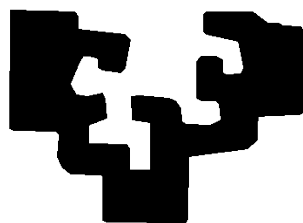


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

Caracterización y tratamiento experimental del síndrome de isquemia-reperfusión en extremidades inferiores en la rata

Iñigo Cearra Guezuraga

Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología

Hospital Universitario de Basurto

Mayo 2016

Agradecimientos

Antes de presentar este trabajo, es de justicia dedicarles mi mayor agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado a llegar hasta aquí.

A mi director de Tesis, y además de eso profesor y amigo, Dr Ignacio García-Alonso, por inculcarme el método científico y el orden en investigación.

Al también doctorando Borja Herrero, que me ha enseñado todo lo que puede ofrecer el excelente Laboratorio de Cirugía Experimental que tenemos en Leioa.

A los doctores Tarik Chaoui-El-Kaid y Patxi Aguayo, por su inestimable ayuda con los análisis bioquímicos.

A la Comisión de Investigación de la OSI Bilbao Basurto, que ha creído en este proyecto y ha sufragado una importante parte de los gastos derivados de la ejecución del mismo, con la concesión de una ayuda a la investigación en convocatoria de 2014.

A la “kuadrilla”, con la que aprendí que estudiar medicina podía ser más divertido que ninguna otra cosa.

A mis compañeros del Servicio, por enseñarme todo lo que sé de Trauma, y por hacer que ir a trabajar cada día sea un motivo de alegría.

A mis padres y hermanos, por enseñarme el valor del estudio y el esfuerzo, y a mi tío el Dr José Antonio Cearra Asúa por su cariño, ánimo y consejos.

Y a Diana, que ha estado a mi lado cada día de los cinco años que he tardado en completar esta tesis, y que da sentido a todo lo que hago.

Bilbao, Mayo de 2016

Índice

INTRODUCCIÓN	7
LA CIRUGÍA DE EXTREMIDADES BAJO ISQUEMIA	9
<i>Historia.....</i>	<i>9</i>
Primeros pasos	9
Siglos XVI a XVIII	9
Siglo XIX.....	11
Siglo XX.....	12
El torniquete en la guerra y en catástrofes	13
<i>Situación actual.....</i>	<i>15</i>
Indicaciones.....	15
Contraindicaciones	17
<i>Fundamento.....</i>	<i>18</i>
<i>Variables a considerar.....</i>	<i>19</i>
Presión ejercida por el dispositivo.	19
Diámetro de la extremidad	20
Composición de los tejidos subyacentes	21
Diseño del dispositivo	21
<i>Recomendaciones de uso.....</i>	<i>24</i>
Valoración previa: pros y contras.....	24
Exanguinación	25
Dispositivo: diseño y colocación.....	27
Cálculo de la Presión de Oclusión Arterial (POA)	28
Tiempo que permanece aplicado	32
Cuándo retirarlo	36
Protección de la piel	36
Profilaxis antibiótica	37
Consideraciones en situaciones especiales	37
<i>Descripción del daño producido por la isquemia de extremidades.....</i>	<i>38</i>
Etiología del daño.....	38
Fisiopatología del daño	45
Traducción clínica de las alteraciones descritas	64
TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES DEL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MIEMBROS INFERIORES.....	72
<i>Antioxidantes</i>	<i>72</i>

Enzimas endógenas. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa, sistema glutatión reductasa/ glutatión peroxidasa	72
Alopurinol.....	74
Melatonina	75
N-Acetil-Cisteína (NAC)	75
Manitol.....	76
Ac ascórbico (vitamina C)	76
Alfa-tocoferol (vitamina E)	77
Resumen de antioxidantes.....	77
<i>Condicionamiento isquémico</i>	78
Precondicionamiento isquémico (PCI)	78
Postcondicionamiento isquémico o Reperfusión Intermitente (RI)	82
<i>Otros tratamientos descritos</i>	83
Anestésicos.....	83
Nitritos y NO.....	84
Estatinas	85
Otros tratamientos.....	85
TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DEL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CON ÁCIDO FÓLICO	87
MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MIEMBROS INFERIORES	90
<i>Aproximación general</i>	90
<i>Modelo animal</i>	92
<i>Sistema empleado para la inducción y mantenimiento de la isquemia</i>	93
<i>Evaluación del daño, parámetros y escala temporal</i>	97
Alteración de la microvascularización	97
Indicadores de estrés oxidativo.....	99
Marcadores bioquímicos de daño local.....	101
Marcadores bioquímicos de daño no específico de tejido muscular, remoto o con implicación sistémica	104
Parámetros anatomopatológicos.....	107
Resultados funcionales.....	112
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	115
RESUMEN DE LA SITUACIÓN ACTUAL	117
HIPÓTESIS	121
OBJETIVOS	122
MATERIAL Y MÉTODOS	125
MATERIAL.....	127

<i>Animales</i>	127
<i>Sistema para implementar la isquemia</i>	130
<i>Sistemas para mantener la isquemia</i>	130
Banda elástica tipo tortor.....	131
Anillo elástico	131
Manguito neumático	132
Dispositivo de aire a presión	132
Clampaje de la arteria femoral	133
Dispositivo de cable a tensión	133
<i>Ácido Folínico</i>	136
MÉTODOS.....	141
<i>Protocolo preoperatorio</i>	142
<i>Protocolo de inducción de la anestesia</i>	142
<i>Inducción de la isquemia</i>	143
<i>Mantenimiento durante el periodo isquémico</i>	145
<i>Tratamiento experimental</i>	146
<i>Periodo de reperusión</i>	146
<i>Medida del perímetro de las extremidades</i>	147
<i>Toma de las muestras sanguíneas</i>	148
<i>Procesamiento de las muestras sanguíneas</i>	149
<i>Obtención de muestras anatomopatológicas</i>	150
<i>Procesamiento de las muestras anatomopatológicas</i>	152
<i>Sacrificio</i>	154
<i>Exámenes bioquímicos</i>	155
<i>Anatomía Patológica</i>	155
Parámetros macroscópicos	155
Parámetros microscópicos	156
<i>Grupos experimentales</i>	159
Serie O. Determinación de la tensión óptima	159
Serie C. Determinación de parámetros analíticos normales, en población control	160
Serie A. Caracterización bioquímica del daño tras 2 horas de isquemia, evolución cronológica	160
Serie B. Caracterización bioquímica del daño tras 3 horas de isquemia, evolución cronológica	161
Serie F. Estudio del efecto bioquímico del ácido folínico tras 3 horas de isquemia y 3 horas de reperusión .	162
Serie AP.C. Estudio del daño anatomopatológico tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión, en grupo control o no tratado	163

Serie AP.F. Estudio del efecto anatomopatológico del ácido folínico tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión.....	164
<i>Estadística</i>	164
RESULTADOS	167
AJUSTE DEL MODELO EXPERIMENTAL	169
<i>Inducción de isquemia en el miembro inferior de la rata</i>	169
<i>Equipo de mantenimiento de la isquemia</i>	172
<i>Descripción de la presión mínima de oclusión</i>	176
VALORACIÓN DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN	178
<i>Evolución cronológica del daño</i>	179
Isquemia de 2 horas	179
Isquemia de 3 horas	191
<i>Cambios atribuibles a la prolongación de la isquemia</i>	202
Electrolitos: Na, K, Cl	202
Indicadores de función renal: Urea, Creatinina.....	204
Enzimas inespecíficas: FA, GOT, GPT.....	205
Enzimas musculares: CK, LDH.....	208
PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO FOLÍNICO.....	210
<i>Modificaciones en bioquímica sanguínea</i>	210
Electrolitos: Na, K, Cl	210
Indicadores de función renal: Urea, Cr.....	212
Enzimas inespecíficas: FA, GOT, GPT.....	214
Enzimas musculares: CK, LDH.....	216
<i>Estudios anatomopatológicos</i>	217
Perímetro de la extremidad	217
Peso de los gastrocnemios	219
Estudio microscópico	221
DISCUSIÓN	225
COMENTARIOS SOBRE LA IDONEIDAD DEL MODELO EXPERIMENTAL	227
<i>Idoneidad de emplear un modelo animal</i>	227
<i>Idoneidad de la rata como modelo experimental</i>	228
<i>Idoneidad de emplear la extremidad inferior</i>	229
<i>Idoneidad del dispositivo de inducción y mantenimiento de la isquemia</i>	230
<i>Idoneidad de los parámetros de valoración del daño</i>	236

Evaluación de la microvascularización	236
Indicadores inmediatos de daño celular	237
Enzimas musculares	238
Mioglobina	239
Otros parámetros analíticos.....	240
Parámetros anatomopatológicos.....	241
Pruebas funcionales	244
<i>Idoneidad del esquema temporal</i>	<i>245</i>
Tiempo de isquemia	245
Tiempo de reperfusión	245
VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	247
<i>Validez del dispositivo de cable a tensión</i>	<i>247</i>
<i>Evolución de parámetros bioquímicos durante la reperfusión.....</i>	<i>248</i>
<i>Variaciones bioquímicas con el incremento del tiempo de isquemia de 2 a 3 horas</i>	<i>250</i>
<i>Examen del daño a nivel bioquímico, con y sin tratamiento.....</i>	<i>252</i>
<i>Examen del daño a nivel anatomopatológico, con y sin tratamiento.....</i>	<i>258</i>
<i>Comparación con otros tratamientos experimentales.....</i>	<i>260</i>
<i>Conclusión general del análisis de la bibliografía</i>	<i>266</i>
EXTRAPOLACIÓN DE RESULTADOS.....	270
<i>Traslación de la experiencia experimental a la clínica</i>	<i>270</i>
<i>Posibilidades de traslación del tratamiento experimental a la práctica clínica</i>	<i>271</i>
<i>Líneas futuras de investigación.....</i>	<i>272</i>
CONCLUSIONES GENERALES	273
BIBLIOGRAFÍA	275

Introducción

La cirugía de extremidades bajo isquemia

Historia

La realización de la isquemia programada, habitualmente mediante la aplicación de un manguito de presión, es hoy en día un procedimiento rutinario en la cirugía de miembros, especialmente en Cirugía Ortopédica y Traumatología, al ofrecer un campo quirúrgico libre de sangre, que facilita la disección anatómica y visualización de estructuras. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de isquemia estuvo inicialmente orientado a la disminución de hemorragias desde las cirugías más primitivas de amputación de extremidades. Repasaremos brevemente los diversos procedimientos desarrollados a lo largo de la historia.

Primeros pasos

Aunque hay evidencia de la práctica de amputaciones desde la era neolítica, los primeros ingenios para controlar la hemorragia durante las mismas datan de la época greco-romana. Archigenes y Heliodoro, contemporáneos de Celso (s. II DC), utilizaban bandas de tela apretadas proximal y distalmente a la zona de incisión, atadas con un sólo nudo simple. Probablemente, esto controlaba únicamente el sangrado venoso, pero conceptualmente suponía un avance respecto a su antecesor Hipócrates (s. V-IV aC), quien creía que realizar la amputación “siempre por la parte muerta, con cuidado de no dañar tejido sano” era la mejor manera de sufrir un menor sangrado¹.

Siglos XVI a XVIII

Tras un largo periodo sin avances significativos, no es hasta el s. XVI cuando Ambrosio Paré (1510-1592) sugirió la colocación de “una goma fuerte y gruesa parecida a la que usan las mujeres para recogerse el pelo”, por encima del lugar de la incisión, indicando además que la misma debía realizarse siempre sobre tejido sano (de ahí, “cortar por lo sano”). Describió cómo este tipo de banda ayudaba a “controlar la hemorragia, disminuir el dolor y retener la máxima cantidad de piel y músculo para el muñón”², ya que las

amputaciones en aquella época se realizaban aún sin anestesia, y la retracción muscular a causa del dolor era muy considerable.

La descripción del sistema sanguíneo por Harvey (1578-1657) en 1616, basándose en los trabajos de Miguel Servet (1511-1553), ayudó a desarrollar mejores sistemas de control del sangrado. De esta forma, el siguiente paso consistió en la adición de una barra enrollada a la goma que permitía aumentar la constricción realizada (figura 1). Este invento, que se conoció como el “cabestrante español” (Spanish windlass), se atribuye alternativamente a William Fabry de Hilden (1560-1624) y a Etienne Morel (1648–1710)³. Este último, médico militar francés, habría diseñado este dispositivo durante las numerosas amputaciones que tuvo que realizar durante el asedio de Besaçon (1674), en el cual la ciudad, pasados 201 años bajo dominio español con los Habsburgo, fue conquistada para el reino de Francia por Luis XIV tras 26 días de asedio.



Figura 1. Fotografía de una reproducción de un “cabestrante español” como los que utilizó Etienne Morel. El dispositivo permitía un cierto control de la presión ejercida, que aumentaba a medida que se giraba la barra.

También es en el siglo XVII cuando se empezó a utilizar el término de torniquete, que se mantiene hasta nuestros días, para denominar a estos ingenios para limitar la hemorragia. Jean Louis Petit (1674-1750) desarrolló un nuevo modelo que añadía a la banda alrededor del miembro un tornillo que permitía aumentar la presión y, lo que es más importante, mantenerla sin necesidad de un ayudante (figura 2). Debido al funcionamiento del aparato, con los giros del tornillo, se dio en llamar torniquete, del francés “tourner” (girar)⁴.

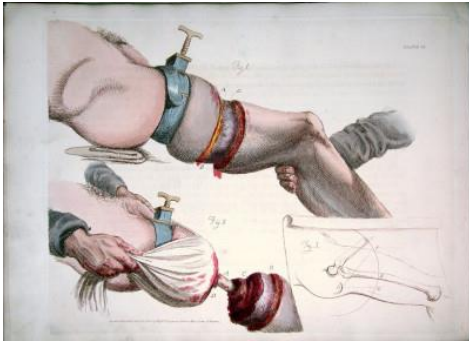


Figura 2. Dibujo del libro "Illustrations of the Great Operations of Surgery" de Charles Bell (Londres, 1821), que muestra la ejecución de una amputación. Durante la misma se emplea un torniquete como lo describió Jean Louis Petit. El tornillo mantenía la presión suficiente sin necesidad de un ayudante.

Siglo XIX

Durante el siglo XIX se introdujeron múltiples variaciones del anterior torniquete, con una aceptación cada vez mayor entre los cirujanos. En este sentido, se considera que fue Joseph Lister (1827-1912), en 1864, el primero en emplear la isquemia provocada para intervenciones distintas de la simple amputación, ya que describió las bondades de un campo libre de sangre para la exéresis precisa de un tuberculoma en la mano⁵.

No obstante, la consecución de un campo verdaderamente exangüe no podía conseguirse mediante la simple aplicación de un torniquete proximal, debido a la remanencia de toda la sangre en el circuito venoso. De manera que durante el siglo XIX se fueron proponiendo métodos para vaciar el miembro de la sangre venosa, desde la simple elevación propuesta por Lister hasta la aplicación de otro instrumento presente en nuestros días: Johann Fierdrich August von Esmarch (1823-1908) desarrolló la banda elástica que lleva su nombre y que arrollado a la extremidad a intervenir, permitía someterla a una tensión suficiente para evacuar completamente toda la sangre previamente a la colocación de un torniquete. Esta innovación posibilitaba no sólo disponer de un campo realmente libre de sangre, sino que además evitaba una pérdida sanguínea innecesaria y considerable⁶. La venda o banda de Esmarch tuvo una enorme aceptación, y fue utilizada como torniquete en sí misma; incluso para isquemias a niveles inconcebibles hoy en día, como la isquemia "de Ribera-Momburg" a nivel abdominal para cirugías ginecológicas y desarticulaciones coxo-femorales⁷ (figura 3) o la isquemia de Trendelemburg para cirugía de cadera y hombro, consistente en arrollar la venda por encima de una aguja transfixiante a través de piel y fascias de la parte más proximal del miembro, evitando así el desplazamiento distal

de la venda⁸ (figura 4). Hoy en día la banda de Esmarch sigue utilizándose para exangüinar el miembro previamente a la cirugía.

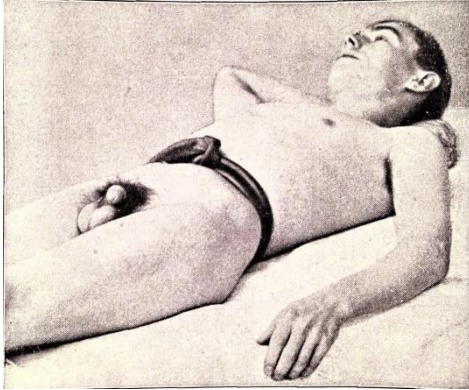


Figura 3. Fotografía que ilustra la utilización de la venda de Esmarch alrededor de la cintura para provocar la llamada isquemia "de Ribera-Momburg", que dejaba sin riego la pelvis y las extremidades inferiores, y fue empleada especialmente para cirugías ginecológicas y desarticulaciones coxo-femorales.

Figura 4. Fotografía demostrando la aplicación de la venda de Esmarch según el método de Trendelenburg. La venda podía colocarse en la parte más proximal del miembro, pues la aguja que se pasaba de forma transfixiante a través del plano miofascial impedía su migración distal. Este método fue empleado para realizar bajo isquemia intervenciones en cadera y hombro, casi siempre de desarticulación.



Siglo XX

Sin embargo, todos los sistemas de torniquete descritos presentaban múltiples complicaciones, destacando la aparición de daños neurológicos y necrosis muscular por una presión excesiva, y la dificultad para ponerlo o quitarlo rápidamente si fuese necesario. Con intención de disminuir estas complicaciones, Harvey Cushing (1869-1939) ideó en 1904 el primer manguito neumático. Modificó los esfigmomanómetros de Riva-Rocci para medir la tensión arterial recientemente descritos, conectándoles una bomba de bicicleta para facilitar un inflado rápido, y adaptando un manómetro para monitorizar la presión ejercida (figura 5). Cushing, padre de la neurocirugía, llegaba a emplear sus esfigmomanómetros alrededor del cráneo para disminuir el sangrado de la incisión cutánea en las craneotomías⁹.

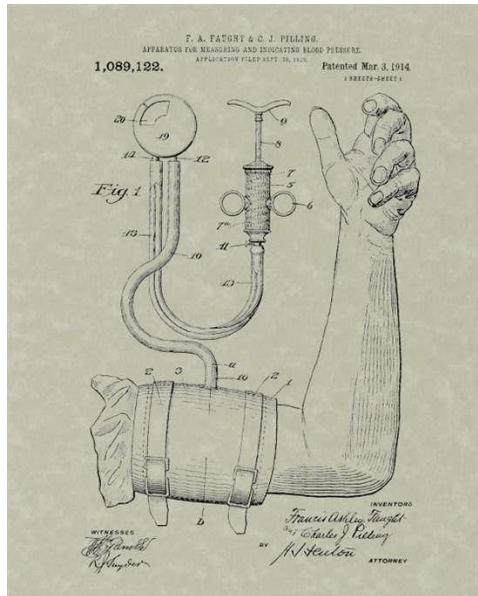


Figura 5. Dibujo de la patente de un manguito neumático desarrollado en 1914, a partir del diseño de Cushing. Una bomba de aire permitía incrementar progresivamente la presión que ejerce el manguito, y esta presión estaba por otra parte monitorizada a través de un manómetro conectado al circuito.

Durante el restante siglo XX, las indicaciones del manguito de isquemia se fueron restringiendo en el medio hospitalario a la cirugía de extremidades, excluyendo las cirugías muy proximales, de hombro y de cadera. Las complicaciones, más frecuentes en los inicios, solían derivar del mantenimiento de una presión excesivamente alta y/o durante demasiado tiempo, incluyendo desde el autolimitado Síndrome postorniquete (debilidad, parestesias, palidez y rigidez), hasta el grave Síndrome compartimental y el compromiso sistémico por rabdomiolisis¹⁰. Progresivamente, la generalización de recomendaciones como no realizar isquemias de más de 2-3 horas ni a presiones superiores a 100mmHg por encima de la sistólica del paciente han ido disminuyendo drásticamente la frecuencia y gravedad de las complicaciones¹¹. A ello también han colaborado sucesivas mejoras en el diseño¹².

El torniquete en la guerra y en catástrofes

Mención aparte merece el papel del torniquete en la medicina militar, donde ha tenido una rica tradición histórica. Dejando aparte su uso histórico en las amputaciones, de las que ya hemos hablado, desde el siglo XIX empezó a ser empleado también por su papel para cohibir las hemorragias de los heridos en el campo de batalla.

Tenemos constancia de la inclusión sistemática del torniquete en los equipos quirúrgicos de campo al menos desde la guerra civil americana¹³. Parece que durante esta guerra el torniquete pudo jugar un papel determinante. El 6 de abril de 1862, durante la batalla de Shiloh, el brillante general confederado Albert Sindey Johnston fue herido en una pierna por una bala, que probablemente le seccionó la arteria poplítea. No dándole importancia, rechazó la colocación de un torniquete por su médico personal, al que envió a atender a otros heridos. Johnston murió desangrado al cabo de pocos minutos, y su pérdida significó en palabras del presidente confederado Jefferson Davis “el punto de inflexión” hacia la derrota del bando confederado¹⁴.

La generalización de los torniquetes durante las guerras dio lugar, sin embargo, a que con frecuencia se aplicasen de forma incontrolada durante largos periodos de tiempo, originando complicaciones sistémicas graves. Esto generó una disputa permanente entre los defensores de su papel salvando vidas controlando la hemorragia, y los críticos con las complicaciones, incluso mortales, que pueden derivarse de su mala utilización. Aún hay quien los considera “instrumentos diabólicos que a veces salvan la vida”¹⁵. Por ello, su uso fue durante largo tiempo parcialmente abandonado, o al menos no empleado de forma sistemática¹⁶.

Desde la guerra de Vietnam, donde se estimó que el torniquete podía haber salvado a 105 (38%) de un total de 227 soldados que fallecieron debido a hemorragias en las extremidades¹⁷, el torniquete ha vuelto a ocupar un lugar preeminente en el equipo sanitario militar. Y parece que la guerra de Irak ha reforzado esta tendencia. De hecho, el recordatorio que se utiliza en el contexto del soporte vital traumatológico prehospitalario (SVTPH) de la armada de Estados Unidos es actualmente «MARCH» (hemorragia masiva [massive bleeding], vía respiratoria [airway], respiraciones [respirations], circulación [circulation] y traumatismo craneoencefálico [head injury]), más que el de «ABC» (vía respiratoria [airway], respiración [breathing] y circulación [circulation]), en reconocimiento del hecho de que la amenaza principal para la supervivencia en el campo de batalla es la hemorragia masiva y que este problema se debe atender de manera rápida¹⁸.

Es probable que su uso prehospitalario se generalice en conflictos bélicos y de catástrofes, como ha ocurrido en el medio hospitalario¹⁹.

Situación actual

Con algunas mejoras en el diseño, y modelos que mantienen la presión ejercida con control electrónico, destacando en este sentido las aportaciones de McEwen²⁰, el manguito neumático ideado por Cushing constituye, más de un siglo después, el sistema *gold standand* para instaurar una isquemia programada en miembro superior e inferior. La gran ventaja que esta isquemia aporta, es un campo exangüe que facilita la disección anatómica e identificación de estructuras.

Las sucesivas mejoras han permitido optimizar el control sobre la presión ejercida y disminuir las complicaciones derivadas del uso de manguitos de isquemia, y en general puede decirse que los efectos adversos que son importantes son muy escasos, y que los efectos adversos que son frecuentes no son graves.

Repasaremos las indicaciones y contraindicaciones actuales de uso del manguito de isquemia, su fundamento de uso, su fisiopatología, y la evidencia experimental y clínica del daño producido con su uso.

Indicaciones

El uso de la isquemia está tan extendido en la cirugía programada de extremidades de Traumatología y Cirugía Ortopédica, que resulta fácil caer en la generalización de que está siempre indicada. Sin embargo, debería ser considerada en todo momento como un instrumento que nos aporta la ventaja de disponer de un campo quirúrgico exangüe, pero que tiene también unos efectos nocivos, por lo que su uso debería estar supeditado a un correcto balance de riesgos-beneficios²¹.

La primera consideración es que la isquemia precisa la colocación de un manguito de presión, y el espacio físico que éste ocupa limita proximalmente el campo quirúrgico. De

esta forma está universalmente aceptado que la cirugía sobre hombro y cadera se haga sin isquemia, por no disponer de espacio para poder ubicar un manguito de presión proximal. Procedimientos como la isquemia de Ribera-Momburg o el sistema de Trendelemburg, ideados en el siglo XIX para cirugías muy proximales están completamente abandonados, por la comorbilidad y los inaceptables riesgos vasculonerviosos que conllevaban. A pesar de que clásicamente se ha recomendado colocar siempre el manguito lo más proximal posible en el miembro, aun cuando la cirugía vaya a ser muy distal (muñeca-mano y tobillo-pie), recientemente está ganando popularidad la indicación de colocar el manguito de isquemia tan distal como lo permita la cirugía, en antebrazo²², muñeca²³, pierna²⁴ o tobillo²⁵. La ventaja teórica consistiría en no someter a isquemia a más cantidad de tejido que el mínimo necesario. En cualquier caso aún no hay evidencia concluyente para recomendar este posicionamiento del manguito, frente a la histórica y actualmente muy mayoritaria colocación proximal²⁶, y se hacen necesarios nuevos estudios de calidad comparando ambas posibilidades²⁷.

Por otra parte, hay que cuantificar los beneficios de operar bajo isquemia. La ventaja indiscutible, que hemos mencionado ya, es la obtención de un campo libre de sangre. Esto puede ser considerado en algunas cirugías sólo como un “lujo” o una comodidad para el cirujano²⁸, pero en otros casos puede decirse que es imprescindible, sobre todo en lo relativo a las cirugías de la mano, donde la complejidad anatómica, rica vascularización e inervación, y graves secuelas que cada pequeño daño a estructuras nobles puede acarrear, hacen que operar sin isquemia pueda constituir un gran riesgo. En este sentido se atribuye a Bunnell, unos de los padres de la cirugía de la mano, la sentencia de que “es tan difícil operar en una mano sin isquemia como componer la maquinaria de un reloj dentro de un frasco de tinta”²⁹.

No obstante, otras ventajas teóricas de la isquemia están en entredicho. Aunque históricamente, y todavía hoy, se ha postulado que la mejor visualización de estructuras anatómicas conlleva un menor tiempo de cirugía³⁰, al menos dos estudios de nivel de evidencia I en extremidad inferior –osteosíntesis de fracturas de tobillo y artroscopias de rodilla -^{31,32} y una revisión sistemática en extremidad superior³³, concluyen que no hay una

diferencia significativa, en cuanto a tiempo quirúrgico, entre operar con o sin isquemia. Lo mismo cabe decir respecto al sangrado, con estudios de calidad que no encuentran diferencias significativas entre la cirugía con o sin isquemia^{34,35}.

Por tanto, la indicación actual para realizar una isquemia debería ser, únicamente, conseguir un campo libre de sangre, con las ventajas en cuanto a disección anatómica e identificación de estructuras ya mencionadas. Y estas ventajas deberían ser siempre contrapesadas con el daño que origina, y que luego analizaremos en detalle.

Contraindicaciones

No hay publicadas, hasta donde ha llegado mi búsqueda bibliográfica, contraindicaciones absolutas para el uso de manguitos de isquemia, o de utilización de la isquemia en general en cirugía de miembros. Sí hay descritas una serie de contraindicaciones relativas, que se enumeran de forma no exhaustiva en la tabla 1.

Tabla 1. Contraindicaciones relativas al uso de manguitos de isquemia

Categoría	Condición patológica
Riesgo de diseminación de un problema local	*Trombosis venosa profunda *Infección concomitante *Cirugía oncológica
Lesión local subyacente	*Quemaduras, abrasiones, heridas quirúrgicas, u otras soluciones de continuidad en la piel bajo el manguito. *Sospecha de síndrome compartimental *Lesión previa muscular, nerviosa o vascular
Enfermedades sistémicas	*Arteriosclerosis severa *Enfermedades del colágeno *Anemia falciforme *Artritis Reumatoide agresiva *Diabetes Mellitus muy evolucionada

Adaptada de Estebe JP. The pneumatic tourniquet. Surgical techniques in orthopaedics and traumatology (EFORT). En: DuParc J, editor. Elsevier; 2002

En general, podemos decir que hay que tener una especial precaución en las siguientes situaciones:

- Existencia de un problema local (trombosis, neoplasia, infección...), que puede extenderse al resto del cuerpo por la aplicación de un manguito de isquemia, y sobre todo si se realiza una exanguinación previa con una venda de Esmarch.
- Presencia de lesión previa en los tejidos bajo el manguito, que pueda exacerbarse con la presión ejercida por el manguito de presión (quemaduras, síndrome compartimental...).
- Concurrencia de enfermedades o condiciones sistémicas que hagan que los tejidos sometidos a compresión presenten especial vulnerabilidad (hemólisis en anemia falciforme, fragilidad vascular en colagenopatías...).

