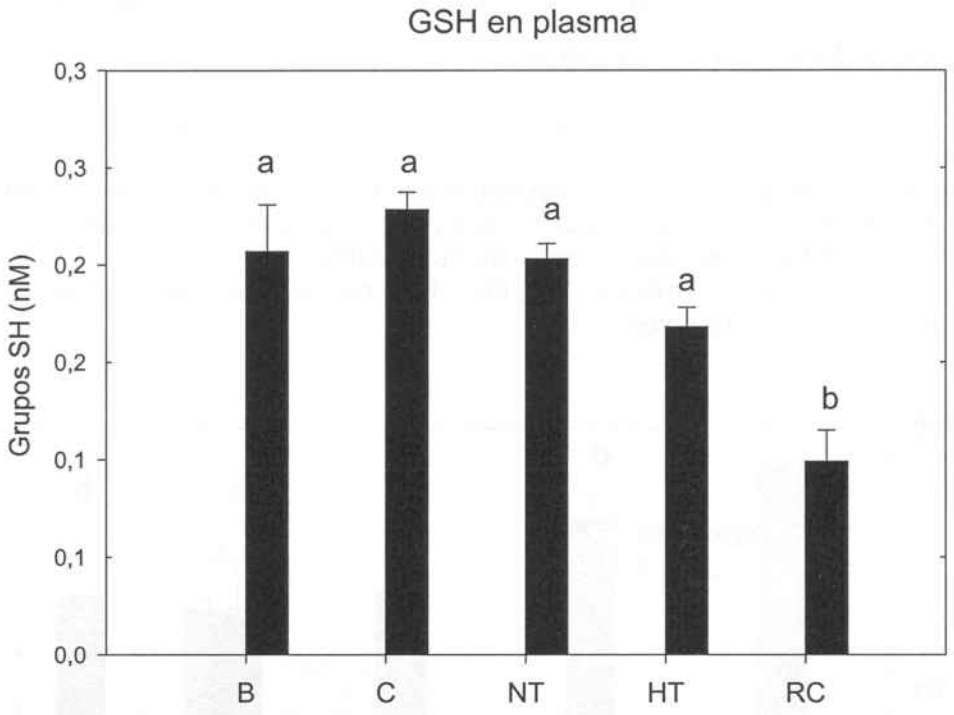
Figura 3.11a
Variaciones en los niveles de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG),total (GSH + GSSG)y el ratio GSH/GSSG en hígado de ratas control (C), normotérmicas (NT), hipotérmicas (HT) y recalentadas (RC).





Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

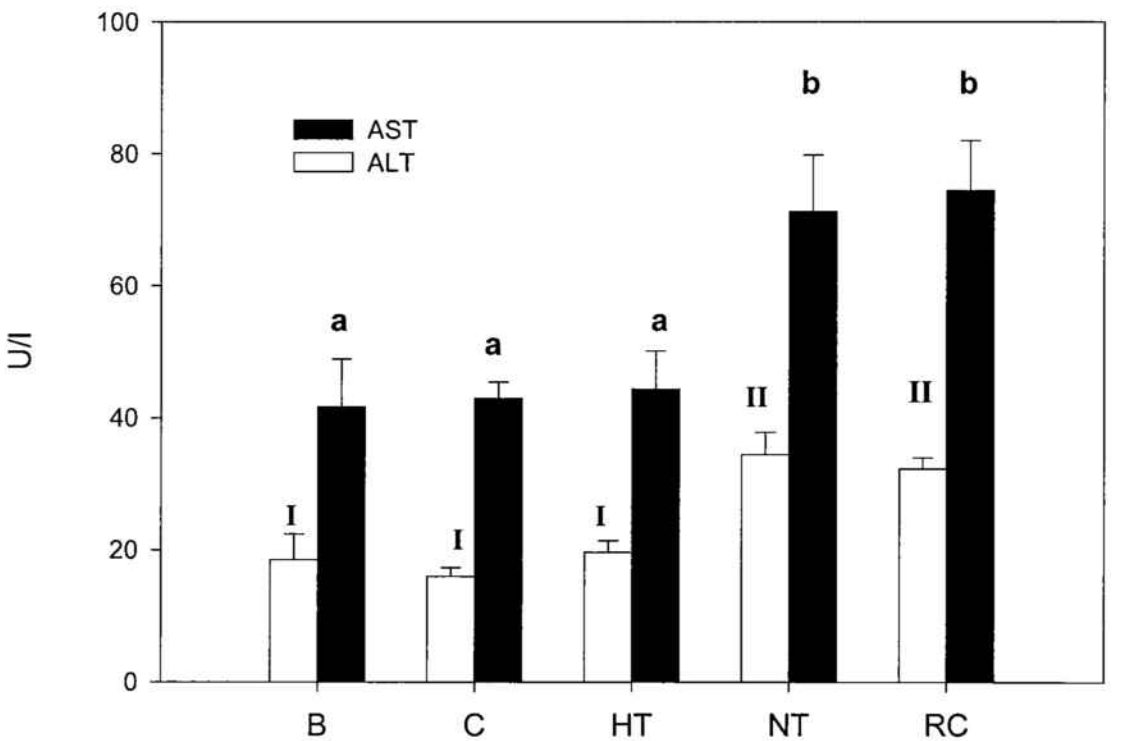
Figura 3.11b
Variaciones en los niveles de grupos SH en plasma de ratas control (C), normotérmicas (NT), hipotérmicas (HT) y recalentadas (RC).



Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes.

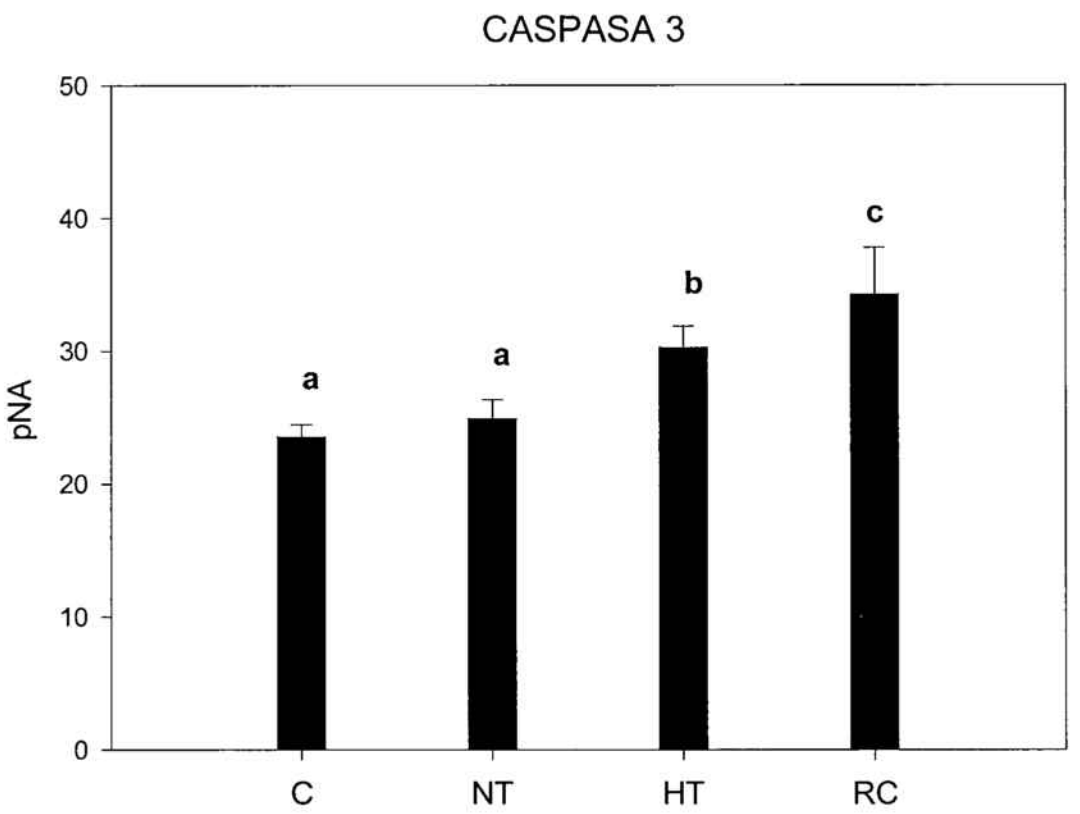
En cuanto a los indicadores de daño tisular la Figura 3.12 muestra los valores de transaminasas en los grupos estudiados. Aun cuando se observa un incremento significativo de los valores de estos indicadores de daño tisular en los grupos de NT y de RC_M, no exceden de los valores reportados para ratas por otros autores en grupos control, (lo cual significaría que no existe evidencia de lesión a estos niveles).

Figura 3.12
Actividades de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) plasmáticas en los grupos basal (B), control (C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC).
Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes.



La hipotermia incrementa la apoptosis, tal como lo muestra el incremento en los niveles de Caspasa 3, que sigue aumentando en el recalentamiento.

Figura 3.13:
Actividad de la caspasa-3 hepática en los grupos Control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento (RC). Las letras diferentes representan diferencias significativas.



3.2.3 DISCUSIÓN DEL BLOQUE II.

La disminución del flujo durante la hipotermia ya ha sido descrita por otros autores en diferentes modelos. Cuando disminuye la temperatura del animal anestesiado se produce una redistribución del flujo sanguíneo que se ve influenciada por el tipo de anestésico. En la zona hepática se ha encontrado un flujo bien preservado cuando se usa Pentobarbital. A pesar de que se observa una caída muy pronunciada del FVP cuando el animal alcanza los 20° C, este efecto se revierte casi completamente tras el recalentamiento.

El manejo de gases se realizó siguiendo la estrategia alpha stat, que se consiguió modificando la frecuencia respiratoria para mantener la presión de CO_2 constante a medida que disminuía la temperatura. Durante el recalentamiento se siguió el proceso inverso aumentando la frecuencia a la par que se incrementaba la temperatura corporal, por lo tanto, la acidosis que aparece al final en el grupo RC_M, acompañada de valores altos de SBE (cuando la PCO_2 es normal) tiene un origen metabólico, debido posiblemente a la liberación de metabolitos acumulados durante la hipotermia (cuando el flujo disminuyó).

Aun cuando el lactato sanguíneo va en aumento durante el enfriamiento, y más aun durante el recalentamiento, no parecen ser aumentos estadísticamente significativos. Si consideramos que el ratio $[OH^-]/[H^+]$ es significativamente más alto en el grupo HT cuando se compara con RC_M y sin embargo no existen diferencias significativas entre los niveles de Lactato sanguíneo en ambos grupos se puede sugerir entonces la implicación de otros metabolitos distintos del ácido láctico que sumaron su efecto en el desarrollo del nivel de acidosis encontrado en las ratas recalentadas. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Zinchuck y col (2002). que en su ensayo en ratas enfriadas hasta 22° C encontró un nivel de acidosis mucho mayor (el pH cayó de 7,333 hasta 7,148) con una disminución de hasta el 50 % de bicarbonato, la diferencia más clara con nuestro trabajo es que

los autores no usaron ventilación asistida, y que el anestésico que usaron fue hexenal, lo cual puede haber generado una acidosis ventilatoria de tal magnitud .

Aunque el lactato hepático no varió significativamente durante el enfriamiento, se observó una disminución de sus niveles en el grupo RC_M, el incremento en la perfusión hepática asociada al recalentamiento bien puede ser la causa de la descarga del lactato desde el hígado para diluirse en la la sangre. No hay por tanto indicio claro de anaerobiosis durante el periodo de enfriamiento (en el cual el flujo portal cayó abruptamente) debido a que aun cuando el aporte de O_2 a los tejidos disminuye en las zonas en las que cae el flujo, también lo hace la demanda de oxígeno de los tejidos por la disminución del metabolismo en respuesta a la hipotermia.

En el hígado ni la hipotermia ni el recalentamiento parecen alterar las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px, lo que corresponde con un nivel estable de los TBARS en el hígado. Sin embargo el MDA plasmático aumentó ligeramente durante la hipotermia al tiempo que disminuye los grupos SH, posiblemente porque constituyen la primera línea de defensa contra el ataque de los radicales libres de oxígeno. La actividad de la SOD eritrocitaria también disminuyó, aunque no significativamente cuando se compara con el grupo NT, por lo cual puede ser únicamente el efecto del protocolo quirúrgico y la anestesia durante el tiempo que duró el experimento. El incremento, aunque no significativo del lactato hepático en los grupos NT y HT también puede ser atribuido a la misma causa.

En la literatura existen resultados contradictorios con respecto al efecto de la hipotermia sobre los antioxidantes, y en muy pocos se usa un modelo de enfriamiento en animal entero al nivel de hipotermia profunda inducido en este estudio. Zinchuck coincide en señalar la disminución de la actividad de la CAT eritrocitaria, pero señala además una disminución en la enzima hepática. Como ya se comentó anteriormente el modelo usado por estos autores dista del control alfa

stat empleado en nuestro ensayo, y la mayor carga ácida desarrollada en su modelo pudo alterar la actividad de esta enzima en el hígado.

En la fase de recalentamiento también se puede intuir un ligero ataque de radicales libres de oxígeno a nivel plasmático que es amortiguado con el consumo de los grupos SH en plasma, y de CAT hepática, sin que se produzca un incremento en el MDA. Cuando se analizan los niveles de glutatión hepático se encuentran diferencias más claras, un primer efecto de "desgaste" antioxidante se observa en el grupo NT con la disminución de la concentración de GSH, aunque se mantiene constante el nivel de GSSG. En el grupo HT sin embargo no se observa el consumo de GSH hepático. En el grupo RC_M encontramos una disminución más aguda del nivel de GSH y del ratio GSH/GSSG, al tiempo que el glutation oxidado se mantiene constante, lo cual indica que este GSH una vez oxidado es rápidamente transportado fuera de la célula (80); (52)a la misma velocidad que el grupo NT (comparado con el cual no se observan diferencias significativas). El estrés quirúrgico y/o anestésico inducido en los animales está pues claramente amortiguado en las ratas hipotérmicas, pero no es tan evidente en el recalentamiento. Si consideramos que al nivel de hipotermia alcanzado la vasoconstricción inducida por el frío ha dejado isquémicas muchas células (isquemia fria) el periodo de recalentamiento e incremento del flujo y con ello el regreso de O_2 a los tejidos podría acarrear una lesión análoga a la descrita en la isquemia/reperfusión, amortiguada por el frío. En esto aparece la ventaja del pH ácido en la sangre de ratas recalentadas. Se ha descrito que tras la isquemia se produce acidosis pero que cuando se corrige el pH al tiempo de reoxigenarse la lesión se agrava, de hecho el daño es únicamente atribuido al incremento del pH hacia el nivel normal incluso sin oxigenación, lo cual se conoce como la "paradoja del pH" (81). Es por tanto recomendable para minimizar el daño reoxigenar a pH ácido.

Curiosamente se encontró durante la hipotermia un incremento de NOx hepático (concidiendo con su aumento en el plasma de las mismas ratas) el mismo que continua incrementándose en el recalentamiento. Se puede observar una

respuesta idéntica en los niveles de la actividad del marcador proapoptótico Caspasa-3 que se incrementó en HT, y aún más en RC_M. El paso de la forma inactiva procaspasa-3 a su forma activa es considerado como el "punto del no retorno" en la cascada apoptótica de las caspasas (82), un incremento en caspasa 3 (cuando el ATP está conservado) es un indicador fiable de un incremento en la apoptosis.

Azuara y col.(83) encontraron en un modelo de transplante intestinal heterotrópico en rata, (con una protocolo de isquemia fria del órgano) una relación directa entre el NO y la apoptosis, de su trabajo se concluye que el NO exógeno confiere una protección frente a la necrosis al mismo tiempo que induce un incremento de la via apoptótica. Sin embargo otros autores atribuyen al NO un papel antiapoptótico en el hepatocito(84). Bossenmeyer realizó un estudio con células neuronales a las cuales sometió a hipoxia en hipotermia y concluye que la hipotermia protege frente a la lesión por hipoxia pero no incrementa la apoptosis. A nuestro entender el período de 96 horas post hipoxia de la observación podría ser un artificio ya que las células lesionadas irreversiblemente, sería las primeras en morir (presumiblemente por apoptosis cuando se trató con hipotermia), permitiendo al resto recuperarse y sobrevivir; aun cuando el tipo celular también podría marcar una diferencia en la respuesta observada.

Dada la complejidad de un estudio con un animal entero y la similitud del tejido intestinal y hepático a falta de más pistas sobre lo que sucede en el hígado hipotérmico podemos sumarnos a las conclusiones del estudio de Azuara y col. y sugerir que el aumento de la actividad de caspasa 3 podría ser consecuencia del incremento del NO inducido por la hipotermia. Respecto a valorar este efecto como positivo o nocivo sería necesario valorar conjuntamente el efecto de estos tratamientos en la necrosis. Durante la muerte no programada se produce la liberación del contenido intracelular de las células que mueren, y en el caso de tejido hepático, se liberan transaminasas de tipo ALT. Si comparamos los valores de estos indicadores de daño tisular encontramos que se incrementan como respuesta al estrés quirúrgico y/o anestesia, pero en ningún caso superan los

niveles considerados dentro del rango normal, y reportados como valores control en experimentación con ratas.

El hecho de que ni los indicadores de daño oxidativo ni tisular sobrepasan los rangos de normalidad en ninguno de los grupos aporta una prueba más de la viabilidad de nuestro modelo de hipotermia aguda y recalentamiento.

3.3 *BLOQUE III: EFECTO DE LA HIPOTERMIA PROFUNDA SOBRE LA HIPOXIA AGUDA NORMOBÁRICA.*

3.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudiar las alteraciones del flujo portal en ratas hipóxicas.
- Caracterizar la respuesta redox (balance ácido/ base) durante la hipoxia aguda.
- Valorar el nivel de protección de la hipotermia frente a la hipoxia estudiando los indicadores de daño tisular y sistémico.

3.3.2 GRUPOS EXPERIMENTALES:

- *Normotermia + Hipoxia : NT Hx*

  Los animales fueron tratados como se describe para el grupo NT, pasados los primeros 60 minutos en estas condiciones, se reemplazó el aire atmosférico que respiraban los animales por una mezcla enrarecida de 0_2 (10%) durante una hora al final del cual fueron sacrificados por sobredosis de anestesia.

- *Hipotermia + Hipoxia: HT Hx*

  Los animales fueron tratados como se describe para el grupo HT, pero a diferencia se le mantuvo sólo una hora en normoxia. Transcurrido este tiempo se reemplazó el aire atmosférico que respiraban los animales por una mezcla enrarecida de 0_2 (10%) durante una hora al final del cual fue sacrificado por sobredosis de anestesia.