No hay criterios establecidos de forma firme para ninguna de las situaciones señaladas, tratándose siempre de “recomendaciones de expertos”, basadas en la experiencia y también en el sentido común.

Por su frecuencia y carácter en ocasiones silente, la arteriosclerosis puede ser la posibilidad que debemos tener más presente. En ese sentido, se recomienda valorar un estudio vascular complementario, o valorar el no uso del manguito de isquemia, en aquellos pacientes en los que se aprecian calcificaciones vasculares obvias en las radiografías, o ausencia de pulsos distales, sobre todo en el miembro inferior⁴³. Ambas exploraciones deben realizarse de forma sistemática en cualquier paciente para el que se plantee una cirugía bajo isquemia.

Fundamento

El fundamento físico sobre el que se basa el manguito neumático, o cualquier otro torniquete o dispositivo externo destinado a lograr la isquemia de un miembro, es sencillo: aplicar de forma exógena una fuerza tal, que sea capaz de ocluir la luz del vaso o los vasos arteriales del mismo. Esta fuerza, traducida habitualmente a presión, se dispersa desde el

punto en que es aplicada hasta la luz de los vasos que pretende ocluir, ya que se transmite a través de la piel, de la grasa, del músculo y de otros tejidos que rodean a las arterias de las extremidades. Por lo tanto, para que sea efectiva, la presión ejercida ha de ser siempre superior a la tensión arterial sistólica, aunque en grado variable en base a distintas consideraciones, como el diámetro de la extremidad o la anchura del torniquete, que iremos desgranando. Conceptualmente, la presión exógena mínima que es capaz de ocluir la luz arterial, en cada caso concreto, se denomina Presión de Oclusión Arterial (POA, o AOP en sus siglas en inglés).

Variables a considerar

Es difícil realizar una lista completamente exhaustiva de todas las variables que pueden intervenir en la efectividad que un manguito o dispositivo de isquemia tengan para lograr su objetivo. Los más importantes serían los siguientes:

Presión ejercida por el dispositivo.

Desde luego es una de las variables fundamentales. La fuerza que ejerza el dispositivo determina la presión inicial que va a ir perdiéndose antes de alcanzar el vaso. Una de las ventajas principales del manguito neumático con control electrónico, es que conocemos con exactitud la presión que estamos ejerciendo, y que en base a otras consideraciones que iremos analizando, podemos regular de forma que sea la mínima necesaria. Esto evitará daños innecesarios por emplear una presión mayor de la debida.

No puede decirse lo mismo de otros dispositivos de isquemia, como los empleados en primeros auxilios o como la aplicación de la venda de Esmarch a modo de torniquete, en los que desconocemos cuánta presión estamos ejerciendo. Este tipo de dispositivos se suelen emplear cuando no hay otra alternativa, como puede ocurrir en el medio extrahospitalario³⁶.

Diámetro de la extremidad

Aunque es obvio e históricamente reconocido que el incremento del diámetro de una extremidad requiere una mayor presión del torniquete o manguito para ejercer su efecto³⁷, no es hasta la década de los 80 cuando se empieza a estudiar de forma más reglada esta relación, con vistas a optimizar las presiones de inflado del manguito.

En este sentido destaca el trabajo de Shaw y Murray en 1982³⁸, que tras un estudio experimental en extremidades inferiores de cadáveres donde se registraba la presión en un punto central de la extremidad para una presión de manguito dada, desarrollaron el nomograma reproducido en la figura 6.

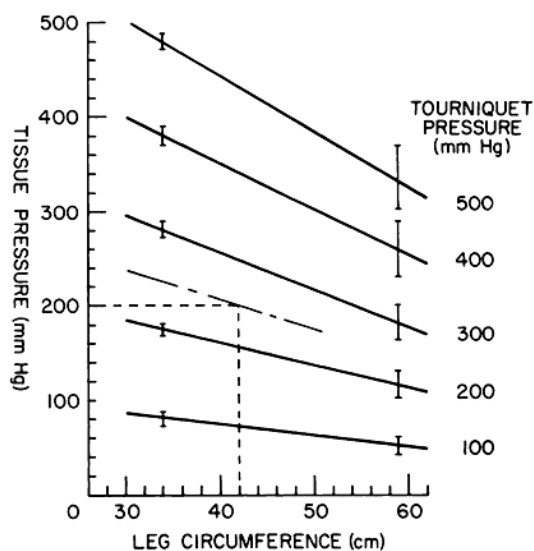


Figura 6. Nomograma que relaciona la presión registrada en la profundidad de la extremidad (*tissue pressure*), ante la aplicación de una presión de torniquete determinada (*tourniquet pressure*) y para diferentes perímetros del muslo (*leg circumference*).

Tomado de Shaw JA y Murray DG. The relationship between tourniquet pressure and underlying soft-tissue pressure in the thigh. J Bone Joint Surg Am 1982;64:1148-1152)

Empleando un manguito de presión estándar de 8,5cm de anchura, estos autores concluían que con el aumento del diámetro de la extremidad, crece de forma consistente la dispersión de la fuerza ejercida de forma que en el punto más profundo de la extremidad hay una presión menor que la ejercida aplicada de forma exógena. Observaron además que esta dispersión no seguía una relación lineal, sino que era discreta para diámetros pequeños y progresivamente aumentaba con diámetros mayores, de forma exponencial.

Composición de los tejidos subyacentes

En este punto comienzan a introducirse variables de muy difícil análisis, como son el distinto comportamiento que los distintos tejidos del cuerpo pueden exhibir ante la comprensión exógena, y su efecto en la dispersión de esta fuerza.

Aunque es obvio que no puede ser lo mismo comprimir tejido graso, fibroso, muscular, u óseo, no disponemos de estudios que evalúen estas diferencias, y normalmente es un aspecto que se ignora en la bibliografía. Hay cambios en la composición de un mismo tejido, por distintas causas, que pueden variar su respuesta a la compresión exógena; en este sentido, la arteriosclerosis que puede producirse en las arterias disminuyendo su elasticidad y deformabilidad es un ejemplo palmario^{38,89}. Pero incluso, una diferencia ostensible como es la presencia de uno o dos huesos en el espesor de la sección del miembro, no son parámetros habitualmente considerados en la literatura; en este sentido, los defensores de una colocación de los manguitos de presión más distal al estándar de raíz del miembro^{22, 23, 24, 25}, no explican ni justifican variaciones en la presión necesaria en base a variación de parámetros muy importantes respecto a la localización estándar: diámetro menor, presencia de dos huesos en pierna y antebrazo respecto a uno en fémur y húmero, menor cantidad de masa muscular y tejido graso subyacente, menor calibre del vaso arterial etc. De hecho, se aplica el mismo principio de aplicar una presión 100mmHg por encima de la sistólica²³, y en un estudio que compara localizaciones proximal y distal se indican las mismas presiones de manguito²⁶. No se habla tampoco de diferencias en cuanto a complicaciones, y el hincapié se realiza en la tolerancia al dolor, ya que la localización distal de los torniquetes suelen defenderse para cirugías rápidas realizadas bajo anestesia local^{23, 24, 25, 26, 44, 45}.

Diseño del dispositivo

Como se ha señalado, y dejando a un lado el tema de los torniquetes empleados de urgencia en el medio extrahospitalario en guerras y catástrofes, hasta el día de hoy han llegado básicamente 2 sistemas para establecer la isquemia: por una parte, sistemas de compresión no controlada representados por el uso de la venda de Esmarch, y por otra parte, sistemas de compresión controlada, cuyo estandarte el manguito neumático.

La venda de Esmarch, como ya se ha señalado, constituye aún hoy el *gold standard* para la exanginación del miembro, pero su anudado proximal para mantener la isquemia durante la cirugía constituye un uso residual, precisamente por no permitir saber qué presión se está realizando y arriesgarse a daños innecesarios por sobrepresión, si bien en series recientes de registros escandinavos hay evidencia de su uso por parte de hasta un 14% de los cirujanos ortopédicos de Noruega¹¹.

Dentro de esta categoría de sistemas de compresión no controlada pueden enmarcarse otros dispositivos que han ganado popularidad en los últimos tiempos, sobre todo en extremidad superior, y que se pueden denominar “tipo anillo con venda tubular (stockinette)”, siendo el llamado S-MART (OHK Medical Devices, Haifa, Israel) el más frecuentemente descrito^{47, 48}. Este sistema, como se puede observar en la figura 7, consiste en un anillo de silicona, alrededor del cual se enrolla en sucesivas capas una tela elástica, que serán desenrolladas con ayuda de unas asas.

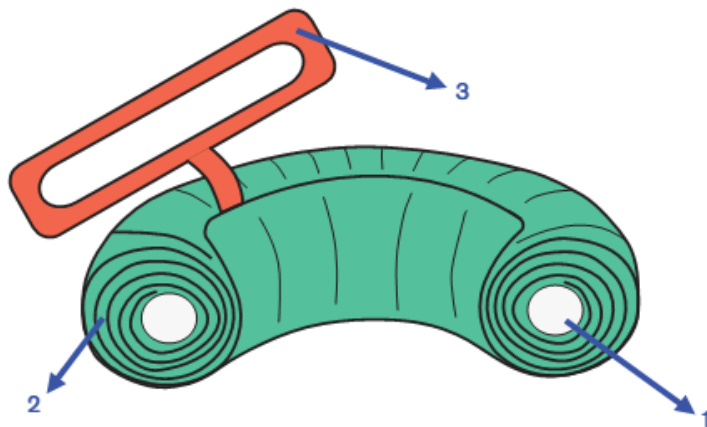


Figura 7. Dibujo explicativo mostrando las partes principales del dispositivo.

1) Anillo de silicona.

2) Tela elástica (Stockinette)

3) Asa de tracción.

Tomado de Eidelman M, Katzman A, Bialik V. A novel elastic exsanguination tourniquet as an alternative to the pneumatic cuff in pediatric orthopedic limb surgery. J Pediatr Orthop B. 2006;15:379-384.

Tras abocar el anillo desde el extremo más distal del miembro, se le hace rodar en sentido proximal tirando de las asas dispuestas a tal efecto, de forma que la tela va desenrollándose y quedando pegada a la piel. El anillo junto con la tela, por su diámetro y estructura elástica, van realizando una compresión sobre el miembro, de forma que desalojan la sangre en su avance. Al llegar al punto deseado a nivel más proximal, se fija el anillo, y

posteriormente, de forma opcional, puede recogerse la tela desplegada enrollándola en este caso hacia proximal, o bien puede dejarse la tela extendida a modo de cobertor estéril tipo *Esteri-Drape* (figura 8)⁴⁶.

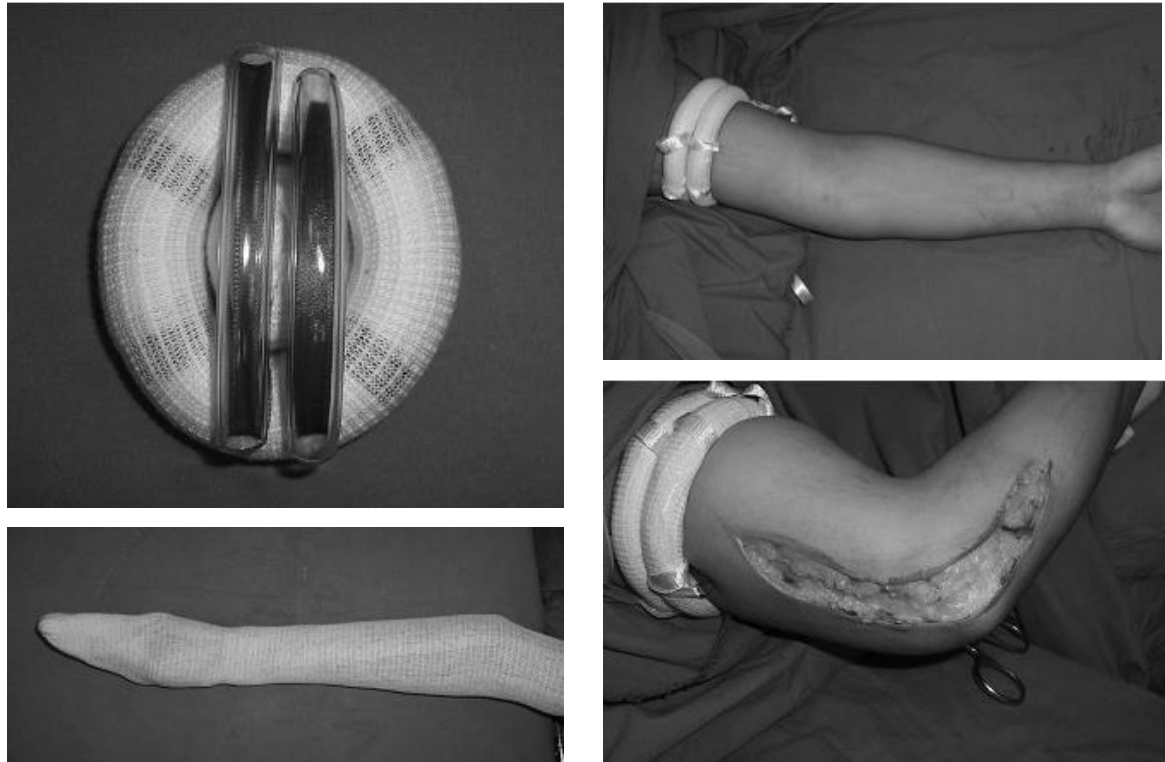


Figura 8. Aspecto del torniquete tipo tubular elástico plegado (arriba izquierda), tras extender el anillo de silicona desplegando la tela a modo de *Esteri Drape* (abajo izquierda) y tras plegar la tela en un segundo anillo, a nivel proximal en el miembro (arriba derecha). Puede verse la isquemia conseguida con el dispositivo (abajo derecha).

Tomado de Norman D, Greenfield I, Ghrayeb N, Peled E, Dayan L. Use of a new exanguination tourniquet in internal fixation of distal radius fractures. *Tech Hand Up Extrem Surg* 2009;13(4):173-5

En un intento de disminuir la realización de sobrepresiones, se propone la utilización de distintos diámetros del anillo, en función del diámetro de la extremidad sobre la que se va a realizar la isquemia. En cualquiera de los casos, al concluir la cirugía se consigue la restauración del flujo sanguíneo cortando el anillo de silicona. Los defensores de este sistema argumentan que es rápido, que permite realizar la exanguinación y mantener la isquemia con un solo dispositivo, que es desechable y permite hacerlo de forma estéril, y finalmente que permite colocar el torniquete a nivel más proximal que el manguito de

presión, ya que es mucho más estrecho^{46, 47, 48}. Esto parece que puede ser especialmente interesante en la población pediátrica, con extremidades más cortas⁴⁷. Estos autores no aprecian más complicaciones que las descritas con el manguito de presión. Sin embargo, se trata de series muy cortas como para poder sacar conclusiones, y entre los inconvenientes del sistema hay que destacar que no se controla la presión realizada, que hay que conocer la tensión arterial sistólica y el diámetro de la extremidad para escoger el diámetro de anillo correcto –y aun así probablemente se realizan sobrepresiones–, y que al tener una anchura mucho menor que el manguito neumático estándar, podría generar más daño a los tejidos subyacentes. Por último, también se ha descrito una menor calidad de la isquemia, que tiende a perderse en procedimientos de más de una hora, quizás por pérdida de propiedades elásticas del anillo⁴⁸.

Recomendaciones de uso

A continuación, se describen brevemente cuáles son las pautas de uso actualmente recomendadas para realizar una cirugía de miembros bajo isquemia, en base a los fundamentos biomecánicos que hemos ido desgranando, y en base también al balance de daño-beneficio.

Valoración previa: pros y contras

Es lógicamente la primera consideración antes de ejecutar cualquier procedimiento. Debe considerarse cada caso de forma individualizada, y contemplar que se cumplan las indicaciones ya descritas, y no concurran las contraindicaciones también explicadas.

Pero, además, hay que ser muy conscientes de los beneficios y perjuicios que podemos obtener de la utilización de la isquemia programada. Como ya se ha discutido, el único beneficio indiscutible que nos proporciona la isquemia es la consecución de un campo libre de sangre, que nos facilite la disección anatómica y la identificación de estructuras; y esto a veces es indispensable y otras veces es un “lujo”. Los perjuicios o daños que se pueden derivar del empleo de una isquemia van a ser ampliamente analizados los apartados

futuros, cuando se aborden los mecanismos fisiopatológicos del daño, y su repercusión clínica.

Exanguinación

Se entiende por exanguinación el proceso mediante el cual se evacúa la totalidad o la mayor parte de la sangre contenida en una extremidad, antes de aplicar el manguito de presión o torniquete que vaya a mantener la isquemia. Su finalidad, lógicamente, es conseguir un campo lo más perfectamente exangüe, libre de sangre, que facilite la identificación de estructuras y de esta manera la disección anatómica.

El sistema más básico de exanguinación es la simple elevación del miembro, dejando que la fuerza de la gravedad tienda a desalojar la sangre contenida en la extremidad. Este sistema está descrito desde los albores de la cirugía moderna, y como se ha comentado antes fue descrito y defendido por Lister⁵. Aunque sólo consigue una evacuación parcial de la sangre, hay quien defiende que la permanencia de cierto volumen en el circuito venoso puede ayudar a identificar las venas durante la disección, y así facilitar una mejor hemostasia^{39, 40}. Para cirugías sobre miembro superior se recomienda la elevación del mismo a 90° durante 5 minutos, y en el caso de la extremidad inferior a 45°, también durante 5 minutos. Este gesto puede llevarse a cabo mientras la extremidad está siendo pintada con sustancias antisépticas y se van colocando los paños quirúrgicos estériles, antes de la cirugía²¹.

Sin embargo, la mayoría de cirujanos prefieren emplear dispositivos que ayuden a retirar la mayor parte de la sangre del miembro mediante la aplicación de una presión en sentido centrípeto. En este sentido, el ingenio descrito por Esmarch⁶, y que lleva su nombre, la venda o banda de Esmarch, es posiblemente el más popular en nuestros días. Como se ha descrito anteriormente, consiste en aplicar dicha banda arrollada en la extremidad desde distal a proximal, ejerciendo una presión que va ascendiendo por el miembro desalojando la sangre contenida en los vasos (Figura 9).



Figura 9. Fotografías donde se muestra el aspecto y la aplicación de la banda de Esmarch. Véase además cómo en la raíz del miembro está ya colocado el manguito neumático destinado a mantener la isquemia.

Otro sistema similar es el descrito por Rhys-Davies⁴⁹, y que también lleva su nombre, exanguinador de Rhys-Davies. Su diseño consiste en un tubo neumático de unos 50cm de longitud, que después de inflado a la presión deseada deja una pequeña alma a través de la cual se desliza el miembro, de distal a proximal, sometiéndolo a una presión que va desalojando la sangre en sentido centrípeto (Figura 10).



Figura 10. Fotografías donde se muestra el aspecto y la aplicación del exanguinador de Rhys-Davies.

Aunque es más rápido de aplicar que la banda de Esmarch, no puede evitar que la presión sea menor en los puntos de menor diámetro de la extremidad, normalmente los más acros, y por tanto no es tan eficaz como la anterior. En cualquier caso, hay que remarcar que las contraindicaciones señaladas para la isquemia en puntos anteriores, son igualmente válidas para estos dispositivos de exanguinación activa, y deberían emplearse con el mayor cuidado o no emplearse cuando se sospeche que puedan ayudar a diseminar un problema local, como una trombosis venosa profunda o un tumor localizado en la extremidad⁴¹.

Finalmente, cabe realizar la puntualización de que, aunque se realice una exanguinación minuciosa de la extremidad, y se coloque adecuadamente el manguito de isquemia o similar, la sangre que se consigue movilizar es sólo la que tiene localización extraósea, y que siempre queda una pequeña colección de sangre en el circuito intraóseo, sangre que queda protegida de la compresión exógena porque la carcasa ósea sólida dentro de la cual asientan, no cede e impide su colapso⁴². Esto normalmente tiene poca importancia clínica, pero obviamente hay que tenerlo en cuenta, sobre todo cuando se van a realizar osteotomías o en general cuando se vaya a trabajar sobre el tejido óseo.

Dispositivo: diseño y colocación.

Dejando de lado los sistemas minoritarios de mantenimiento de la isquemia, y centrándonos en el *gold standand* actual, el manguito neumático, es importante señalar que hay variaciones en el diseño que implican diferencias funcionales.

La anchura del manguito es un punto cardinal. De forma sólida, se ha comprobado que la utilización de manguitos más anchos consiguen una isquemia efectiva a presiones de inflado inferiores^{12, 51, 52}, por lo que la recomendación actual es emplear manguitos de anchura superior al radio de la extremidad en el punto de aplicación de los mismos; esto es, aproximadamente, más de 5cm para la extremidad superior, y más de 9cm para la extremidad inferior^{53, 54}.

Por otra parte, en los últimos tiempos se aboga por diseños de manguito de forma cónica o troncocónica²¹, en lugar de la clásica forma tubular, que se adapten mejor a la forma del miembro, especialmente cuando se trata del muslo de una persona obesa o musculada.

Como se aprecia en la figura 11, esta mejor adaptación se traduciría en una distribución más homogénea de la presión, que sería más eficiente. Se conseguiría así la isquemia a una presión de inflado menor, y por otra parte se evitaría que hubiese zonas de mayor diámetro con sobrepresiones dañinas.

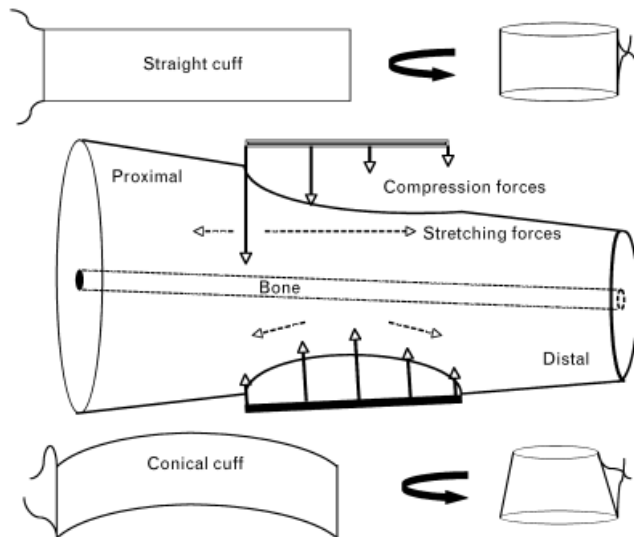


Figura 11. Diseño recto (*straight cuff*) y diseño cónico (*conical cuff*) de un manguito de presión, y su influencia en la distribución de las fuerzas de compresión (*compression forces*) y cizallamiento (*stretching forces*).

Tomado de Estebe JP, Davies JM, Richebe P. The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. Eur J Anaesthesiol 2011; 28(6):404-11

Cálculo de la Presión de Oclusión Areterial (POA)

Como ya se ha comentado, hay una dispersión de la fuerza desde la presión exógena que hacemos en el miembro, hasta que alcanza la luz de los vasos que pretende ocluir, lo que obliga a ejercer presiones mayores a la presión arterial sistólica, para lograr una isquemia. Esto ha sido estudiado en animales⁵⁵, cadáveres³⁸, y voluntarios sanos anestesiados⁵⁶.

De los estudios experimentales en animales, de los que luego hablaremos, sabemos que el incremento de la presión de inflado lleva consigo un aumento del daño tisular, sobre todo a nivel muscular y nervioso^{57, 58, 59}.

Históricamente, el valor de la presión para el inflado del manguito se ha establecido de forma empírica por el cirujano, tratando de asegurar ante todo que la isquemia no se perdiese en ningún momento. Esto ha dado lugar a la utilización de presiones mayores o mucho mayores de la necesaria.

Al aumentar la conciencia sobre el daño derivado de la utilización de dispositivos de isquemia, con el paso del tiempo se ha intentado afinar para dar con la presión mínima necesaria para lograr la misma, sin añadir sobrepresiones. Esta presión “ideal” ha sido definida como Presión mínima de Oclusión Arterial (POA) o *minimal Arterial Occlusion Pressure (AOP)*, en inglés²¹, aunque también se le llama en algunas ocasiones *Limb Occlusion Pressure (LOP)*²⁷.

Como hemos analizado, hay muchos factores que deben considerarse a la hora de definir la POA, y de la utilización de muchos o pocos de ellos obtendremos un cálculo más o menos preciso. En general, vamos a referirnos siempre al manguito neumático, que es el muy mayoritario, *gold standand*, y que permite controlar la presión que estamos ejerciendo.

La recomendación actual, independientemente del cálculo que llevemos a cabo, consiste en no emplear presiones de inflado de más de 250mmHg en extremidad superior, o mayores a 300mmHg en extremidad inferior²⁷. Sin embargo, veremos que presiones bastante más bajas pueden ser suficientes para lograr la isquemia.

Para calcular la presión ideal POA, una primera aproximación clásica pero vigente hoy en día en muchos quirófanos (quizás en la mayoría), consiste en inflar el manguito de presión 100–150mmHg sobre la presión arterial sistólica para miembros inferiores, y 50–75 mmHg para miembros superiores⁶⁰. Como vemos, es un sistema empírico que sólo toma en consideración la tensión arterial del paciente, y únicamente establece una diferencia de presión para miembros superiores o inferiores, en reconocimiento de que los miembros superiores suele ser de menor diámetro que los inferiores.

Con intención de ajustar más el cálculo, Graham y cols⁶¹ introdujeron la circunferencia del miembro y la anchura del manguito entre las variables a considerar. Propusieron la siguiente fórmula:

$$POA = ((TAS - TAD) \times \text{Circunf} / (3 \times \text{Anch manguito})) + TAD$$

Donde,

- POA= Presión de Oclusión Arterial (en mmHg).
- TAS= Tensión Arterial Sistólica (en mmHg)
- TAD= Tensión Arterial Diastólica (en mmHg)
- Circunf= Circunferencia del miembro (en cm)
- Anch manguito= Anchura del manguito (en cm)

Se recomienda añadir a la presión así calculada, un margen extra de 50mmHg para compensar posibles variaciones de la Tensión Arterial durante la cirugía.

Así, tendríamos que para un paciente estándar, con TAS de 120mmHg y TAD de 70mmHg, con un muslo de 45cm de circunferencia o perímetro y empleando un manguito estándar de 9cm:

$$POA = ((120-70) \times 45 / (3 \times 9)) + 70 = 153\text{mmHg}$$

De manera que añadiéndole los 50mmHg de margen, tendríamos que una presión de inflado de 203mmHg debería ser suficiente para conseguir la isquemia.

Empleando esta fórmula, se ha calculado que la presión de inflado del torniquete puede disminuirse un 20-40% en adultos⁵¹ y más del 50% en niños⁵², comparado con sistemas de cálculo empírico.

En la misma línea, Tuncali y cols⁵⁶ defienden una nueva fórmula más sencilla que la de Graham. Estos autores, como se ha dicho antes, estudian la dispersión sufrida desde la presión externa ejercida desde el manguito, a la presión real registrada en la profundidad del miembro, en pacientes sanos anestesiados. De esta forma hallan un coeficiente ajustable para distintos rangos de diámetro de extremidad, que denominan coeficiente de dispersión por los tejidos o *Tissue Padding Constant* (K_{TP}).

Aplicando el valor de K_{TP} correspondiente al diámetro de la extremidad en cuestión, proponen la siguiente fórmula para calcular la POA:

$$POA = (TAS + 10) / K_{TP}$$

Donde,

- POA= Presión de Oclusión Arterial (en mmHg).
- TAS= Tensión Arterial Sistólica (en mmHg)
- K_{TP} = coeficiente de dispersión por los tejidos

En este caso, no se menciona la conveniencia o no de añadir al manguito un margen extra de presión para contrarrestar posibles variaciones en la TAS durante la cirugía.