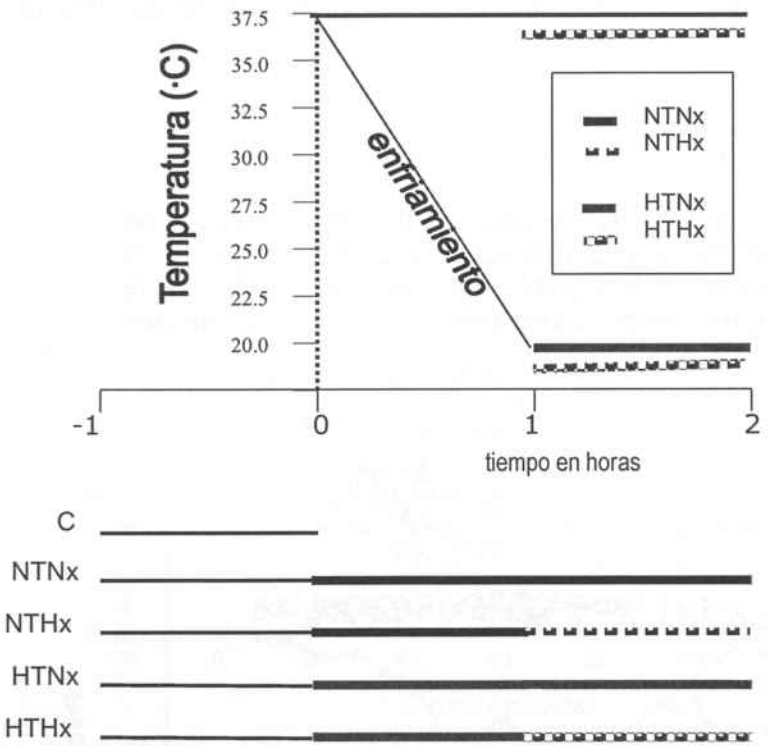
3.3.2.1 PARÁMETROS A EVALUAR

Se realizaron valoraciones equivalentes a las del bloque anterior, para la evaluación del equilibrio ácido base en estos grupos. Se analizaron las concentraciones de los diferentes iones en sangre y se evaluaron las concentraciones de lactato sanguíneo y hepático. También se analizaron indicadores de daño oxidativo, TBARS en hígado y plasma, así como la presencia de los principales antioxidantes, también en hígado, plasma y eritrocitos. Finalmente se determinó la actividad de la caspasa-3.

3.3.3 RESULTADOS DEL BLOQUE III.

Figura 3.13:

Esquema del Protocolo Experimental E.



Tiempo "0" indica el final del proceso quirúrgico.
La temperatura corporal durante el período de hipotermia estable fue de 20,85 °C.
Los grupos enlistados arriba son: NTNx: grupo normotérmico, NTHx grupo normotérmico hipóxico; HTNx grupo hipotérmico; HTHx: grupo hipotérmico hipóxico.

En la figura 3.13 se describe el protocolo de hipoxia –hipotermia empleado.

En la figura 3.14 se observan las respuestas del flujo de la vena porta a la hipoxia en condiciones de normotermia e hipotermia. En el grupo NTHx el flujo no muestra ninguna correlación con la temperatura a lo largo del experimento, ni con la hipoxia. En el grupo HTHx se observa una disminución del flujo a medida que el animal se enfría que no se ve afectada en el período hipóxico.

Figura 3. 14a
Temperatura corporal y flujo venoso portal en el grupo de normotermia-hipoxia (NTHx) Los círculos vacíos representan la temperatura y las lineas con triangulo las fluctuaciones del flujo de la vena porta a lo largo del tiempo. La hipoxia se inició a los 60 minutos (n=4).

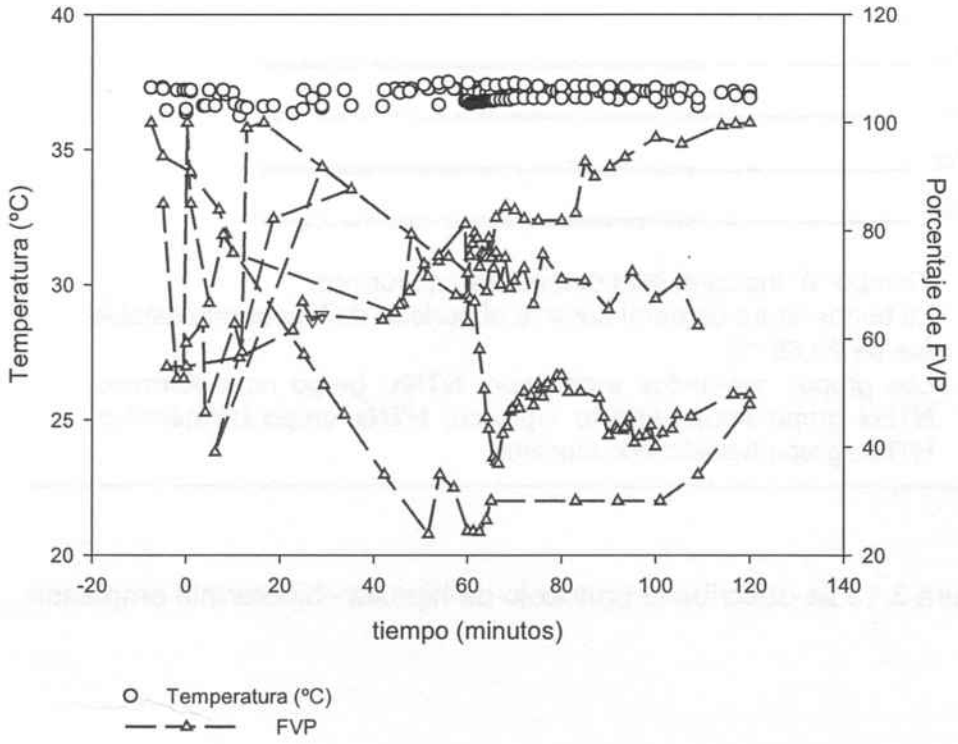
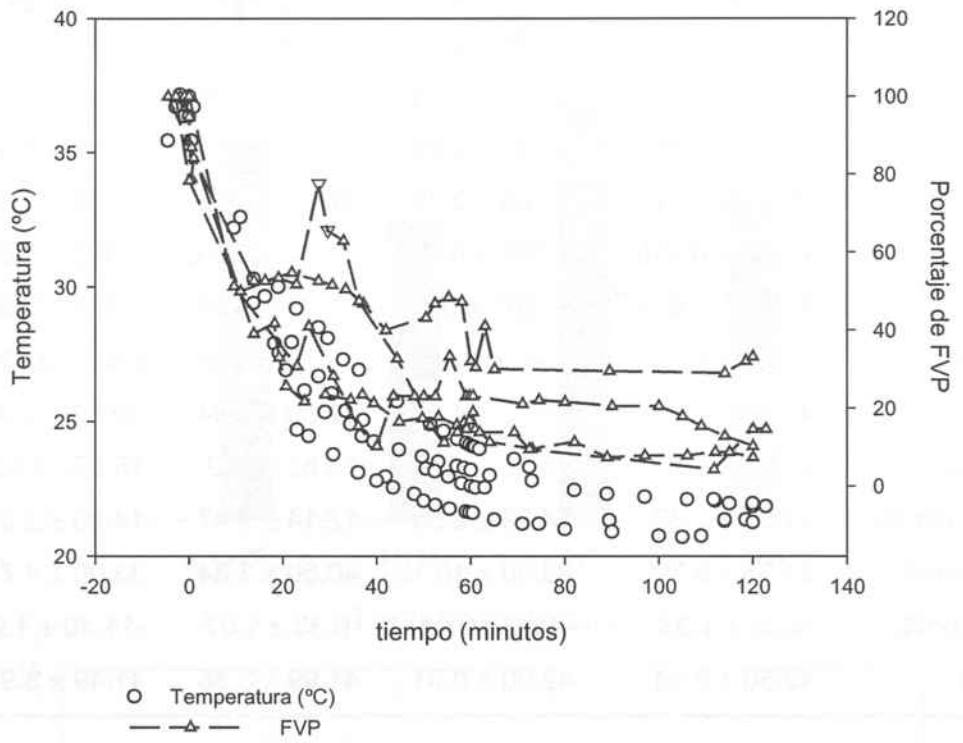


Figura 3. 14b
Temperatura corporal y flujo venoso portal en el grupo de normotermia-hipoxia (HTHx) Los círculos vacíos representan la temperatura y las lineas con triangulo las fluctuaciones del flujo de la vena porta a lo largo del tiempo. La hipoxia se inició a los 60 minutos (n=4).



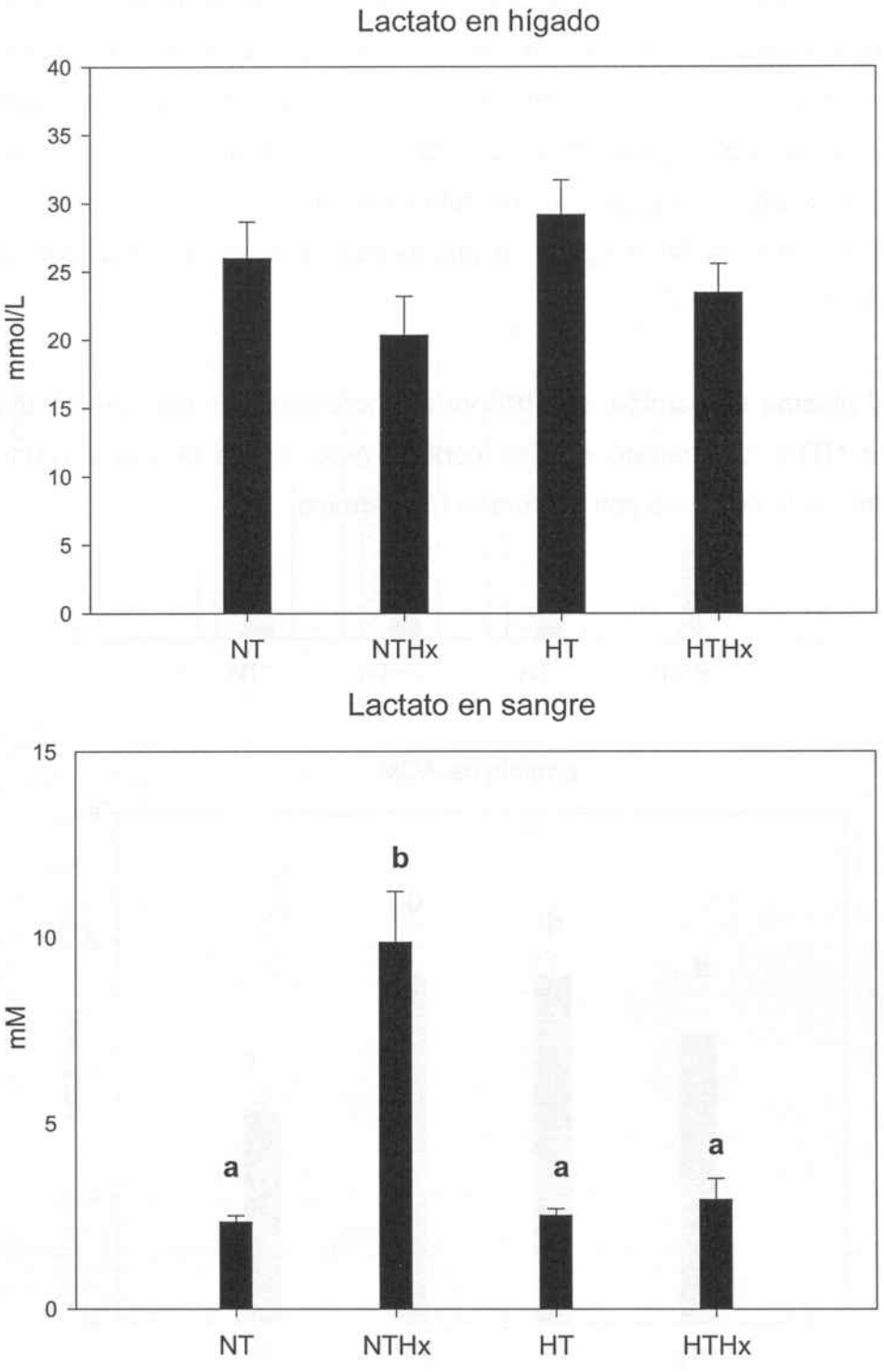
La tabla 3.9 presenta los resultados de la analítica de gases arteriales, en donde se observa claramente que la hipoxia induce el desarrollo de acidosis, junto con un mayor valor del SBE, y una disminución del ratio Na/Cl. No existe diferencias significativas en la presión parcial de O_2 leída a 37º C pero si en la saturación de la Hb que como es lógico está más elevada en el grupo de hipotérmicas hipóxicas.

TABLA 3.9:

Cambios en los gases arteriales y los indicadores del equilibrio ácido base en los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx).
+ p< 0.05 and +++ p< 0.001, vs. NTNx; * p< 0.05 and *** p< 0.001 vs. HTHx.

GRUPO	NTNx	NT Hx	HTNx	HTHx
Tc(°C)	37.60 ± 0.29***	36.86 ± 0.16	20.85 ± 0.22	21.80 ± 0.14
P_{O2} mmHg$_{(37°C)}$	86.00 ± 2.08***	45.00 ± 2.74	182.5.± 5.94	92.00.± 8.19
P_{O2} mmHg real	90.57 ± 3.08*	44.63 ± 2.60	115.42 ± 5.89	36.81 ± 5.42
Hb O_2 (%)	90.80 ± 0.32*	57.80 ± 2.17	97.68 ± 0.66	87.48 ± 2.16
pH $_{(37°C)}$	7.360 ± 0.010	7.300 ± 0.031	7.372 ± 0.032	7.300 ± 0.020
pH real	7.349 ± 0.014***	7. 300 ± 0.031	7.602 ± 0.036	7.514 ± 0.020
$[OH^-]/[H^+]$	12.00 ± 0.76	9.97 ± 1.28	13.78 ± 1.59	8.43 ± 0.79
P_{CO2} mmHg$_{(37°C)}$	42.25 ± 3.93	25.50 ± 4.52	32.60 ± 2.04	29.60 ± 4.98
P_{CO2} real	41.00 ± 5.35***	28.38 ± 4.61	16.52± 1.02	15.25± 2.56
HCO_3^- mmol/L	21.67 ± 2.33	14.25 ± 2.56	17.14 ± 1.47	14.00 ± 2.05
tCO_2 unidad	51.33 ± 5.70	29.50 ± 10.12	40.50 ± 3.84	33.00 ± 4.74
SBE mmol/L	-2.33 ± 1.33	-11.5 ± 3.04	-6.33 ± 1.67	-11.40 ± 1.91
Hto (%)	42.50 ± 2.04	42.00 ± 0.91	41.99 ± 3.38	41.49 ± 3.99

Figura 3.15: Niveles de lactato hepático y sanguíneo en los grupos en los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes



El lactato en sangre se triplicó en el grupo NTHx, comparado con HTHx. La concentración de lactato hepático no muestró diferencias significativas en ninguno de los grupos.

El MDA total a nivel hepático aumentó significativamente en el grupo NTHx si se compara con el control normotérmico. No sucede lo mismo con el grupo HTHx que no presenta diferencias cuando se le compara con su control hipotérmico. Cuando se analizan las diferentes fracciones se encuentra que las ratas del grupo NTHx incrementan principalmente el MDA ligado al precipitado, que se previene con la hipotermia.

En el plasma en cambio, se observa un incremento en los TBARS del grupo NTHx comparado con su control, pero no en el grupo HTHx cuando se le compara con su control hipotérmico.

Figura 3.16

Niveles de MDA en hígado (ligado a proteína, y libre) y plasma en los normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes.

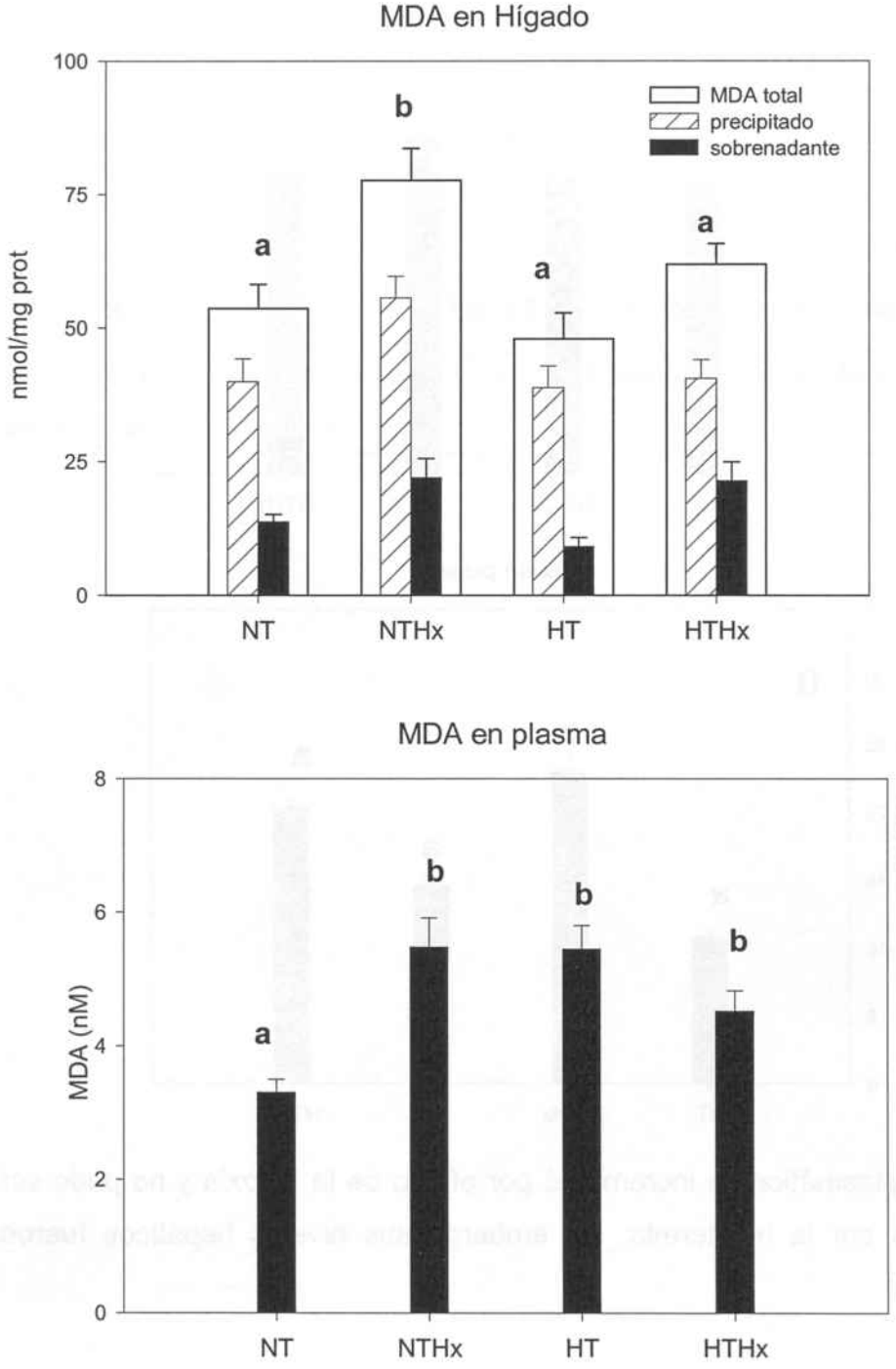
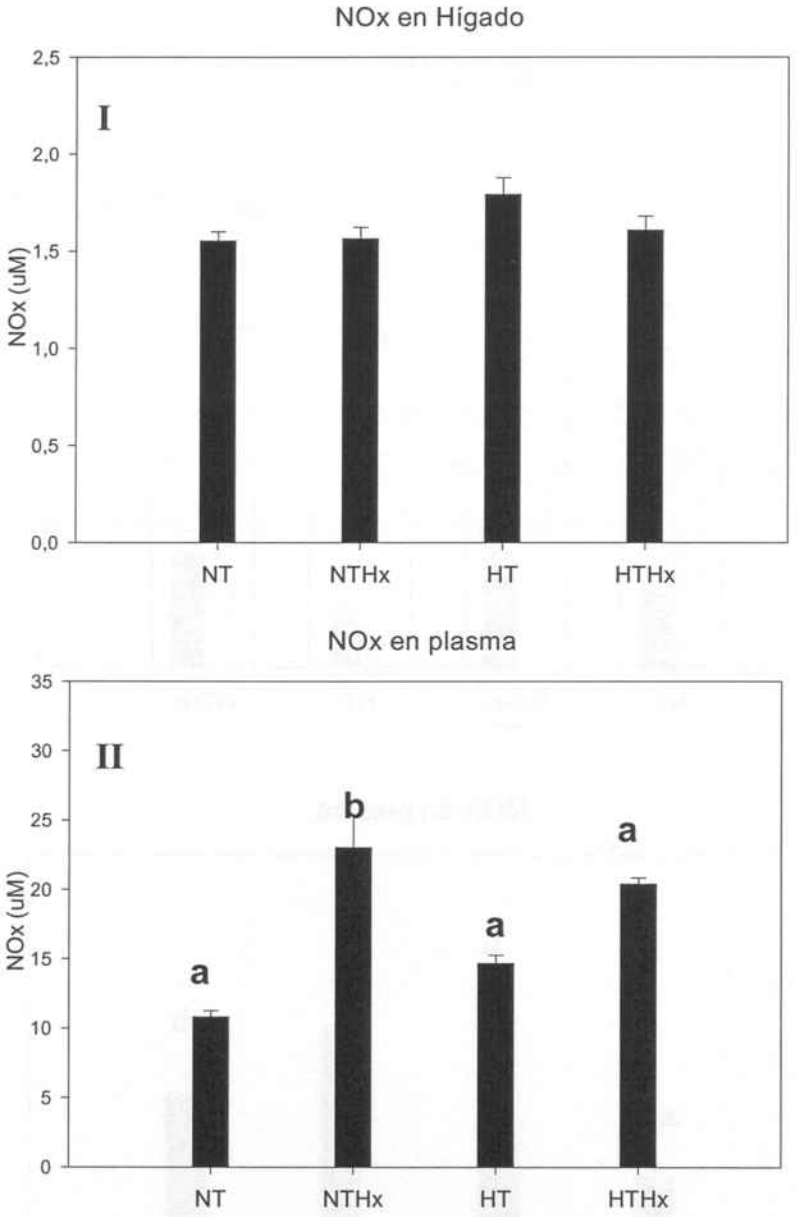