Así, se propone el ejemplo de que para un paciente con un perímetro de extremidad de 37cm (al que corresponde según las tablas propuestas un K_{TP} = 0,78), y 100mmHg), para el que tendríamos que:

$$POA = (100+10) / 0,78 = 141\text{mmHg}$$

Una presión de 141mmHg debería ser suficiente para mantener la isquemia.

Si bien este sistema es más sencillo que la fórmula propuesta por Graham, requiere la utilización de las tablas con el coeficiente de dispersión por los tejidos, por lo que es dudoso que aporte grandes ventajas en términos de aplicabilidad a la práctica clínica. Además, aunque no se menciona, parece plausible que si hay cambios en la presión arterial sistólica, debieran hacerse correcciones, o mejor aún, calcular un margen razonable de sobrepresión en el momento de la inducción de la isquemia.

Finalmente en este apartado, creo conveniente mencionar que se está describiendo la aplicación de nuevas tecnologías, que harían innecesario ese nuevo cálculo con los cambios de TAS, o la sobrepresión profiláctica inicial. Recientemente, se ha definido un nuevo sistema que monitoriza de forma no invasiva la TAS, y actualiza en base a la misma y a otros parámetros como la circunferencia del miembro, la presión mínima necesaria en

cada momento. Este dispositivo se denomina *MT-920 tourniquet system* (Mizuho-Ika, Tokio, Japón)⁶². Puede observarse en la figura 12.

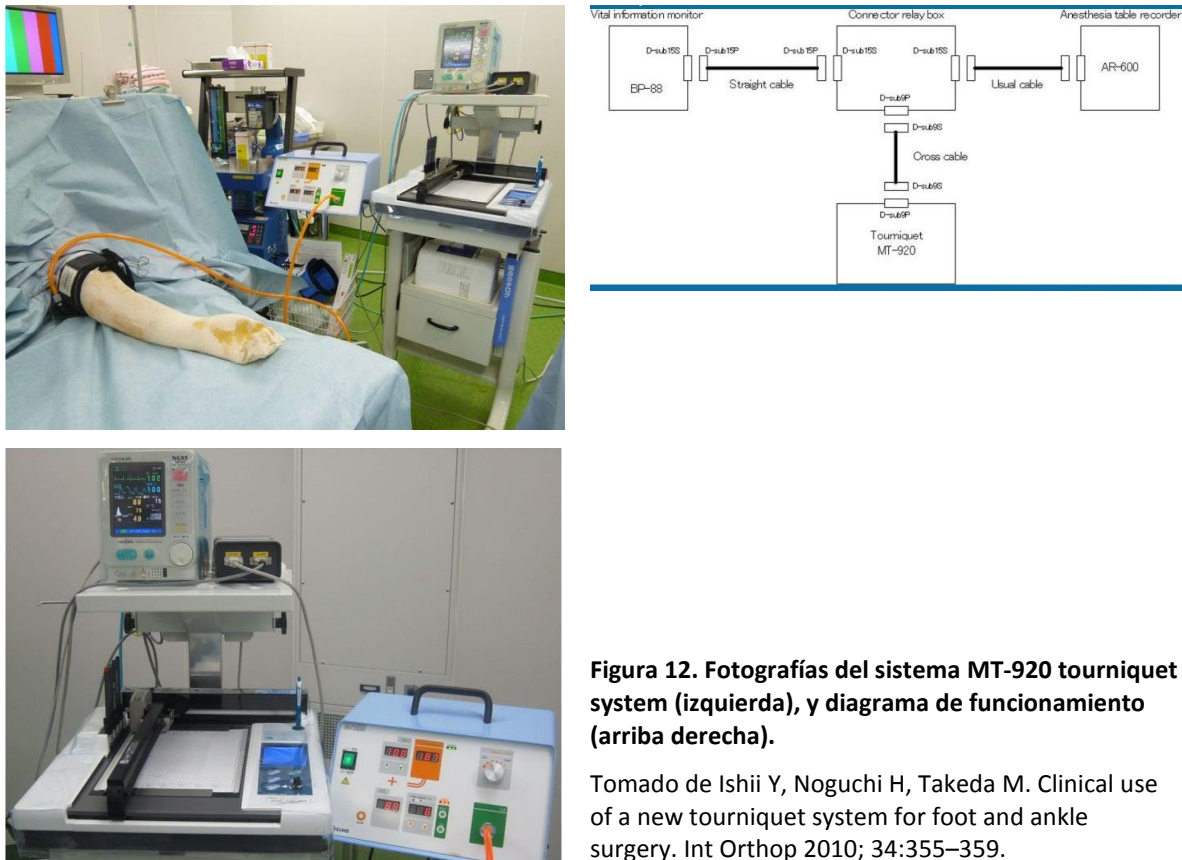


Figura 12. Fotografías del sistema MT-920 tourniquet system (izquierda), y diagrama de funcionamiento (arriba derecha).

Tomado de Ishii Y, Noguchi H, Takeda M. Clinical use of a new tourniquet system for foot and ankle surgery. *Int Orthop* 2010; 34:355–359.

Este último avance representa, probablemente, el camino al que debemos dirigirnos al instaurar una isquemia con manguito neumático, de forma que se aplique la mínima presión (y agresión) necesaria, y así se minimicen los daños secundarios a la misma, de los que hablaremos un poco más adelante.

Tiempo que permanece aplicado

La tolerancia a la isquemia muy es variable entre los distintos tejidos del cuerpo. Considerando groseramente la supervivencia o necesidad de amputación de una extremidad tras un periodo de isquemia, la experiencia que tenemos deriva básicamente de la experiencia en guerras o catástrofes, en especial de la lesión aguda de grandes vasos⁶³ y las isquemias secundarias al aplastamiento de la extremidad o *crush syndrome*⁶⁴. En este

contexto, el límite de tiempo establecido para la viabilidad del miembro tras una isquemia es muy variable y dependiente de muchos otros factores además del tiempo, pero está históricamente establecido en 6 a 8 horas⁶³. Actualmente estos tiempos tan largos de isquemia suelen ser secundarios a tromboembolismos agudos, siendo la Cirugía Vascular la especialidad quirúrgica responsable del tratamiento en estos casos.

Sin embargo, en los ejemplos señalados, las isquemias pueden ser sólo subtotales en base a la existencia de vascularización colateral, y puede confluir un daño tisular directo por las mismas causas que provocaron la lesión u oclusión vascular. Además, en la valoración del resultado sólo como supervivencia de la extremidad o necesidad de amputación, no estamos considerando el grado de recuperación funcional de los miembros no amputados.

Intentando afinar la descripción de este daño de acuerdo a nuestros intereses, interesa conocer la viabilidad individual según el tipo de tejido y tras una isquemia absoluta. En este sentido, es más interesante la experiencia que tenemos sobre todo en base al desarrollo de injertos microvascularizados empleados de forma creciente en la Cirugía Plástica. Dichos injertos pueden contener todos los tejidos presentes en los miembros, a saber: piel, grasa, músculo, nervio periférico, y hueso. En la tabla 2 se señalan los tiempos críticos de isquemia, definidos como el tiempo máximo que cada tejido puede tolerar y, lo que es más importante, seguir siendo viable tras la reperusión. Vemos cómo en las extremidades, la piel o la grasa aguantan mucho más tiempo la isquemia que el tejido muscular, el más sensible y para el que se indica un tiempo máximo de isquemia de 4 horas⁵⁰.

Tipo de tejido	Isquemia crítica a temperatura ambiente
Músculo	4 horas
Nervio periférico	8 horas
Grasa	13 horas
Piel	24 horas
Hueso	4 días

Tabla 2. Tiempo de isquemia crítica para distintos tejidos, a temperatura ambiente.

Tomado de Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. Injury 2012; 43(6):670-5.

Sin embargo, al referirnos a las isquemias programadas, el límite máximo deseable se sitúa tradicionalmente en 2 horas. Aquí estaríamos hablando no de tiempos críticos o de lesiones reversibles, sino de algo bastante más subjetivo, como sería un daño “tolerable” o “asumible”. El señalado margen de 2 horas se trata, desde luego, de un límite establecido de forma aleatoria, pero que está universalmente aceptado porque sabemos que con ese tiempo de isquemia las complicaciones serias son extremadamente raras, porque la percepción subjetiva de daño derivado del uso del manguito es escasa, y porque la mayoría de cirugías de extremidades pueden realizarse dentro de ese periodo de tiempo.

Al abordar la cuestión desde una perspectiva de rigor científico, hemos de fijarnos primeramente en la experiencia experimental en animales. Una limitación que hemos de asumir, es que en la bibliografía publicada las isquemias practicadas se realizan por horas completas (1, 2, 3, ó 4, para el caso que nos ocupa).

De algunos estudios experimentales en animales ya mencionados y de otros que repasaremos más adelante, concluimos que efectivamente una isquemia de 2 horas de duración provoca un daño cuantificable de forma bioquímica, histopatológica, y en cierta medida funcional, pero que este daño es autolimitado y reversible^{57, 58, 59, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72}. Sin embargo, en aquellos casos en que la isquemia se prolongaba hasta las 3 horas, las alteraciones detectadas también resultaron ser temporales^{58, 65, 66, 68, 73}. Es en isquemias a partir de las 4 ó 5 horas donde, además de cambios potencialmente reversibles, se detectan cambios de necrosis tisular irreversible^{74, 75}.

Precisamente por la generalización tácita de no realizar isquemias programadas de más de 2 horas de duración, hay muy pocos estudios clínicos que recojan este escenario, y en general no tienen una evidencia fuerte. No obstante, sus resultados orientan a pensar que un periodo de hasta 3 horas seguidas de isquemia, sobre un músculo sano, no produciría alteraciones sistémicas relevantes, ni daño local irreversible⁷⁶. En la misma línea, otro estudio no encuentra diferencias en el resultado a largo plazo entre pacientes sometidos a tiempos de isquemia que varían desde 40 a 183 minutos, en la reconstrucción del ligamento cruzado anterior de la rodilla⁷⁷. Finalmente, otro trabajo detectaría un mayor riesgo de lesión neurológica con isquemias superiores a 2 horas (145 minutos), si bien

tratándose en todo caso de neuroapraxias autolimitadas que se recuperaron en el medio-largo plazo⁷⁸.

Por otro lado, para isquemias programadas de menos de 2 horas de duración, la evidencia clínica es clara, con estudios de alta calidad (nivel de evidencia I-II). De estos trabajos concluimos que, a pesar de que hay cambios bioquímicos y funcionales en la función muscular a corto plazo en aquellos pacientes sometidos a una intervención bajo isquemia, el resultado funcional a largo plazo es indistinguible de los pacientes sometidos a la misma cirugía, pero sin emplear manguito de isquemia^{31, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85}.

Por todo ello, y aunque como se ha dicho no hay evidencia suficiente para contraindicar una isquemia de hasta 3 horas de duración, el consenso y recomendación actual para la práctica clínica es procurar un tiempo de isquemia menor a las 2 horas²⁷. En el caso de que hubiese necesidad de prolongar la misma, se ha defendido la realización de periodos de reperusión intercalados. Hay distintos protocolos propuestos, y algunos autores propugnan iniciar estos intervalos de reperusión tan pronto como a la hora de iniciada la isquemia⁸⁶, pero la mayoría recomienda contemplar esta posibilidad al acercarnos a las 2 horas²⁷. Por contra, se propone que introducir los periodos de reperusión más tarde de esas 2 horas de isquemia, podría exacerbar más el daño muscular que pretende disminuir⁸⁷. Hay consenso, por último, en que estos descansos de reperusión duren al menos 10 minutos, y en que se repitan por cada hora de isquemia adicional^{21, 27}. Con este régimen, parece que se consigue limitar el daño tisular, respecto a realizar toda la intervención bajo isquemia continua^{69, 78}. Es importante distinguir estos periodos de reperusión de “descanso” durante una cirugía con tiempo de isquemia prolongado, de los conceptos de pre-condicionamiento y post-condicionamiento, que son técnicas para combatir el daño por isquemia y reperusión, y que consisten en cortos intervalos de isquemia seguidos de cortos periodos de reperusión, en régimen variable, que se realizan antes o después de la intervención y el periodo de isquemia principal. De estos últimos procedimientos hablaremos más adelante, en el apartado correspondiente al tratamiento experimental del daño por el síndrome de isquemia-reperusión.

Cuándo retirarlo

El retirar el manguito de isquemia antes o después de iniciar el cierre tras el procedimiento quirúrgico ha sido fuente de controversia, especialmente en cirugías de artroplastia de rodilla.

En un metaanálisis reciente⁸⁰, se concluye que la retirada del manguito antes de iniciar el cierre aumenta levemente el sangrado, probablemente por el estado pro-fibrinolítico y el aumento de tiempo quirúrgico total, pero disminuye de forma significativa las complicaciones menores y mayores. Se concluye que esto último probablemente se deba, por una parte, a que la realización de la hemostasia antes del cierre disminuye la incidencia y tamaño de los hematomas postquirúrgicos, y por otra, a que supone un menor tiempo de colocación del manguito. Por todo ello, la recomendación actual es retirar el torniquete o manguito neumático tras el procedimiento quirúrgico, y llevar a cabo una hemostasia reglada antes de iniciar el cierre por planos.

Protección de la piel

Un aspecto que no debe olvidarse es, por último, la adecuada preparación de la piel en el segmento corporal en que se va a colocar el manguito neumático.

Es muy recomendable el adecuado acolchado de la misma con paños o compresas sin arrugas o irregularidades²¹. La finalidad de esto es conseguir una adecuada distribución de la presión que se va a ejercer, puesto que si hay zonas que soportan una mayor presión respecto a las vecinas, parte de la fuerza sagital de compresión se dispersa de forma axial a lo largo del eje largo del miembro, dando lugar a vectores de fuerza de cizallamiento⁸⁸. En este sentido, se ha recomendado aumentar el grosor de este acolchado sobre la piel^{88, 90}.

Debe evitarse una movilización del manguito una vez inflado, también para evitar fuerzas indeseadas de cizallamiento²¹.

Por último, y para evitar eventuales lesiones químicas derivadas de la aplicación de agentes antisépticos que luego pueden ser comprimidos contra la piel debido al inflado del manguito, se recomienda aislar la piel sobre la que va a asentar el mismo, idealmente con un adhesivo de plástico^{91, 92}.

Profilaxis antibiótica

Un punto de relativa polémica es cuándo comenzar la administración de profilaxis antibiótica, que tradicionalmente se realiza con Cefalosporinas de primera a tercera generación antes de la instauración de la isquemia, en la cirugía programada de extremidades. La discusión deriva de que lógicamente el manguito impide el paso del antibiótico en sangre desde el momento en que se instaura la isquemia, hasta que se inicia la reperusión. Así que, durante el tiempo de la cirugía, la presencia de antibiótico en los tejidos sobre los que se está trabajando dependería sólo de la impregnación previa de los mismos. Se han propuesto tiempos concretos en los que comenzar la infusión, antes del inflado del manguito: 20 minutos¹¹⁰, cinco minutos¹¹¹, dos minutos¹¹², o un minuto¹¹³. Sin embargo, ninguno de estos regímenes ha demostrado superioridad respecto a los demás¹¹⁴. La mayoría de protocolos actuales, y el que usamos en nuestro medio, no suelen concretar un tiempo determinado, recomendando la infusión del antibiótico 10-20 minutos antes²¹, o dentro de la primera hora anterior a la instauración de la isquemia, con la excepción de la Vacomicina en pacientes alérgicos a Beta-lactámicos, en cuyo caso el plazo se amplía a 2 horas¹¹⁵. En casos de olvidar la administración antes del inflado del manguito, se propone a nivel experimental la infusión regional intervenosa en el miembro isquémico¹¹⁶. Incluso, hay autores que defienden que aplicar la profilaxis antibiótica 10 minutos después de iniciar la reperusión sería tan efectivo como hacerlo previamente a la instauración de la isquemia¹¹⁷.

Consideraciones en situaciones especiales

Las excepcionales complicaciones descritas con el uso del manguito de isquemia en pacientes con TCE y en aquellos en que se realiza el fresado de un hueso sobre el que está aplicado el mismo, que analizaremos en el siguiente apartado, llevan a reclamar precaución al aplicar el manguito en estas situaciones.

Descripción del daño producido por la isquemia de extremidades.

Habiendo analizado los aspectos básicos de biofísica y biomecánica aplicables a la utilización de los dispositivos de inducción y mantenimiento de la isquemia, sus ventajas y sus recomendaciones de uso, es imprescindible examinar la morbilidad que produce este procedimiento, morbilidad sobre la que sólo hemos mencionado de forma superficial algunos aspectos. También se describen en este apartado otras alteraciones no necesariamente patológicas, pero que suponen una variación respecto a parámetros fisiológicos, y por tanto merecen ser analizadas.

Etiología del daño

Cuando empleamos un manguito neumático u otro procedimiento de inducción de isquemia programada se produce un daño, o puede producirse, por un triple mecanismo básico: la compresión (daño mecánico), la isquemia (daño anóxico) y la reperfusión (daño inflamatorio y oxidativo). Los dos últimos están especialmente ligados, y ambos se agrupan bajo el llamado síndrome de isquemia-reperfusión. Además, aunque la lesión inicialmente sólo tiene un ámbito local, puede expandirse y tener una repercusión sistémica.

Daño por compresión.

En los tejidos situados directamente bajo el manguito neumático, hay lógicamente un sufrimiento por la presión que ejerce el dispositivo. Como se ha discutido, este daño depende en gran medida de la magnitud de la fuerza de presión, del tiempo en que permanece activa, o del diseño del propio manguito. Pero, y ahora lo vamos a analizar, cada uno de los tejidos que sufre este insulto va a tener sus particularidades.

Con respecto a la **piel**, hay que decir que la escasa frecuencia con que se aprecian lesiones evidentes hace que muchas veces se trate de un tejido que se ignora entre los damnificados por el uso de dispositivos de isquemia.

Sin embargo, ha sido descrita la aparición de quemaduras, flictenas, despegamientos cutáneos o necrosis, hasta en un 0.04% al 1.5% de los casos^{88, 93}, siempre sobre la piel

situada bajo el manguito de presión. Su patogenia exacta ha sido interpretada de diferentes formas^{94, 95}, pero parece que pueden existir factores mecánicos^{88, 93} y factores térmicos y químicos^{11, 96}, más que factores isquémicos o secundarios al síndrome de isquemia-reperusión.

Desde el punto de vista mecánico, se propone que la presión que ejerce el manguito desde el perímetro del miembro a la altura en que es aplicado, se distribuye de forma desigual por la superficie⁹⁷. Como se puede ver en la figura 13, hay una sobrepresión en la zona donde el manguito de presión se superpone sobre sí mismo, al ser siempre más largo que el perímetro de la extremidad sobre la que se aplica.

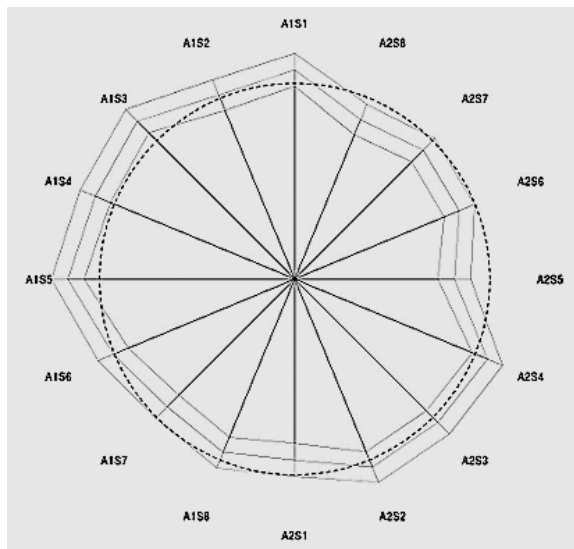


Figura 13. Diagrama donde se señala la distribución de la presión ejercida por el manguito neumático en el perímetro del miembro. La línea central representa el valor medio, y las líneas interna y externa representan el 5% y 95% del intervalo de confianza. LA presión es mayor entre las 9 y las 12, coincidiendo con la zona de superposición del manguito.

Tomado de Roth KE, Mandryka B, Maier GS, Maus U, Berres M, Rompe JD, Bodem F. In-vivo analysis of epicutaneous pressure distribution beneath a femoral tourniquet--an observational study. BMC Musculoskelet Disord 2015 31;16(1):1-6.

Esta distribución no homogénea de la fuerza de presión del manguito favorece en los puntos de mayor presión la dispersión de la fuerza sagital en fuerzas axiales cizallantes, que serían especialmente dañinas para la piel²¹ (figura 14).

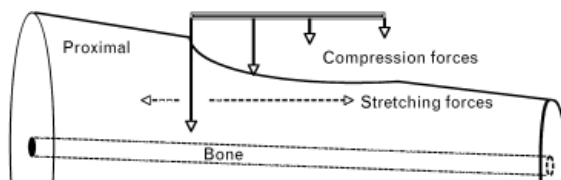


Figura 14. Dispersión de las fuerzas de compresión (*compression forces*) en fuerzas de cizallamiento (*stretching forces*).

Tomado de Estebe JP, Davies JM, Richebe P. The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. Eur J Anaesthesiol 2011; 28(6):404-11

Además, en el caso de la piel, y como se ha explicado, hay un riesgo incrementado de lesión por fricción mecánica con el manguito, que podría dar lugar a lesiones térmicas¹¹. También el uso de agentes químicos antisépticos parece causar en ocasiones quemaduras químicas, que no se ven en el resto de extremidad impregnada de la sustancia, de lo que se deduce que en su aparición juega un papel fundamental la asociación de la presión ejercida por el manguito^{91, 92, 96}.

El **músculo** es un tejido que sufre un daño reseñable con la presión, siendo el caso extremo el síndrome de aplastamiento o *crush syndrome*⁹⁸, con magnitudes de presión y tiempos de prolongación de la misma muy superiores a los que nos ocupan. Pero aún con tiempos y presiones de inflado de manguito tan bajos como los recomendados en las isquemias programadas, se produce un daño que puede atribuirse principalmente a la presión ejercida por el manguito, tanto en fuerzas sagitales como axiales. Así, en algunos modelos animales podemos observar cómo el tejido muscular bajo el manguito neumático, sometido a compresión e isquemia, sufre una mayor lesión que el tejido muscular localizado más distalmente en el miembro, sometido sólo a isquemia. Esto ha sido también objetivado a través de la diferente captación de un radiotrazador en gammagrafía⁷⁴, y diferente afectación de la función motora en electromiografía⁹⁹.

También en estudios clínicos en humanos se han descrito hallazgos que abundan en esta dirección, como una pérdida de fuerza muscular en extremidades inferiores más marcadas en el cuádriceps, tras la colocación de un manguito de presión en el muslo para la realización de una artroscopia de rodilla para llevar a cabo una ligamentoplastia anterior⁷⁷.

Por último en este apartado hay que mencionar el daño que, derivado de la presión, se realiza sobre **el tejido nervioso** periférico. Al igual que ocurre con el músculo, se acepta que el desencadenante principal del daño es la compresión, más que la anoxia^{100, 101}. A diferencia de éste, se considera al nervio menos vulnerable al daño agudo por el uso de manguitos neumáticos. Pero cuando existen lesiones, éstas se prolongan más en el tiempo en el tejido nervioso que en el tejido muscular²¹. Por otra parte, se considera que el daño por presión ocurre especialmente en las secciones del nervio situadas bajo los extremos del manguito neumático¹⁰².

En modelos animales, se ha estudiado con microscopía electrónica el daño a nivel del nervio ciático en la rata, tras periodos de isquemia desde los 30 minutos hasta las 3 horas, con presiones de 300mmHg¹⁰³. En este trabajo, se describen lesiones moderadas desde los 30 minutos, con aparición de discontinuidades en la vaina de mielina a partir de las 2 horas, y disrupción completa de la mielina en algunos puntos e hipertrofia de las células de Schwann a las 3 horas. En microscopía óptica también se describen cambios de desestructuración neuronal y edema, sobre todo a partir de las 2 horas, con presiones de 350mmHg, en conejos¹⁰⁴. Estos cambios estructurales han mostrado una correlación en pruebas de electromiografía, también en un modelo animal, ya descrito⁶⁷.

A nivel clínico, hay algunos estudios que detectan alteraciones electromiográficas y de velocidad de conducción nerviosa en la extremidad intervenida de hasta un 62,5% de los pacientes sometidos a una cirugía ortopédica con manguito de isquemia, que se normalizarían al cabo de unos 2 meses¹⁰⁵. Afortunadamente, la repercusión funcional clínica de estos hallazgos es, como analizaremos un poco más adelante, también autolimitada. La repercusión funcional clínica de estos hallazgos es, como analizaremos un poco más adelante, también autolimitada.

Por último con respecto a la lesión neurológica por presión, cabe destacar que algunos autores sugieren que los torniquetes o manguitos más estrechos resultarían menos dañinos para el nervio^{106, 107}, basándose en los resultados de un estudio clásico en monos de Ochoa y cols⁵⁷; sin embargo, esta conclusión ha sido criticada²¹, ya que Ochoa y cols nunca definieron una anchura concreta de manguito. En cualquier caso, actualmente hay controversia al respecto, con algunos estudios clínicos orientando a un menor daño del nervio periférico con manguitos estrechos¹⁰⁸ y otros defendiendo menor lesión con manguitos anchos^{12, 52}; ninguno de estos estudios es capaz de demostrar una trascendencia funcional de los hallazgos encontrados²⁷.

Daño por isquemia.

Ya se ha señalado en la tabla 2 el límite máximo aproximado de tolerancia de los distintos tejidos a una interrupción completa del flujo sanguíneo, destacando por su vulnerabilidad

el músculo y el nervio. Sin embargo, dichos tiempos máximos quedan lejos de los manejados habitualmente en la isquemia programada de miembros, de en torno a 2 horas.

Por otra parte, hemos observado cómo se describe que tras la colocación de un manguito neumático la lesión tisular es mayor en los tejidos situados bajo el mismo (sometidos a compresión e isquemia), respecto a los tejidos situados más distalmente (sometidos sólo a isquemia). Esto ha sido descrito para la piel^{88, 93, 97}, tejido nervioso^{100, 101, 102, 103, 104} y tejido muscular^{74, 77, 99}. De lo anteriormente mencionado, cabe concluir que el daño por isquemia pura, es de menor consideración que el descrito para la compresión, al menos para los tiempos de isquemia y presiones de inflado habituales.

Centrándonos en la etiología del daño por isquemia, baste decir en este apartado que el mismo deriva de la falta de aporte sanguíneo en los tejidos sometidos a isquemia, lo cual conduce a una anoxia de los mismos. La falta de oxígeno en los tejidos impide la realización del metabolismo aeróbico fisiológico, por lo que la célula sufre una depleción de sus reservas energéticas, se ve obligada a instaurar un metabolismo anaerobio mucho menos eficaz e insostenible por largo tiempo, y en última instancia sufre cambios bioquímicos y estructurales que llevan a su muerte, transcurrido un tiempo crítico sin aporte de oxígeno. Todo ello será explicado con detalle en el apartado de fisiopatología.

Una última consideración dentro del apartado de daño por isquemia es la hipoxia detectada de forma postoperatoria a nivel de la herida quirúrgica, en los pacientes en los que se usa un dispositivo de isquemia¹⁰⁹. Se ha propuesto que esto podría tener implicaciones en cuanto a la cicatrización de la herida y en cuanto a riesgo de infección²¹, aunque no hay una evidencia sólida que confirme esta hipótesis, lo que también desarrollaremos más adelante.

Daño por Reperusión

Esta fase lesional se inicia desde el momento en que se libera la isquemia y se restaura la circulación al tejido que ha estado sometido a la anoxia.

El retorno de sangre oxigenada a estos tejidos desencadena una serie de procesos bioquímicos entre los que destaca la formación de radicales libres de oxígeno, activación

de citosinas, y alteración de la permeabilidad capilar, que van a dar lugar a un daño local mayor al sufrido durante el proceso isquémico¹¹⁸, y a un daño expandido al conjunto del organismo. Todo ello se va a describir detalladamente en el siguiente apartado de fisiopatología.

Conviene subrayar que así como el daño por compresión y el daño por anoxia tienen un tiempo de actuación muy definido, que corresponde al periodo en que el manguito neumático permanece activo, el daño por reperusión o más propiamente por el síndrome de isquemia-reperusión, va a prolongarse más allá del cese de dicho insulto. Además, el daño que origina va a tener un ámbito no sólo local, sino que también puede tener repercusión sistémica. Todo ello hace que sea, probablemente, el factor etiológico más importante de los que concurren en el daño tras la realización de una isquemia programada de extremidades.

Etiología de otras alteraciones descritas

Además de los aspectos explicados hasta ahora, hay algunas otras alteraciones que no pueden encuadrarse claramente bajo ninguno de los epígrafes anteriormente detallados.

En este sentido, se han descrito por ejemplo problemas debidos a la propia presencia física del manguito de isquemia en la extremidad que va a ser sometida a la cirugía. Ya hemos señalado que no puede utilizarse en cirugías muy proximales del miembro, como las realizadas sobre el hombro o la cadera; pero, además, puede implicar una **limitación del campo quirúrgico** en localizaciones más distales, en aquellos casos en que la cirugía requiera una extensión más proximal de lo habitual. Esto supone que en ocasiones hay que renunciar a su uso de entrada o, lo que es peor, descubrir durante la cirugía que es necesario retirar el manguito de presión y extender la preparación del campo quirúrgico a un nivel más proximal. Por otra parte, en la bibliografía se ha descrito cómo tanto los manguitos como los exanguinadores tienen una relevante contaminación bacteriana¹¹⁹, y por tanto, podrían ser una **fuentes de infección quirúrgica**¹²⁰, por su situación de proximidad espacial y temporal con la piel sobre la que se realiza la incisión quirúrgica. De hecho, en este sentido, hay autores que subrayan la importancia de una limpieza exhaustiva de estos dispositivos antes de cada uso^{119, 121}, e incluso autores que defienden el uso de

exanguinadores y manguitos estériles¹²², con ánimo de disminuir las infecciones quirúrgicas.

También en el plano estrictamente físico, se ha sugerido clásicamente la posibilidad de que la presencia de sangre en el hueso, ocupando un volumen, disminuya la calidad del fraguado del cemento en aquellos casos en que se utilicen implantes protésicos cementados, y se empeore la interdigitación de este cemento en las trabéculas óseas. En última instancia, esto podría eventualmente conducir a un **aflojamiento de las prótesis cementadas**, en aquellos pacientes en los que no se usa un manguito de isquemia³⁵. Sin embargo, y aunque el razonamiento pueda tener una plausibilidad biológica, en el único trabajo que estudia de forma sistemática esta posible relación, no hay diferencias significativas en cuanto a la fijación protésica entre pacientes operados con o sin isquemia²⁰².

Por otra parte, existen una serie de efectos sistémicos que no se explican exclusivamente por las vías mencionadas de compresión, anoxia y reperfusión. Los mencionaremos a continuación, ofreciendo en cada caso la explicación etiológica más aceptada, y dejaremos para más adelante la discusión de la repercusión clínica real de todas estas variaciones detectadas.

En primer lugar, se ha descrito un **sangrado** de mayor cuantía a nivel intraarticular y de los drenajes –sin mayor pérdida sanguínea en términos generales- tras la utilización de cirugías bajo isquemia^{123, 124, 125, 126}, y este hallazgo ha sido puesto en relación con el desarrollo de una fibrinólisis local después de iniciar la reperfusión, secundaria a la liberación de factores fibrinolíticos desde el área sometida a la cirugía²¹.

También se han estudiado los efectos derivados de la re-distribución de la volemia excluyendo el espacio correspondiente a la extremidad exanguinada, y del retorno a un volumen normal de distribución con la restauración del flujo a la misma. Así, se describe cómo tras el inflado del manguito hay un **incremento de la tensión arterial**, en cuyo desarrollo colaborarían la distribución de la volemia en un menor continente, y el dolor provocado por el manguito¹²⁷. Al contrario, con la retirada del manguito puede aparecer

durante los primeros momentos de la reperfusión una **hipotensión arterial**, entre cuyos desencadenantes estarían la recuperación de la totalidad del volumen de distribución vascular, la hemorragia por la intervención, o la vasodilatación con hiperemia reactiva en la extremidad sometida al periodo de isquemia, entre otros¹²⁸.

Un aspecto muy estudiado es la relación que parece existir entre el uso de manguitos neumáticos u otros dispositivos de isquemia y **alteraciones tromboembólicas**. Hay evidencia clínica en este sentido desde hace tiempo, con el hallazgo de datos de trombosis por venografía en hasta un 18% de los pacientes sometidos a una artroscopia con uso de manguito de isquemia, y hasta una semana después de la cirugía¹²⁹. No sólo eso, sino que se han detectado mediante ecocardiografía transesofágica pequeños émbolos en el 100% de los pacientes sometidos a una cirugía de artroplastia de rodilla, cuando se empleaba el manguito de isquemia¹³⁰. Se propone que en su etiología podría tener un papel importante el incremento de marcadores de un estado pro-trombótico en la circulación sistémica durante el tiempo de isquemia; entre estos marcadores estarían los Dímeros D, el activador de plasminógeno tisular (t-PA), la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la antitrombina III (AT-III), o la proteína C^{131, 132, 133}. Se considera que, compartiendo la inflamación y la hemostasia vías comunes de activación y feedback¹³⁶, el uso del torniquete activa y exagera ambas respuestas, no sólo durante el periodo perioperatorio, sino con extensión hasta los 2 días tras la cirugía^{134, 135, 136}.

Por ultimo en este apartado, se ha descrito la posibilidad del desarrollo de un **incremento de la presión intracraneal** tras la liberación del manguito de presión, que se consideraría secundario a la hipercapnia, y que podría agravar lesiones intracraneales previas¹³⁷.

Fisiopatología del daño

A través de cualquiera de las principales vías etiológicas descritas (compresión mecánica, anoxia, y daño por reperfusión), hemos señalado que el músculo esquelético es el tejido más vulnerable. En el músculo es donde se concentra el grueso del daño local (rabdomiolisis), y el músculo es el principal responsable de la repercusión sistémica del

daño. Por ello, merece la pena realizar un breve recordatorio de los aspectos más importantes de su fisiología¹³⁸, antes de abordar su fisiopatología.

Fisiología de la célula muscular

El músculo esquelético o estriado es una célula especializada en la consecución de movimiento a través del deslizamiento de sus miofilamentos de actina y miosina. Para ejercer esta función necesita una energía, y en su obtención se emplean dos vías metabólicas: aeróbica y anaeróbica, siendo la principal la aeróbica. El músculo recibe del torrente sanguíneo nutrientes, que en la mitocondria y por diferentes vías metabólicas que no entraremos a describir, pero siendo la principal la fosforilación oxidativa, son transformados en enlaces de fuerte potencial energético en forma de Adenosin Trifosfato (ATP) que representa la fuente de energía inmediatamente disponible. La mioglobina juega un papel importante en el metabolismo aerobio, ya que capta y almacena a partir de la Hemoglobina el oxígeno presente en el torrente sanguíneo. Por otra parte, la Fosfocreatina o Creatina Fostato tiene especial relevancia en el metabolismo anaerobio, funcionando como un elemento de transporte y almacén temporal de energía.

Los distintos elementos celulares suelen emplear diversas enzimas ATP-asas que hidrolizan el ATP, lo que da lugar a la liberación de energía y a una molécula Adenosin Difosfato (ADP). Para restaurar el potencial energético del ADP se emplea la Fosfocreatina: ésta última dona un grupo fosfato al ADP, que se convierte de nuevo en ATP, en una reacción anaeróbica mediada por la Creatin Kinasa. La creatina resultante puede reciclarse de nuevo a Fosfocreatina mediante la adición de un grupo fosfato, o es metabolizada y convertida en Creatinina, que es excretada. La función de almacenaje temporal de energía de la Fosfocreatina es particularmente importante en el tejido muscular, sometido a una alta y fluctuante demanda de energía.

La energía proporcionada por la hidrólisis del ATP es indispensable para la homeostasia de la fibra muscular. Entre las necesidades de la célula muscular destaca mantener unas concentraciones intracelulares adecuadas de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} ; y lógicamente asegurar la interacción cíclica miofibrilar que garantice la función de contracción muscular.

Con respecto a esta última, la cantidad de calcio libre que alcanza los miofilamentos de actina y miosina representa un factor determinante: el calcio se fija a la proteína reguladora (troponina) que inhibe la acción de la tropomiosina y permite la interacción de los filamentos finos de actina y gruesos de miosina. La hidrólisis de ATP por la miosina ATPasa permite la rotación de la cabeza de miosina alrededor de su ciclo de unión a la actina. Numerosos ciclos de rotación-unión-separación de los puentes son necesarios para posibilitar una sola contracción muscular. Al final de los ciclos, la separación de los puentes necesita igualmente una molécula de ATP. La relajación dependiente de la energía está en función de las capacidades de almacenamiento de calcio por el retículo sarcoplásmico que reconstituye los depósitos de calcio, gracias a una bomba ATPasa calcio-magnesio dependiente.

En cuanto a la homeostasia, en las células musculares existe una estrecha relación entre las concentraciones intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} . La bomba Na^+/K^+ -ATPasa, situada en la membrana celular, regula la concentración intracelular de Na^+ . Las bajas concentraciones de Na^+ intracelular crean un gradiente con el medio extracelular, que facilita a su vez el intercambio de Na^+ con el ion Ca^{2+} , a través de canales iónicos diferentes. La concentración intracelular de calcio, cuya misión principal es garantizar la contracción muscular, es mucho menor que en el medio extracelular. La despolarización de membrana que llega con las terminaciones nerviosas hace que aumente la concentración de Ca^{2+} intracelular desde el medio extracelular y desde el retículo sarcoplásmico, y en última instancia esto provoca el deslizamiento de los miofilamentos y la contractura muscular (figura 15). Sin embargo, como veremos, el aumento incontrolado en la concentración del calcio intracitoplasmático juega también papel central en la destrucción muscular¹³⁹.

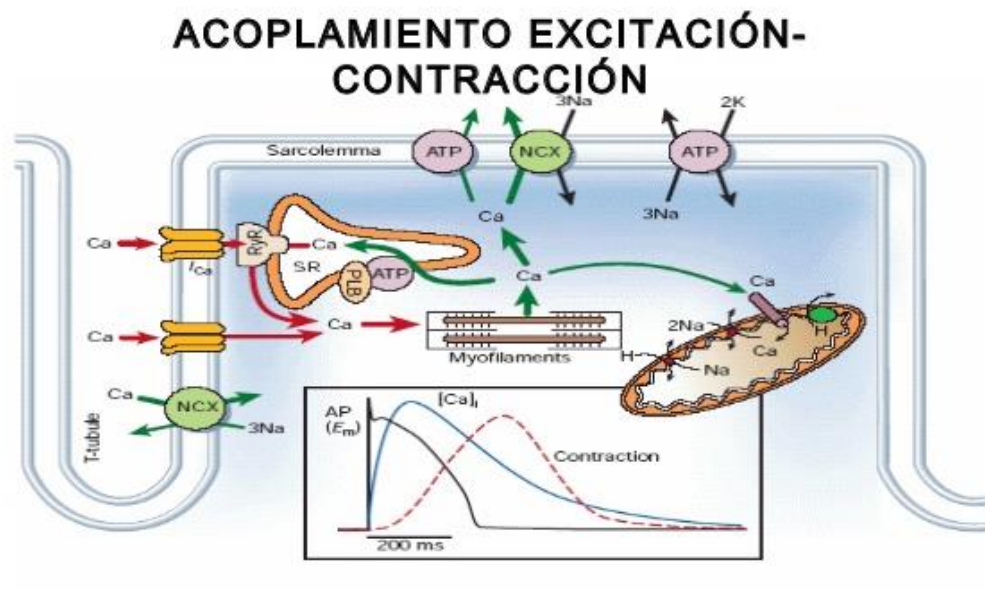


Figura 15. Esquema ilustrativo del funcionamiento de la célula muscular, donde se aprecia la presencia de bombas iónicas de membrana, y el papel central del Ca^{2+} .

Tomado de Guyton, A.C. Hall, J.E. Tratado de fisiología médica. 11ª ed. Madrid: Elsevier; 2006.

Fisiopatología del daño local por compresión e isquemia

Puede haber una muerte celular por una lisis mecánica, que directamente la destruya, o que le provoque lesiones irreversibles que pongan en marcha su apoptosis. Entre estas, se incluye el fracaso de la función de barrera por porosidad en la membrana o por malfunción de sus canales, o la estimulación del retículo sarcoplásmico, en ambos casos con el resultado de aumentar la concentración del calcio intracelular, lo que inicia una serie de cambios fisiopatológicos que enseguida analizaremos. Este daño que se inicia por factores mecánicos es principalmente atribuible a traumatismos durante la cirugía, y especialmente a la compresión mecánica que ejerce el manguito.

En lo respectivo a la isquemia, el daño se inicia cuando la célula muscular o miocito se ve privada del aporte sanguíneo, y con él se interrumpen la llegada de nutrientes y oxígeno. Esto impide la fosforilización oxidativa normal en la mitocondria, y la generación de energía por vía aerobia (“respiración mitocondrial”). En este contexto, la célula muscular

se ve obligada a llevar a cabo un metabolismo anaerobio, y hay una disminución de la producción de ATP. La necesidad de energía hace que cuando todo el Adenosin Trifosfato (ATP) ha sido hidrolizado a Adenosin Difosfato (ADP), éste último sea hidrolizado a su vez a Adenosin Monofosfato (AMP). Como veremos, el metabolismo de este AMP va a jugar un papel muy relevante en la génesis del síndrome de isquemia-reperfusión.

Cuando esta situación se prolonga en el tiempo, el metabolismo anaerobio (glicolisis anaerobia) da lugar a la acumulación de lactato y de protones (H^+), lo que lleva a una progresiva acidificación del medio intracelular¹⁴⁰. Esta acidificación, junto con la depleción del ATP, origina un descenso de la actividad de las bombas Na^+/K^+ -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasa, lo que finalmente conduce a un aumento de la concentración del Ca^{2+} intracelular.

El incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular constituye, como hemos señalado, el primer paso a partir del cual se inician varios procesos patológicos¹⁴¹, que llevan a la muerte de la célula muscular (rabdomiolisis):

- Contractura muscular mantenida, con gasto de las reservas de ATP.
- Aumento de la actividad de las proteasas citoplasmáticas, que degradan las proteínas miofibrilares.
- Activación de las fosforilasas Ca^{2+} dependientes, que lisan las membranas celulares (citoplasmática, mitocondrial, lisosomal...).
- Activación de nucleasas o fosfodiesterasas, que degradan los ácidos nucleicos.
- Disminución de la producción mitocondrial de ATP por inhibición de la respiración mitocondrial, lo que unido a la depleción de las reservas existentes de ATP lleva al colapso energético.

Un esquema de este proceso puede apreciarse en la figura 16.

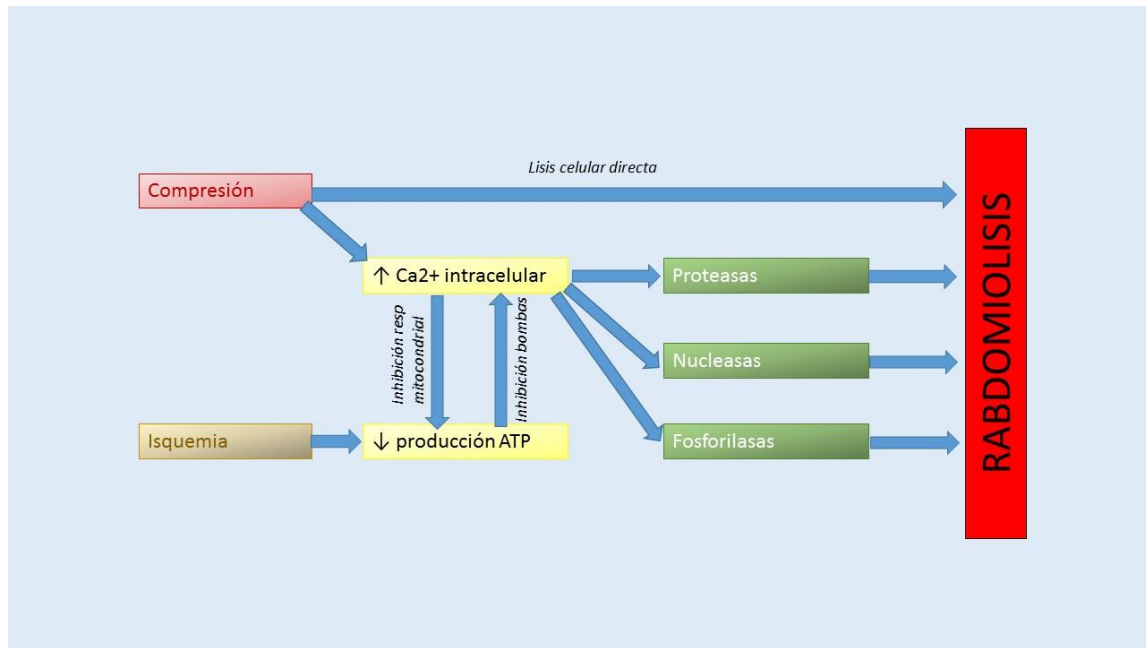


Figura 16. Algoritmo etiopatológico de la rhabdmiolisis por compresión e isquemia.

Modificado de Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. Crit Care Clin 2004;20:171–92.

Además de esto, otro efecto importante es el desarrollo de edema celular. La membrana plasmática se altera al inhibirse la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, que normalmente transporta el Na^+ hacia el exterior celular y el K^+ hacia el interior. De esta forma, y debido a la elevada concentración de cloro extracelular y la elevada concentración protéica intracelular el cloro penetra dentro de la célula con un catión (sodio y calcio) arrastrando agua y el potasio sale fuera para mantener el equilibrio iónico con el espacio intersticial (efecto Donnan: se crea una presión oncótica coloidal intracelular alta). El edema celular resultante va a tener consecuencias, como veremos, durante la reperusión.

Fisiopatología del daño local por el síndrome de isquemia-reperusión

Además de estos cambios intracelulares, con la reperusión de los tejidos sometidos al daño descrito, entran en acción una serie de agentes que van a amplificar ese daño local y

van a extenderlo al conjunto de la economía: las citocinas y el complemento, los polimorfonucleares activados –básicamente neutrófilos-, los radicales libres de oxígeno, y la alteración de la permeabilidad capilar. Nos centraremos primeramente sólo en el daño local, donde está clásicamente reconocido que el daño originado durante la reperfusión es mayor que el originado durante el periodo de isquemia¹¹⁸. Por otra parte, en el futuro nos referiremos indistintamente a PMNs y a neutrófilos, dado el papel muy mayoritario de estos últimos en el conjunto de los PMNs.

Como es sabido, las **Citocinas** son un conjunto amplio y diverso de proteínas, cuya misión es la comunicación intercelular. De esta manera, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. No obstante, su función principal, y la que más nos interesa analizar ahora, es la modulación de la respuesta inflamatoria, existiendo citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias^{142,143}.

Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMNs), células endoteliales, epiteliales, adipocitos, células musculares y del tejido conjuntivo.

El papel de las citocinas en el desarrollo del síndrome de isquemia-reperfusión ha sido ampliamente estudiado, siendo algunos de los principales implicados Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Tromboxano A2 (TXA2) y los Factores de Necrosis Tumoral (TNF). Estas citocinas median las señales entre el leucocito activado y el endotelio vascular, y parece que son también responsables de la adhesión selectiva de los leucocitos a dicho endotelio y la migración a su través^{144, 145, 146, 147, 148, 149}. De esta forma, en los tejidos sometidos al insulto isquémico van acumulándose estas citocinas, que al extenderse a la circulación sistémica con la reperfusión activan, reclutan y atraen leucocitos a dichos tejidos, sentando las bases para que éstos inicien un daño por reperfusión que en seguida describiremos.

En cuanto al **Sistema del Complemento**, sabemos que constituye una de las herramientas de la respuesta inmune innata. Consta de un conjunto de moléculas plasmáticas implicadas

en distintas cascadas bioquímicas, cuyas funciones son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células incluyendo la apoptosis. El Complemento se activa por 3 vías: clásica, alternativa, y de las lectinas.

En general, los integrantes de este sistema se nombran con una C seguida de un número que indica el orden de participación en la cascada (del 1 al 9). Las tres vías tienen un acontecimiento común que consiste en la formación de la C3 convertasa, enzima capaz de convertir C3 en C3b y C3a. La vía clásica se activa fundamentalmente por complejos antígeno-anticuerpo. La vía de las lectinas se activa por la presencia de ciertos azúcares (mananos) que aparecen en la superficie de las bacterias. La vía alternativa no necesita anticuerpos para activarse, al ser un sistema más primitivo.

Cuando la activación llega hasta el final tiene lugar la lisis celular (destrucción de la célula), proceso en el que intervienen los componentes de C5 hasta C9 (complejo de ataque a membrana). Esta fase final de la cascada tiene como resultado la formación de grandes poros en la membrana, alterándose el equilibrio osmótico y destruyendo el agente patógeno o la célula afectada¹⁵⁰.

En este contexto, se propone que las células sometidas a isquemia expresan en su superficie un neoantígeno o “antígeno de isquemia”, al cual se une la IgM circulante con la llegada de la reperusión. Esto desencadena la unión de C1 al complejo y la activación del complemento, pasando por la formación de C3a y C3b y luego de los complejos de ataque a membrana, que en última instancia dañan los tejidos sometidos a isquemia^{151, 152}. Además, estos complejos estimularían el metabolismo del ácido araquidónico, precursor de la síntesis de eicosanoides, y presente en las membranas celulares que destruyen. De este modo favorecería a su vez la formación de citocinas y otros mediadores pro-inflamatorios, como Prostaglandina E2, Leucotrieno B4, tromboxano B2, IL-1, y favorecería también la producción de radicales libres de oxígeno^{153, 154}.

El papel del Complemento como catalizador del daño por síndrome de isquemia-reperusión a nivel local y sistémico ha sido demostrado en modelos animales, con un menor daño en ratones con déficit de C5 o tratados con inhibidores del complemento^{155, 156}.

^{157, 158, 159, 160}. En humanos, la activación del complemento es clásicamente reconocida por el incremento de los niveles de C3a y C5a tras la isquemia de miembros inferiores^{161, 162}.

Los **radicales libres de oxígeno (RLO)**, en literatura inglesa *Reactive oxygen species (ROS)*, juegan un papel central en el desarrollo del Síndrome de Isquemia-Reperfusión. Por ello, merece la pena hacer una breve descripción de los mismos, antes de explicar sus efectos.

Se llama radical a cualquier especie atómica o molecular que tenga un electrón o más no apareados en su órbita externa. Los radicales son por lo general muy reactivos y buscan con avidez completar su par electrónico. Esto puede lograrse mediante una reacción entre dos radicales, con lo cual ambos dejan de serlo, o bien, sustrayendo un electrón de otra molécula, la cual se convierte entonces en un radical. Este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, es decir la propagación del fenómeno inicial, que incluye la peroxidación lipídica de los lípidos de membrana¹⁶³.

En condiciones normales, el cuerpo elimina el 95% del oxígeno transformándolo en agua en una reacción catalizada por la citocromo oxidasa mitocondrial. Sin embargo, el 5% restante se procesa por la denominada reducción univalente del oxígeno, que consiste en que el oxígeno se va reduciendo de un en un electrón, originando por tanto de forma fisiológica radicales libres de oxígeno, sustancias con un número impar de electrones.

Así, los radicales libres de oxígeno son metabolitos tóxicos que presentan estados intermedios de reducción electroquímica del oxígeno al agua^{164, 165}.

Se señalan los principales RLO en el orden en que se produciría dicha reducción progresiva. Además, se añaden por su importancia otros RLO producto de la reacción con otras moléculas. Como se aprecia, se suelen representar con el signo de la carga aniónica y un punto cuando existe un electrón no apareado.

- Anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$): Suele constituir el primer paso en la reducción del oxígeno, y ser la fuente a partir de la cual se forman el resto de RLO.

- Peróxido de hidrógeno (**H₂O₂**): El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a pesar de no ser en sí un radical, tiene una importancia vital, ya que en presencia de los metales de transición Cu⁺ o Fe²⁺ da lugar a la reacción de Fenton con la producción de radical hidroxilo (·HO).
- Radical hidroxilo (**·HO**): el radical hidroxilo formado es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos, a velocidades sólo limitadas por su difusión.
- Oxígeno singular (*oxigen singlet*) (**¹O₂**): Como no tiene electrones no apareados, no constituye estrictamente un RLO, pero por su gran reactividad e intervención en muchas reacciones en las que participa el O₂ molecular, se suele incluir en dicho grupo. Tiene una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo lípidos de membrana.
- Ácido hipocloroso (**HOCl**): no se forma directamente por reducción progresiva del oxígeno, sino a partir de H₂O₂ por acción de la Mieloperoxidasa (MPO). Es un ion no disociado del cloro dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Es una molécula que a su vez reacciona con otras moléculas produciendo nuevos RLO, expandiendo la reacción.
- Peroxinitrito (**OONO⁻**): formado por reacción entre ·O₂⁻ y NO. De especial importancia a nivel del endotelio vascular.

En la tabla 17 se muestra la reducción progresiva del oxígeno, hasta la formación de agua, con la producción de algunos de los radicales descritos. En la figura 18, por otra parte, se muestran las reacciones formadoras de nuevos RLO a partir del ácido hipocloroso.

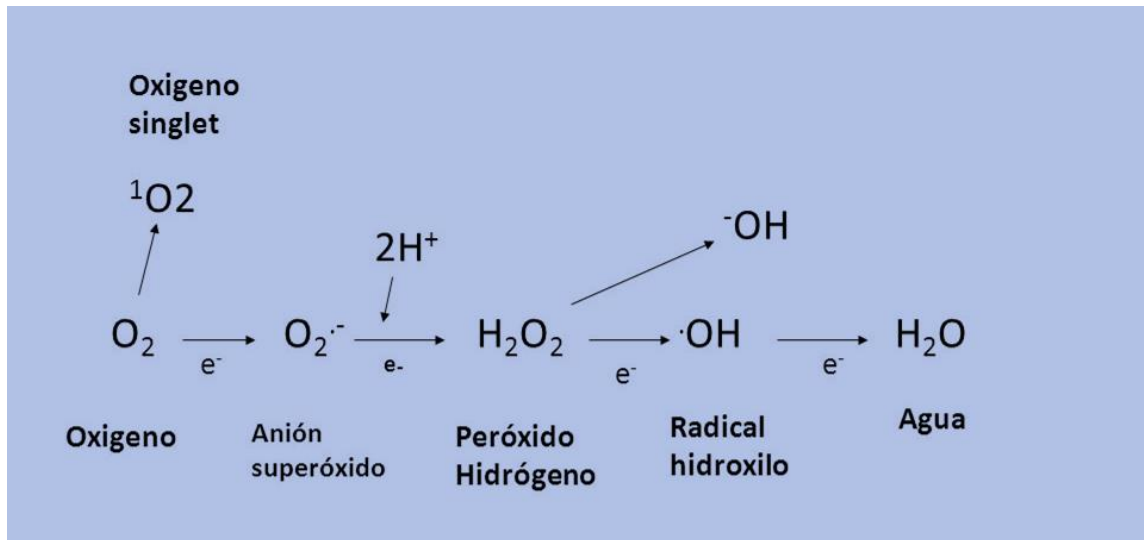


Figura 17. Formación de radicales libres a partir de la reducción del oxígeno.

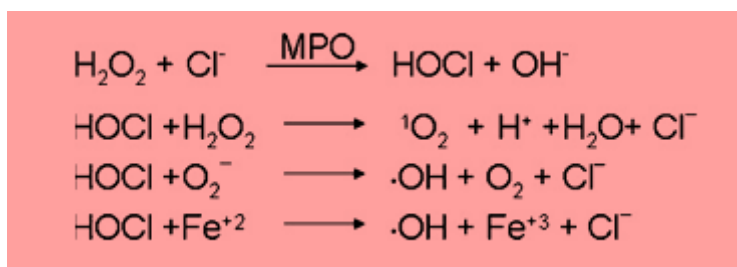


Figura 18. Formación de radicales libres a partir del ácido hipocloroso.

Tomado de Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. Injury 2012;43(6):670-5.

Sin embargo, esta reacción de reducción fisiológica se exagera de forma patológica, cuando en tejidos en los que se han acumulado una serie de metabolitos durante un periodo de isquemia, vuelve a recibir oxígeno con la reperusión.

La producción de los RLO en el tejido sometido a isquemia y reperusión se realiza básicamente a partir de la Xantina Oxidasa (XO) y de los neutrófilos activados.