Figura 3.17

Variaciones de los niveles de oxido nítrico en hígado (I) y plasma(II) en los grupos normotermia (NT), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HT) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes



a

El NOx plasmático se incrementó por efecto de la hipoxia y no pudo ser revertido por la hipotermia, sin embargo sus niveles hepáticos fueron normales

TABLA 3.10:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas Cu-Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos normotermia (NT), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HT) e hipotermia hipoxia (HTHx).

	NT	NTHx	HT	HTHx
	a	b	a	b
Cu-Zn SOD	462.92 ± 20.50	273.19 ± 19.25	451.04 ± 15.73	263.45 ± 8.15
CAT	385.48 ± 15.77	422.20 ± 9.54	433.60 ± 29.90	443.48 ± 6.11
	a	b	a	b
GSH-Px	75.116 ± 2.703	56.256 ± 3.917	70.341 ± 4.833	59.860 ± 1.331

Los valores obtenidos son medias ± CME de 6 animales. Letras distintas son estadísticamente diferentes

TABLA 3.11:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes eritrocitarias Cu-Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos normotermia (NT), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HT) e hipotermia hipoxia (HTHx).

	NT	NTHx	HT	HTHx
Cu-Zn SOD	476.66 ± 18.04	439.23 ± 8.73	430.48 ± 32.36	436.80 ± 6.65
	a	b	b	b
CAT	216.38 ± 5.54	165.77 ± 9.78	175.66 ± 11.22	175.92 ± 4.87
	a	b	a	b
GSH-Px	95.25 ± 4.180	59,70 ± 0.70	100.18 ± 4.41	45.29 ± 7.58

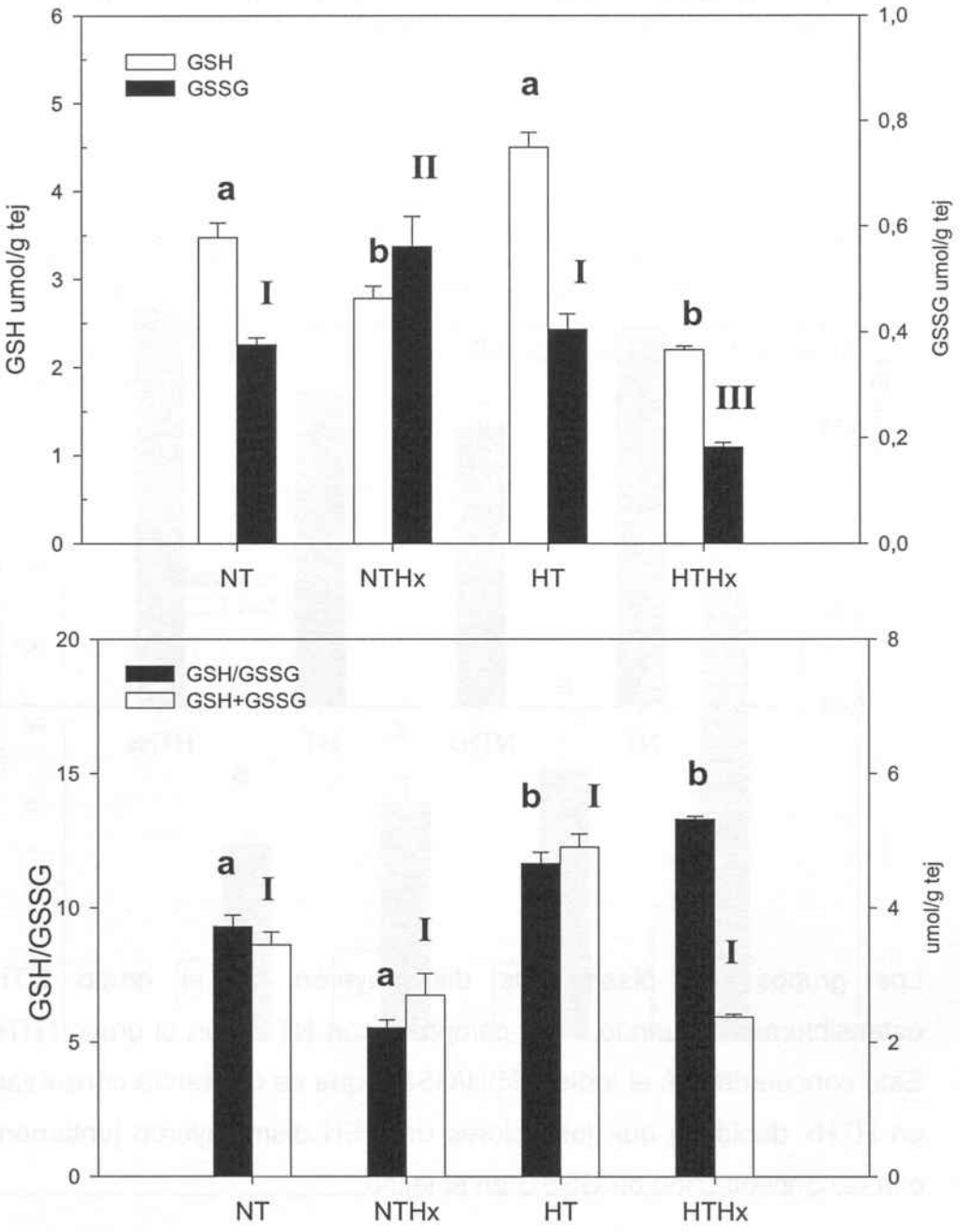
Los valores obtenidos son medias ± CME de 6 animales. Las letras distintas son estadísticamente diferentes

La SOD hepática disminuye significativamente por la hipoxia y no se observa mejora en el grupo hipotérmico.

No se encontraron cambios significativos entre ambos grupos hipóxicos cuando se analizó la actividad de la CAT hepática o eritrocitaria.
Por otro lado en ambos grupos hipóxicos la actividad de la GPx eritrocitaria disminuye, lo que concuerda con lo hallado en la misma enzima hepática.

Figura 3.18a

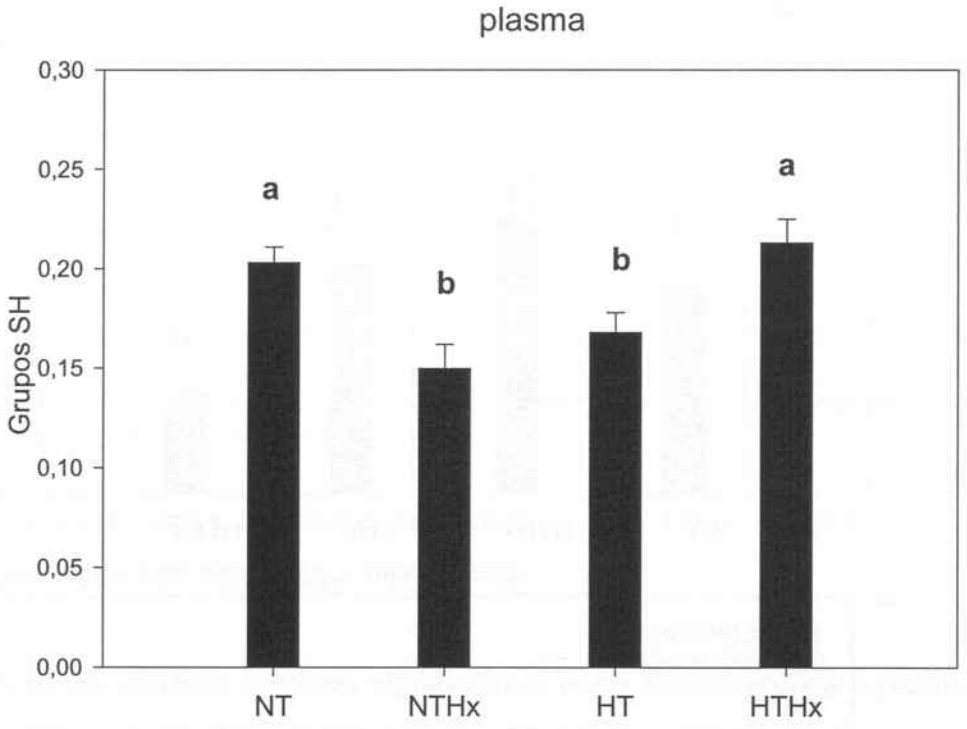
Variaciones en los niveles de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG),total (GSH + GSSG) y el ratio GSH/GSSG en hígado de ratas de los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx).



Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 3.18a

Variaciones en los niveles de grupos SH en plasma de ratas de los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes



Los grupos SH plasmáticos disminuyeron en el grupo NTHx ostensiblemente cuando se le comprara con NT o con el grupo HTHx. Esto concuerda con el índice GSH/GSSG que se encuentra conservado en HTHx debido a que los valores de GSH disminuyeron juntamente con la concentración de GSSG en el tejido.

La AST se incrementan al doble en el grupo NTHx y aunque la ALT también se encuentra mayor en este grupo, la diferencia no es tan evidente.

La hipoxia induce un aumento en la actividad proapoptótica si se compara con sus respectivos controles (HTHx vs. HT y, NTHx vs. NT).

Figura 3.19
Actividades de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) plasmáticas en los grupos grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

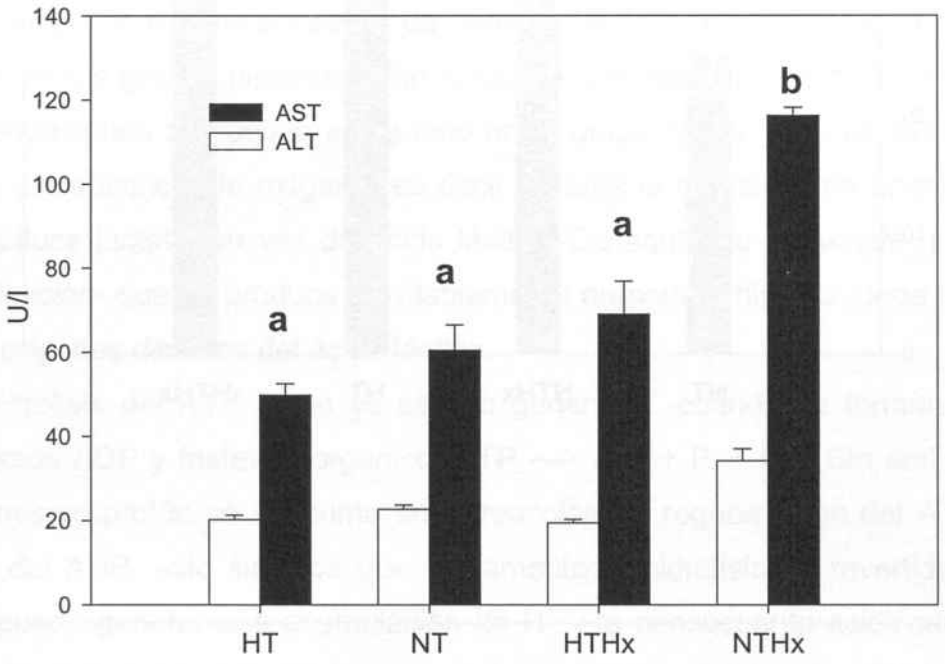
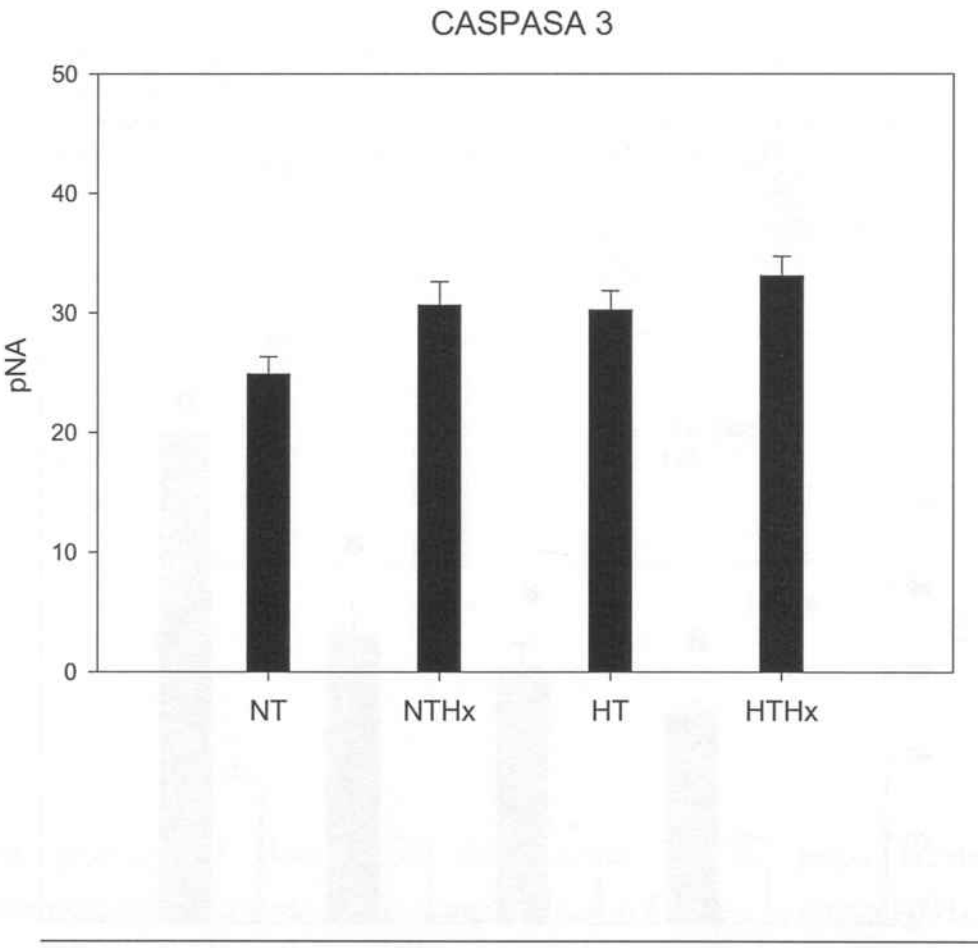


Figura 3.20:

Actividad de la caspasa-3 hepática en los grupos grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas



3.3.4 DISCUSIÓN DEL BLOQUE III

Cuando se analizan las respuestas del flujo de la vena porta a la hipoxia en condiciones de normotermia e hipotermia (fig 3.14) se observa que aparentemente no existe correlación entre la hipoxia y las alteraciones del FVP. La disminución del flujo en el grupo HTHx se correlaciona directamente con la temperatura (como ya se había demostrado en el bloque anterior) y no con el inicio de la hipoxia. Los incrementos de flujo asociado a la hipoxia que se describen en la literatura no son evidentes en este modelo.

El nivel de acidosis encontrados en ambos grupos hipóxicos es equivalente, a juzgar por los valores de $[OH^-]/[H^+]$. La alteración del bicarbonato estandar señala además su origen metabólico Existe amplio consenso en señalar esta disminución del pH como consecuencia clara de un proceso hipóxico.
Si analizamos la concentración de lactato hepático encontramos que no difiere en los grupos hipóxicos. Sin embargo si existe un incremento en las concentraciones del lactato sanguíneo en el grupo NTHx., que es bastante lógico En ausencia de oxígeno, es decir durante el metabolismo aneróbico se produce lactato$^-$ en vez de ácido láctico. De aquí que se señale que la acidificación- que se produce inevitablemente durante la hipoxia- debe tener otros orígenes distintos del ácido láctico.
La hidrólisis del ATP como ya se dijo genera H^+ cuando se forman sus productos ADP y fosfato inorgánico (ATP —> ADP+ P_i + H^+). Sin embargo este mismo protón se consume en la reacción de regeneración del ATP a partir del ADP, esto significa que únicamente la hidrólisis no revertida del ATP puede generar una acumulación de H^+ y la consecuente acidificación. Cuando el O_2 no se suministra adecuadamente a los tejidos, las células se adaptan cambiando su via metabólica hacia la anaeróbica, la cual es la oxidación controlada enzimaticamente de un alcohol (glucosa) vía aldehido hacia ácido. Para preservar la electroneutralidad y la estequiometria se liberan además de lactato- también protones. Estos H^+ son liberados en muchos de los pasos de descarboxilación incluyendo la formación de

piruvato. Por tanto la acidificación tisular es resultados de la producción glicolítica de protones. Bajo esta condición los protones son tamponados por HCO_3^- en el tejido [esto concuerda con la caída de bicarbonato observado en ambos grupos al final de la hipoxia].