La Xantina Oxidasa es una enzima presente en el endotelio microvascular del tejido muscular, en condiciones normales en una célula no isquémica, en forma de Xantina Deshidrogenasa (XDH) dependiente de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en su forma oxidada (NAD⁺).

Durante la isquemia, XDH se convierte progresivamente en XO. La acumulación de XO, junto con la acumulación de Hipoxantina, producto de degradación del ATP, ADP y AMP, sientan las bases para la producción de radicales libres de oxígeno, con la llegada de la reperusión: la XO cataliza la conversión de Hipoxantina a Xantina, y de esta reacción resulta la producción de un anión superóxido. Este último iniciará una cadena de oxidación-reducción, con producción de nuevos radicales libres^{166, 167, 168}. Se muestra un pequeño resumen de esta reacción en la figura 19.

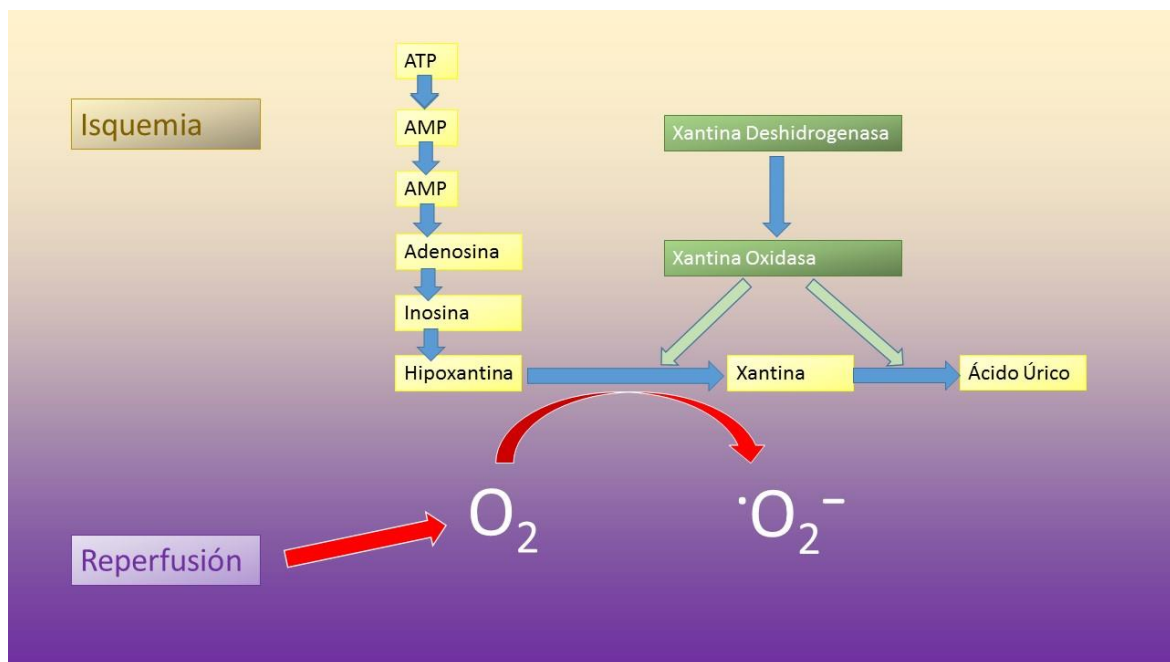


Figura 19. Formación de anión superóxido a partir de la Xantina Oxidasa.

Además del anión superóxido resultante de la acción de la XO, otra de las principales fuentes de RLO proviene de la activación de los neutrófilos, que de forma fisiológica cuentan con un amplio arsenal de radicales para su función bactericida, pero que en este caso van a dañar las células propias. Entre los radicales producidos por los neutrófilos destacan:

- Anión superóxido, formados por acción de la Fagocito Oxidasa sobre la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), en este caso en su forma reducida (NADH)¹⁷⁹.
- Peróxido de hidrógeno, por la acción de la Superóxido Dismutasa (SOD) sobre el anión superóxido.
- Ácido hipocloroso, producto de la reacción catalizada por la Mieloperoxiadasa (MPO) a partir del peróxido de hidrógeno, como se ha descrito anteriormente.
- Peroxinitrito, resultado de la reacción de NO con el anión superóxido, como también se ha explicado.

En cualquiera de los casos, los RLO generados producen un daño molecular directo o indirecto¹⁶⁹.

Dentro del daño directo, se describen:

- Modificaciones de los ácidos nucleicos y rupturas del ADN^{170, 171}.
- Despolimeración de mucopolisacáridos y del ácido hialurónico, así como degradación del colágeno¹⁷².
- Inactivaciones enzimáticas, en particular por oxidación de grupos sulfhidrilo, lo cual puede por sí mismo alterar la integridad de las membranas¹⁷³.

El daño indirecto es aquel derivado de la reacción del RLO, principalmente anión superóxido, con otras moléculas, alterándolas y convirtiéndolas a su vez en nuevos radicales libres. El proceso principal en este sentido es el de lipoperoxidación, que constituye la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares. De ello resulta una reacción en cadena con formación de radicales libres intermedios que son altamente reactivos y, por tanto, extremadamente tóxicos^{164, 175}. La riqueza en ácidos grasos insaturados de las membranas celulares e intracelulares nos dan idea de la gravedad potencial de las lesiones de membrana, que pueden conducir a la pérdida de función de barrera de la misma y, finalmente, a la apoptosis celular.

Por otra parte, la progresión de la cascada oxidativa sobre los lípidos de membrana conduce a la activación de las vías de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, con formación de compuestos cíclicos como los eicosanoides, de tipo prostanoides (protaglandinas, tromboxano, prostaciclina), o leucotrienos. Se considera que la activación de dichas vías junto con la liberación de iones de metales de transición (como el Fe^{2+}), contribuyen a la expansión de la lipoperoxidación en los tejidos vecinos, cerrando un círculo vicioso¹⁷⁶. Además, los productos de la vía de la lipooxigenasa contribuyen a la activación de más neutrófilos¹⁷⁷.

Merece destacar en esta peroxidación lipídica el papel del ácido hipocloroso (HOCl), producido fundamentalmente a partir de la Mieloperoxidasa (MPO), ya que se le considera actualmente el actor principal en la misma^{179, 180, 181}. En especial, resulta especialmente dañina la formación de oxígeno singular ($^1\text{O}_2$), a partir de HOCl y H_2O_2 ; y del radical hidroxilo ($\cdot\text{HO}$), a partir del y Fe^{2+} . Tanto $^1\text{O}_2$ como $\cdot\text{HO}$ son radicales de vida muy corta pero extremadamente reactivos.

Llegamos finalmente a la descripción de los PMNs **neutrófilos**, principales células ejecutoras del sistema inmune. Estas células van a migrar al tejido que ha soportado la isquemia, atraídas por los factores quimiotácticos liberados, principalmente citocinas, y van a desarrollar una acción dañina sobre el mismo, a través principalmente de la liberación de los gránulos contenidos en su citoplasma, y que liberan al espacio extracelular cuando son activados. Estos gránulos son de cuatro tipos¹⁷⁸:

- Azurófilos o primarios: contienen Mieloperoxidasa (MPO), lisozima, hidrolasas ácidas y proteasas neutras, entre ellas elastasa. Ya hemos destacado la importancia capital de la MPO en la generación del ácido hipocloroso, iniciando la cascada de peroxidación lipídica.
- Específicos o secundarios: más grandes, contienen lisozima, colagenasa, gelatinasa, apolactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina. Se considera que los productos de los gránulos específicos podrían tener un papel en la activación del Sistema del Complemento, antes comentado¹⁸³. Además, la

apolactoferrina y la colagenasa juegan un papel relevante en la adhesión de los neutrófilos al tejido diana¹⁸⁴.

- Terciarios: con contenido en gelatinasa y catepsinas, podrían tener una función también de facilitar la adhesión del neutrófilo¹⁸⁵.

Aunque las citocinas son parcialmente responsables del **aumento de la permeabilidad vascular**, este efecto es resultado de varios factores más. Los propios leucocitos activados que llegan al foco de quimiotaxis, se adhieren al endotelio y crean un “microambiente” que resulta en un aumento de la porosidad endotelial, cuando no en su disrupción¹⁸⁶. La pérdida de competencia de la barrera microvascular continúa cuando los PMNs migran al espacio extracelular (intersticial) y liberan las enzimas citotóxicas y RLO descritos⁵⁰.

También parece tener un papel central al respecto el óxido nítrico (NO), que en condiciones normales es un importante regulador del tono de vasodilatación vascular. Durante la isquemia, hay un descenso en la producción de NO, mediada principalmente por una menor actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS en inglés), y parte del poco NO disponible reacciona durante la reperusión con el anión superóxido, lo que da lugar a la formación del radical Peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$), tal y como se ha descrito anteriormente. Parece que la combinación de la disminución de la biodisponibilidad del NO, y la formación de $\text{OONO}^\cdot$ tienen como efecto un aumento patológico de la permeabilidad endotelial¹⁸⁷.

El resultado de la disfunción de la barrera microvascular es la salida de proteínas plasmáticas al espacio extracelular, lo que origina un aumento de la presión oncótica o coloidosmótica intersticial. La salida de proteínas desde el espacio vascular arrastra agua, resultando un edema en el espacio intersticial, que junto con el edema intracelular, lleva a una compresión de los capilares, e incluso a su oclusión completa y/o trombosis. Es más, se ha propuesto que la acumulación y adhesión de leucocitos en los vasos pueden *per se* llevar a su trombosis¹⁸⁸.

Este empeoramiento paradójico de la perfusión microvascular tras un periodo de isquemia, que se conoce como el “fenómeno de no retorno”, repercute en la célula muscular, que no

puede satisfacer sus demandas energéticas con la llegada de la perfusión, y lleva a la necrosis muscular.

Se muestra el esquema completo del desarrollo fisiopatológico del daño por compresión, isquemia y perfusión en la figura 20.

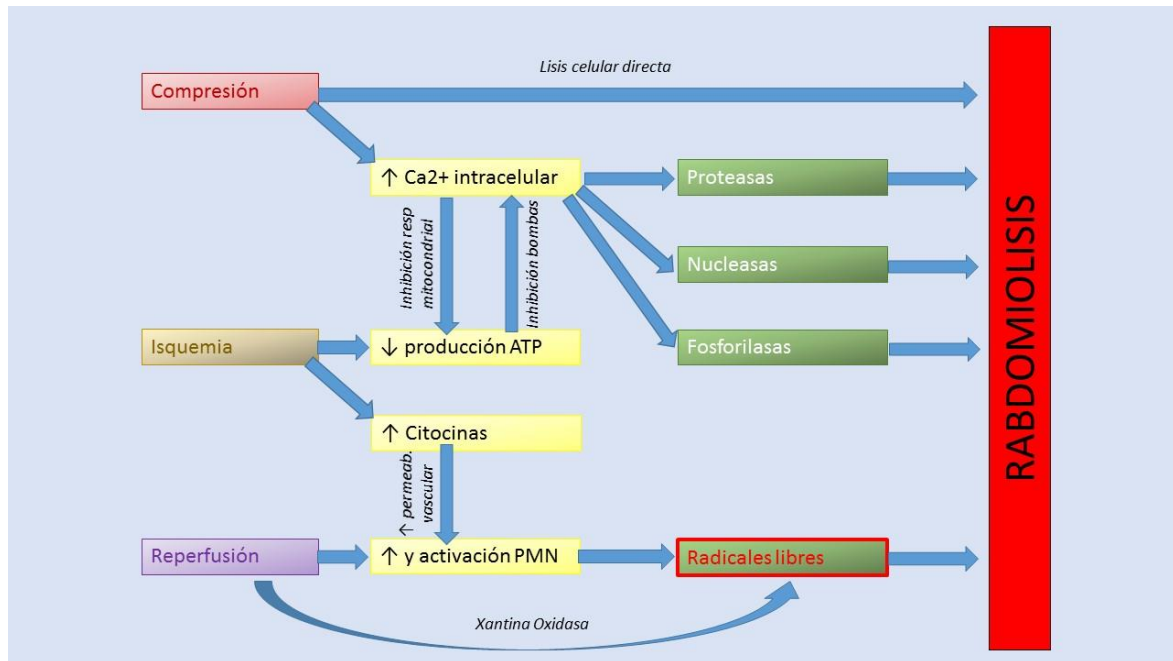


Figura 20. Algoritmo patogénico de la rabdomiolisis.

Modificado de Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. Crit Care Clin 2004;20:171–92.

Fisiopatología del daño sistémico

Ya hemos mencionado y seguiremos analizando que para las isquemias programadas estándar realizadas en Traumatología y Cirugía Ortopédica, es rara la aparición de complicaciones sistémicas relevantes. Para que las mismas aparezcan es necesario un daño local mucho mayor, y nuestro conocimiento en ese sentido deriva más bien de la experiencia en catástrofes con aplastamientos de extremidades (*crush syndrome*) y/o daño arterial agudo, y de las isquemias prolongadas tras embolismo arterial agudo.

La repercusión sistémica del daño va a tener dos orígenes fundamentales: el desequilibrio iónico y la producción de metabolitos a nivel local que resultan tóxicos a nivel sistémico¹⁸⁹, y la acción de radicales libres de oxígeno a distancia del foco inicial¹⁹⁰.

El **desequilibrio iónico** entre medio intracelular y extracelular que se van desarrollando durante la isquemia, como se ha explicado, dan lugar a la acumulación intracelular de iones como sodio y calcio, y la salida al medio extracelular de otros típicamente intracelulares, destacando el potasio. Este desequilibrio da lugar al secuestro de líquidos a nivel intracelular y en el tercer espacio en el miembro reperfundido, y un descenso del volumen circulante eficaz. Además, el desarrollo de un metabolismo anaerobio durante el periodo isquémico origina varios **metabolitos** de desecho, como las purinas, y una acidosis local. Por último, la muerte celular facilita la salida de moléculas intracelulares como la Creatin Kinasa (CK), Lactato Deshidrogenasa (LDH) o la Mioglobina (Mb). Con la llegada de la reperusión, estos desequilibrios locales se transmiten al torrente sanguíneo, desarrollándose hiperpotasemia, hiperuricemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia, acidosis - debida mayormente a la formación de lactato-, y aumento de CK y Mb. Además, el aumento de permeabilidad vascular en los vasos del miembro reperfundido y el desarrollo de edema celular y del aumento de la presión coloidosmótica en el espacio intersticial llevan al secuestro de líquido en el miembro, y el eventual desarrollo de una hipovolemia y una hemoconcentración.

De los metabolitos liberados al torrente sanguíneo, son especialmente deletéreos el potasio y la Mb. Por una parte la hiperpotasamia, si es suficientemente alta y asociada a la hipocalcemia y descenso del volumen sanguíneo circulante, es capaz de provocar arritmias cardíacas e incluso parada cardíaca y muerte. El propio desequilibrio de fluidos puede dar lugar a un shock hipovolémico o distributivo. Por otra parte, la Mb liberada al torrente sanguíneo debe ser filtrada por el riñón. La depleción de volumen plasmático y la liberación en el mismo de ácidos resultantes del metabolismo anaerobio dan lugar a un descenso del pH urinario, y esto da lugar a la precipitación de la Mb en gel, llegando a obstruir los glomérulos. El descenso del volumen circulante junto con la precipitación de la Mb puede dar lugar a una necrosis tubular aguda y fallo renal, también eventualmente letal.

Por último, hay un aumento de la actividad de tromboplastina, que puede dar lugar a una hipercoagulabilidad, y el desarrollo de una coagulación intravascular diseminada (CID).

Como se ha dicho, otra parte del daño sistémico puede devenir de la acción de los **radicales libres** a distancia del foco original. Se ha descrito la posibilidad de aparición de un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS o *SIRS* en inglés) con fracaso multiorgánico, tras una isquemia de miembros inferiores, sobre todo en pacientes críticos¹⁹¹. Se postula que la liberación de mediadores pro-inflamatorios como las citocinas y los RLO en el lugar de la isquemia, lleva a una activación leucocitaria y del endotelio vascular en múltiples lechos además del foco original^{192, 193, 194, 195}. El pulmón sería el órgano más vulnerable, con posibilidad de desarrollar un distrés respiratorio agudo o insuficiencia respiratoria dentro de las 24 a 72 horas posteriores al evento isquémico, mediado por el incremento de la permeabilidad microvascular y la acumulación de neutrófilos en el lecho pulmonar^{196, 197}. Los siguientes órganos con posibilidad de disfunción mediada por el SRIS y formación de RLO a distancia del foco original, serían el hígado, el riñón, el sistema gastro-intestinal, el sistema nervioso central, y el miocardio; por último, pueden desarrollarse trombosis, coagulación intravascular diseminada e inmunocompromiso^{190, 198}.

Conviene remarcar una vez más que durante la realización de isquemias programadas estándar de menos de 3 horas de duración, y con manguitos neumáticos a presiones razonables, no es esperable ver semejantes complicaciones, pero conviene conocer los mecanismos fisiopatológicos de daño sistémico, porque sí pueden apreciarse leves cambios analíticos de los parámetros descritos.

Se resumen los cambios fisiopatológicos descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los principales agentes implicados en el daño sistémico, y la acción que desarrollan, tras una isquemia de extremidades.

Agente	Efecto
Potasio	Hiperpotasemia y cardiotoxicidad, asocia hipocalcemia e hipovolemia
Fosfato	Hiperfosfatemia, empeorando la hipocalcemia
Ácido orgánicos	Acidosis metabólica y aciduria
Mioglobina	Mioglobinuria y nefrotoxicidad
Purinas	Hiperuricemia, cristales ácido úrico
Creatin Kinasa	Elevación de niveles plasmáticos de CK
Tromboplastina	Coagulación Intravascular Diseminada
Agua, Sodio, Calcio	Hipovolemia, inestabilidad hemodinámica, fallo prerrenal, hipocalcemia, depósito calcio en células musculares dañadas
Radicales libres	SRIS, fracaso respiratorio y multiorgánico

Traducción clínica de las alteraciones descritas

Lesión de la piel

Como se ha señalado en apartados anteriores, la piel puede lesionarse tras la utilización de un manguito neumático u otro dispositivo de isquemia. No obstante, la aparición de lesiones es rara, describiéndose una frecuencia de 0.04% al 1.5% de los casos^{88, 93}. Puede tratarse de daños por compresión, por lesión térmica o química^{11, 88, 93, 96}, y el espectro de lesiones varía desde la aparición de enrojecimiento, a la aparición de flictenas, despegamientos cutáneos o necrosis. La inmensa mayoría de las veces suele tratarse de lesiones menores, y con resolución espontánea⁸⁸, cuya incidencia además podría disminuirse siguiendo las recomendaciones anteriormente señaladas^{21, 91, 92}.

Daño neurológico

Hemos visto que a nivel anatomopatológico y electroneuromiográfico se aprecian alteraciones de los nervios periféricos en el miembro sometido a isquemia en la amplia mayoría de los individuos, tanto en modelos animales como en la experiencia clínica. Recordemos, en ese sentido, que se han descrito alteraciones electroneuromiográficas y de velocidad de conducción nerviosa en la extremidad intervenida de hasta un 62,5% de los pacientes sometidos a una cirugía ortopédica con manguito de isquemia¹⁰⁵.

No obstante, dichas alteraciones tienen en general una escasa trascendencia clínica. No hay unanimidad a la hora de cuantificar la incidencia de lesiones nerviosas clínicamente detectables en el corto plazo, con registros que oscilarían entre un 0,1% a un 7,7%^{11, 78}. El 0,1% corresponde a un registro escandinavo de todo tipo de cirugías bajo isquemia realizadas por Cirujanos Ortopédicos en Noruega¹¹. El 7,7% se describe tras cirugías de artroplastia total de rodilla, en las que el tiempo medio fue bastante más largo del habitual, de 145 minutos⁷⁸. Esta discrepancia podría explicarse por una parte porque los tiempos más largos de isquemia se relacionan con mayor riesgo de lesión neurológica, y por otra parte por la posibilidad de que se establezcan distintos criterios en lo respectivo a la definición de “lesión neurológica clínicamente detectable”. Sí hay consenso en que, a pesar de que las lesiones parecen más frecuentes en miembro superior que en el inferior¹¹⁴, el nervio ciático poplíteo externo es el más vulnerable de las extremidades, probablemente

por su posición subcutánea en la vecindad de la rodilla. También hay consenso, y esto es lo más importante en este apartado, en que salvo contadas excepciones, en la inmensa mayoría de los casos las lesiones detectadas corresponden a neuroapraxias con resolución espontánea en el curso de pocas semanas^{11, 67, 78, 101, 114}.

Es decir, que podemos concluir que el uso correcto del manguito de isquemia, en general, no da lugar a lesiones neurológica clínicamente relevantes, aunque ocasionalmente origina neuroapraxias autolimitadas y con resolución espontánea.

Cabe destacar por último en este apartado las parestesias de muy breve duración que pueden experimentar los pacientes con el retorno de la perfusión, de etiología no bien conocida, y que pueden ser vividas como una experiencia desagradable²¹.

Daño muscular: dolor, edema, retraso en la recuperación funcional.

El tejido muscular es, como hemos repetido ya en numerosas ocasiones, el más vulnerable al daño por cualquiera de las vías patogénicas explicadas. Además, el volumen muscular supone un porcentaje muy alto del volumen total del miembro. Esto hace que complicaciones locales del conjunto de la extremidad como el dolor, el edema, o el tiempo de recuperación funcional, puedan ser achacables principalmente al daño ocurrido sobre el tejido muscular. Siempre al margen, claro está, del daño inherente a la propia cirugía que motivó la isquemia.

Bruner acuña en 1951 el término, hoy casi abandonado, de “síndrome post-torniquete”, que se caracteriza por debilidad, rigidez articular, disestesias, y dolor¹⁹⁹. Actualmente se acepta que dicho “síndrome” obedece principalmente a la isquemia y necrosis muscular, el edema intracelular y del tercer espacio, y la congestión microvascular²⁰⁰, todo ello originado según lo descrito en el apartado de fisiopatología.

Hay un interés creciente en los últimos años por definir la parte del daño quirúrgico que es atribuible sólo al uso del manguito de isquemia, y las consecuencias funcionales que pueda tener. Se acepta que las diferencias entre usar o no usar un manguito de isquemia pueden ser sutiles, y de hecho, ya hemos mencionado que hay multitud de estudios experimentales y clínicos que indican que no hay diferencias en el largo plazo^{31, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85}.

Pero se considera que en el corto y medio plazo sí puede tener un impacto cuantificable, con respecto a la recuperación funcional. En este sentido, hay multitud de trabajos recientes que comparan una misma cirugía, llevada a cabo con o sin isquemia, para evidenciar estas diferencias. La mayoría de la bibliografía se centra en cirugías de artroplastia de rodilla, seguida a distancia de cirugías en el tobillo y pie, y por último cirugías en extremidad superior^{31, 33, 77, 79, 81, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214}.

Con respecto al **dolor**, casi todos los estudios de nivel de evidencia I y metaanálisis recientes, muestran una disminución estadísticamente significativa del dolor cuando no se emplea manguito de isquemia, en algunos sólo durante los primeros días^{201, 202, 204, 207, 208, 210, 209, 212, 213}, en otros casos hasta las 2 semanas^{201, 208}, o en ocasiones incluso hasta 6 semanas tras la cirugía³¹. En extremidad superior, en un metaanálisis reciente, se concluye que aun cuando las carencias metodológicas y el tamaño de las muestras impiden alcanzar una significación estadística, la tendencia a una disminución del dolor en los pacientes no sometidos a isquemia parece clara³³.

Cuando se evalúa el **edema** en la extremidad intervenida, empleando o no isquemia, se detecta un incremento en los pacientes operados con torniquete. Las diferencias alcanzan significación estadística sólo durante los primeros días²¹², 2 semanas⁸¹, o 6 semanas³¹. Un metaanálisis reciente parece confirmar ese mayor edema a las 6 semanas, que se cuantifica en un incremento medio del perímetro del tobillo en 0,8cm, en cirugías de pie y tobillo²⁰⁷. En otros casos, no llegan a detectarse diferencias significativas en ningún momento^{33, 201, 202, 205}.

Otro parámetro relevante es la recuperación del **balance articular** en el miembro intervenido. Se describe un rango articular significativamente mayor en extremidades intervenidas sin isquemia en los primeros días^{211,212}, a las 2 semanas⁸¹, 6 semanas³¹ u 8 semanas²¹³. En un metaanálisis reciente sobre prótesis de rodilla, se cuantifica en 10º más, de media, la recuperación del rango articular a los 10 días tras la cirugía, cuando no se emplea manguito neumático. Existe incluso un ensayo clínico aleatorizado donde se descubren diferencias de forma residual, a los 2 años tras la cirugía, a favor del no uso del

manguito²⁰⁶. En otros estudios donde se ha evaluado el rango articular, no se encuentran diferencias en ningún punto^{201,205}.

También se ha medido la **recuperación de la fuerza**, sobre todo en cuádriceps. En dos recientes trabajos, se detecta una disminución significativa de la fuerza de contracción del cuádriceps en las primeras semanas y hasta 3 meses después de la cirugía, cuando se utilizó un manguito neumático^{77, 202, 205}. La fuerza tardó en normalizarse por completo entre 6 y 12 meses²⁰².

En ocasiones se han medido los resultados con **escalas de valoración funcional** (KOOS, WOMAC, Oxford). En un ensayo clínico aleatorizado se encuentran resultados mejores, con significación estadística, a las dos semanas tras una cirugía de artroplastia de rodilla, en los pacientes no sometidos a isquemia; posteriormente las diferencias pierden significación estadística²¹³. En otro ensayo, aunque hay resultados levemente favorables a la cirugía sin manguito, no se llegan a alcanzar diferencias significativas⁸¹, y lo mismo ocurre en dos metaanálisis^{202, 203}.

En consideración de la mejora de los parámetros descritos, se considera que el no emplear un manguito de isquemia repercute en una recuperación funcional más rápida^{212, 214}. En este sentido, al estudiar el **tiempo de retorno al trabajo**, un trabajo ya clásico describe una reincorporación 7 días antes en los pacientes operados sin isquemia, al osteosintetizar una fractura de tobillo²¹⁵; sin embargo, otros estudios recientes no encuentran diferencias^{207, 208, 211}. Lo mismo cabe decir respecto al **tiempo de ingreso**, donde sólo hay un estudio de calidad, un ensayo clínico aleatorizado, donde se aprecian ingresos más largos para una determinada cirugía –osteosíntesis de fractura de tobillo–, en los pacientes sometidos a isquemia³¹. No obstante, el propio estudio reconoce que al excluir a los pacientes que sufrieron complicaciones, desaparecía la significación de las diferencias entre operados con o sin isquemia. Esto parece congruente con otros estudios, que tampoco aprecian diferencias en el tiempo de ingreso^{33, 81, 201, 207}.

Daño sistémico y otros daños

Trataremos de aclarar, por último, la implicación que pueden tener las alteraciones sistémicas a las que se ha hecho mención en apartados anteriores.

En lo respecto al **sangrado**, existe cierta controversia. Como se ha ido desgranando al principio de este trabajo, clásicamente se consideraba que el uso del manguito reduciría el sangrado derivado de una intervención. Hay varios estudios actuales donde efectivamente, se aprecia una disminución del sangrado, pero sólo si nos ceñimos exclusivamente al tiempo quirúrgico^{35, 205, 211, 213}. Por contra, en otros trabajos en los que se ha evaluado el periodo postoperatorio, se sugiere que el uso del manguito de isquemia podría incrementar el volumen de sangrado a nivel intraarticular y a través de los drenajes en el postoperatorio^{123, 124, 125, 126}. Cuando se considera el sangrado total, en estudios actuales con evidencia de calidad y metaanálisis, no se aprecian diferencias usando manguito de isquemia o no^{34, 35, 205, 213}. De esta forma, el manguito reduciría el sangrado durante la cirugía, pero esto quedaría compensado por una mayor pérdida hemática en el postoperatorio, en el contexto de una mayor actividad fibrinolítica tras la retirada del manguito. Podemos concluir, en definitiva, que el uso de manguitos neumáticos u otros dispositivos de isquemia, no tienen una repercusión clínica relevante en lo relativo al sangrado.

En la otra cara de la moneda, hemos hecho referencia al estado pro-trombótico que parece establecerse con el uso de un torniquete, y que da lugar al aumento de **trombosis** y **tromboembolismo** antes descritos. Es muy importante destacar que hay una disociación entre los hallazgos patológicos en pruebas complementarias, y su repercusión clínica real. Así, en los estudios antes mencionados en los que se apreciaban datos de trombosis en venografía en hasta un 18% de los pacientes sometidos a una artroscopia con uso de manguito de isquemia¹²⁹, o microémbolos en ecocardiografía transesofágica en todos los pacientes sometidos a una artroplastia de rodilla bajo isquemia¹³⁰, es importante aclarar que en ninguno de los pacientes dieron lugar al desarrollo de una trombosis venosa o un tromboembolismo clínicos. De hecho, la mayoría de casos de problemas tromboembólicos clínicamente relevantes o incluso letales se describen en artículos clásicos “a propósito de

un caso^{216, 217, 218}, en los cuales la exanguinación o isquemia no se realizaron conforme a los estándares recogidos en el apartado de recomendaciones de uso. En algunas series sí se describe un aumento leve pero significativo del riesgo de trombosis venosa profunda (TVP) y tromboembolismo pulmonar (TEP) en cirugías de artroplastia de rodilla, cuando se emplea el manguito de isquemia^{219, 220, 221}. También se aprecia esta tendencia en un metaanálisis de cirugías de pie y tobillo, aunque sin alcanzar significación estadística²⁰⁷. En otros casos no se encuentran diferencias²²², y en algunos estudios se sugiere que en el riesgo de desarrollo de problemas de TVP o TEP puede jugar un papel mucho más determinante la agresividad de la cirugía²²³ o el tiempo de la cirugía²²⁴, más que el uso o no de manguitos de isquemia. Hay incluso un estudio antiguo que aprecia mayor riesgo de TVP cuando no se emplea el torniquete²²⁵, aunque no hay más trabajos que apunten en esta dirección. Puede concluirse, y así lo hace la inmensa mayoría de la bibliografía, que no hay evidencia suficiente en este sentido, como para desaconsejar el uso sistemático del manguito de isquemia, aunque debería tenerse especial precaución con pacientes con riesgos añadidos de desarrollo de problemas tromboembólicos^{21, 27, 114, 214}.

En relación con los **cambios metabólicos** que se gestan durante el periodo de isquemia, han sido estudiados desde hace largo tiempo^{82, 226, 227, 228, 229}. En estos estudios se detectan tras un periodo estándar de isquemia cambios leves en el pH, aumento de la concentración de ácido láctico, o variaciones en las concentraciones de la Xantina o Hipoxantina, con el inicio de la reperusión, que se normalizan en el curso de pocos minutos, sin transcendencia clínica. De forma experimental se ha demostrado asimismo una rápida normalización de estos parámetros incluso tras isquemias de 3 horas⁷⁰ y de 4 horas⁶⁶. También de forma experimental, se ha constatado un descenso de la Fosfocreatina, con normalización en escasos minutos, y sin descenso de los niveles de ATP, cuando se realiza una isquemia de hasta 3 horas⁶⁹.

Por otra parte, también se ha estudiado la posible transcendencia clínica de un daño multiorgánico y especialmente **daño pulmonar**, derivado del síndrome de isquemia-reperusión, tras cirugías con tiempos de isquemia estándar sobre miembro inferior. Se ha descrito un aumento de la permeabilidad microvascular, aumento del número de

leucocitos, y generación de RLO en tejido pulmonar tras una isquemia de duración estándar de miembros inferiores, en un estudio ya citado¹³⁶, así como alteración de parámetros de intercambio gaseoso como la PaO_2 o el ratio a/A ⁸³. Al igual que ocurría con los cambios metabólicos, estas alteraciones regresan a la normalidad en un plazo de minutos, y no parecen tener ninguna repercusión clínica.

Por último, se ha comentado que el uso de dispositivos de isquemia parece conllevar una hipoxia relativa a nivel de la herida quirúrgica¹⁰⁹, y que esto podría tener implicaciones en cuanto a la cicatrización de la herida y en cuanto a riesgo de **infección**²¹. Tampoco hay evidencia concluyente en este sentido, si nos fijamos sólo en metaanálisis. Si bien el metaanálisis recientemente mencionado sobre cirugías de pie y tobillo aprecia un dudoso aumento del riesgo de infección cuando se emplea manguito de isquemia²⁰⁷ y otro sobre artroplastia de rodilla detecta un aumento del riesgo de complicaciones locales entre las que está la infección con el uso del manguito²¹¹, esta tendencia no es compartida en otros estudios también sobre artroplastia de rodilla²¹⁴ o en extremidades superiores³³. De manera que parece que el uso de dispositivos de isquemia podría aumentar levemente el riesgo de infección de la herida quirúrgica, pero sin una fuerte evidencia.

Efecto en el tiempo quirúrgico

Aun siendo un aspecto que hemos mencionado al principio de esta tesis, merece la pena volver sobre él, al ser fuente de cierta controversia.

Se ha comentado que en la cirugía de la mano y en otras cirugías finas resulta imprescindible, pero que en el resto de operaciones, la inmensa mayoría, puede más bien considerarse un lujo. Hemos dicho en repetidas ocasiones que el uso de la isquemia facilita la disección quirúrgica, y hace que el procedimiento resulte más cómodo para el cirujano.

Todo lo anterior es algo que no resulta discutido. Sin embargo, sí hay debate respecto a si esa mayor facilidad o comodidad se traduce o no en una disminución del tiempo de cirugía. Es conveniente dejar a un lado las recomendaciones de expertos defendiendo una cirugía más larga sin isquemia³⁰ o que no hay diferencia²⁷, y fijarnos sólo en ensayos clínicos aleatorizados o metaanálisis. Si hacemos esa criba, podemos observar que hay dos estudios

que detectan un tiempo quirúrgico significativamente mayor cuando no se emplea el manguito de isquemia: en artroplastias de rodilla²¹¹ y en fijación de fracturas extraarticulares de tibia²⁰⁸, las cirugías de en torno a 70 minutos serían unos 5 minutos más largas. Sin embargo, el grueso de la bibliografía no detecta diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tiempo quirúrgico, en muy distintas localizaciones y técnicas quirúrgicas^{31, 32, 33, 202, 205, 207, 212, 213, 214}. Por ello, y como decíamos al principio, el uso de la isquemia en las cirugías de extremidades no parece tener una repercusión sobre el tiempo quirúrgico e incluso, si llegase a tenerlo, sería de tan escasa consideración que probablemente carece de importancia clínica.

Conclusión respecto a la relevancia clínica del uso de la isquemia en extremidades

De todo lo mencionado hasta ahora, cabe concluir que el uso de dispositivos de isquemia según los estándares establecidos y aceptados a nivel general, parece tener poca relevancia clínica con respecto al tiempo quirúrgico, sangrado, aparición de infecciones y otras complicaciones sistémicas y de otra índole, ya analizadas. Sin embargo, el daño tisular que se genera sí parece ocasionar un mayor dolor postoperatorio, y un mayor edema de tejidos, lo que en última instancia parece llevar a un tiempo de recuperación más lento, en el corto y medio plazo. En el largo plazo, incluso esos últimos aspectos se normalizan.

Tratamientos experimentales del Síndrome de Isquemia-reperfusión en miembros inferiores

Partiendo de la base de que el principal mecanismo lesivo tras el uso de un manguito neumático en extremidades es el síndrome de isquemia-reperfusión, y del conocimiento de la fisiopatología del mismo, son múltiples los tratamientos que se han propuesto. Al tener los radicales libres un papel central en la generación del daño, la mayoría de los tratamientos experimentales propuestos se dirigen a disminuir la concentración o efecto de los mismos.

Se presenta a continuación una revisión de aquellos tratamientos con mayor presencia en la literatura. Para una mayor claridad, se desarrollarán clasificados según su mecanismo de acción.

Antioxidantes

Denominados “*Scavengers*” en la bibliografía. Son un conjunto heterogéneo de moléculas, que tienen en común su capacidad de neutralizar los radicales libres de oxígeno, protegiendo así a las células de los efectos deletéreos de aquellos. En algunos casos son enzimas que favorecen su eliminación o no producción, en otras ocasiones son sustancias que aumentan la producción y actividad de estas enzimas, y finalmente en otros casos se trata de moléculas que reaccionan con los radicales libres, dando lugar a moléculas no reactivas.

Enzimas endógenas. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa, sistema glutatión reductasa/ glutatión peroxidasa

Descritas por primera vez en 1969²³⁰, las **superóxidos dismutasas** forman un conjunto de enzimas que están presentes en casi todas las células del cuerpo, y que de forma fisiológica tiene por misión la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio²³¹. La SOD cataliza la reacción de dos aniones superóxido para formar peróxido de hidrógeno.

Algo similar puede decirse de la **catalasa**, descrita mucho antes²³², que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua²³³.

Se señalan estas reacciones en la figura 21.

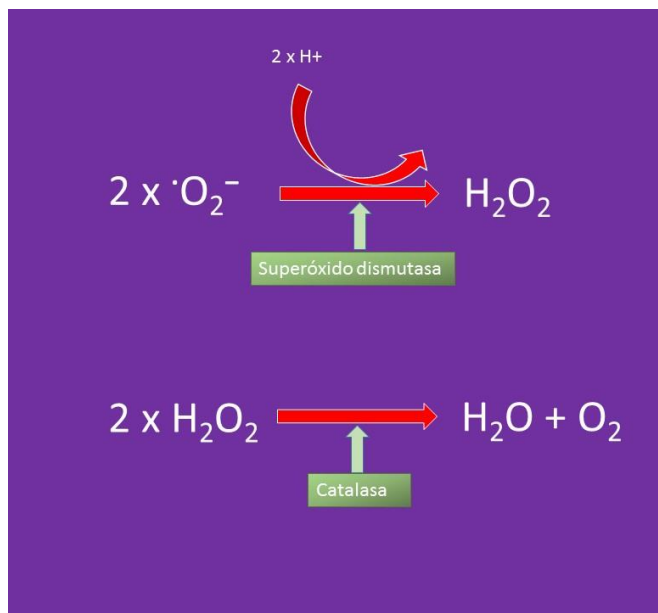


Figura 21. Neutralización del anión superóxido, tras la acción de Superóxido dismutasa y Catalasa, con formación final de agua y oxígeno.

También cabe destacar el papel que juega en la eliminación de radicales libres el **sistema glutathion peroxidasa/glutathion reductasa**. La glutathion reductasa es una flavoenzima dependiente del nicotinamin adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutathion oxidado (GSSG) a glutathion reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutathion peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno y de los lipoperóxidos²³⁴.

De forma fisiológica existe un equilibrio entre la producción de radical superóxido por la respiración celular, y la concentración de estas enzimas. En condiciones de sobreproducción patológica de radical superóxido, la cantidad disponible de sistemas antioxidantes no sería suficiente para neutralizar el mismo. Por ello, se ha propuesto la administración exógena de SOD y catalasa como tratamiento experimental del síndrome de isquemia-reperfusión en modelos de músculo aislado^{235, 236}. En estos estudios, un equivalente de la SOD, SC52608, disminuiría de forma significativa la cantidad de

malondialdehído (MDA) en músculo y su infiltración por neutrófilos, pero sin lograr diferencias significativas en cuanto a peso muscular como indicador de edema tisular.

Sin embargo, y al menos en aparato locomotor, existen dudas razonables sobre su efectividad in vivo en modelos animales^{236, 237} y en la práctica clínica²³⁸. Aunque sigue siendo una línea posible de tratamiento²³⁹, estas enzimas son más bien consideradas marcadores indirectos del daño por isquemia-reperfusión, en la medida en que su concentración aumenta en los tejidos en los que hay un incremento en la producción de radicales libres²⁴⁰. A pesar del papel central del sistema glutatión reductasa/ glutatión peroxidasa, no he hallado estudios en los que se emplee el glutatión para tratar el daño por isquemia-reperfusión. También puede emplearse como indicador de daño oxidativo²⁴⁰.

Alopurinol

El Alopurinol es un fármaco usualmente empleado para el tratamiento de las hiperuricemias, en la medida en que funciona inhibiendo la actividad de la Xantina Oxidasa. Como hemos visto antes (figura 19), esta enzima se encarga de la oxidación de la xantina e hipoxantina dando lugar al ácido úrico, el compuesto final del metabolismo humano de las purinas. Así que el tratamiento con Alopurinol resulta en una disminución de la formación de ácido úrico y de su concentración en sangre²⁴¹.

Sin embargo, volviendo a la reacción descrita en la figura 19, vemos que la inhibición de la Xantina Oxidasa resultaría también en una menor formación del anión superóxido dependiente de la misma, por lo que el Alopurinol también se ha considerado un *scavenger* y se ha propuesto como tratamiento experimental para el tratamiento del daño por isquemia y reperfusión²³⁶. No obstante, y como pasaba con las enzimas antes descritas, los resultados de la experiencia experimental no invitan a pensar en una gran eficacia de este tratamiento: en modelos de isquemia en músculo aislado, el Alopurinol no logró disminuir de forma significativa el aumento de marcadores de daño bioquímicos (Lactato Deshidrogenasa (LDH) ni Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT)) ni anatomopatológicos (tinción de viabilidad de nitroazul de tetrazolio o *nitro blue tetrazolium* (NBT))^{237, 242}.

Melatonina

La melatonina ha sido más recientemente propuesta como *scavenger*²⁴³. Se propone que, como antioxidante, tiene un efecto directo de neutralización de radicales libres; pero además, podría aumentar el efecto de la SOD y de la catalasa. Estas acciones se llevarían cabo esencialmente en las mitocondrias^{243, 244}.

El tratamiento experimental de la melatonina ha sido probada in vitro e in vivo en modelos experimentales de isquemia-reperfusión, mostrando resultados prometedores, también en tejido musculo-esquelético. Al parecer, la melatonina sería capaz de disminuir en hasta un 69% la cantidad de citocromo C mitocondrial, que es considerada una proteína indicadora de la actividad apoptótica, y además atenuaría la alteración de la microvascularización^{245, 246}. La teórica no toxicidad de la melatonina parece hacerla una buena candidata para estudios experimentales en la práctica clínica. En este sentido, destaca el reciente trabajo de Mowafi y cols, en el que se describe un descenso significativo en la percepción del dolor durante el periodo de isquemia en el contexto de cirugía de miembros, y un tiempo mayor hasta necesitar el primer rescate analgésico durante la perfusión³⁶².

N-Acetil-Cisteina (NAC)

La N-Acetil-Cisteina o NAC es un fármaco empleado en la práctica clínica desde 1968. Sus principales indicaciones son la fluidificación de la mucosidad en el tracto respiratorio rompiendo enlaces disulfuro, y como antídoto ante la intoxicación con determinadas sustancias, como el paracetamol o los contrastes iodados²⁴⁷.

Al ser precursor del glutatión y por tanto del sistema glutatión reductasa/ glutatión peroxidasa se considera un antioxidante, y también se ha propuesto su uso para tratar el daño por isquemia-reperfusión en miembros. Su mínima toxicidad ha facilitado que sea ensayada en la práctica clínica, como NAC por sí sola²⁴⁸ o en combinación con otros procedimientos de pre o postcondicionamiento isquémico^{249, 250}, que más adelante desarrollaremos. En ninguno de estos estudios se comparan resultados clínicos ni de complicaciones. Sí se observa un descenso estadísticamente significativo de la concentración de malondialdehído (MDA), considerado un marcador de peroxidación

lipídica²⁵¹, en la membrana sinovial en el inicio inmediato del periodo de reperfusión, en los pacientes tratados con NAC.

Manitol

El manitol es un derivado de la manosa, que ha sido principalmente empleado como diurético osmótico, en situaciones de síndrome nefrótico o de hipertensión intracraneal²⁵². Pero también ha sido empleado en isquemias agudas de extremidades en el contexto de embolias agudas, con buenos resultados²⁵³. Parece que el manitol actuaría como antioxidante a través de la regulación al alza de la acción de la catalasa²⁵⁴, aunque el mecanismo no es completamente conocido.

El manitol ha sido ensayado en isquemia-reperfusión de miembros en la práctica clínica en un estudio sobre pacientes sometidos a una cirugía de artroplastia de rodilla. Los resultados se miden en términos bioquímicos en las primeras 24 horas de postoperatorio, midiendo entre otros fosfocreatina, lactato, o concentración de glutatión en tejido muscular. No obstante, en este trabajo no se aprecia que la administración perioperatoria de manitol suponga ningún beneficio respecto al placebo²⁵⁵.

Ac ascórbico (vitamina C)

El ácido ascórbico es considerado un agente antioxidante directo, por su capacidad reductora. Al reaccionar con RLO, dona un primer electrón formando un radical, semihidroascórbico, poco reactivo y poco agresivo a nivel celular. En una nueva reacción, puede donar un segundo electrón dando lugar al ácido hidroascórbico, inerte desde el punto de vista redox²⁵⁶.

Tenemos constancia de un estudio en el que se evalúa el papel del ácido ascórbico en el control del daño por isquemia-reperfusión en aparato locomotor, en el contexto de una cirugía de artroplastia de rodilla. Si bien de nuevo no disponemos de resultados clínicos, los autores encuentran unos niveles significativamente menores de MDA y troponinas en la sinovial de los pacientes que recibieron ácido ascórbico en el periodo perioperatorio inmediato²⁵⁷.

Alfa-tocoferol (vitamina E)

Algo muy parecido cabe decir del alfa-tocoferol, que también se considera un antioxidante directo que reacciona con los RLO neutralizando la cadena oxidativa²⁵⁸, si bien en este caso algunos autores dudan de esta capacidad in vivo²⁵⁹.

A nivel clínico hay un estudio antiguo que evalúa el daño muscular en extremidades inferiores tras isquemia y reperfusión, en el contexto de cirugías sobre la aorta abdominal²⁶⁰. En este trabajo, no sólo se aprecia una disminución de las concentraciones de MDA en músculo en los pacientes pre-tratados con alfa-tocoferol, sino también menor necrosis muscular y menor infiltración de neutrófilos.

Resumen de antioxidantes

En la figura 22 se muestra de forma resumida el mecanismo de acción de los principales antioxidantes, que hemos ido desgranando.

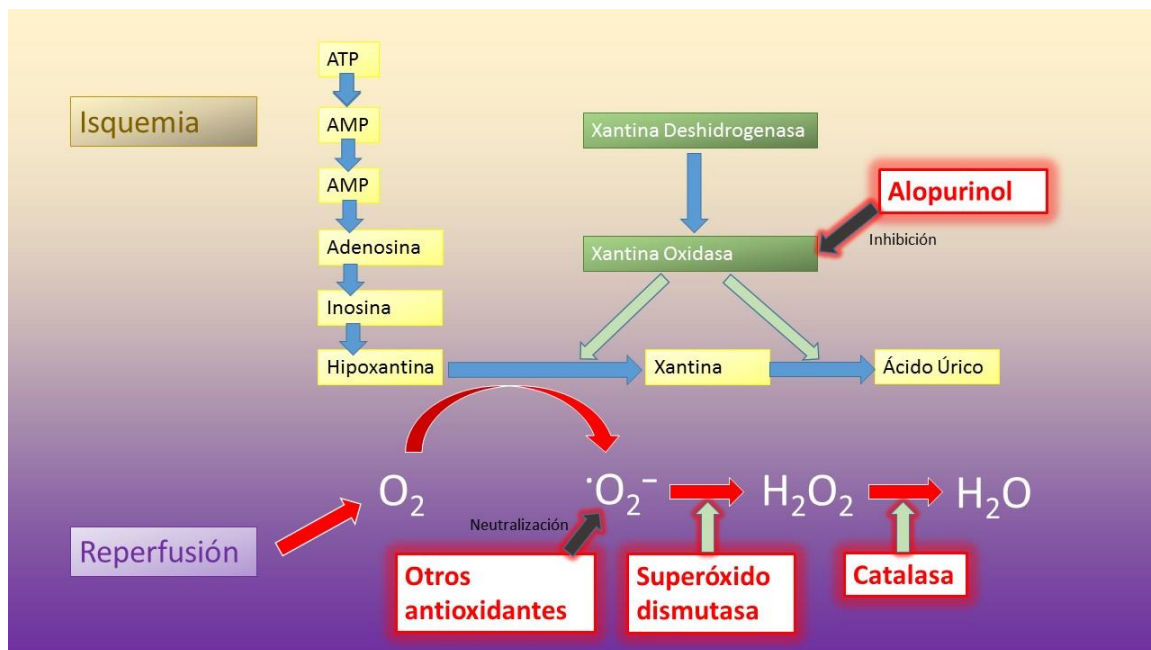


Figura 22. Punto de acción de los principales antioxidantes propuestos y ensayados en el control del daño por el síndrome de isquemia-reperfusión.

Condicionamiento isquémico

Bajo el epígrafe de condicionamiento, incluimos todos los procedimientos en los que se llevan a cabo uno o varios periodos de isquemia de poco tiempo, en la misma o distinta localización anatómica, y antes o después del periodo de isquemia largo. Como describiremos, con esta actuación se pretende activar los mecanismos de tampón redox endógenos, sin necesidad de administrar medicación exógena.

Precondicionamiento isquémico (PCI)

El preconditionamiento isquémico (PCI), consistente en la realización de uno o varios periodos de isquemia previos a la ejecución de una isquemia prolongada, fue descrito por primera vez por Murry y cols en 1986. Estos autores describieron cómo el PCI aumentaba de forma relevante la tolerancia del miocardio a periodos largos de isquemia²⁶¹.

Investigaciones posteriores han descrito dos fases de protección del PCI: una inicial que aparecería inmediatamente tras el estímulo isquémico y que duraría unas 2 horas, y una segunda fase que se iniciaría de 12 a 24 horas tras la isquemia breve y se prolongaría hasta los 2 ó 3 días^{262, 263}. Parece que el mecanismo subyacente en el corto plazo sería un reclutamiento de los sistemas antioxidantes fisiológicos del organismo (SOD, catalasa etc), que aumentarían su disponibilidad; además, algunos agentes vasoactivos como la adenosina o el óxido nitroso podrían tener un papel relevante en este proceso²⁶⁴. Pero además, parece que con el estímulo isquémico se iniciaría una cascada de señalización molecular que conllevaría una regulación al alza de determinados genes y una activación de factores de transcripción de proteínas efectoras, que en última instancia aumentarían la cantidad de los agentes implicados en los sistemas tampón endógenos, ofreciendo una protección de inicio más lento pero más mantenida en el tiempo²⁶⁵.

El preconditionamiento isquémico ha sido ensayado clínicamente a nivel cardiorrespiratorio o hepático, con buenos resultados^{266, 267}. Pero también ha sido estudiado en la artroplastia de rodilla con resultados prometedores de mejora de la respuesta genómica al estrés oxidativo²⁶⁸. En este caso se implementó un régimen de tres ciclos consecutivos de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de perfusión, antes del periodo largo

de isquemia. Este mismo protocolo ha sido empleado en otros 3 estudios clínicos sobre isquemia en el contexto de cirugías de extremidades inferiores, donde se aprecia un efecto protector del PCI en términos de disminución de indicadores de estrés oxidativo en plasma en las primeras horas tras la reperusión, especialmente MDA. Desafortunadamente, no hay en ninguno de los estudios otros marcadores bioquímicos y anatomopatológicos, de aparición más tardía, del daño muscular^{249, 359, 360}.

No obstante la coincidencia en método de los estudios anteriores, lo cierto es que no existe actualmente un protocolo estandarizado para la realización del pre-condicionamiento en isquemias electivas en músculo estriado. A nivel experimental se han propuesto diferentes regímenes, que se resumen en la tabla 4. De todos los que se mencionan, más adelante sólo serán comentados aquellos estudios en los que la isquemia se realiza en modelo murino y en todo el miembro mediante manguito u otro sistema no invasivo^{277, 278, 287, 288}, entendiéndose que los demás, sobre todo los que se centran en el estudio de flaps aislados mediante disección y clampaje^{265, 270, 273, 274, 279, 280, 281, 283, 285, 286} no se asemeja al modelo que pretendemos emular.

Tabla 4. Regímenes experimentales de PCI propuestos en la literatura.**NC: No controlable**

Autor y año	Nº ciclos	Duración PCI (min)	Duración I/R (min)	Tipo de PCI	Animal
Carroll, 1997 ²⁷³	2	10	N/C	Precoz/ tardío. Local	Rata
Whetzel, 1997 ²⁷⁷	3	10	2/72	Precoz. Local	Rata
Saita, 2002 ²⁷⁰	1 a 5	10	4/24	Precoz. Local	Rata
Lepore and Morrison, 2002 ²⁷⁸	1 ó 2	10	2/24	Tardío. Local y remoto	Rata
Bushell, 2002 ²⁷⁹	1	5	4/1	Precoz. Local	Rata
Adanali, 2002 ²⁷⁴	1	30	4/1	Precoz/ tardío. Local	Rata
Küntscher, 2003 ²⁸⁰	1	10	2/1	Tardío. Remoto.	Rata
Badhwar, 2003 ²⁸¹	5	10	2/1.5	Tardío. Remoto.	Rata
Addison, 2003 ²⁸²	3	10	2/1.5	Precoz. Remoto	Cerdo
Wang, 2004 ²⁶⁵	1	45	4/1	Remoto. Local	Rata
Zhang, 2004 ²⁸³	3	10	4/72	Precoz. Local	Rata
Harralson, 2005 ²⁸⁴	2	30/10	4/72	Remoto. Local	Conejo

Huang, 2006 ²⁸⁵	2	30	4/2	Precoz. Local	Rata
Webster, 2006 ²⁸⁶	3	5	2 a 4/1	Precoz. Local	Rata
Schoen, 2007 ²⁸⁷	3	10	3/24	Precoz. Local	Rata
Szabó, 2008 ²⁸⁸	2	10	1/3	Precoz. Local	Rata
Hartmann, 2011 ²⁷²	2	10	1/3	Precoz. Local	Rata
Mansour, 2012 ²⁷¹	3	10	3/2	Precoz. Local y remoto	Rata

Tomado de Kocman EA, Ozatik O, Sahin A, Guney T, Kose AA, Dag I, et al. Effects of ischemic preconditioning protocols on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. J Surg Res 2015; 193(2):942-52

De las experiencias de estos estudios, podemos sacar ciertas conclusiones. Para empezar, parece que los ciclos de PCI de 10 minutos consiguen un mayor resultado que aquellos de sólo 5 minutos de duración²⁶⁹, y lo mismo ocurre con la realización de 3 a 5 ciclos en vez de 1 ó 2²⁷⁰. Con respecto a la realización del PCI en la misma localización en que se va a llevar a cabo la isquemia prolongada, o una localización remota, parece que no hay diferencias relevantes entre ambas posibilidades²⁷¹.

Finalmente, existe controversia respecto a cuál de las fases de protección del PCI es más eficaz, si la inicial hasta las 2 horas, o la tardía entre 24 y 72 horas. A pesar de que se ha sugerido que la fase tardía debería ser más eficaz, dado que como hemos dicho resultaría en la neosíntesis de proteínas y sistemas tampón²³⁶, hay estudios que sugieren un mayor papel protector de la fase inicial^{272, 273, 274}. Con todo, es posible que la fase tardía haya sido valorada demasiado pronto en estos estudios, en la mayoría de los casos a las 24 horas, porque en evaluaciones a las 48 o 72 horas los resultados son equivalentes a los descritos en la fase inicial²⁷⁵. Un estudio reciente alcanza estas mismas conclusiones²⁷⁶. Actualmente

no hay consenso respecto al régimen más conveniente de PCI, a nivel experimental ni clínico.

Postcondicionamiento isquémico o Reperusión Intermitente (RI)

Tras comprobar que el PCI es capaz de desencadenar un mecanismo adaptativo de protección frente al estrés oxidativo del síndrome de isquemia-reperusión, el siguiente paso ha sido plantearse si obtendríamos un beneficio similar al intercalar breves periodos de isquemia, tras un periodo largo, a lo largo de la reperusión. En este sentido, Wang y cols son probablemente los primeros autores que exploran esta posibilidad en 1998. En este estudio, se objetivaba que periodos de reoclusión de 5 minutos, en la reperusión inmediata tras un periodo largo de isquemia, conllevaba un efecto protector sobre la microcirculación local, equivalente al hallado para el PCI²⁸⁹.

Se hipotetiza que este efecto protector se debería, al menos en parte, a que se modularía la “explosión” de radicales libres, distribuyendo su producción sobre un periodo de tiempo más extenso, lo que daría a los sistemas tampón del organismo mayores oportunidades de ir neutralizándolos de forma progresiva²⁹⁰.