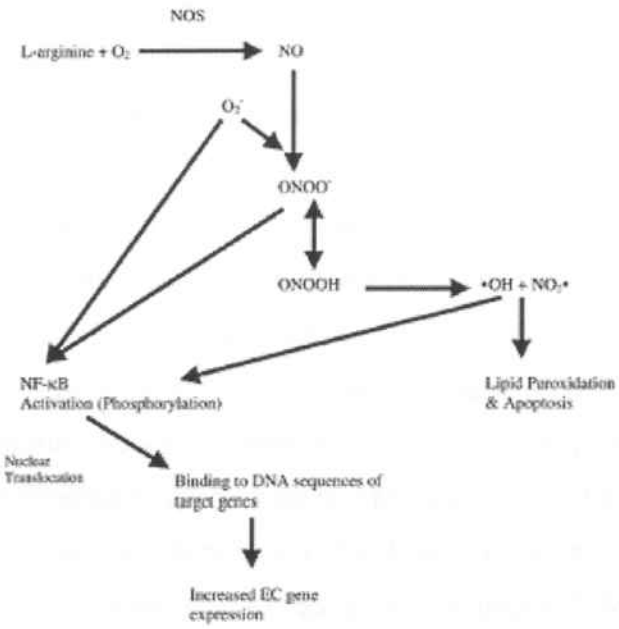
¿Qué sucede con el lactato en hígado durante la hipoxia?

En anaerobiosis (ejercicio intenso o contracción anaeróbica) la velocidad de producción de piruvato por la glicólisis excede a su velocidad de oxidación por el ciclo del ácido cítrico, con la formación del NADH y protones. El piruvato se ha de transformar en lactato por la acción de lactato deshidrogenasa (LDH) para conseguir regenerar el NAD, necesario para la oxidación de gliceraldehido 3 fosfato (sin el cual la glicólisis no puede continuar). La membrana plasmática de la mayoría de las células es muy permeable al lactato y piruvato, ambas sustancias difunden desde la célula que los produce hasta la sangre y son transportados al hígado. El lactato que entra en el hígado se oxida a piruvato y de ahí se convierte a glucosa por la via gluconeogénica del hígado para ser devuelto a la sangre. Esta glucosa nuevamente tras generar ATP vuelve a convertirse en lactato. Estas conversiones constituyen el ciclo de Cori. Por otro lado Sumida y col.(85) en un modelo de perfusión hepática con una solución conteniendo 2,31 mM de lactato demostró que una disminución del flujo hepático mejora la incorporación de lactato desde la sangre dentro del hepatocito que luego es transformado en glucosa (con una eficiencia de hasta el 80%). Cuando el flujo disminuye, la extracción fraccional de lactato se incrementó exponencialmente, lo cual se explica por que aumenta el tiempo de tránsito del lactato que es más fácilmente captado por el hepatocito. Esto justificaría que en los animales del grupo HTHx el nivel de lactato total (en sangre e hígado) fuese menor que en el grupo NTHx. En este último grupo el lactato producido se encuentra en la sangre ya que no encontramos su acumulación hepática en ninguno de los dos grupos. El hígado parece ser el responsable reciclar el lactato retirándolo del sistema, especialmente cuando

existe una disminución del flujo. Esto concuerda con experimentos hechos en animales enteros (perros, Tashkin, S03/06 ref 30; y humanos, Nielsen) en reducciones de flujo hepático mayores al 70%. En perros sólo cuando se superó el 88% de reducción se consiguió que el hígado finalmente pasara a producir lactato en vez de retirarlo. El autor señala que hormonas glucoreguladoras serían las responsables de esta respuesta exacerbada en el hígado. De esto se deduce que en disminuciones de flujo como la inducida por la hipotermia profunda (bajo anestesia de pentobarbital) el hígado es el último órgano que contribuiría a la hiperlactatemia. Nuestros resultados encajan bien con estas observaciones, ambos grupos hipóxicos desarrollan acidosis, como era predecible, sin diferencias significativas en la presion arterial de O_2 (leída a 37° C), esto es que se encuentran sometidos al mismo nivel de hipoxía. Se observan un descenso en la concentración de bicarbonato que se ha consumido para tamponar el exceso de protones (parcialmente), pero si nos fijamos en las concentraciones de lactato en sangre, solo se incrementan en el grupo NTHx. El lactato hepático en las ratas del grupo HTHx tampoco aumenta indicando un incremento en la vía gluconeogénica del hepatocito, con el rescate de los niveles de ATP, que no sucede en la hipoxia normotermica.

El NO se incremento en ambos grupos. Se ha descrito que el NO se puede generar enzimatica y no enzimaticamente y su efecto puede ser promotor o inductor de la muerte celular, dependiendo del tipo de célula y la concentración(86). Un mecanismo que relaciona ambos se esquematiza en la figura 3.21

Figura 3.21: Mecanismo de acción del NO



Cuando la producción de O_2^- es elevada, el NO tiende a formar $ONOO^-$, Tanto O_2^- como el $ONOO^-$ pueden alterar la expresión génica de la célula via activación de segundos mensajeros como por ejemplo el NF-kB.

Por otro lado la hipoxia unida a la acidosis potencian la generación de NO, ya que la vasodilatación que éste induce ayudará al O_2 a llegar a las células. Los thioles plasmáticos disminuyen significativamente en el grupo NTHx,, también disminuyen el GSH hepático y el ratio GSH/GSSG cae significativamente.

Estudios realizados en vitro han demostrado que en ausencia de O2 el NO reacciona con el GSH y otros tioles consumiéndolos (F01/04). Células de carcinoma humano en anaerobiosis expuestas a 18uM NO disminuyeron sus niveles de GSH intracelular a la mitad tras 60 minutos, En cambio en otro ensayo in vitro a 27° C y pH ácido el NO reaccionó mucho más lentamente con el GSH en ausencia de O_2.

Si bien el GSH se consume en ambos grupos hipóxicos, sólo se incrementa el GSSG en el grupo normotérmico. En condiciones ideales el GSH que se consume es convertido en una mínima parte a GSSG y principalmente pasa a GSSP acompañado de una pérdida de proteínas thioles. (54) (87) Este GSSP es rápidamente exportado fuera de la célula y el rol desempeñado por la producción de GSSP en las células es diverso va desde la protección de grupos PSH específicos de reacciones indeseadas, la generación de GSH extra a partir de GSSP, o la modulación de varios enzimas (como la fosfofructoquinasa, fructosa 1, 6-bifosfatasa, glucosa 6-fosfato dehidrogenasa) (88). Aunque el GSSP, no se midió pero se puede deducir que se encuentra incrementado en el grupo HTHx, los efectos antioxidantes que se le atribuyen sustentarían el efecto protector de este tratamiento.

La apoptosis se encuentra incrementada en ambos grupos aun cuando en si se descarta las células "marcadas" para seguir la via apoptótica por efecto del frio, sólo se obtiene un 9% de incremento de la actividad de caspasa 3 atribuible a la hipoxia comparado con el 23% encontrado en el grupo NTHx. Además si partimos del hecho que las reservas de ATP de las ratas de este grupo se agotarán antes, y dado que se necesita ATP para llevar a cabo la muerte programada, fácilmente una parte de ese porcentaje terminará en necrosis, aumentando la lesión que ya es bastante evidente por el incremento de las transaminasas en el grupo no protegido.

CONCLUSIONES

4 CONCLUSIONES

1. Se demostró que la velocidad de recalentamiento influye en la tasa de supervivencia. En nuestro modelo recalentando a 0,35° C/minuto se encontró una alta tasa de mortalidad mientras que a 0,25° C/minuto la supervivencia fue del 100%. La estrategia seguida para el manejo de gases, fue el alfa-stat y la evaluación de los principales factores hemodinámicos avalan la viabilidad de nuestro modelo de hipotermia profunda en rata.

2. La ketamina indujo un incremento en los niveles plasmáticos de óxido nítrico, acompañado del desarrollo de acidosis de tipo metabólico en sangre, mientras que el uso de pentobarbital causó acidosis respiratoria. La anestesia con Ketamina durante el enfriamiento, bloqueó el efecto de disminución del flujo sanguíneo portal atribuido a la hipotermia y que si se observó usando pentobarbital. Dado que el NO es un potente vasodilatador se sugiere que su participación justificaría este efecto.

3. La hipotermia profunda en animales anestesiados con pentobarbital, indujo una abrupta disminución del flujo portal que se recupera totalmente tras el recalentamiento. No se encontró indicios de metabolismo anaeróbico por lo cual se sugiere que el nivel de oxígeno del que disponen las células y tejidos es el adecuado.

4. La hipotermia profunda en animales anestesiados con pentobarbital incrementó el nivel de indicadores de estrés oxidativo, como lo demuestra el incremento de MDA y la disminución de tioles en el plasma, preservando sin embargo los niveles de las principales enzimas antioxidantes.

5. Los animales desarrollaron una acidosis metabólica tras el recalentamiento, debido posiblemente a la acumulación de metabolitos que se produjo durante la hipotermia. El recalentamiento es el momento crítico debido de la reoxigenación de los tejidos (tras la vasoconstricción inducida por el frio). A pesar de producirse un incremento en el estrés oxidativo estos radicales libres de oxígeno no alcanzaron un nivel inductor de lesión ni durante la hipotermia, ni tras el recalentamiento como lo demuestra el nivel de transaminasas.

6. En el hígado de animales sometidos a una hipotermia profunda se encontró un aumento en los niveles de NOx, así como un incremento en la actividad de la caspasa-3. Este efecto se pronuncia aun más tras el recalentamiento. Ambos procesos pueden estar relacionados entre sí, ya que el NO es un reconocido señalizador de la via apoptótica.

7. En el modelo de hipoxia aguda normobárica se demostró que el uso de la hipotermia profunda puede proteger frente a la lesión oxidativa revirtiendo efectos nocivos como el incremento de lactato sanguíneo, del NO y de las transaminasas en el plasma, y la disminución del ratio GSH/ GSSG a nivel hepático.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mortola, J. P. and Frappell, P. B. (2000). Ventilatory responses to changes in temperature in mammals and other vertebrates. *Annu. Rev Physiol* **62,** 847-874.

2. Malan, A., Rodeau, J. L., and Daull, F. (1985). Intracellular pH in hibernation and respiratory acidosis in the European hamster. *J Comp Physiol [B]* **156,** 251-258.

3. Danzl, D. (2002). Hypothermia. *Semin. Respir. Crit Care Med* **23,** 57-68.

4. Gentilello, L. M. (1995). Advances in the management of hypothermia. *Surg. Clin. North Am.* **75,** 243-256.

5. Gentilello, L. M. and Moujaes, S. (1995). Treatment of hypothermia in trauma victims: thermodynamic considerations. *J Intensive Care Med* **10,** 5-14.

6. Gordon, C. J. (2001). The therapeutic potential of regulated hypothermia. *Emergency Medicine Journal* **18,** 81-89.

7. Gordon, C. J., McMahon, B., Richelson, E., Padnos, B., and Katz, L. (2003). Neurotensin analog NT77 induces regulated hypothermia in the rat. *Life Sci.* **73,** 2611-2623.

8. Tveita, T., Skandfer, M., Refsum, H., and Ytrehus, K. (1996). Experimental hypothermia and rewarming: Changes in mechanical function and metabolism of rat hearts. *J Appl Physiol* **80,** 291-297.

9. Marion, D. W., Leonov, Y., Ginsberg, M., Katz, L. M., Kochanek, P. M., Lechleuthner, A., Nemoto, E. M., Obrist, W., Safar, P., Sterz, F., Tisherman, S. A., White, R. J., Xiao, F., and Zar, H. (1996). Resuscitative hypothermia. *Critical Care Medicine* **24,** S81-S89.

10. Kofstad, J. (1996). Blood gases and hypothermia: some theoretical and practical considerations. *Scand. J Clin. Lab Invest Suppl* **224,** 21-26.

11. Prakash, O. (1987). Hypothermia and Acid-Base Regulation in Infants. *Clinics in Perinatology* **14,** 199-225.

12. Swain, M. S. and Lebherz, H. G. (1986). Hybridization between fructose diphosphate aldolase subunits derived from diverse biological systems: anomolous hybridization behavior of some aldolase subunit types. *Arch. Biochem. Biophys.* **244,** 35-41.

13. Belke, D. D., Wang, L. C. H., and Lopaschuk, G. D. (1997). Effects of hypothermia on energy metabolism in rat and Richardson's ground squirrel hearts. *J Appl Physiol* **82,** 1210-1218.

14. Sprung, J., Cheng, E. Y., Gamulin, S., Kampine, J. P., and Bosnjak, Z. J. (1991). Effects of acute hypothermia and beta-adrenergic receptor blockade

on serum potassium concentration in rats. *Critical Care Medicine* **19,** 1545-1551.

15. McQueen, S. and Eyzaguirre, C. (1974). Effects of temperature on carotid chemoreceptor and baroreceptor activity. *Journal of Neurophysiology* **37,** 1287-1296.

16. Dietrich, W. D., Busto, R., Alonso, O., Globus, M. Y. T., and Ginsberg, M. D. (1993). Intraischemic But Not Postischemic Brain Hypothermia Protects Chronically Following Global Forebrain Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **13,** 541-549.

17. Barone, F. C., Feuerstein, G. Z., and White, R. F. (1997). Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci. Biobehav. Rev* **21,** 31-44.

18. Corbett, D., Hamilton, M., and Colbourne, F. (2000). Persistent neuroprotection with prolonged postischemic hypothermia in adult rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion. *Exp. Neurol.* **163,** 200-206.

19. Callaway, C. W., Tadler, S. C., Katz, L. M., Lipinski, C. L., and Brader, E. (2002). Feasibility of external cranial cooling during out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* **52,** 159-165.

20. Aardal, N. P., Svanes, K., and Egenberg, K. W. (1973). Effect of hypothermia and Pentobartal anaesthesia on the distribution of cardiac output in rabbits. *European Surgical Research* **5,** 362-372.

21. Schumaker, P. T., Rowland, J., Saltz, S., Nelson, D. P., and Wood, L. D. H. (1987). Effects of hyperthermia and hypothermia on oxygen extraction by tissues during hypovolemia. *J Appl Physiol* **63,** 1246-1252.

22. Mansfield, R. T., Schiding, J. K., Hamilton, R. L., and Kochanek, P. M. (1996). Effects of hypothermia on traumatic brain injury in immature rats. *J Cereb. Blood Flow Metab* **16,** 244-252.

23. Chen, R. Y. and Chien, S. (1978). Hemodynamic functions and blood viscosity in surface hypothermia. *American Journal of Physiology* **235,** H136-143.

24. Poulos, N. D. and Mollitt, D. L. (1991). The nature and reversibility of hypothermia-induced alterations of blood viscosity. *Journal of Trauma* **31,** 996-1000.

25. West, R. C. (1971). Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland, USA.

26. Varathan, S., Shibuta, S., Varathan, V., Takemura, M., Yonehara, N., and Mashimo, T. (2003). Effects of deep hypothermia on nitric oxide-induced cytotoxicity in primary cultures of cortical neurons. *J Neurosci. Res.* **72,** 613-621.

27. Yager, J. Y. and Asselin, J. (1996). Effect of Mild Hypothermia on Cerebral Energy Metabolism During the Evolution of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Immature Rat. *Stroke* **27,** 919-926.

28. Leith, D. E. The new acid-base: Power and simplicity. ACVIM FORUM. [9th], 611-617. 1991. NEW ORLEANS, LA, PROC.

Ref Type: Conference Proceeding

29. Rahn, H. (1966). Evolution of the gas transport system in vertebrates. *Proc. R. Soc. Med* **59,** 493-494.

30. Reeves, R. B. (1969). Role of the body temperature in determining the acid-base state in vertebrates. *Federation Proceedings* **28,** 1204-1208.

31. Radiometer (1998). Manual de gases en sangre. Radiometer Medical A/S., Bronshoj.

32. Jakob, S. M., Kosonen, P., Ruokonen, E., Parviainen, I., and Takala, J. (1999). The Haldane effect--an alternative explanation for increasing gastric mucosal PCO2 gradients? *Br. J. Anaesth.* **83,** 740-746.

33. Siggaard-Andersen, O. and Fogh-Andersen, N. (1995). Base excess or buffer base (strong ion difference) as measure of a non-respiratory acid-base disturbance. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **39,** 123-128.

34. Siggaard-Andersen, O. (1977). The Van Slyke equation. *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **37,** 15-20.

35. Siggaard-Andersen, O., Fogh-Andersen, N., Gothgen, I., and Larsen, V. (1995). Oxygen status of arterial and mixed venous blood. *Critical Care Medicine* **23,** 1284-1293.

36. Yunoki, M. (2003). Hypothermic Preconditioning induces rapid tolerance to focal ischemia injury in tne rat. *Experimental Neurology* **181,** 291-300.

37. Becker, H., Vinten-Johansen, J., Buckberg, G. D., Leaf, J. D., Lazar, H. L., and Manganaro, A. J. (1981). Myocardial damage caused by keeping pH 7.40 during systemic deep hypothermia. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82,** 810-820.

38. Swan, H. (1982). The hydroxyl-hydrogen ion concentration ratio during hypothermia. *Surg. Gynecol. Obstet.* **155,** 897-912.

39. Swan, H. (1984). The importance of acid-base management for cardiac and cerebral preservation during open heart operations. *Surg. Gynecol. Obstet.* **158,** 391-414.

40. White, F. N. (1981). A comparative physiological approach to hypothermia. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82,** 821-831.

41. White, F. N. and Somero, G. (1982). Acid-base regulation and phospholipid adaptations to temperature: time courses and physiological significance of modifying the milieu for protein function. *Physiol Rev* **62,** 40-90.

42. Erecinska, M., Thoresen, M., and Silver, I. A. (2003). Effects of hypothermia on energy metabolism in mammalian central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **23,** 513-530.

43. Bostek, C. C. (1989). Oxygen toxicity: an introduction. *AANA J* **57,** 231-237.

44. Wilhelm, J. (1990). Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* **137,** 1-53.

45. Ernster, L. (1988). Biochemistry of Reoxygenation Injury. *Critical Care Medicine* **16,** 947-953.

46. Margaill, I., Plotkine, M., and Lerouet, D. (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic. Biol. Med* **39,** 429-443.

47. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* **52,** 253-265.

48. Stohs, S. J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology* **6,** 205-228.

49. Mccord, J. M. (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* **26,** 351-357.

50. Zinchuk, V. and Borisiuk, M. (1998). The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats. *Respiration Physiology* **113,** 39-45.

51. Camera, E. and Picardo, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781,** 181-206.

52. Shivakumar, B. R. and Ravindranath, V. (1992). Oxidative stress induced by administration of the neuroleptic drug haloperidol is attenuated by higher doses of haloperidol. *Brain Res.* **595,** 256-262.

53. Di Simplicio, P. and Rossi, R. (1994). The time-course of mixed disulfide formation between GSH and proteins in rat blood after oxidative stress with tert-butyl hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1199,** 245-252.

54. Camera, E. and Picardo, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781,** 181-206.

55. Bellizi, M. C., Dutta-Roy, G., Duthie, G., and James, W. P. (1996). alphaTocopherol binding activity of red blood cells in smokers. *Free Radical Research* **27,** 105-112.

56. Hetts, S. W. (1998). To Die or NoT to Die. An overview of Apoptosis and its role in disease. *The Journal of the American Medical Association* **279,** 300-307.

57. Formigli, L., Conti, A., and Lippi, D. (2004). "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Medica* **95,** 159-164.

58. Green, D. and Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* **8,** 267-271.

59. Rose, C., Michalak, A., Pannunzio, M., Chatauret, N., Rambaldi, A., and Butterworth, R. F. (2000). Mild hypothermia delays the onset of coma and

prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* **31,** 872-877.

60. Gumbleton, M., Nicholls, P. J., and Taylor, G. (1990). Differential influence of laboratory anaesthetic regimens upon renal and hepatosplanchnic haemodynamics in the rat. *J Pharm. Pharmacol.* **42,** 693-697.

61. Thomson, A. M., West, D. C., and Lodge, D. (1985). An N-methyl-D-Aspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* **313,** 479-481.

62. Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol autooxidation. In *Anonymous handbook of methods for oxygen radical research* pp. 243-247, CRC Press, Boca Raton, FL.

63. Cohen, G., Dembiec, D., and Marcus, J. (1970). Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts. *Analytical Biochemistry* **34,** 30-&.

64. Hissin, P. J. and Hilf, R. (1976). A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analytical Biochemistry* **74,** 214-226.

65. Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978). Determination of malondialdehide precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* **86,** 271-278.

66. Cavalieri, B., Perrelli, M. G., Aragno, M., Mastrocola, R., Corvetti, G., Durazzo, M., Poli, G., and Cutrin, J. C. (2002). Ischemic preconditioning

attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transplantation* **8,** 990-999.

67. Bradford, M. M. (1976). A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72,** 248-254.

68. Alfaro, V. and Palacios, L. (1992). Differential-Effects of Hypothermia Upon Blood Acid-Base State and Blood-Gases in Sodium Pentobarbital and Urethane Anesthetized Rats. *General Pharmacology* **23,** 677-682.

69. Kelman, G. R. and Nunn, J. F. (1966). Nomograms for correction of blood $pO_{2, pCO2, pH, \text{and base excess for time and temperature}}$. *J Appl Physiol* **21,** 1484-1490.

70. Yagi, K. (1984). Assay for blood plasma or serum. In *Methods in Enzymology* pp. 328-331, Academic Press.

71. Aebi, H. E. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105,** 121-126.

72. Alfaro, V. and Palacios, L. (1993). Comparison of acid/base status in conscious and anaesthetized rats during acute hypothermia. *Pflügers Archives* **424,** 416-422.

73. Galley, H. F., Le Cras, A. E., Logan, S. D., and Webster, N. R. (2001). Differential nitric oxide synthase activity, cofactor availability and cGMP accumulation in the central nervous system during anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* **86,** 388-394.

74. Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1997). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43,** 109-142.

75. Fineman, J. R., Wong, J., Morin, F. C. I., Wild, L. M., and Soifer, S. J. (1994). Chronic Nitric Oxide Inhibition In Utero Produces Persistent Pulmonary Hypertension in Newborn Lambs. [Article]. *Journal of Clinical Investigation* **93,** 2675-2683.

76. Surdacki, A., Nowicki, M., Tsikas, D., Sandmann, J., Kruszelnicka-Kwiatkowska, O., Kokot, F., and Froelich, J. C. (1998). Systemic nitric oxide production in insulin-resistant and insulin-sensitive male subjects with essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **31,** 261.

77. Loeb, A. L., Gödény, I., and Longnecker, D. E. (1997). Anesthetics alter relative contributions of NO and EDHF in rat cremaster muscle microcirculation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **42,** H618-H627.

78. Tarnow, J., Bruckner, J. B., Eberlein, H. J., Gethmann, J. W., Hess, W., Patschke, D., and Wilde, J. (1975). Blood pH and PaCO2 as chemical factors in myocardial blood flow control. *Basic Res. Cardiol.* **70,** 685-696.

79. Heintz, A., Koch, T., and Deussen, A. (2005). Intact nitric oxide production is obligatory for the sustained flow response during hypercapnic acidosis in guinea pig heart. *Cardiovasc. Res.* **66,** 55-63.

80. Camera, E. and Picardo, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781,** 181-206.

81. Lemasters, J. J. (1999). Mechanisms of hepatic toxicity v. necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *American Journal of Physiology* **276,** G1-G6.

82. Mueller, T. H. J., Kienle, K., Beham, A., Geissler, E. K., Jauch, K. W., and Rentsch, M. (2004). Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* **78,** 1267-1273.

83. Azuara, D., Sola, A., Hotter, G., Calatayud, L., Jaurrieta, E., and de Oca, J. (2003). Role of nitric oxide in apoptosis and cell necrosis for intestinal transplantation. *Transplantation Proceedings* **35,** 1931-1932.

84. Carini, R., De Cesaris, M. G., Splendore, R., Domenicotti, C., Nitti, M. P., Pronzato, M. A., and Albano, E. (2003). Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **34,** 1047-1055.

85. Sumida, K. D., Urdiales, J. H., and Donovan, C. M. (2006). Impact of flow rate uptake and gluconeogenesis in glucagon-stimulated perfused livers. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism* **290,** 185-191.

86. Kim, J. S., Qian, T., and Lemasters, J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* **124,** 494-503.

87. Shivakumar, B. R. and Ravindranath, V. (1992). Selective modulation of glutathione in mouse brain regions and its effect on acrylamide-induced neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **43,** 263-269.

88. Rossi, R., Cardaioli, E., Scaloni, A., Amiconi, G., and Di Simplicio, P. Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1243[2], 230-238. 1995.

ANEXO

6 ANEXO

6.1 *LISTA DE TABLAS Y FIGURAS*

Tabla 1.1. Clasificación de la hipotermia de acuerdo a sus intensidad. Niveles propuestos en la literatura por Safar y Gentilello

Tabla 1.2. Valores del producto iónico y del pH neutro del agua (pK'w y pN respectivamente) a diferentes temperaturas.

TABLA 3.1:
Cambios en los gases arteriales y parámetros relacionados con el equilibrio acido base en ratas normotérmicas.

TABLA 3.2:
Cambios en las concentraciones de los principales iones en ratas normotérmicas. En el grupo Ketamina (K) se aplicó una dosis extra de anestesia a la mitad del experimento. Se incluyeron medidas de antes y después de esta dosis (30 y 45 min).

TABLA 3.3:
Cambios en el estado oxidativo: efectos prooxidante medidos por la técnica de malondialdehido (MDA); concentración antioxidante (grupos SH); e indicadores de daño tales como transaminasas plasmáticas (AST) y lactato sanguíneo a los 15 y 60 minutos después de la inducción anestésica con Ketamina+ Xylacina o con Pentobarbital en ratas. (n=6).

TABLA 3.4:
Cambios en la frecuencia cardiaca (FC) y la presión arterial media (MAP) a diferentes temperaturas

TABLA 3.5:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas Cu- Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Y Glutation peroxidasa (GPx), en los grupos Control (C), normotermia (NT), hipotermia (HT), y recalentadas (RC_M)

TABLA 3.6:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas Cu- Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos Control (C), normotermia (NT), hipotermia (HT), y recalentadas (RC_M)

TABLA 3.7:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes eritrocitarias Cu- Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos Control (C), normotermia (NT), hipotermia (HT), y recalentadas (RC_M)
Letras distintas son estadísticamente diferentes

TABLA 3.8:
Cambios en los gases arteriales y los indicadores del equilibrio ácido base en los grupos Basal (sólo canulados), Control(después de la cirugía), 2 y 3 horas de normotermia (NT2h y NT3h), hipotermia (HT), y recalentadas (RC25)

TABLA 3.9
Cambios en los gases arteriales y los indicadores del equilibrio ácido base en los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx).
+ $p< 0.05$ and +++ $p< 0.001$, vs. NTNx; * $p< 0.05$ and *** $p< 0.001$ vs. HTHx.

TABLA 3.10:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas Cu-Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los gruposnormotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Letras distintas son estadísticamente diferentes

TABLA 3.11:
Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes eritrocitarias Cu- Zn Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), y Glutation peroxidasa (GSH-Px), en los grupos normotermia (NT), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HT) e hipotermia hipoxia (HTHx). Letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 1.1.
Comparación de los valores de pH de sangre de mamíferos y poiquilotermos como una función de la temperatura corporal.

Figura 1.2.
Esquema del intercambio gaseoso arterio-venoso

Figura 1.3.
Esquema representativo de la desviaciones de la CDO de oxígeno cuando varían las concentraciones de CO_2, el pH y la temperatura.

Figura 1.4.
Representación del intercambio gaseoso entre las células y el eritrocito (a) donde se realizan las reacciones del sistema CO_2.

Figura 1.5. Principales fuentes de radicales libres. Los aniones superóxido altamente reactivos son producidos principalmente por (1) la ruta del ácido araquidónico, (2) la cadena respiratoria mitocondrial, (3) la oxidación de la xanthina e hipoxanthina por la xantina oxidasa, y (4) NADPH-oxidasas. Los aniones superóxido pueden reaccionar tanto con el óxido nítrico, producido por las oxido nítrico sintasas, para generar un potente oxidante: el peroxinitrito, o bien pueden ser degradados por la superoxido dismutasa en una especie menos reactiva: el peroxido de hidrógeno. El peróxido puede ser luego (1) catabolizado por su reacción con la glutation peroxidasa o con la catalasa, (2) puede reaccionar con el Fe^{2+} para formar radicales hidroxilo vía la reacción de Fenton, o (3) puede ser degradado por mieloperoxidasa, otra fuente de radicales hidroxilo. Abreviaciones: COX, ciclooxygenasa; G6PD, glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa; GSH, glutation reducido; GR, glutation reductasa; GPX, glutation peroxidasa; GSSG, glutation oxidado; HOCl, ácido hipoclórico; H_2O_2; LOX lipoxigenasa; MPO, mieloperoxidasa; NADPH, nicotinamida adenina difosfato; NO, óxido nítrico; NO_3^-; NO_2^-, nitrato y nitrito; NOS, NO sintasa; $O_2^{\bullet-}$ anion superóxido; $OH^{\bullet}$, radical hidroxilo; $ONOO^-$, anion peroxinitrito; ONOOH, ácido peroxinitroso; SOD, superóxido dismutasa; XO, xanthina oxidasa.

Figura 1.6.
Esquema de las vías de muerte celular

Figura 1.4.
Representación del intercambio gaseoso entre las células y el eritrocito

Figura1.15:
Variaciones del pH durante el enfriamiento en animales ectotermos e hibernantes

Figura 2.1
Effecto del pH sobre la formación del derivado GSH-OPA.

Figura 3.1:
Niveles de NOx plasmático a 15, 30, 45, and 60 minutos después de la inducción anestésica con Ketamina o Pentobarbital.

Figura 3.2:
Temperatura corporal y flujo venoso portal durante el periodo de enfriamiento.

Figura 3.3:
Esquema del sistema de enfriamiento y recalentamiento.

Figura 3.4:
Esquema del Protocolo Experimental C.

Figure 3.5:
Porcentaje de supervivencia vs. temperatura corporal en °C durante el recalentamiento a diferentes velocidades.

Figura 3.6:
Esquema del Protocolo Experimental D.

Figura 3.7
Temperatura corporal y flujo venoso portal en los grupos de Hipotermia/ recalentamiento moderado (RC_M) y normotérmico (NT).

Figura 3.8:
Niveles de lactato hepático (I) y sanguíneo (II) en los grupos basal (B), control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC_M) Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes..

Figura 3.9
Niveles de TBARS en hígado (ligado a proteína, y libre) y plasma en los grupos basal (B), control (C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC).

Figura 3.9

Variaciones de los niveles de oxido nítrico en hígado y plasma basal (B), control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC)

Figura 3.11a
Variaciones en los niveles de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG),total (GSH + GSSG)y el ratio GSH/GSSG en hígado de ratas control (C), normotérmicas (NT), hipotérmicas (HT) y recalentadas (RC).
Figura 3.11b
Variaciones en los niveles de grupos SH en plasma de ratas control (C), normotérmicas (NT), hipotérmicas (HT) y recalentadas (RC

Figura 3.12:
Actividades de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) plasmáticas en los grupos basal (B), control (C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento moderado (RC_M).

Figura 3.13.
Actividad de la caspasa-3 hepática en los grupos Control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento (RC).

Figura 3.13:
Esquema del Protocolo Experimental E
.
Figura 3. 14
Temperatura corporal y flujo venoso portal en los grupos de normotermia-hipoxia (NTHx) e hipotermia-hipoxia (HTHx)

Figura 3.15: Niveles de lactato hepático y sanguíneo en los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 3.16
Niveles de TBARS en hígado (ligado a proteína, y libre) y plasma en los normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 3.17
Variaciones de los niveles de oxido nítrico en hígado (I) y plasma(II) en los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las

medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 3.18
Variaciones en los niveles de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG),total (GSH + GSSG)y el ratio GSH/GSSG en hígado de ratas de los grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 3.19
Actividades de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) plasmáticas en los grupos grupos normotermia (NTNx), normotermia hipóxia (NTHx), hipotermia (HTNx) e hipotermia hipoxia (HTHx). Los valores son las medias ± CME. Las barras con letras distintas son estadísticamente diferentes

Figura 3.20:
Actividad de la caspasa-3 hepática en los grupos Control(C), hipotermia (HT), normotermia (NT) y recalentamiento (RC). Los valores son las medias ± CME. Las letras diferentes representan diferencias significativas

Figura 3.21
Mecanismo de acción del NO.

6.2 *GLOSARIO*

ABC: Azul brillante de Coomasie.

ALAT: Alanina amino transferasa

ASAT: Aspartato amino transferasa

ALF: (acute liver failure) Insuficiencia hepática aguda.

APAF-1: Factor 1 activador de proteasas apoptóticas.

BHT: Tert-butil-hidroperóxido

CME: Cuadrado medio del error

CO_2: Dióxido de carbono.

CPR: Reanimación Cardiopulmonar.

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DTT: DL-dithiothreitol

EDTA: Ácido etileno diamino tetraacético

FBP: Fructosa 1,6-bifosfato.

FC: Frecuencia cardíaca.

FVP: Flujo de la vena porta hepática.

CDO: Curva de disociación hemoglobina- oxígeno

GSH-Px: Gllutation peroxidasa.

GSH-R: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado.

GTP: Glutamato- piruvato transaminasa

Hb: Hemoglobina.

HbCO: Carboxihemoglobina

HPLC: Cromatografía líquida de alta precisión.

Kd: Constante de disociación.

L-LDH: L-Lactato deshidrogenasa

MDA: Malondialdehido

MetHb: Metahemoglobina.

mmol: milimol

NAD: nicotinamida- adenina- dicluneótido.

NADH: Nicotin amida adenin dinucleótido

NADP+: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato, forma oxidizada.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato, forma reducida

NEM:

NMDA: N-metil-D-Aspartato (NMDA)

$NO^{\bullet}$: Óxido nitrico, especie radical.

$^{\bullet}NO_2$: dióxido de nitrógeno.

$ONOO^-$: peroxinitrito.

OPA: *ortho*-phthalaldehido

$PaCO_2$: Presión arterial de dióxido de carbono.

PAM: Presión arterial media

PaO_2: Presión arterial de oxígeno.

PBS:Tampón fosfato

pN: Punto de neutralidad

pN H_2O: punto de neutralidad del agua

pNA: *para*-nitroanilina

Q_{10}: Cambio relativo en la tasa metabólica por cada 10 grados de cambio en temperatura corporal

RLO: Radicales libres de oxígeno.

ROS: Especies oxígeno reactivas

RSN: Especies nitrógeno reactivas

SSF: Solución salina fisiológica.

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TCA: Ácido tricloroacético

TEP: Ácido 1,1,3,3-tetraetoxipropano

umol: micromol.

TRABAJOS PUBLICADOS

ELSEVIER

Journal of Thermal Biology 29 (2004) 259–264

Journal of
THERMAL BIOLOGY

www.elsevier.com/locate/jtherbio

A model of deep experimental hypothermia and rewarming in rat

N. Alva, T. Carbonell, J. Palomeque*

Departamento de Fisiologia, Facultad de Biologia, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

Received 25 November 2003; received in revised form 7 January 2004; accepted 28 April 2004

Abstract

We studied the effects of deep hypothermia and rewarming on hepatic regional blood flow, acid–base balance and level of plasma transaminases in rat. A high mortality was found when rewarming at 0.35°C/min. At a rate of 0.25°C/min, all animals survived and the decrease in portal vein flow induced by hypothermia was restored. The reduced blood flow did not affect aerobic metabolism based on lactate levels. In this animal model, pH was maintained by controlling ventilation following the alpha-stat strategy. It appears that deep hypothermia protocol could be safely used to rewarm hypothermic subjects.
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Deep hypothermia; Rewarming; Transaminases; Portal vein flow; Acid–base balance; Alphastat strategy; Rat

1. Introduction

There are different situations that could lead to a hypothermic state in humans. Accidental hypothermia occurs as a consequence of exposure to low environmental temperatures. Hypothermia is induced and applied in cardiac surgical procedures such as cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest, cardiopulmonary resuscitation and transplant surgical techniques (Swain, 1988).

During the last 60 years, research has focused on the mechanism by which hypothermia protects vital organs such as the brain (Schmid-Elsaesser et al., 1999), the heart (Tveita et al., 1996) and even the whole body exposed to ischemia and reperfusion damage (Colbourne et al., 1997). As a result, we know that protection depends on the hypothermia level: mild (34–36°C), moderate (28–32°C) or deep (15–24°C) (Marion et al., 1996), and on the physiological state of the tissue: ischemic or post-ischemic (Yager and Asselin, 1996). Some of the favourable effects of hypothermia are metabolic rate diminution (decreasing the oxygen demand of the tissues) (Takasu et al., 1999), maintenance of ATP/ADP stores (Barone et al., 1997), decrease in oxygen free radicals and lipid peroxidation products in traumatic ischemia (Lei et al., 1994), and diminution of vascular permeability which reduces vascular resistance (Zar et al., 1999).