El postcondicionamiento ha sido empleado como tratamiento aislado para el control del daño por isquemia-reperusión en miembros, con buenos resultados respecto a placebo, en términos de microvascularización medida mediante láser doppler²⁹¹, pero también a nivel de marcadores de estrés oxidativo como es la actividad de la mieloperoxidasa²⁹². Aunque muchos autores consideran la RI o postcondicionamiento como una estrategia igual de válida que el PCI^{293, 294}, en al menos un estudio experimental que compara ambas técnicas sobre miembros inferiores, se apreciaría una efectividad mucho mayor del preconditionamiento²⁹⁵.

La que parece una ventaja incontestable del postcondicionamiento respecto al preconditionamiento, es que puede emplearse cuando la isquemia no es programada sino que sobreviene de forma inesperada. En este sentido, quizás pueda ser una estrategia más interesante para la Cirugía Vascular que para la Cirugía Ortopédica.

Otros tratamientos descritos

Anestésicos

Dado que las cirugías que se realizan en miembros bajo isquemia se hacen bajo algún tipo de anestesia, se ha estudiado en varios trabajos la influencia que puede tener el emplear un régimen u otro de anestesia en el estrés oxidativo derivado del síndrome de isquemia-reperusión.

El **propofol**, al contar con una estructura molecular con base de fenol (es un disopropilfenol), es capaz de actuar como antioxidante o *scavenger*, reaccionando con los RLO y dando lugar a un radical fenoxilo menos reactivo²⁹⁶. Se trataría de un mecanismo similar al atribuido al alfa-tocoferol.

Dado que el propofol es un anestésico empleado con mucha frecuencia en la práctica clínica, no es de extrañar que se haya evaluado su actividad antioxidante en cirugías con isquemia de miembros inferiores en varios estudios, sólo o en combinación con otros agentes anestésicos como el sevoflurano o el halotano^{250,297, 298, 299}. Por desgracia, todos ellos miden el impacto de esta medicación en el periodo inmediato a la reperusión, y estudiando marcadores indicativos del estrés oxidativo como el MDA, también muy inmediatos.

Por otra parte la **dexmedetomidina**, un agonista de los receptores alfa2 con capacidad de ofrecer sedación y analgesia sin depresión respiratoria que ha sido recientemente comercializada en España, también ha sido estudiada como un fármaco eventualmente protector frente al daño por isquemia-reperusión. Una vez más, nos encontramos con que los autores hacen una evaluación sólo en el postoperatorio inmediato, y no se contemplan complicaciones o resultados clínicos. Además, los resultados son contradictorios. Mientras en uno de ellos se identifica un descenso significativo de marcadores del daño oxidativo e incluso una contención significativa del aumento de Creatin Kinasa y Lactato Deshidrogenasa –aunque con dudosa relevancia por estar sólo medida en la reperusión inmediata-³⁰¹, en otro más reciente no se aprecian diferencias³⁰².

La **ketamina**, con un amplio rango terapéutico incluyendo sedación, analgesia y anestesia, sí ha sido evaluada en términos clínicos a diferencia de otros anestésicos, concretamente en cuanto al dolor, aunque sólo en las primeras horas del postoperatorio. Siendo empleada a dosis sedantes, se ha observado un aumento significativo el el tiempo transcurrido hasta la primera demanda de analgesia y un descenso en la puntuación de la Escala de Valoración Analógica (EVA) del dolor, en aquellos pacientes tratados durante la inducción anestésica con Ketamina, en artroscopias de rodilla con realización de isquemia y perfusión³⁰³.

Por último, se ha estudiado la eventual diferencia en cuanto a daño oxidativo, entre la **anestesia intradural** y la **anestesia general**. En este sentido, se sugiere que la anestesia intradural sería más beneficiosa, aunque siempre en términos de indicadores de estrés redox, y sin consideración de resultados clínicos³⁰⁴.

Nitritos y NO

Hemos mencionado antes el papel regulador de la vasodilatación del óxido nítrico (NO), y cómo hay una depleción del mismo durante la isquemia-reperfusión, dando lugar a un empeoramiento de la perfusión microvascular que puede condicionar incluso el mentado fenómeno de “no retorno”, empeorando todo ello el daño local durante la perfusión.

Recientemente los nitritos han sido identificados como un importante reservorio de NO en la sangre y los tejidos. Estos nitritos pueden reducirse a NO en los tejidos isquémicos mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos^{305, 306, 307}. Por ello, se ha ensayado el tratamiento con ion nitrito como protector del daño microvascular en escenarios de isquemia-reperfusión en miocardio e hígado, con buenos resultados^{308, 309}. También se ha empleado el nitrito de sodio en isquemia-reperfusión en tejido muscular. Parece que la infusión intraarterial reduce de forma significativa las alteraciones microvasculares medidas mediante Doppler durante la perfusión³¹⁰, si bien no se estudia la traducción que esto pudiese tener en cuanto a reducción del daño muscular. También se ha planteado el óxido nítrico inhalado en la práctica clínica, con el mismo fin, en cirugías de extremidades bajo isquemia. Aunque parece que habría una disminución en la expresión de marcadores de daño celular como CD11b/CD18, selectina P o el factor nuclear kappaB en la perfusión inmediata, estos hallazgos no se acompañarían de una disminución de la

actividad de la mieloperoxidasa en muestras de tejido muscular tomados antes del cierre por planos³¹¹.

Estatinas

Las estatinas, fármacos inhibidores de la 3-hidroxil-3-metilglutaril-CoenzimaA, son fármacos usualmente utilizados como hipolipemiantes³¹². Sin embargo, recientemente se ha descrito su potencial antioxidante, que sería dependiente de múltiples vías bioquímicas³¹³. Partiendo de esta capacidad antioxidante, tanto la pravastatina³¹⁴ como la simvastatina³¹⁵ se han ensayado como tratamiento experimental para el síndrome de isquemia-reperfusión, resultando en una disminución significativa del daño. De forma muy interesante, en este caso esta disminución del daño no se justifica sólo por la disminución de marcadores inmediatos del estrés oxidativo, sino que también se apoya en datos anatomopatológicos, objetivándose una disminución significativa del edema, porcentaje de fibras dañadas, o infiltración neutrofílica^{314, 315, 316}.

Otros tratamientos

Bajo este epígrafe agruparemos algunos otros tratamientos, a priori con menor relevancia, que han sido propuestos para el control del daño por isquemia-reperfusión.

El **oxígeno hiperbárico**, por mecanismos aún no bien definidos pero que implicarían al NO, parece ser capaz de inhibir la adhesión leucocitaria al endotelio vascular, en un contexto de isquemia-reperfusión³¹⁷. No se ha estudiado la implicación que este efecto tendría en el control del daño.

Instaurar una **hipotermia** es una estrategia común para la mejor conservación de los órganos en los trasplantes, o de miembros amputados hasta su reimplantación. Su fundamento consiste en disminuir las necesidades (y consumos) metabólicos, para tratar de evitar una depleción de las reservas energéticas en los tejidos afectados. La hipotermia se ha propuesto como medida profiláctica del daño por isquemia y perfusión, mediante la aplicación de parches fríos sobre la extremidad afectada. Sin embargo, parece que el efecto protector que efectivamente se objetiva durante el periodo isquémico, se traduce en un agravamiento del daño en el momento de la perfusión³¹⁸.

El **ácido sulfhídrico (H₂S)**, presente en el cuerpo en muy baja cantidad pero a la vez extremadamente tóxico, ha sido asimismo propuesto como tratamiento contra el estrés oxidativo, en un mecanismo que implicaría un aumento de la síntesis endógena del sistema glutatión. En isquemias-reperfusiones sobre tejido muscular, el ácido sulfhídrico ha mostrado una acción protectora, tanto in vitro como in vivo en modelo animal, a nivel anatomopatológico, aunque en el contexto de isquemias muy prolongadas de hasta 5 horas³¹⁹.

Tratamiento experimental del Síndrome de Isquemia-reperfusión con ácido fólico

El ácido fólico, folacina, ácido pteroil-L-glutámico, o vitamina B9, es una vitamina hidrosoluble esencial para múltiples funciones corporales. Al no poder ser sintetizada de novo por el organismo, ha de ser administrada de forma exógena, estando presente en múltiples alimentos como legumbres, frutas o vegetales de hoja verde en su forma aniónica (familia de moléculas que se denominan folatos). El ácido fólico (AF) hace referencia a la forma oxidada y más estable del folato. Y el ácido folínico constituye la forma activa, disponible para la administración parenteral³²⁰.

Sin extendernos en exceso, diremos que los folatos constituyen un grupo sustancias que actúan como substratos -o como cofactores (en forma de tetrahidrofolato o FH₄ o THF)- en múltiples vías biológicas, como la síntesis de ADN y ARN, la replicación celular, la señalización intracelular o la metilación genética, entre otras. Esta participación en los fenómenos de replicación celular explica cómo una deficiencia de ácido fólico puede afectar a la hematopoyesis, caracterizada por la alta tasa de división celular, y dar lugar a una anemia megaloblástica³²¹. O cómo en el feto en desarrollo, con igualmente muy alto número de mitosis, la carencia de folatos puede dar pie a múltiples alteraciones, entre las que destacan los defectos del tubo neural³²². De hecho, por esta razón desde hace varias décadas se recomienda la suplementación sistemática con ácido fólico a todas las embarazadas, previa a la concepción, y durante toda la gestación³²³.

También se ha implicado al déficit de ácido fólico con muchas otras condiciones patológicas, y se ha propuesto su suplementación para prevenirlas. Entre otras, se ha relacionado al ácido fólico con una mejora de la subfertilidad^{324, 325}, de determinadas depresiones³²⁶, o con una disminución del riesgo de padecer degeneración macular asociada a la edad³²⁷. También ha sido muy estudiado un posible papel protector con respecto a determinados tipos de cáncer^{328, 329} y de eventos cardiovasculares incluyendo el infarto, situaciones en las que la disminución de la homocisteinemia por la acción del ácido fólico jugaría un papel fundamental³³⁰. Estas dos últimas posibilidades, protección frente a

determinadas neoplasias y coronariopatías, sin embargo, parecen quedar desmentidas en metaanálisis con el mayor nivel de evidencia^{331, 332, 333}.

Con todo, la indicación principal de tratamiento con ácido fólico es, además de la suplementación durante el embarazo, de antídoto contra fármacos antifolatos, especialmente metotrexate. El metotrexate es un fármaco clásico, indicado como quimioterápico en el tratamiento de determinados tipos de cáncer³³⁴, y aún muy empleado en la actualidad como fármaco modificador de enfermedad (FAME) en enfermedades reumáticas como la Artritis Reumatoide o el Lupus³³⁵.

Hay pocos trabajos que utilicen el ácido fólico, como fármaco antioxidante, para el tratamiento del daño por isquemia y reperfusión, y ninguno sobre tejido muscular de extremidades, hasta donde ha llegado nuestra búsqueda bibliográfica.

En el Laboratorio de Cirugía Experimental dependiente del Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física, de la Universidad del País Vasco UPV-EHU, el ácido fólico ha sido ensayado en modelos de isquemia-reperfusión en territorio mesentérico, en su preparación parenteral de ácido folínico. En nuestra experiencia, la administración intravenosa de ácido folínico a dosis relativamente altas de 2,5 mg/kg durante los minutos previos al restablecimiento del flujo mesentérico tras el bloqueo completo de la arteria mesentérica superior en la rata, disminuye tanto la gravedad de las lesiones mucosas³³⁶, como la mortalidad³³⁷. Este daño también ha sido estudiado a nivel bioquímico, con la medición de enzimas como Creatin Kinasa, Lactato Deshidrogenasa o Fosfatasa Alcalina³³⁸. En este último trabajo, además, no se observaron diferencias entre el uso de la forma racémica (ácido folínico) y *levo* (ácido levofolínico) del fármaco.

Aunque como hemos señalado, no hemos encontrado ningún artículo sobre el tratamiento de la isquemia-reperfusión en extremidades con ácido fólico (ni folínico), en fechas recientes sí se han publicado algunos trabajos interesantes estudiando la acción de este fármaco cuando la isquemia-reperfusión asienta sobre músculo cardíaco.

Partiendo de la observación de que el tamaño del infarto de miocardio tras un ciclo de isquemia-reperfusión es mayor en ratones modificados para una expresión deficiente de la

Oxido Nitrico Sintetasa endotelial (eNOS en inglés)³³⁹, y menor en otros con sobreexpresión de la misma enzima³⁴⁰, se ha propuesto explorar las formas de estimular su función. La eNOS requiere de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄) para llevar a cabo su función³⁴¹. Y dado que el ácido fólico es capaz de estabilizar la cantidad de BH₄ desde la forma oxidada e inactiva BH₂³⁴², se considera que aumentaría la actividad del complejo BH₄ – eNOS, combatiendo el descenso que aparece de forma característica durante la isquemia de tejidos, limitando en última instancia la disfunción vascular y el daño por isquemia-reperfusión^{343, 344}. Este mecanismo de acción se añadiría a la actividad *scavenger* o antioxidante directo del ácido fólico, al reaccionar con radicales libres creando sustancias menos reactivas, en un mecanismo similar a otros antioxidantes³⁴⁵.

En los estudios arriba mencionados, el fármaco se administra por vía oral y en forma de suplementación en los días previos al episodio de isquemia, y no como ácido folínico intravenoso previo al inicio de la reperfusión, como en nuestras experiencias anteriores. Las dosis de ácido fólico oral que se emplean varía desde los 400 µg/ día a los 10 mg/día, en un rango similar al empleado en otras aplicaciones clínicas ya establecidas del fármaco, como son la prevención de defectos del tubo neural durante el embarazo o el tratamiento de anemia megaloblástica³⁴⁶. Aunque no hay consenso en cuanto a la dosis óptima, parece que las dosis más altas serían también las más eficaces³⁴⁷.

Hasta donde ha llegado nuestra búsqueda no hay estudios que traten el daño por isquemia-reperfusión con ácido folínico parenteral, más allá de las experiencias arriba señaladas, pero cabe destacar que las dosis ensayadas en la práctica clínica para otras indicaciones – principalmente terapia complementaria a antifolatos en enfermedades reumáticas y determinadas neoplasias- varían enormemente. Aunque se trata de un aspecto de se desarrollará más en el apartado de material y métodos, cabe adelantar que están aprobadas dosis desde 1mg/día intramuscular en anemia megaloblástica por déficit de B₉; hasta 500mg/m²/6h intravenoso en determinados casos de sarcoma osteogénico metastásico en tratamiento con metotrexate³⁴⁸. Esta enorme variabilidad en la dosis viene facilitada porque el ácido fólico se considera un fármaco sin toxicidad descrita *per se*³⁴⁹. Este último punto también será desarrollado en Material y Métodos.

Modelos experimentales de isquemia-reperfusión en miembros inferiores

A partir del reconocimiento del daño que el uso de dispositivos de isquemia conlleva, se han desarrollado diversos modelos experimentales de isquemia-reperfusión en miembros inferiores en animales. Muchos de ellos han sido ya mencionados, y nos han servido para comprender mejor cómo se produce el daño en los distintos tejidos, con experimentos que por motivos obvios no pueden ser llevados a cabo en humanos.

En este apartado, sin embargo, se va a realizar un repaso de aquellos modelos experimentales que han resultado de más interés para el desarrollo del modelo experimental defendido en la presente tesis. Por ello, en general, se indican principalmente estudios donde se practican tiempos y presiones de isquemia similares a los realizados durante las cirugías programadas de extremidades, con especial atención en el método por el que provocan la isquemia, y los parámetros empleados para cuantificar el daño.

Aproximación general

En la tabla 5 se recogen algunos de los modelos más relevantes, indicándose las variables de más interés.

Tabla 5. Resumen de los estudios experimentales más relevantes de isquemia-reperfusión sobre tejido muscular.**NC: No controlable****BQ: Bioquímico****AP: Anatomopatológico****EMG: Electromiografía****Microvasc: Microvascularización****MPO: Actividad de la Mieloperoxidasa****PMN: Infiltración tisular por polimorfonucleares neutrófilos**

Autor, año	Modelo animal	Dispositivo de isquemia	Tiempo de isquemia	Presión estimada	Resultado estudiado	Periodo evaluación (reperfusión)
Bushell et al, 1996 ³⁵⁰	Conejo	Manguito neumático	4h	300mmHg	BQ (CK), AP (necrosis)	1h reperfusión
Chiu et al, 1976 ⁷⁰	Perro	Manguito neumático	1h, 2h, 3h	300mmHg	BQ (CK, LDH, Urea)	2h, 3h, 1sem
Dillon et al, 2006 ³¹⁴	Rata	Goma elástica	2.5h	NC	Viabilidad, AP (MPO, edema), EMG	12h
Duarte et al, 1997 ³⁵¹	Ratón	Goma elástica	1h, 1.5h, 2h	NC	Glutación, AP (edema)	1h, 1.5h
Fish et al, 1989 ³⁵²	Rata	Manguito neumático	1h, 2h, 3h, 4h	300-400mmHg	EMG	2 sem
Gersoff et al, 1989 ³⁵³	Gato	Manguito neumático	1h	200mmHg	EMG	2 sem
Heppenstall et al, 1976 ⁶⁵	Perro	Manguito neumático	1h, 2h, 3h	350mmHg	BQ (CK)	2h
Nitz et al, 1986 ⁶⁷	Rata	Manguito neumático	1h, 2h, 3h	200, 300, 400mmHg	EMG	6 sem
Pedowitz, 1991 ⁵⁹	Conejo	Manguito neumático	1h, 2h, 4h	125, 200, 350mmHg	AP (necrosis)	48h
Patterson et al, 1979 ⁷⁵	Mono	Manguito neumático	3h, 5h	300mmHg	AP (necrosis)	1, 2, 3, 7 días
Sapega et al, 1985 ⁶⁹	Perro	Manguito neumático	3h	350mmHg	AP (fosfocreatina, necrosis)	24h?
Crawford et al, 2007 ³⁵⁴	Ratón	Goma elástica	1.5h	NC	Microvasc, AP (edema, necrosis)	4h, 24h

Murata et al, 2011 ³⁵⁵	Rata	Tubo elástico	5h	NC	BQ completa, AP (MPO, edema, necrosis)	1h, 3h, 24h
McCormack et al, 2008 ³⁵⁶	Ratón	Goma elástica	2h	NC	AP (necrosis de forma sistemática)	12h, 24h, 48h
Bonheur et al, 2004 ³⁵⁷	Ratón	Torniquete de tensión controlada	1h, 3h, 6h	0,2kg	Microvasc, viabilidad, AP (edema, necrosis)	4h, 24h
Deune et al, 1996 ²³⁵	Conejo	Clamp vascular	4h	NC	AP (edema, MDA, PMN, necrosis)	1h, 24h
Wang et al, 2011 ²⁴⁶	Rata	Clamp vascular	4h	NC	Microvasc. AP (citocromo C)	24h
Köksoy et al, 2007 ³¹⁵	Rata	Goma elástica	4h	NC	AP (glutación, MDA, MPO, edema, necrosis)	24h
Sagara et al, 2009 ³⁶¹	Rata	Goma elástica	1h, 2h, 3h	NC	BQ completa, AP (edema)	4h
Varios autores sobre condicionamiento isquémico (ver tabla XX)	Rata	Varios	Varios	NC	Varios	Varios

A partir del análisis de estos estudios, podemos ir desgranando ideas respecto a una serie de cuestiones como el modelo animal, el sistema de implementación de la isquemia, o el protocolo de evaluación del daño.

Modelo animal

Empezando por el modelo de animal, vemos que el modelo predominante es el murino, especialmente la rata. La similitud de múltiples parámetros biológicos de la rata con el ser humano, así como su pequeño tamaño y rápida velocidad de reproducción, hace que constituyan un excelente modelo para la investigación. En lo respectivo al objeto de

estudio de la presente tesis, hay que decir que el tejido muscular en la rata exhibe una tolerancia a la isquemia muy similar al músculo esquelético del ser humano; de hecho, los límites de tiempo empleados en la práctica clínica derivan en parte de la experiencia sobre modelos murinos de ratas o ratones, estableciéndose las 3 horas como el periodo límite a partir del cual los cambios locales pueden empezar a ser irreversibles y pueden aparecer daños sistémicos, y las 6 horas como el tiempo máximo para la viabilidad del miembro^{21, 27, 58, 67, 68, 314, 352, 354, 355, 356, 357}. A estos estudios hay que añadir la mayoría de los mencionados en la tabla 4 sobre regímenes de condicionamiento isquémico, realizados sobre un modelo murino^{265, 270, 271, 272, 273, 277, 278, 280, 281, 283, 285, 286, 287, 288}. Es conveniente remarcar, por último, que en todas las experiencias con animales pequeños la isquemia se hace siempre sobre extremidades inferiores.

Sistema empleado para la inducción y mantenimiento de la isquemia

Se trata de un punto de especial interés. En modelos animales mayores, como perros^{70, 73} o monos^{57, 66, 75}, es muy razonable plantearse el uso de manguitos neumáticos como los empleados en humanos y, de hecho, así se hace en los trabajos mencionados. El tamaño más cercano al ser humano de estos animales probablemente facilita que pueda emplearse el que es, al fin y al cabo, el *gold standard* en la realización de la isquemia en la práctica clínica. Sin embargo, en animales de menor tamaño y en concreto en la rata, no es viable emplear manguitos de isquemia del tamaño de los utilizados en personas, ni siquiera los de tamaño pediátrico. Esto da lugar a que se deban buscar formas alternativas para inducir y sobre todo mantener la isquemia.

En algunos artículos, los autores dicen fabricar manguitos neumáticos adaptables al pequeño tamaño del animal modificando los empleados en la práctica clínica, para conejos^{59, 71, 72, 350} o incluso para ratas^{67, 277, 352} y ratones³⁵⁸. En el caso de los conejos, de en torno a 3.5kg, se han descrito manguitos con anchura entre 20 y 40mm⁵⁹. En ratas se emplearía una anchura de manguito de 15mm⁶⁷. Un dispositivo de manguito de presión es posiblemente el sistema ideal, en tanto permita controlar la presión realizada, y con el

mismo sistema que el utilizado en la clínica. Una fotografía de manguito de isquemia para conejos se expone en la figura 23, y un dibujo explicativo del sistema para la rata muestra en la figura 24. Por desgracia, no hay fotografías de un sistema de manguito aplicado en la rata, en los artículos consultados.

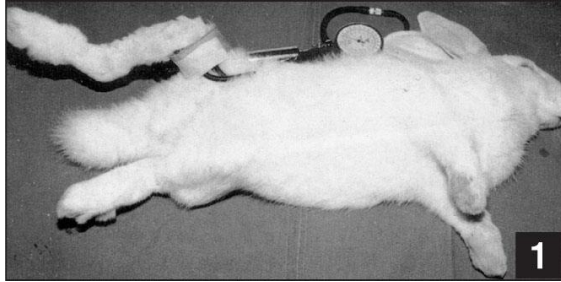


Figura 23. Manguito neumático adaptado a un modelo de conejo, a partir de un manguito pediátrico.

Tomado de Pedowitz RA. Tourniquet-induced neuromuscular injury: A recent review of rabbit and clinical experiments. *Acta Orthop Scand Suppl* 1991;245:1-33

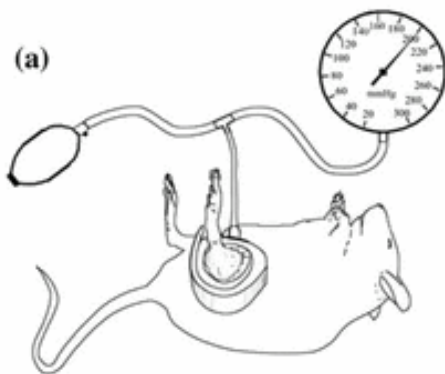


Figura 24. Manguito neumático adaptado a un modelo murino, a partir de un manguito pediátrico.

Tomado de Nitz AJ, Dobner JJ, Matulionis DH: Pneumatic tourniquet application and nerve integrity: Motor function and electrophysiology. *Exp Neurol* 1986; 94(2):264-279.

En otros casos, se emplean sistemas que no permiten controlar la presión ejercida. Entre estos, se describen sistemas de anillos o gomas que se deslizan desde el extremo de la pata hacia su aspecto más proximal, pudiéndose utilizar aplicadores de gomas de hemorroides (figura 25)^{354, 356}, o gomas más gruesas fabricadas a partir de la adición de vueltas sucesivas con una goma tipo tortor (figura 26)^{316, 355}.

En cuanto a los estudios sobre condicionamiento isquémico en modelos murinos recogidos en la tabla 4, la variabilidad es mucho mayor, en tanto que muchos no llevan a cabo isquemia de toda una extremidad, sino que en muchos casos proceden de estudios del área

de la Cirugía Plástica, en los que se evalúa la tolerancia a la isquemia para un colgajo muscular de forma aislada. Así que en estos estudios de condicionamiento se emplean en ocasiones manguitos de isquemia²⁷⁷, sistemas no invasivos pero de presión no controlada como gomas, tubos o sistemas tipo Esmarch^{278, 280, 287, 288}, pero también modelos invasivos en los que se realiza un clampaje de los vasos arteriales que irrigan la extremidad o grupo muscular a estudio^{265, 270, 271, 273, 274, 279, 281, 283, 285, 286}. El sistema de clamp vascular también ha sido utilizado ocasionalmente en tratamientos farmacológicos experimentales^{235, 246}. Es conveniente señalar a este respecto que para la consecución de una isquemia completa en miembros inferiores, no es suficiente con el clampaje de la arteria femoral primitiva, sino que para evitar circulación colateral sería necesario interrumpir todo el flujo aórtico infrarrenal^{270, 279}.

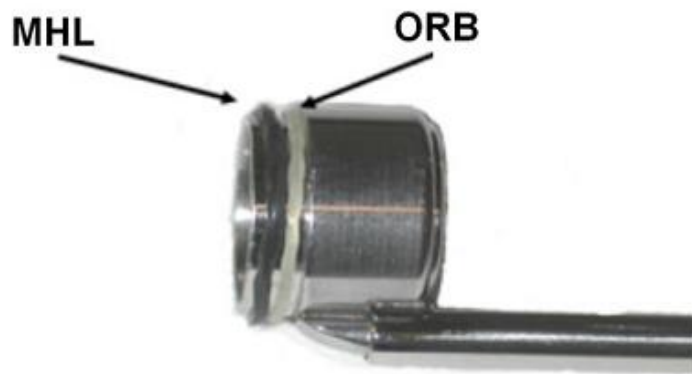
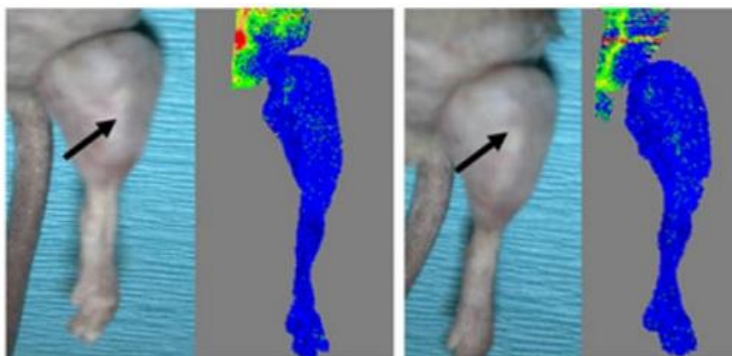


Figura 25. Se muestra un sistema de isquemia en el que ligaduras de hemorroides (MHL, *McGivney hemorrhoidal ligator applicator*) o gomas de ortodoncia (ORB, *Orthodontic rubber band*) son posicionados en el extremo proximal del miembro inferior izquierdo de ratones con un aplicador para hemorroides, como se aprecia en la fotografía superior.



En la fotografía inferior, se aprecia el aspecto de la pata con cada uno de los dispositivos, y la imagen dópler correspondiente.

Tomado de Crawford RS, Hashmi FF, Jones JE, Albadawi H, McCormack M, Eberlin K, et al. A novel model of acute murine hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(2):830-7

Este sistema, evolución de otros más primitivos³⁵¹, tiene mucha popularidad sobre todo en modelos murinos, y muchas investigaciones actuales de tratamiento experimental del daño

por isquemia-reperfusión que hemos ido mencionando en apartados anteriores utilizan sistemas de gomas o anillos^{314, 315, 345, 355, 356}.