The extended use of hypothermia has shown that, alongside its beneficial effects, several unfavourable consequences have been described, such as peripheral vasoconstriction, a decreased myocardial contractility, and metabolic acidosis (Swain, 1988). Some deleterious effects may be associated with the rewarming period. For example, circulatory collapse occurs when rewarming victims from accidental hypothermia. This resulting fatal circulatory derangement is characterised by failing cardiac output and a sudden drop in blood pressure (Maclean and Emslie-Smith, 1977).

Although mild and moderate hypothermia can be considered therapeutically safe (Bissonnette et al., 1999), studies on deep hypothermia are not conclusive. Rats

*Corresponding author. Tel.: +34-34021526; fax: +34-34110358.

E-mail address: jpalomeque@ub.edu (J. Palomeque).

0306-4565/$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jtherbio.2004.04.001

kept for five hours in deep hypothermia die during the rewarming at a body temperature of 25–30°C (Popovic and Kent, 1965). More recently it has been described that a peripheral vasoconstriction induced by hypothermia is related with a loss in plasma proteins and water from the vascular bed (Mathew et al., 2002a).

Concerning the acid–base control of hypothermic patients, there are two types of rewarming strategies that have been used in clinical medicine. The pH-stat, based on maintaining the pH at 7.40 when measured at actual body temperature, is achieved by modifying the ventilation rate. The alpha-stat refers to restrain the pH at 7.40 only when measured at 37°C (Kofstad, 1996). Since during hypothermia there is a decrease (Watanabe et al., 1999) and redistribution (Anzai et al., 1978) of the blood flow, we choose the liver as an indicator of the viability of the model due to its important role as a vital metabolic organ for both endogenous and exogenous substances. In the present study we have used the alpha-stat strategy and have measured the hepatic regional blood flow, the acid–base balance, blood lactate, the release of transaminases and the survival rate in rewarmed hypothermic rats.

2. Material and methods

The experimental protocol was reviewed and approved by the Institutional Committee of Animal Care and Research of the University of Barcelona in accordance with European Community guidelines. Forty-two adult male Sprague–Dawley rats (285–300 g body weight) maintained in a 12 h light-dark cycle and at a temperature of 24°C were used.

The animals were fasted overnight and given tap water ad libitum before the surgery. All the experiments started at 10:00 and finished according each specific procedure. They were anaesthetised by sodium pentobarbital (60 mg/Kg body weight intraperitoneally) and placed in supine position on the cooling/rewarming table to avoid anaesthetic-induced hypothermia during the surgery. A right common carotid artery was cannulated and a polyethylene catheter was inserted (PE 50) for blood sampling. The basal group was sacrificed at this point. After tracheal intubation, respiration was supported by a volume and frequency controlled small-animal respirator (Harvard Apparatus Limited, Kent, United Kingdom) using room air. By modifying the respiratory frequency the arterial P_{CO_2} was adjusted to maintain the pH close to 7.4 when measured at 37°C to follow the alpha-stat scheme. A small longitudinal incision (2–3 cm) in the abdominal cavity was performed, the portal vein was isolated and a flow probe was placed around it (Transonic Systems Inc., NY, USA).

In order to achieve the changes in body temperature two sets of polyethylene tubes were connected in a closed circuit to a cold (14°C) or warm (40°C) water baths. A circulating pump delivered the fluid into two parallel branches of coils, one of which (6 mm of inner diameter) was placed under the surgery table and the other (0.7 mm of inner diameter) into the abdominal cavity. The flow rates were 97.2 mL/min and 2.81 mL/min, respectively. With this experimental design we accomplished the desired final body temperatures taking into account the heat loss.

Two thermocouples were inserted, one next to the carotid artery (internal neck temperature) and the other into the core in the peritoneal cavity near the liver (abdominal temperature). Since no differences greater than 0.5°C were found, the average of both were considered as core temperature. Finally, the muscular layer and skin were stitched separately to avoid excessive loss of heat. The surgery protocol never lasted more than one hour.

Animals were then divided into seven groups of six individuals. Normothermic animals were kept at 37°C during 2 or 3 h (NT 2H and NT 3H). Hypothermic group (HT) were cooled by circulating cold water through abdominal catheter and under the surgery table (at a mean rate of −0.25°C/min) and kept in the cold (20.65 ± 0.25°C) for 1 h (Fig. 1). REW25 and REW35 were cooled as described above but after the hypothermic period they were rewarmed at rates of 0.25 and 0.35°C/min, respectively, for 1 h or until physiological body temperature was reached. Basal (B) (carotid cannulation but not surgery was performed) and post-surgery (PS) groups were also studied. Capillary blood samples were obtained every 30 min to control acid–base status. Animals were killed by anaesthesia overdose.

Arterial pH, partial pressures of arterial blood gases: P_{O_2} and P_{CO_2} were measured with a microgas analyzer Radiometer ABL 5 acid–base laboratory (Radiometer, Copenhagen, Denmark) at 37°C. The values were corrected to body temperature according to previous reports, for pH (Alfaro and Palacios, 1992), for P_{O_2} (Severinghaus, 1979), and the nomograms for P_{CO_2} (Kelman and Nunn, 1966). Acid–base balance: the $[OH^-]/[H^+]$ ratio, concentration of hydrocarbonates $[HCO_3^-]$, standard excess of buffer bases (SBE) and total carbon dioxide content, (tCO_2) were also calculated by Severinghaus algorithms. The percentage of oxihemoglobin was determined using hemoximeter (OSM3, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Plasma aspartate aminotransferase (AST) (3397 Merckotest; Merck) and plasma alanine aminotransferase (ALT) (3398 Merckotest; Merck) activities were determined using commercial kits. Blood lactate concentration was determined by a lactate dehydrogenase method with commercial kits (Boehringer, Mannheim, Germany).

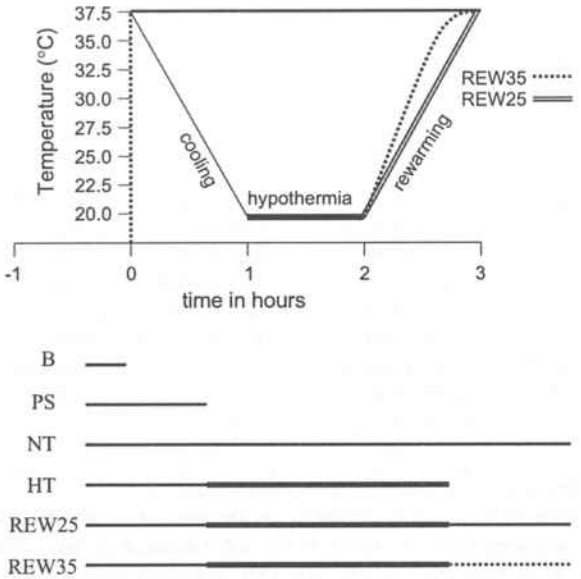


Fig. 1. Experimental protocol. Time "0" indicates the end of the surgery. The average body temperature during the period of stable hypothermia was 20.85°C. A period of approximately 1 h was required to produce deep hypothermia. The rewarming rate was 0.25°C or 0.35°C/min (moderate or fast rewarming groups, respectively). The temperature of the water which was circulating both under the surgery table and inside the coil tube place in the rat's abdominal cavity was adjusted to 37°C (—), 38°C (····) and 20°C (▬). Groups listed at the bottom are B: basal group; PS: post surgery; NT: normothermic group, HT: hypothermic animals; REW25 and REW35, moderated and fast rewarmed groups, respectively.

Results were expressed as means ± standard error of the mean (SEM) of six animals. Data were analysed either by the Student's t test or by the two-way ANOVA using the Student–Newman–Keuls test to identify significant differences ($p<0.05$). All graphics and analyses were obtained using computer software packages.

3. Results

Fig. 2 reveals the mortality rate comparing REW25 and REW35 groups at different periods of the experiment. Following deep hypothermia REW35 group showed lower portal vein flow than REW25 which did not increase during rewarming (data non-shown). During the rewarming phase a statistically significant higher mortality rate was found in the fast rewarming group.

Fig. 3 displays the body temperatures and portal vein blood flow in NT and REW25 group, expressed as a percentage of the basal value, during the 3 h of the experiment. Data of REW35 were not considered

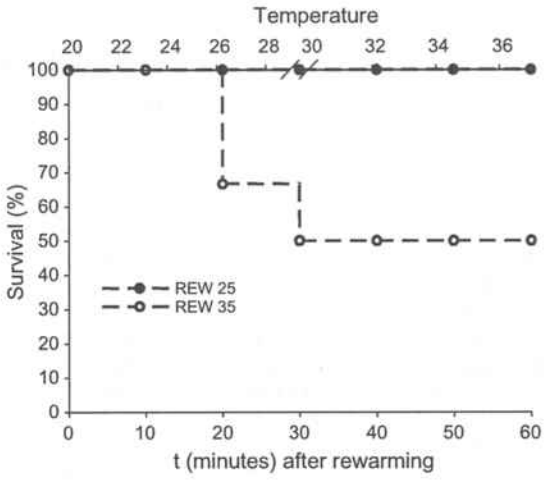


Fig. 2. Survival vs. body temperature in post hypothermia at different rates of rewarming: REW25, moderate rewarming (0.25°C/min); REW35, fast rewarming (0.35°C/min).

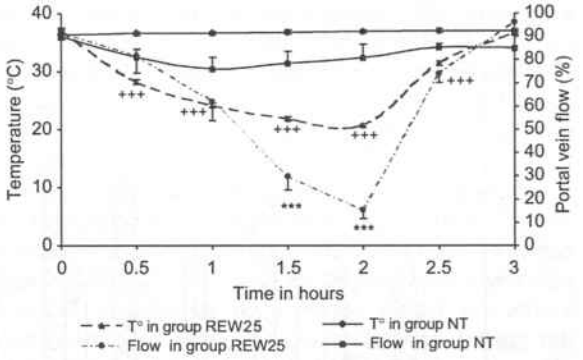


Fig. 3. Body temperature and portal vein flow in hypothermia/moderate rewarming (REW 25) and normothermic (NT) groups. $^{+++}p<0.001$ vs. NT temperature; $^{***}p<0.001$ vs. NT flow.

because of its high mortality rate. Table 1 shows O_2, CO_2 blood pressures and pH, $[OH^-]/[H^+]$ ratio, bicarbonate and CO_2 content, standard base excess, oxygen saturation of the haemoglobin and haematocrit in basal, post surgery, normothermia at two and three hours, hypothermia and hypothermia-rewarmed (at moderate rate) animals. In general the results were quite homogeneous with the exception of an increase in carbon dioxide pressure and acidosis in anaesthetised rats. All the animals recovered their normal range of blood gases and pH after they were connected to the respirator but at the end of rewarming blood acidosis redeveloped.

Fig. 4 indicates the values of AST and ALT in the basal, Post surgery, normothermic (2 and 3 h) hypothermic and hypothermia-moderate rewarming groups. No statistically significant differences were detected between

Table 1
Changes in blood arterial gases and related acid-base indices at basal (pre-surgery), post-surgery (PS), normothermia lasting 2 h (NT 2 h) or 3 h (NT 3 h), hypothermia (HT), and moderate rewarming (REW25) groups

Group	Basal	PS	NT 2 H	HT	NT 3 H	REW25
Tb (°C)	36.83±0.17	36.82±0.22***	37.60±0.29***	20.85±0.22+++	37.44±0.12	36.66±0.09***
$P_{(a)O_2}$ mm Hg	81.17±4.31	97.17±4.48***	86.00±2.08***	182.5±5.94+++	90.0±4.16	91.40±6.62***
Act $P_{(a)O_2}$ mm Hg	80.00±4.52	95.23±3.05**	90.57±3.08*	115.42±5.89	92.54±4.67	96.65±3.81
Hb O_2 (%)	89.06±1.33+	94.77±0.61	90.80±0.32*	97.68±0.66	90.67±2.17	91.80±1.91
$PH_{(a)}$	7.276±0.007+	7.388±0.015	7.360±0.010	7.372±0.032	7.387±0.024†	7.273±0.028
Act pH	7.276±0.011+	7.391±0.015	7.349±0.014***	7.602±0.036	7. 380±0.024†	7.280±0.028
$[OH^-]/[H^+]$	8.57±0.26+	14.71±1.05	12.00±0.76	16.78±1.59	14.33±1.59†	9.57±1.58*
$P_{(a)CO_2}$ mm Hg	53.17±1.45+++	37.00±2.42	42.25±3.93	32.60±2.04	34.43±3.23	40.0±2.41
Act $P_{(a)CO_2}$	52.63±1.33+++	36.56±2.26	41.00±5.35***	16.52± 1.02	35.30±3.35	39.24±2.39
HCO_3^- mmol/L	23.33±0.67	20.00±1.32	21.67±2.33	17.14±1.47	20.33±1.61	18.00±1.63
tCO_2	56.00±1.44	47.22±2.56	51.33±5.70	40.50±3.84	51.50±4.79	43.40±4.46
SBE mmol/L	−2.7±0.71	−4.5±0.94	−2.33±1.33	−6.33±1.67	−2.5±1.85	−7.4±2.25
Hto (%)	46.73±0.96	46.73±0.96	42.50±2.04	41.99±3.38	41.43±1.67	44.68±1.58

+$p<0.05$ and +++$p<0.001$, vs. PS; *$p<0.05$ and ***$p<0.001$ vs. HT; †$p<0.05$ vs. REW25. Values are the mean ± SEM. Tb (°C), body temperature in °C; $P_{(a)O_2}$, $P_{(a)CO_2}$, $pH_{(a)}$ are arterial O_2 and CO_2 presures and pH measured at 37°C. Act $P_{(a)O_2}$, Act $P_{(a)CO_2}$, Act $pH_{(a)}$ are actual arterial O_2 and CO_2 pressures and actual pH corrected to body temperature. $[OH^-]/[H^+]$, relative alkalinity ratio; tCO_2, total carbon dioxide content; SBE, standard excess of buffer bases; Hto, hematocrit.

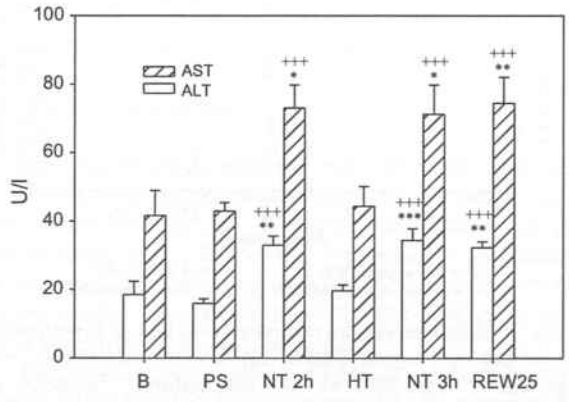


Fig. 4. Plasma aspartate aminotransferase (AST) and plasma alanine aminotransferase (ALT) activities in basal (B), Post surgery (PS), hypothermia (HT), normothermia (NT) and moderate rewarming (REW25) groups. +++$p<0.001$ vs. post surgery. *$p<0.05$, **$p<0.01$ and ***$p<0.001$ vs. hypothermia.

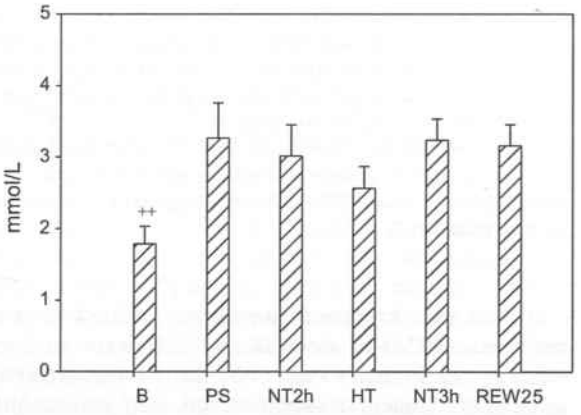


Fig. 5. Blood lactate levels in basal (B), Post surgery (PS), hypothermia (HT), normothermia (NT) and moderate rewarming (REW25) groups. ++$p<0.01$ vs. post surgery.

B, C and HT either, between NT 2 h, NT 3 h and REW25 groups. Blood lactate concentration was found to be the same in all treated animals (Fig. 5). Although there were statistically significative differences between basal and post surgery levels.

4. Discussion

In the present study a model was developed that took into consideration the most important variables present in a clinical trial of rewarming such as the effect of anaesthesia, supported ventilation and the surgical stress. Special emphasis was drawn to the liver because of the interest of our group on its metabolism. There are many cooling and rewarming techniques and most of them are used in human resuscitation. Techniques that include an infusion of warm intravenous fluids, body cavity lavage or extracorporeal circulatory techniques (Gentilello, 1995). All these active methods of rewarming add other variables in the study of hypothermia/rewarming which are avoided in our model by keeping electrolytes and blood volume constant.

In REW25 a strict correlation between body temperature and hepatic blood flow was observed. Blood flow decrease during hypothermia reaching about 20% of the basal value when the body temperature descended

to 20.85±0.22°C. Interestingly, the blood flow during rewarming recovered its basal value. No changes in core temperature or portal vein blood flow were observed in the normothermia (NT) group versus the hypothermia-rewarmed group (REW25) at the end of the experiment suggesting a completely restored physiological status. Other authors have found that rats cooled to a core temperature of 13°C survived the hypothermic insult but frequently died within 2 h of rewarming (Tveita et al., 1996). In that model, hypothermia severely decreased flow to most organs that was partially restored upon rewarming. Moreover, in a non-invasive hypothermic model a mortality rate of 21% when rewarming from 20°C was observed (Mathew et al., 2002b). In our model the use of ventilatory support, which stabilise acid–base status, improved survival from recovery.

At the fast rewarming rate, mortality occurred between a core temperature of 26–30°C. It corresponded with the time when the most acute increase in portal blood flow was expected (if compared with REW25). Rewarming shock is well documented following hypothermia, an apparent result of the reversal vasoconstriction and lowered circulating volume which results in vascular collapse (Golden et al., 1991). In the unsuccessfully rewarmed rats we observed a failure in recovering portal vein flow. This fact also implies that blood fails in distributing the heat through the body. The effect of temperature gradients in different vascular regions may result in a disassociation between metabolism and flow (Enomoto et al., 1996; Nakamura et al., 2003) resulting in cardiac failure due to circulatory collapse (Mathew et al., 2002b) could explain mortality rate during the earlier stage of fast rewarming. Although previous reports demonstrate that hypothermic mice could be quickly rewarmed by radiofrequency radiation, such a high rewarming rate would produce protein denaturation when techniques others than microwave rewarming are used (Gordon, 1982).

The highest P_{O_2} values found in the HT group could be attributed to the temperature induced solubility changes in blood that would also be in agreement with a slight increase in oxygen saturation. Concerning the pH, acidic values found in the basal group together with the high P_{CO_2}, total CO_2 values suggests that the anaesthesia provoked a respiratory depression and a concomitant respiratory acidosis. Although in hypothermia the pH normalised to body temperature is apparently alkaline, we need to take into consideration the ratio $[OH^-]/[H^+]$ or the relative alkalinity which is the parameter that is actually controlled by an animal in non-isothermic conditions (Rahn, 1966). When analysed the pH in hypothermia referred to 37°C, a slightly acidic parameter was found which could be due to the accumulation of non-volatile acidic metabolites as is evident from the negative base excess. Other authors found a very acidic blood pH at a similar level of hypothermia (Zinchuk and Dorokhina, 2002). However they did not mention ventilatory support, those results could be explained by a respiratory acidosis. On the other hand we found a low ratio $[OH^-]/[H^+]$ in REW25 group. The finding that the P_{CO_2} values are normal rules out any change in ventilation. The negative base excess indicates acidosis due to the release of metabolites other than lactate, which was unchanged. The low HCO_3^- content corroborates the metabolic origin of the acidosis observed. As expected, the P_{CO_2} in hypothermia was low due to the acid–base balance dependence on temperature (Alfaro and Palacios, 1993).

From the point of view of the acid–base balance the strategy applied in this model of deep hypothermia follows the pattern of alpha-stat (Kofstad, 1996), which keeps the $[OH^-]/[H^+]$ ratio at a neutral level. In general the standard base excess appears slightly negative in relation to the normal values, probably as a consequence of the anaesthesia and surgical procedures. Nevertheless higher results were found in the HT and REW25 groups. This additional increase could be due to changes in the metabolism during hypothermia. The hematocrit values were not statistically different in the groups considered. It could be deduced that the decrease in blood volume in the animals in which several blood samples were withdrawn in order to control the pH were negligible.

In summary our results point out the importance of the rewarming rate in terms of mortality. In the present conditions a safe rewarming rate should not be higher than +0.25°C/min. The deep hypothermia-rewarming protocol appears to be a viable model for animal experimentation using an appropriate rewarming rate while keeping an optimal $[OH^-]/[H^+]$ ratio. The reduction of metabolism corresponding with a decrease in blood flow could be the origin of the hypothetical protective effect, related to the clinical surgery.

Acknowledgements

We are grateful to Cristina Palomeque for language assistance. This study was supported by grants PM99-0165, and BFI 2003-03439.

References

Alfaro, V., Palacios, L., 1992. Differential effects of hypothermia upon blood acid base state and blood gases in sodium penthobarbital and urethane anaesthetised rats. Gen. Pharmacol. 23, 677–682.

Alfaro, V., Palacios, L., 1993. Comparison of acid/base status in conscious and anaesthetized rats during acute hypothermia. Pflüg. Arch. 424, 416–422.

Anzai, T., Turner, M.D., Gibson, W.H., Neely, W.A., 1978. Blood flow distribution in dogs during hypothermia and post hypothermia. Am. J. Physiol. 234, H706–H710.

Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., White, R.F., 1997. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. Neurosci. Biobehav. R. 21, 31–44.

Bissonnette, B., Pellerin, L., Ravussin, P., Daven, V.B., Magistretti, P.J., 1999. Deep hypothermia and rewarming alters glutamate levels and glycogen content in cultured astrocytes. Anesthesiology 91, 1763–1769.

Colbourne, F., Sutherland, G., Corbett, D., 1997. Postischemic hypothermia: a critical appraisal with implications for clinical treatment. Mol. Neurobiol. 14, 171–201.

Enomoto, S., Hindman, B.J., Dexter, F., Smith, T., Cutkomp, J., 1996. Rapid rewarming causes an increase in the cerebral metabolic rate for oxygen that is temporarily unmatched by cerebral flow. Anesthesiology 84, 1392–1400.

Gentilello, L.M., 1995. Advances in the management of hypothermia. Surg. Clin. North Am. 75 (2), 243–256.

Golden, F.S., Hervey, G.R., Tipton, M.J., 1991. Circum-rescue collapse: collapse, sometimes fatal, associated with a rescue of immersion victims. J. R. Nav. Med. Ser. 77, 139–149.

Gordon, C.J., 1982. Rewarming mice from hypothermia by exposure to 2450-MHz microwave radiation. Cryobiology 19, 428–434.

Kelman, G.R., Nunn, J.F., 1966. Nomograms for correction of blood P_{O_2}, P_{CO_2}, pH, and base excess for time and temperature. J. Appl. Physiol. 21, 1484–1490.

Kofstad, J., 1996. Blood gases and hypothermia: some theoretical and practical considerations. Scand. J. Clin. Lab. Inv. 56 (Suppl. 224), 21–26.

Lei, B., Tan, X., Cai, H., Xu, Q., Guo, Q., 1994. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. Stroke 25, 147–152.

Maclean, D., Emslie-Smith, D., 1977. Accidental Hypothermia. Blackwell Scientific. Melbourne, Australia.

Marion, R.W., Leonov, Y., Ginsberg, M., Katz, L.M., Kochanek, P.M., Lechaleuthner, A., Nemoto, E.M., Obrist, W., Safar, P., Sterz, F., Tisherman, S.A., White, R.J., Xiao, F., Zar, H., 1996. Resuscitative hypothermia. Crit. Care Med. 24, S81–S87.

Mathew, C.B., Sils, I.V., Bastille, A.M., 2002a. Tissue-specific extravasation of albumin-bound Evans blue in hypothermic and rewarmed rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 80, 233–243.

Mathew, C.B., Bastille, A.M., Gonzalez, R.R., Sils, I.V., 2002b. Heart rate variability and electrocardiogram waveform as predictors of morbidity during hypothermia and rewarming in rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 80, 925–933.

Nakamura, T., Miyamoto, O., Sumitani, K., Negi, T., Itano, T., Nagao, S., 2003. Do rapid systemic changes of brain temperature have an influence on the brain? Acta Neurochir. 145, 301–307.

Popovic, V.P., Kent, K.M., 1965. Cardiovascular responses in prolonged hypothermia. Am. J. Physiol. 209, 1069–1074.

Rahn, H., 1966. Development of gas exchange. Evolution of the gas transport system in vertebrates. Proc. Roy. Soc. Med. 59, 493–494.

Schmid-Elsaesser, R., Hungerhuber, E., Zausinger, S., Baethmann, A., Reulen, H.J., 1999. Combination drug therapy and mild hypothermia. A promising treatment strategy for reversible cerebral ischemia. Stroke 30, 1891–1899.

Severinghaus, J.W., 1979. Simple, accurate equations for human blood O_2 dissociation computations. J. Appl. Physiol. 46, 599–602.

Swain, J.A., 1988. Hypothermia and blood pH. Arch. Intern. Med. 148, 1643–1646.

Takasu, A., Carrillo, P., Stezoski, W., Safar, P., Tisherman, S.A., 1999. Mild or moderate hypothermia but not increased oxygen breathing prolongs survival during lethal uncontrolled hemorrhagic shock in rats, with monitoring of visceral dysoxia. Crit. Care Med. 27, 1557–1564.

Tveita, T., Skandferd, M., Refsum, H., Ytrehus, K., 1996. Experimental hypothermia and rewarming: changes in mechanical function and metabolism of rat hearts. J. Appl. Physiol. 80, 291–297.

Watanabe, T., Oshikiri, N., Inui, K., Kuraoka, S., Minowa, T., Hosaka, J., Takahashi, T., Shimazaki, Y., 1999. Optimal blood flow for cooled brain at 20°C. Ann. Thorac. Surg. 68, 864–869.

Yager, J.Y., Asselin, J., 1996. Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. Stroke 27, 919–926.

Zar, H.A., Tanigawa, K., Kim, Y.M., Lancaster., Jr, J.R., 1999. Mild therapeutic hypothermia for postischemic vasoconstriction in the perfused rat liver. Anesthesiology 90, 1103–1111.

Zinchuk, V.V., Dorokhina, L.V., 2002. Blood oxygen transport in rats under hypotermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway. Nitric Oxide 6, 29–34.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Nitric Oxide 15 (2006) 64–69
NITRIC OXIDE Biology and Chemistry
www.elsevier.com/locate/yniox

Nitric oxide induced by ketamine/xylazine anesthesia maintains hepatic blood flow during hypothermia

N. Alva, J. Palomeque, T. Carbonell *

Department de Fisiologia, Facultad de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Received 29 July 2005; revised 28 October 2005
Available online 27 December 2005

Abstract

Among the anesthetics influencing the nitric oxide (NO) pathway, ketamine is widely reported in the literature. We researched the variations in blood physiological parameters following ketamine/xylazine- or pentobarbital-induced anesthesia, with particular emphasis on plasmatic NO levels and oxidative stress-related factors. The effects of ketamine on hepatic blood flow during deep hypothermia were also examined. Adult male Sprague–Dawley rats were anesthetized intraperitoneally with ketamine/xylazine or with sodium pentobarbital. Animals underwent serial blood extraction to analyze acid–base balance and lactate levels in blood, as well as NO, MDA, SH groups, and AST levels in plasma samples. We demonstrated that ketamine leads to increased plasmatic NO levels, induces metabolic acidosis, and causes oxidative damage, though without reaching hepatic toxicity. When experimental hypothermia was induced, ketamine affected hepatic blood flow. Based on these results, we suggest that studies on physiological processes involving NO should exercise caution if anesthesia is induced by ketamine.
© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Acid–base balance; Blood flow; Hypothermia; Ketamine; Nitric oxide

Nitric oxide (NO) is a component of the excitatory and inhibitory neurotransmitter pathways involved in anesthesia [1]. In addition, anesthetics have been shown to affect nitric oxide levels [2,3]. Among them, ketamine is widely used in combination with such analgesics as propofol or xylazine [4–6]. The dissociative anesthetic agent ketamine is a non-competitive blocker of the glutamate subtype of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [7,8], preventing the neurotransmission of pain. The lack of cardiovascular [9] and respiratory [10] depression at normal doses of ketamine makes it suitable as a general anesthetic. However, some care should be taken when anesthetizing laboratory animals since considerable variation exists among individuals in both the elapsing and depth of anesthesia [6]. In the rat central nervous system, a cyclic GMP accumulation following ketamine-induced anesthesia has been noted, which demonstrates its effects on the nitric oxide pathway [11]. That nitric oxide will lend ketamine such analgesic properties is expected [12]. Although the effects of ketamine-induced nitric oxide in other tissues are somewhat conflicting [13–15], caution should be exercised when dealing with physiological processes in which nitric oxide may play a modulatory role [16]. Our own study focuses on experimental hypothermia, a commonly used therapeutic approach to reduce damage in post-ischemic tissues [17–19]. Since hypothermia is characterized by peripheral vasoconstriction, we hypothesized that this response would vary according to the anesthetic used. Most of the previously published works in deep hypothermia using animal models were performed under barbiturate anesthesia [20,21]. As pentobarbital has not been implicated in the NO pathway, we chose it as our control. The present study was designed to characterize blood physiological parameters following ketamine-induced anesthesia, with particular emphasis on the levels of plasmatic nitric oxide and the related factors of oxidative stress. Moreover, we also addressed the effects of ketamine and pentobarbital anesthesia in hepatic blood flow during deep hypothermia.

* Corresponding author. Fax: +34 3 411 03 58.
E-mail address: tcarbonell@ub.edu (T. Carbonell).

1089-8603/$ - see front matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.niox.2005.11.002

Experimental procedures

Animals and experimental models

Adult male Sprague–Dawley rats (285–300 g body weight) were used. They were housed in a temperature- and humidity-controlled room, on a 12 h light:dark cycle, and fasted overnight. This experimental protocol was approved by the Institutional Committee of Animal Care and Research at the University of Barcelona, in compliance with European Community guidelines.

Animals were anesthetized intraperitoneally with a daily-prepared mixture of ketamine (68 mg kg^{-1} body weight) and xylazine (4.5 mg kg^{-1} body weight) (ketamine group) or with sodium pentobarbital (60 mg kg^{-1} body weight) (pentobarbital group). The doses in both anesthesia protocols (and the time at which the maintenance doses were applied) were the minimum required to produce surgical anesthesia, and were within the range commonly used for laboratory anesthesia in the rat. The required depth of anesthesia was considered to have been attained when corneal reflex and response to painful stimuli were no longer present, according to Gumbleton et al. [22].

Cannulation of the right common carotid artery was performed by insertion of a polyethylene catheter (PE 50), and was completed within the first 15 min following induction of anesthesia.

All anesthetics were provided by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Acid–base analyses

Blood samples were obtained in 15 min intervals (0.5 ml) over 1 h, using 1 ml syringes in which air was replaced by heparinized saline solution to avoid alterations in actual blood gas concentrations. The first blood sample was obtained just after cannulation, the others collected at 30, 45, and 60 min. Additional doses of ketamine/xylazine (20 and 1.5 mg kg^{-1}, respectively) were given every 30 min for maintenance. The pentobarbital group, however, required no extra anesthesia [22]. Finally, animals were sacrificed by anesthesia overdose. For every blood sample, arterial pH and partial pressures of arterial blood gases (O_2, CO_2) were measured using the microgas analyzer Radiometer ABL five acid–base laboratory. K^+, Na^+, Ca^{2+}, and Cl^- ion concentrations were measured in blood with the electrolyte analyzer Radiometer EML 100 electrolyte metabolite laboratory (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Blood was then used to determine lactate concentration, the rest was centrifuged and the plasma was utilized for biochemical testing.

Biochemical determinations

As an index of plasma NO levels, nitrate and nitrite (NO_x) were monitored using a colorimetric assay kit (Cayman Chemical, USA) previously described [23]. Nitrate was enzymatically reduced to nitrite by incubation with nitrate reductase and NADPH. Nitrite levels were then assayed by Griess reaction and expressed in micro molar. Thiobarbituric acid-reactive substances in plasma (TBARS), which indicate pro-oxidant status, were then determined using the Yagi method, with one slight modification [24]. Butylated hydroxytoluene and EDTA were added to the reaction mixture as antioxidants at a final concentration of 0.01% and 1.3 mol L^{-1}, respectively. TBARS formation was spectrophotometrically measured at 540–620 nm, and the calibration curve was determined using tetraethoxypropane. TBARS values are expressed in terms of malondialdehyde (MDA) concentration in milli molar. Oxidative modification of protein sulfhydryl groups (SH groups) in plasma was quantified in accordance with the method described by Hu [25], using spectrophotometric measurement at 414 nm. Total SH groups are expressed in millimolar. Plasma aspartate aminotransferase (AST) activity was determined using a commercial kit (Merck, Germany), and expressed in units per liter. Blood lactate concentration was measured using a lactate dehydrogenase method with a commercial kit (Boehringer–Mannheim, Germany), and expressed in millimolar.

Hypothermia and hepatic blood flow

A hypothermia protocol, previously described by our group [26], was applied in this study. Anesthetized rats from both groups (ketamine and pentobarbital) were cannulated via the carotid artery for pressure monitoring and blood sampling. Arterial blood pressure and heart rate were continuously recorded on a two-channel polygraph (Model 2006, Letica, Scientific Instruments). A tracheal intubation was also performed. Rats were connected to a volume- and frequency-controlled small-animal respirator (Harvard Apparatus, Kent, UK) using ambient air. They were then placed in a supine position on the cooling table. The cooling apparatus was constructed using one water pumping bath, set to 14 °C. The inlet and outlet of the bath were connected by polyethylene tubes (10 mm inner diameter) and "Y" and "T" connectors. Water flowed through two tubes. One (4 mm inner diameter) was placed under the surgery table, and the other tube (1 mm inner diameter) was bent into a coil of eight turns. These loops were placed inside the abdominal cavity. A flow probe was placed around the portal vein (Transonic Systems NY, USA) and portal blood flow was continuously monitored. Finally, the muscular layer was stitched from skin to prevent heat loss.

Body temperature was calculated as the average of the readings from two thermocouples (2 mm diameter), one inserted next to the carotid artery (core temperature) and the other in the peritoneal cavity near the liver (abdominal temperature). Deep hypothermia was reached 1 h after cooling was triggered. Animals were maintained at 20.65 ± 0.25 °C for 1 h. During this period, ketamine or pentobarbital was not administered, due to the anesthetic effects of hypothermia.

Statistical analysis

Data are reported as mean values with standard error of six individuals. Statistical data analyses were performed using GraphPad InStat statistical software. Data were analyzed by the two-way ANOVA using the Student–Newman–Keuls test to analyze significant differences ($p < 0.05$).

Results

Acid–base balance

Table 1 displays the results for oxygen saturation of hemoglobin, O_2 and CO_2 arterial blood pressures, pH, and other parameters related to acid–base status at 15, 30, 45, and 60 min following anesthesia. Ketamine-induced pH acidification (ranging from 7.220 ± 0.021 to 7.281 ± 0.023) contrasted with decreased CO_2 arterial blood pressure (ranging from 41.11 ± 1.64 to 30.14 ± 2.27 mmHg). Low pH levels, without hypercapnia, reject respiratory acidosis. The low values calculated for strong ion differences (SID) (25.91 ± 3.69–31.09 ± 1.59, when normal values of 40 are reported in the literature) [27] suggested that the acidic status had a metabolic origin. The diminution of standard excess of buffer bases (SBE) confirmed the presence of organic acids in plasma, other than lactate, which did not change (Table 2). As we have previously reported, acid–base balance differed consistently in rats anesthetized with pentobarbital, clearly exhibiting respiratory acidosis (reverted later on, with ventilatory assistance) [26].

Nitric oxide levels in plasma

Results for plasma NO_x levels in rats anesthetized with either ketamine or pentobarbital at 15, 30, 45, and 60 min are plotted in Fig. 1. Significantly increased NO_x levels were recorded in the plasma of animals anesthetized by ketamine, compared to the pentobarbital group, with a maximum four-fold increase occurring 45 min after anesthesia induction.

Oxidative stress and damage

Table 2 records the changes observed in plasmatic oxidant status and other related parameters of oxidative dam-

Table 1
Changes in blood arterial gases and related acid–base parameters in normothermic rats

	P15	P60	K15	K30	K45	K60
Hb O_2 (%)	89.26 ± 1.02	89.20 ± 1.76	87.26 ± 2.20	$95.80 \pm 0.42^{++}$	90.43 ± 1.82	$93.18 \pm 1.58^{+}$
Hb CO (%)	0.25 ± 0.08	0.00 ± 0.20	-0.36 ± 0.12	-0.59 ± 0.36	-0.11 ± 0.09	-0.30 ± 0.12
Met Hb (%)	1.21 ± 0.05	1.12 ± 0.06	0.60 ± 0.12	0.61 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.72 ± 0.10
$P_{(a)O2}$ (mmHg)	82.50 ± 3.93	78.25 ± 8.00	74.67 ± 3.86	$94.71 \pm 4.99^{+}$	82.29 ± 6.53	88.00 ± 4.19
$pH_{(a)}$	7.269 ± 0.009	7.270 ± 0.026	7.220 ± 0.021	$7.286 \pm 0.018^{+}$	7.240 ± 0.020	$7.281 \pm 0.023^{+}$
$P_{(a)CO2}$ (mmHg)	54.25 ± 1.31	50.75 ± 3.88	$41.11 \pm 1.64^{***}$	$30.29 \pm 1.76^{+++}$	37.00 ± 1.98	$30.14 \pm 2.27^{++,***}$
HCO_3^- (mM)	24.00 ± 0.68	22.25 ± 0.48	16.33 ± 0.55	13.86 ± 0.59	15.14 ± 0.77	15.00 ± 0.89
SBC (mM)	21.63 ± 0.60	20.25 ± 0.25	15.00 ± 0.71	16.40 ± 0.68	15.25 ± 0.95	15.80 ± 0.37
tCO_2	57.75 ± 1.60	53.00 ± 1.22	36.25 ± 3.38	34.20 ± 1.36	35.25 ± 1.03	33.00 ± 1.41
SBE (mM)	-2.11 ± 0.63	-3.50 ± 0.29	-11.50 ± 0.96	-11.0 ± 0.84	-11.50 ± 0.87	-11.60 ± 0.51
Hct(%)	46.73 ± 0.96	42.07 ± 4.83	45.57 ± 0.94	44.67 ± 0.85	43.67 ± 0.90	44.08 ± 1.17
K^+	3.61 ± 0.20	3.66 ± 0.22	4.125 ± 0.128	4.729 ± 0.207	4.750 ± 0.267	$4.950 \pm 0.15^{+,***}$
Na^+	138.93 ± 2.34	139.33 ± 0.70	141.33 ± 0.55	140.29 ± 0.61	136.71 ± 2.76	139.57 ± 0.61
Cl^-	103.83 ± 2.34	106.73 ± 0.37	$115.00 \pm 4.06^{*}$	111.29 ± 2.61	110.33 ± 5.00	113.83 ± 4.49
Na^+/Cl^-	1.34 ± 0.03	1.31 ± 0.01	1.241 ± 0.040	1.256 ± 0.031	1.166 ± 0.101	1.231 ± 0.045
SID	36.11 ± 1.08	34.27 ± 0.88	28.29 ± 3.78	31.09 ± 1.59	29.63 ± 3.48	25.91 ± 3.69

In ketamine (K) group an extra dose was applied half way through the treatment. Additional measurement before and after this bolus of anaesthesia was considered (30 and 45 min). In pentobarbital (P) group only initial and final values are shown (15 and 60 min). Significantly different from initial values ($n = 6$) using ANOVA and post hoc testing (Student–Newman–Keuls): $^{+}p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ and $^{+++}p < 0.001$. Significantly different from pentobarbital at the same point $^{*}p < 0.05$ and $^{***}p < 0.001$.

Values are the mean ± SEM. $P_{(a)O2}$, $P_{(a)CO2}$, $pH_{(a)}$ are arterial O_2 and CO_2 pressures and pH measured at 37 °C; Hb O_2, oxy hemoglobin; Hb CO, carboxy hemoglobin; Met Hb, methemoglobin; HCO_3^-, plasma concentration of hydrocarbonate; SBC, standard hydrocarbonate; tCO_2, concentration of total carbon dioxide; SBE, standard excess of buffer bases; Hct, hematocrit; K^+, Na^+, and Cl^- are potassium, sodium and chloride ion concentrations; SID, strong ion difference.

Table 2
Changes in plasmatic oxidant status: pro-oxidant effects measured by malondialdehyde technique (MDA); antioxidant concentration (GSH); and related injury indicators such as plasmatic transaminases (AST) and blood lactate at 15 and 60 min following ketamine/xylazine- or pentobarbital-induced anesthesia in rats ($n = 6$)

Parameter	P15	K15	P60	K60
MDA (nM)	4.432 ± 0.446	4.540 ± 0.212	4.597 ± 0.146	4.222 ± 0.166
GSH (mM)	0.229 ± 0.018	$0.186 \pm 0.012^{*}$	0.221 ± 0.021	$0.138 \pm 0.009^{*}$
AST (UI/L)	41.613 ± 7.286	39.767 ± 8.815	42.905 ± 3.290	32.367 ± 0.933
Lactate (mM)	1.838 ± 0.221	2.070 ± 0.242	2.843 ± 0.360	1.941 ± 0.349

Significantly different from pentobarbital at the same point $^{*}p < 0.05$ using ANOVA and post hoc testing (Student–Newman–Keuls).

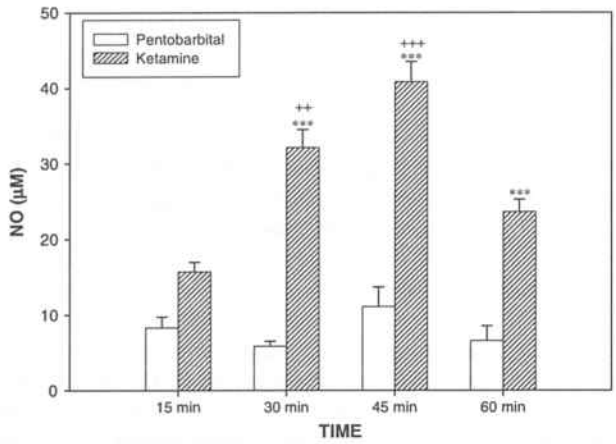


Fig. 1. NO levels in plasma at 15, 30, 45, and 60 min following ketamine- or pentobarbital-induced anesthesia. Values are means ± SEM ($n = 6$). Significantly different from pentobarbital (at each point) by analysis of variance (ANOVA) and post hoc testing (Student–Newman–Keuls): $^{***}p < 0.001$. Significantly different from ketamine at 15 min (ketamine group only): $^{++}p < 0.01$, $^{+++}p < 0.001$.

age. Determinations were made from samples extracted both at the beginning (15 min) and at the end (60 min) of either anesthesia period. Pro-oxidant effects were measured as the MDA concentration in plasma, and antioxidant status was measured in terms of SH group levels. While no changes in MDA were noted, a decrease in the SH groups of ketamine anesthetized rats was observed, indicating some degree of oxidative stress. Related liver injury indicators were also measured, including plasmatic transaminases (AST) and blood lactate concentration. No anesthetic-related toxicity was noted in terms of AST accumulation.

Effects of ketamine anesthesia on hypothermia

Heart rate and mean arterial pressure were measured in rats under hypothermia. Results are shown in Table 3. Deep hypothermia induces a decreased in both values, especially in the pentobarbital group.

Fig. 2 displays the average body temperature and portal vein flow (expressed as a percentage of the basal value) over 2 h of hypothermia in animals anesthetized with pentobarbital (A) and ketamine/xylazine (B). In the pentobarbital group, a strong correlation between decreased body temperature and reduction in portal vein blood flow was observed. We then calculated the degree of lineal dependence in the two courses of hypothermia, the first cooling

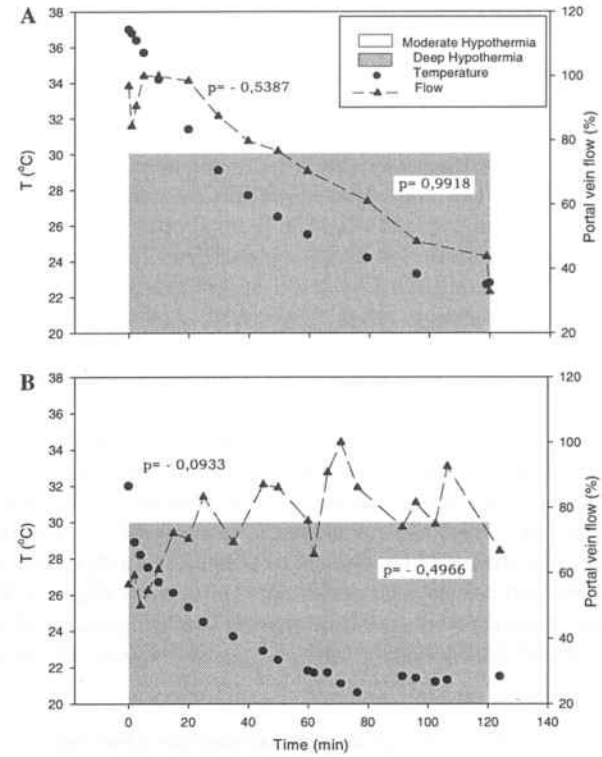


Fig. 2. Body temperature and portal vein flow variations during the cooling period leading to moderate hypothermia (37–30 °C) and deep hypothermia (30–20 °C) in pentobarbital (A) and ketamine (B) rats ($n = 6$). Lineal dependence values (p) of both variables are shown.

period leading to moderate hypothermia (37–30 °C), and the second ranging from moderate to deep hypothermia (30–20 °C). These results revealed a high degree of lineal dependence in the pentobarbital group ($p = 0.992$) when deep hypothermia set in.

Discussion

Our work demonstrates that ketamine/xylazine-induced anesthesia preserves hepatic blood flow during experimental deep hypothermia, implying further conservation of the hepatic metabolism. According to our results, beneficial effects may result from nitric oxide modulatory activity, since NO_x levels increase in animals anesthetized by ketamine. Although we used a mixture of ketamine and xylazine, we assumed that the effect on NO synthesis was due to ketamine. Xylazine is an α_2 adrenergic receptor agonist, sedative, and muscle relaxant used to ensure the comfort of

Table 3
Changes in heart rate (HR) and mean arterial pressures (MAP) at different body temperatures

(°C):	37		32		27		24	
	K	P	K	P	K	P	K	P
HR	447.1 ± 3.7	431.3 ± 6.5	275.6 ± 9.7^{+++}	300.9 ± 23.4^{+++}	213.8 ± 13.1^{+++}	199.2 ± 12.5^{+++}	182.7 ± 1.5^{+++}	131.4 ± 14.5$^{+++,*}$
MAP	129.0 ± 14.1	138.1 ± 1.0	116.5 ± 10.2	116.0 ± 2.1	101.8 ± 5.2^{+}	80.3 ± 3.3^{+++}	98.9 ± 2.4^{+}	68.8 ± 0.8$^{+++,**}$

Values are means of four animals ± SEM. Significantly different between treatments using ANOVA and post hoc testing (Student–Newman–Keuls): $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$. Significantly different compared with basal values (37 °C): $^{+}p < 0.05$, $^{+++}p < 0.001$. HR in beats/min, MAP in mmHg.

the animal. To our knowledge xylazine does not affect NO metabolism or blood flow, whereas ketamine alone participates in the NO pathway in the CNS, in contrast to pentobarbital [11].

Moreover, nitric oxide plays an important role in vasomotor tone regulation [28]. The vasodilator effects of NO may limit vascular resistance. However, due to its radical nature, NO has also been involved in promoting pulmonary hypertension [29]. Other authors reported vasodilation in the rat cremaster muscle, produced by both NO-dependent and NO-independent mechanisms, in animals under ketamine anesthesia [2]. A strong paramagnetic signal (EPR) has also been described in liver extracts from ketamine anesthetized rats [16]. The authors suggested that a secondary amine group of ketamine could be oxidized to a nitroxide radical. Taken together, these results suggested that NO plays a key role in blood flow regulation under ketamine anesthesia. Thus, the use of ketamine during hypothermia would be both advantageous and advisable.

The effects of ketamine and pentobarbital (at recommended doses) on blood pressure and cardiac output did not differ in normothermic conditions [22]. However, our results in hypothermic conditions demonstrated a moderate reduction in heart rate and mean arterial pressure in the ketamine group. In the pentobarbital group, the reduction in both parameters was consistently enhanced throughout the study. When designing an acute experiment many investigators give little attention to the choice of anesthetic. We highlight the necessity for careful consideration of the secondary effects of anesthesia. In our study, ketamine anesthesia increased the levels of plasmatic NO and developed metabolic acidosis in rats. We cannot deduce the origin of this acidosis, although it is clear that lactate is not involved (Table 1). During deep hypothermia well-preserved portal vein flow in ketamine-treated rats was also surprising. The question is whether it is caused by nitric oxide vasodilation or by low pH. In human heart, elevation of arterial pCO_2 and/or lowering of pH increases coronary blood flow [30]. Recently, Heintz et al. [31] demonstrated that nitric oxide production is necessary for acidosis flow response. In our model perhaps both mechanisms operate, but this remains to be established. Our results prove the effects of oxidative stress following ketamine anesthesia, generating oxidative modifications in protein sulfhydryl groups, but without changing plasmatic MDA. Besides the effects of ketamine, the AST values obtained in the present study effectively discard the risks of hepatic injury. In fact, these results confirm that if nitroxide radicals are formed during ketamine anesthesia, they are unlikely to reach levels of toxicological significance.

Ketamine is often used either during veterinary procedures or for experimental purposes. In this study, we have demonstrated that ketamine leads to increased plasmatic NO levels, with minor changes in acid–base balances that generate metabolic acidosis and moderate oxidative stress, but without risking hepatic toxicity. During hypothermia, ketamine-induced NO may affect hepatic blood. We strongly advise that such factors be taken into consideration when using ketamine-induced anesthesia in experimental procedures, as the NO pathway may otherwise be affected.

Acknowledgments

We thank Robin Rycroft for language assistance. This study was supported by Grants BFI 2003-03439 and BFI 2003-02539. Norma Alva is the recipient of a fellowship from the University of Barcelona.

References

[1] R.A. John, Nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate and anesthetic state, Anesthesiology 85 (1996) 457–459.
[2] A.L. Loeb, I. Gödény, D.E. Longnecker, Anesthetics alter relative contributions of NO and EDHF in rat cremaster muscle microcirculation, Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol. 42 (1997) H618–H627.
[3] H.F. Galley, Editorial II: anaesthesia and the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the central nervous system, Br. J. Anaesth. 84 (2000) 141–143.
[4] M. Kakimoto, M. Kawaguchi, T. Sakamoto, S. Inoue, M. Takahashi, H. Furuya, Effect of nitrous oxide on myogenic motor evoked potentials during hypothermia in rabbits anaesthetized with ketamine/fentanyl/propofol, Br. J. Anaesth. 88 (2002) 836–840.
[5] Y. Shiga, K. Minami, Y. Uezono, K. Segawa, E. Nagaoka, M. Shiraishi, T. Noguchi, A. Shigematsu, Effects of the intravenously administered anaesthetics ketamine, propofol, and thiamylal on the cortical renal blood flow in rats, Pharmacology 68 (2003) 17–23.
[6] P. Marini, D. Avison, B.F. Corning, N.S. Lipman, Ketamine/xylazine/butorphanol: a new anesthetic combination for rabbits, Lab. Anim. Sci. 42 (1991) 57–62.
[7] A.M. Thomson, D.C. West, D. Lodge, An *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? Nature 313 (1985) 479–481.
[8] P.F. White, W.L. Way, A.J. Trevor, Ketamine—its pharmacology and therapeutic uses, Anesthesiology 56 (1982) 119–136.
[9] H. Takeshita, Y. Okuda, A. Sari, The effect of ketamine on cerebral circulation and metabolism in man, Anesthesiology 36 (1972) 69–75.
[10] C.A. Hirshman, H. Downes, A. Farbood, N.A. Bergman, Ketamine block of bronchoespasm in experimental canine asthma, Br. J. Anaesth. 51 (1979) 713–718.
[11] H.F. Galley, A.E. Le Cras, S.D. Logan, N.R. Webster, Differential nitric oxide synthase activity, cofactor availability and cGMP accumulation in the central nervous system during anaesthesia, Br. J. Anaesth. 86 (2001) 388–394.
[12] F.S. Bulutcu, A. Dogrul, M.O. Guç, The involvement of nitric oxide in the analgesic effects of ketamine, Life Sci. 71 (2002) 841–853.
[13] J. Wu, T. Kikuchi, Y. Wang, K. Sato, F. Okumura, NO_x^- concentrations in the rat hippocampus and striatum have no direct relationship to anaesthesia induced by ketamine, Br. J. Anaesth. 84 (2000) 183–189.
[14] K.S. Helmer, Y. Cui, A. Dewan, D.W. Mercer, Ketamine/xylazine attenuates LPS-induced NOS expression in various rat tissues, J. Surg. Res. 112 (2003) 70–78.
[15] K.S. Helmer, Y. Cui, L. Chang, A. Dewan, D.W. Mercer, Effects of ketamine/xylazine on expression of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, and cyclo-oxygenase-2 in rat gastric mucosa during endotoxemia, Shock 20 (2003) 63–69.
[16] L.A. Reinke, Y. Kotake, D.R. Moore, A.A. Nanji, Free radical formation during ketamine anesthesia in rats: a cautionary note, Free Radic. Biol. Med. 24 (1998) 1002–1006.
[17] C. Zhu, X. Wang, X. Cheng, L. Qiu, F. Xu, G. Simbruner, K. Blomgren, Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and

diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia, Brain Res. 996 (2004) 67–75.
[18] L.M. Katz, A.S. Young, J.E. Frank, Y. Wang, K. Park, Regulated hypothermia reduces brain oxidative stress after hypoxic-ischemia, Brain Res. 1017 (2004) 85–91.
[19] K. Scholler, S. Zausinger, A. Baethmann, R. Schmid-Elsaesser, Neuroprotection in ischemic stroke–combination drug therapy and mild hypothermia in a rat model of permanent focal cerebral ischemia, Brain Res. 1023 (2004) 272–278.
[20] C.B. Mathew, I.V. Sils, A.M. Bastille, Tissue-specific extravasation of albumin-bound Evans blue in hypothermic and rewarmed rats, Can. J. Physiol. Pharm. 80 (2002) 233–234.
[21] T. Tveita, M. Skandfer, H. Refsum, K. Ytrehus, Experimental hypothermia and rewarming: changes in mechanical function and metabolism of rat hearts, J. Appl. Physiol. 80 (1996) 291–297.
[22] M. Gumbleton, P.J. Nicholls, G. Taylor, Differential influence of laboratory anaesthetic regimens upon renal and hepatosplanchnic haemodynamics in the rat, J. Pharm. Pharmacol. (1990) 693–697.
[23] D. Ricart-Jane, M. Llobera, M.D. Lopez-Tejero, Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method, Nitric Oxide 6 (2002) 178–185.
[24] K. Yagi, Assay for blood plasma or serum, in: Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 1984, pp. 328–331.
[25] M. Hu, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, Methods Enzymol. (1994) 380–385.
[26] N. Alva, T. Carbonell, J. Palomeque, A model of deep experimental hypothermia and rewarming in rat, J. Thermal Biol. 29 (2004) 259–264.
[27] M. Boyle, J. Lawrence, An easy method of mentally estimating the metabolic component of acid/base balance using the Fencl–Stewart approach, Anaesth. Intensive Care 31 (2003) 538–547.
[28] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, Pharmacol. Rev. 43 (1997) 109–142.
[29] V. Hampl, J. Bibova, A. Banasova, J. Uhlik, D. Mikova, O. Hnilickova, V. Lachmanova, J. Herget, Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension, Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. (2005), in press, doi:10.1152/ajplung.00023.2005.
[30] J. Tarbow, J.B. Bruckner, H.J. Eberlein, J.W. Gethmann, W. Hess, D. Patschke, Blood pH and $PaCO_2$ as chemical factors in myocardial blood flow control, Basic Res. Cardiol. 70 (1975) 685–696.
[31] A. Heintz, T. Koch, A. Deussen, Intact nitric oxide production is obligatory for the sustained flow response during hypercapnic acidosis in guinea pig heart, Cardiovascular Res. 66 (2005) 55–63.