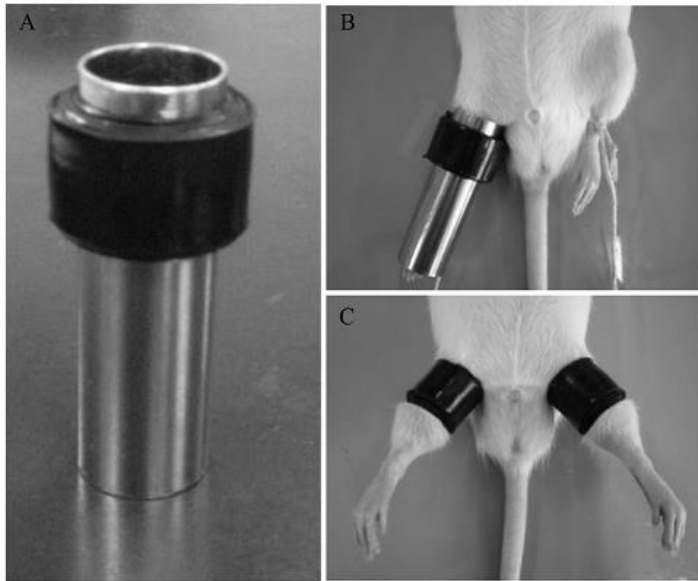


Figura 26. En este caso se coloca una banda gruesa de goma en la raíz del miembro, con ayuda de un cilindro metálico.

Tomado de Murata I, Ooi K, Sasaki H, Kimura S, Ohtake K, Ueda H, et al. Characterization of systemic and histologic injury after crush syndrome and intervals of reperfusion in a small animal model. J Trauma 2011; 70(6):1453-63

Con ánimo de estandarizar la realización de isquemias en miembros inferiores en un modelo murino, y considerando que los sistemas anteriores no tienen la suficiente fiabilidad, Bonheur y cols han desarrollado un nuevo modelo, con un sistema de isquemia que controla la tensión, de forma fiable y reproducible, que denomina “torniquete de tensión controlada” (CTT, *controlled tension tourniquet*)³⁵⁷. Dicho sistema constaría de una goma elástica, conectada a un hilo de seda que conectaría la goma con un cabestrante que va ejerciendo tensión con una manivela. Esta tensión está controlada por un sistema digital, y se indica que en ratones 0,2kg de tensión consiguen inducir y mantener la isquemia. Lamentablemente, los autores no adjuntan un dibujo o fotografía que permita una mejor descripción del sistema.

Evaluación del daño, parámetros y escala temporal

En lo relativo a la evaluación del daño por isquemia y reperfusión, observamos que hay mucha variabilidad en los resultados estudiados, aunque se repiten ciertos patrones en cuanto a qué se mide y en qué momento.

Con ánimo de una exposición ordenada, clasificaremos los parámetros más frecuentemente examinados en los siguientes apartados.

Alteración de la microvascularización

En consideración del papel central que tiene la alteración de la microvascularización en la patogénesis del daño por isquemia-reperfusión, son varios los trabajos que han estudiado la misma durante la reperfusión, de forma simplemente descriptiva^{354, 357}, o como medio para evaluar el efecto de un tratamiento experimental²⁴⁵.

En estos experimentos, se han empleado de forma clásica sondas de Láser Doppler, situadas siempre a la misma distancia del animal, y siempre sobre la misma área. Con esto se intenta minimizar las interferencias, pues se trata de receptores muy sensibles, que pueden registrar erróneamente grandes variaciones por pequeñas diferencias metodológicas entre una y otra medición. Para mejor la precisión, también se lleva a cabo un afeitado de las dos extremidades inferiores.

El fundamento de la técnica reside en que un haz láser (espectro de 780nm) es emitido, reflejado por los elementos formes de la sangre en capilares, arteriolas y vénulas, y captado por la sonda. De la relación entre la emisión y recepción, según efecto Doppler, se calcula el flujo en unidades por cm².

En los últimos tiempos se han desarrollado sistemas mucho más evolucionados que no precisan la aplicación de sondas, sino que captan la imagen y cuantifican el flujo de una o ambas extremidades inferiores al situar éstas sobre una plataforma enfrentada a un receptor tipo cámara. Esto facilita el procedimiento y sobre todo mejora la precisión de la medida. Toda la información, además, es representada en el monitor, en muchos casos según un código de colores, como puede apreciarse en el ejemplo de la figura 27.

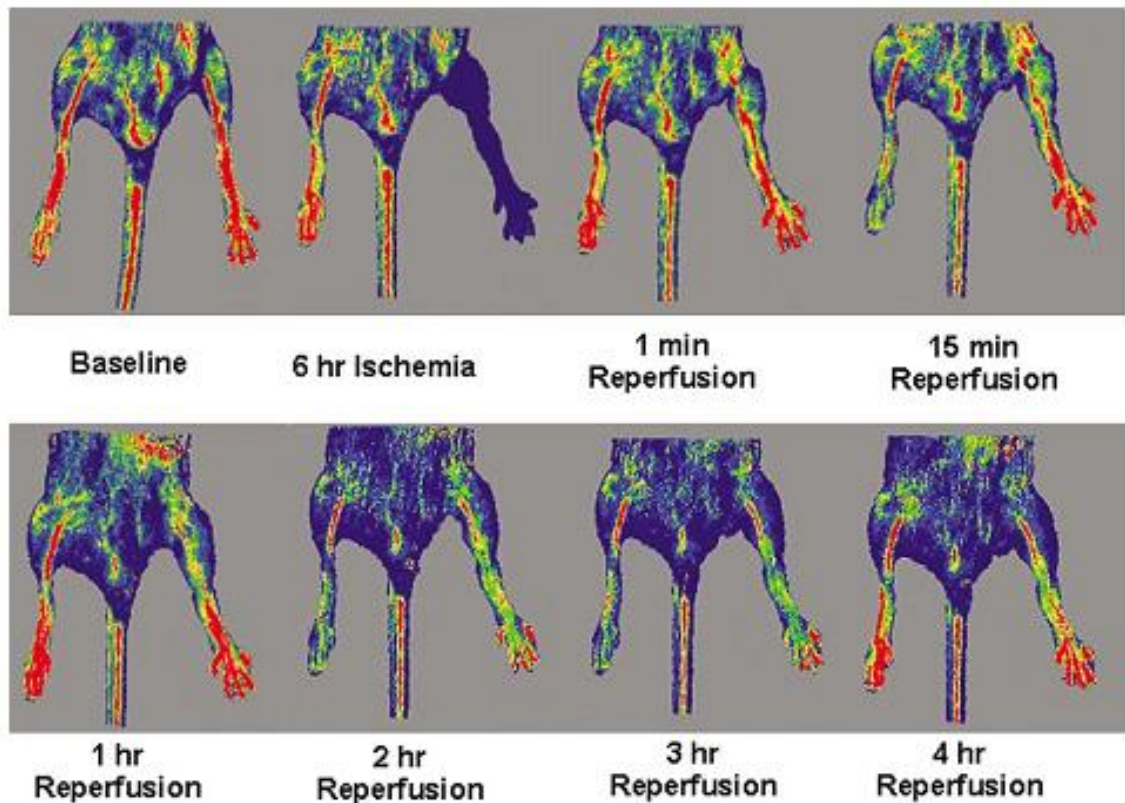


Figura 27. Medición de flujo en ambas extremidades inferiores de ratón mediante tecnología de láser doppler de nueva generación.

Tomado de Bonheur JA, Albadawi H, Patton GM, Watkins MT. A noninvasive murine model of hind limb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2004; 116(1):55-63

El registro del flujo se lleva a cabo antes de inducir la isquemia (registro basal, 100%), y posteriormente se referencian al mismo los valores detectados durante la reperusión, que se expresan en tanto por ciento respecto al flujo basal. Aunque tras una isquemia existe una hiperemia reactiva en los primeros momentos del retorno del flujo sanguíneo, la norma es que disminuya el flujo en las primeras horas de la reperusión. Así, aunque 1 hora de isquemia no parece tener efectos sobre la microvascularización, 3 horas de isquemia reducirían con significación estadística el flujo al entorno del 50% a las 4 horas de la reperusión³⁵⁷, dejando de alcanzar diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas³⁵⁴.

Hemos identificado pocos estudios donde la microvascularización es un elemento de valoración del efecto de un tratamiento experimental tras una isquemia de miembros. Wang y cols indican que el pre-tratamiento con melatonina antes de una isquemia de un miembro inferior de rata de 4 horas, aumenta el microflujo respecto al basal desde un 54% en el grupo control a un 85% en el grupo tratamiento, a las 24 horas de reperusión²⁴⁵. Por otra parte, Schoen y cols observan que en un modelo similar de isquemia de miembro inferior en rata, el preconditionamiento isquémico aumenta significativamente la hiperemia en los primeros 30 minutos de la reperusión, respecto al grupo control, alcanzando valores por encima del 200% del flujo basal. Lamentablemente, su observación no continúa durante las primeras horas de reperusión, cuando cesa el periodo de hiperemia y empiezan a poder valorarse alteraciones de la microvascularización por el daño de isquemia-reperusión²⁸⁷.

La medición de la microvascularización mediante Láser Doppler también ha sido empleada para asegurar que la isquemia inducida es completa, como sistema objetivo frente a datos clínicos subjetivos como la palidez, ausencia de pulsos, o ausencia de sangrado tras un corte³⁵⁷.

Indicadores de estrés oxidativo

Incluimos bajo este epígrafe una serie de sustancias cuyo aumento denota una mayor actividad redox, en el contexto de un aumento de radicales libres de oxígeno, lo que ocurre durante el proceso de reperusión tras la isquemia.

De forma clásica, se ha medido directamente la producción de RLO como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, o radical hidroxilo³⁶³. Estos radicales pueden medirse también en sangre, y se recomienda hacerlo en los primeros minutos (hasta 20) de la reperusión. La cuantificación se lleva a cabo mediante quimioluminiscencia, en un proceso largo y caro²⁹⁷.

También se puede abordar la cuestión desde el punto de vista inverso, es decir de la cuantificación de los sistemas antioxidantes remanentes, midiendo la concentración de superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa y glutatión peroxidasa en sangre o en los tejidos sometidos a la isquemia²⁴⁰. Recientemente, se ha propuesto la medición de la

llamada Capacidad Antioxidante Total (en inglés *TAC*, *Total Antioxidant Capacity*). En este caso, se añadiría al suero una concentración conocida de un radical libre “sintético”, que sería neutralizado por los sistemas antioxidantes remanentes. La cuantificación de esta neutralización se lleva a cabo mediante espectrofotometría³⁰².

Por otra parte, también es posible medir los niveles de Hipoxantina en sangre, en tanto representa el producto de la degradación de las reservas energéticas de la célula y es una molécula precursora de la formación de anión superóxido con la conversión a Xantina por la Xantina Oxidasa, como se ha descrito anteriormente. La Hipoxantina sería entonces un indicador del estrés redox al ser un precursor necesario de la formación de radicales libres. Se ha descrito su medición en sangre en los primeros minutos de la reperusión³⁰¹.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos que buscan medir el daño por isquemia-reperusión de forma inmediata, suelen decantarse por la medición de sustancias resultantes del daño molecular producido por los radicales sobre ADN, proteínas y sobre todo lípidos. Así, se han determinado sustancias como 8-hidroxi-deoxiguanosina, sulfóxido de metionina, albúmina modificada por la isquemia (IMA, del inglés *ischemia-modified albumin*), isoprostanos e isofuranos y, sobre todo, malondialdehído (MDA)^{250, 297, 298, 299, 301, 302, 304}.

La albúmina, principal proteína del torrente sanguíneo, muestra de forma característica una modificación en su extremo N-terminal durante los periodos prolongados de isquemia, dando lugar a la denominada **albúmina modificada por la isquemia (IMA)**. La IMA ha sido especialmente estudiada en la isquemia coronaria, pero también se ha descrito su aumento durante isquemias de tejido muscular en extremidades³⁶⁴. Su cuantificación se realiza mediante espectrofotometría y según un modelo colorimétrico³⁶⁷. Este parámetro también ha sido empleado para valorar la eficacia de tratamientos experimentales para el daño por isquemia-reperusión de extremidades, con medición en sangre en los primeros minutos de la reperusión²⁵⁰.

Los **isoprostanos e isofuranos** son productos de la lipoperoxidación, resultantes de la acción de los RLO sobre las membranas celulares y lipoproteínas³⁶⁵. Su medición en

sangre, mediante espectrometría-cromatografía de masa, permite estimar el grado de estrés oxidativo³⁶⁶. Se han estudiado como marcadores del daño por isquemia-reperfusión en extremidades, con la conclusión de que la anestesia espinal es más protectora frente al estrés oxidativo que la anestesia general³⁰⁴. De forma llamativa en este apartado, la medición de estos marcadores no se circunscribió sólo al periodo de perfusión inmediata, sino que se prolongó durante las primeras 24 horas; con todo, las alteraciones detectadas fueron mucho más pronunciadas en los primeros minutos de perfusión, con disminución progresiva posterior y sin cambios relevantes desde las 2 a las 24 horas.

Finalmente el **malondialdehído (MDA)** constituye el marcador más frecuentemente empleado en sangre en los primeros minutos de la perfusión. Como se ha señalado antes, el MDA es un producto de la peroxidación lipídica, y hay consenso en considerarlo como un marcador sensible del estrés oxidativo. La medición de MDA se realiza mediante espectrofotometría, tras un procesamiento relativamente complejo, descrito por Yagi y cols³⁶⁸. Se han comparado los niveles de MDA en suero de pacientes sometidos a isquemia, en pacientes control y tratados experimentalmente, en múltiples ocasiones, como hemos ido mencionando en apartados anteriores^{250, 257, 260, 297, 298, 299, 301, 302}. Conviene remarcar que en todos ellos, la medición se realizaba en los primeros minutos de la perfusión, desde el primer minuto a los 20 minutos.

Además de la medición en sangre, también se ha estudiado la concentración de DMA en los tejidos sometidos a isquemia, como membrana sinovial²⁵¹ o músculo²⁶⁰.

Marcadores bioquímicos de daño local

En este caso, se trata de detectar las consecuencias del daño sobre la fibra muscular. Así, se miden en suero enzimas que en condiciones normales se encuentran a nivel intracelular, y que salen al torrente sanguíneo cuando hay una muerte celular.

La **Mioglobina (Mb)** es un marcador clásico. Se trata de una hemoproteína sarcoplasmática monomérica de 153 aminoácidos y de tamaño molecular pequeño (18kDa) responsable, como se ha repasado antes, del transporte y almacenamiento de oxígeno dentro del tejido

muscular. La mioglobina aporta oxígeno extra al músculo, para que éste mantenga un nivel de actividad alto durante un mayor periodo de tiempo. En condiciones normales es apartada de la circulación mediante la haptoglobina, pero ante un daño muscular pronunciado se libera una gran cantidad de mioglobina que satura a este sistema, aumentando su concentración en la sangre. Su vida media es bastante corta y precede al incremento en suero de la CK. En humanos, los niveles normales en suero son inferiores a 100 µg/L y en orina a 10 µg/L¹³⁸. También en humanos, se considera que tras un proceso de rabdomiolisis se pueden detectar concentraciones de mioglobina en suero a partir de 1-3 horas, alcanzando un pico máximo a las 8-12 horas, y retornando a la normalidad a las 24 horas del insulto³⁶⁹.

En ratas la concentración fisiológica sería menor a 10 µg/L³⁷⁰, y hay que señalar que la molécula de Mioglobina es levemente diferente de la humana. Esto será analizado en el apartado de material y métodos, pues esta diferencia tiene su implicación técnica a la hora de plantear una cuantificación de la Mb en suero. En el competo trabajo de Murata y cols³⁵⁵, se sugiere que el pico de Mb en suero se alcanzaría en la rata entre las 2 y las 3 horas de la reperusión, con valores que excederían los 700 µg/L tras una isquemia prolongada.

La principal enzima muscular y la más empleada en la práctica clínica es la **Creatin Kinasa (CK)**. Como hemos señalado en el apartado de fisiopatología, la CK tiene la función de restaurar los niveles de Adenosin Trifosfato (ATP) a partir de Adenosin Difosfato (ADP), y dado el elevado consumo energético de la célula muscular, se encuentra en grandes cantidades en la misma. Por ello, su aumento es un indicador bastante específico de daño muscular. La CK muestra una elevación más progresiva que la Mb. Como ocurría antes, hay diferencias en la evolución temporal de la elevación desde el modelo experimental con animales a la práctica clínica. Mientras en humanos la CK alcanza un pico a las 24 a 72 horas tras un daño sobre tejido muscular¹³⁸, en ratas se sugiere que este pico tendría lugar a las 3 horas de la reperusión tras un periodo de isquemia³⁵⁵. Por otra parte, los valores fisiológicos son similares, entre 50 y 150 UI/L^{138, 370}. Aunque no hay establecido un valor límite para hablar de rabdomiolisis, algunos

autores defienden que se puede plantear el diagnóstico con valores 5 veces por encima de los fisiológicos, a partir de 500-750 UI/L³⁷¹. En la clínica, la CK es el principal indicador de la extensión de un daño muscular y de su evolución en el tiempo, aunque esta medición en la práctica habitual se realiza en el contexto de rabdomiolisis tras síndrome de aplastamiento^{64, 98}, y no en una isquemia-reperfusión corta como es nuestro caso.

A nivel experimental en animales, la CK ha sido también frecuentemente evaluada como indicador de sufrimiento muscular en estudios ya mencionados^{65, 70, 350, 355, 361}. Si nos fijamos más concretamente en modelos murinos^{355, 361}, podemos aproximar que tras un periodo de isquemia de un miembro inferior de 3 horas, encontraremos valores de entre 10000 y 20000 UI/L a las 3 ó 4 horas de perfusión.

Desgraciadamente, el único estudio que hemos identificado en el que se estudia CK (y LDH) como indicador del daño por isquemia-reperfusión de extremidades en el ser humano, sólo realiza dicha medición a los 15 minutos de la perfusión, cuando apenas han empezado a aumentar, y por tanto, con resultados que no nos resultan de mucha utilidad³⁰¹. En otros casos se mide el aumento de CK tras muy diversas cirugías de miembros con y sin isquemia³⁸¹ o tras cirugías sin isquemia como son las artroplastias de cadera³⁸²; tratándose en ambos casos de escenarios distintos al que pretendemos caracterizar.

También se ha estudiado el comportamiento de la **Lactato Deshidrogenasa (LDH)**^{70, 355, 361} como indicador del daño muscular. Se trata de una enzima con actividad oxidorreductasa que cataliza una reacción redox en la que el piruvato es reducido a lactato a través de la oxidación de NADH a NAD⁺. Se encuentra en varios tejidos como el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones, por lo que no es un marcador tan específico de la rabdomiolisis como CK³⁷². En humanos se consideran fisiológicos valores de 100 a 200UI/L de LDH en suero¹³⁸, mientras que en ratas suelen considerarse normales niveles más bajos, de en torno a 40-50 UI/L³⁷⁰. De nuevo con atención a los modelos murinos de isquemia-reperfusión^{355, 361} la LHD alcanzaría unos valores entre 800 y 1800 UI/L, para 3 horas de isquemia y 3-4 horas de perfusión, momento en que se intuye, al igual que pasaba con la CK, que los valores alcanzan el pico máximo.

Marcadores bioquímicos de daño no específico de tejido muscular, remoto o con implicación sistémica

En los estudios que hemos ido mencionando, también se evalúan otra serie de parámetros, que por no ser específicos del tejido muscular, caben ser clasificados bajo otro encabezamiento. En el caso del aumento de las enzimas que podríamos denominar “ubicuas”, es difícil decir si es sólo atribuible al daño local, o más bien en consecuencia de un daño en tejidos viscerales remotos; éste sería el caso de GOT. En otros casos, las alteraciones son más dudosamente atribuibles al daño del tejido muscular, y hay que achacarlas a una repercusión sistémica del daño; un ejemplo sería el aumento de GPT. La alteración de otros parámetros, por último, sí pueden ser consecuencia de la miolisis, pero más que indicadores de la misma, se estudian en cuanto a la repercusión sistémica que puedan tener. En este grupo podríamos incluir los desequilibrios electrolíticos o la acumulación de productos de desecho con eliminación renal –indicadores, por tanto, del deterioro de la función renal- como Urea y Creatinina.

Entre los indicadores de daño no específico del tejido muscular tendríamos las transaminasas Aspartato aminotransferasa (AST) o **Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT)**, y Alanina aminotransferasa (ALT) o **Glutamato-piruvato transaminasa (GPT)**. Ambas tienen la función de catalizar reacciones de transaminación, importantes en especial para la síntesis de aminoácidos no esenciales y para la degradación de la mayoría de aminoácidos.

Podemos considerar a GOT como una enzima ubicua, en tanto está presente de forma mayoritaria en el hígado pero también en otros tejidos como son, en orden de abundancia: miocardio, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, leucocitos y eritrocitos. En el único modelo de los presentados que mide la GOT en un modelo de rata, vemos que sus valores se pueden aproximar a 400UI/L tras isquemia de 3 horas de de un miembro inferior, y a las 4 horas de perfusión³⁶¹.

La GPT, por el contrario, es una enzima bastante específica del tejido hepático, por lo que su alteración cabría ser achacada a un daño remoto en dicho órgano. En el estudio antes

mencionado, la isquemia de una pata de 3 horas en la rata, daría lugar a valores en torno a 120UI/L, a las 4 horas de la reperfusión³⁶¹.

Como referencia, cabe recordar que las cifras normales en humanos de GOT y GPT estarían en ambos casos por debajo de las 30-40UI/L¹³⁸, y cabe mencionar que en rata se considerarían fisiológicos niveles hasta un 50% más altos que ese límite alto³⁷⁰.

La **Fosfatasa Alcalina (FA)** es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. También se encuentra en múltiples tejidos del cuerpo, pero es particularmente alta en huesos. Es además un enzima estudiado de forma rutinaria en las analíticas generales en la práctica clínica. Pese a ello, no he encontrado estudios clínicos ni trabajos experimentales en los que se considere la FA como indicador del daño por isquemia-reperfusión en extremidades.

El **Lactato**, producto del metabolismo anaerobio, suele emplearse en la clínica como un indicador de déficit de perfusión de tejidos por compromiso sistémico, y orienta sobre la gravedad del estado general en un paciente crítico. Sólo se valora en uno de los estudios mencionados³⁵⁵, en el contexto más de un *crush syndrome* (isquemia bilateral de 5 horas) que de una isquemia programada como las empleadas durante la cirugía ortopédica de extremidades. En este trabajo, tanto el Lactato como el HCO_3^- , el pH o el anión gap se ven alterados a las 3 horas de la reperfusión, con normalización casi completa a las 24 horas.

En cuanto a los **iones**, y tal y como se ha explicado en el apartado de fisiopatología, la rabdomiolisis tiende a provocar una hiperpotasemia y una hiponatremia. Esta primera, además, podría llegar a provocar incluso compromiso vital por arritmia cardíaca. En los estudios experimentales de isquemia-reperfusión en la rata, vemos que la isquemia de ambas extremidades durante 3 horas puede elevar la potasemia hasta 6mEq/l³⁶¹, y que cuando la isquemia se prolonga en ambas extremidades hasta las 5 horas, el potasio podría alcanzar peligrosos valores por encima de 8mEq/l³⁵⁵. Conviene recordar que la potasemia fisiológica se situaría entre 3,5 y 5mEq/l tanto en el ser humano como en la rata^{138, 370}. Al menos en el ser humano, valores por encima de 5,5mEq/l se consideran en rango de

hiperpotasemia, y la cardiotoxicidad puede aparecer con más facilidad a partir de los 6,5mEq/l. No se aprecian en estas experiencias alteraciones reseñables en cuanto a los niveles de sodio u otros iones.

Finalmente, hay que mencionar en este apartado los dos principales indicadores de la función renal empleados en la práctica clínica, **Urea y Creatinina**.

La urea, principal producto terminal del metabolismo de las proteínas en el hombre y en los demás mamíferos, como la rata, se expresa en ocasiones como nitrógeno ureico o BUN (*Blood Urea Nitrogen*); con relación $\text{Urea (mmol/l)} = \text{BUN (mg/dl)} / 0.357$. Durante la rabdomiolisis hay un aumento de la concentración de urea en sangre, que ha de ser filtrada por el riñón. Este aumento es proporcional al daño tisular, y su eliminación a lo largo de la reperfusión nos indica si hay un adecuado aclaramiento renal. En el ser humano, se consideran valores fisiológicos de urea los inferiores a 20mg/dl¹³⁸, mientras que en la rata el rango normal se sitúa entre los 30 y los 50mg/dl³⁷⁰. En la rata, 3 horas de isquemia de ambas extremidades inferiores darían lugar a niveles de urea de en torno a 70mg/dl³⁶¹. Además, si vemos la evolución, observamos cómo a diferencia de otros parámetros descritos hasta el momento, la urea parece alcanzar su pico hacia el final del periodo de seguimiento, a las 24 horas de la reperfusión³⁵⁵.

La creatinina, por último, representa la degradación de la creatina. Como se ha señalado, se trata de un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos, que aumenta en caso de lisis muscular, y que tiene una eliminación renal. Como ocurría con la urea, el aumento de la creatinina es proporcional al daño muscular, y su aclaramiento durante la reperfusión monitoriza la función renal. El rango normal en el hombre son 0,8 a 1,3mg/dl¹³⁸, mientras que en la rata se consideran valores similares aunque en una horquilla más amplia, entre 0,4 y 1,5mg/dl³⁷⁰. El rango amplio se emplea porque aunque normalmente los valores tienden a estar en el límite bajo de dicha horquilla, hay multitud de situaciones que pueden crear un cierto aumento de la creatinina, que no pueden considerarse necesariamente patológicas. En la rata, 3 e incluso 5 horas de isquemia de ambas extremidades inferiores producen un aumento en los niveles de creatinina, pero que no llegan a salirse de rango^{355, 361}.

Parámetros anatomopatológicos

La anatomía patológica es uno de los principales medios de evaluación del daño por isquemia-reperfusión en investigación experimental. Por contra, supone un medio difícilmente utilizable en la práctica clínica. Expondremos los parámetros anatomopatológicos más frecuentemente empleados.

En otros apartados hemos hablado de la **Mieloperoxidasa (MPO)**, enzima presente en los fagosomas de los neutrófilos y de los monocitos, en los llamados gránulos azurófilos o primarios. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de organismos catalizando la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso, que constituye un RLO que como efecto adverso daña las células vecinas, iniciando la peroxidación lipídica de membranas. En el contexto del síndrome de isquemia-reperfusión, la determinación de la actividad de MPO en los tejidos es un buen indicador de la activación de PMN, de la infiltración de estos PMN en los tejidos y de la generación de RLO en los mismos.

La determinación de la actividad de MPO en un tejido se lleva a cabo usualmente mediante un sistema relativamente complejo descrito por Bradley y cols³⁷³. Tras un procesamiento de las muestras, en última instancia la actividad de MPO se determina por espectrofotometría. Este sistema se emplea en varios de los estudios presentados de isquemia-reperfusión de miembros inferiores en rata^{314, 315, 355}. Sobre tejido muscular, tras 2 horas y media de isquemia hay un incremento de la actividad de MPO superior al 50% respecto a los valores del grupo control, con valores inferiores a 0,6U/g de tejido³¹⁴, a las 24 horas de la reperusión. Observando los valores de MPO de forma evolutiva, en otro trabajo, se aprecia cómo los valores ascienden progresivamente a lo largo de la reperusión y alcanzan el máximo a las 24 horas³⁵⁵. En esta última aportación, resulta especialmente interesante el que los investigadores no sólo miden la actividad de la MPO en el tejido muscular, sino también en riñón y pulmón. Aunque se trata de un modelo de síndrome de aplastamiento con tiempos muy largos de isquemia, de 5 horas, resulta llamativo que la actividad de la MPO es mucho mayor en el pulmón que en el tejido muscular (en torno a

30U/g en pulmón y cerca de 8U/g en músculo), a las 24 horas de reperusión. En comparación con los anteriores, la actividad en riñón es testimonial, inferior a 0,5U/g³⁵⁵.

El **Malondialdehído (MDA)**, producto de la peroxidación lipídica que, como hemos dicho antes, se determinaba en algunos estudios clínicos en suero en el postoperatorio inmediato, también ha sido medida en muestras de anatomía patológica en modelo animal, a las 24 horas de reperusión^{235, 315}. En este caso, las muestras se procesan según el método de Uchiyama y Mihara³⁷⁴, midiendo la cantidad de MDA por espectrofotometría, y expresando el resultado en nanomoles por gramo. Si los valores fisiológicos estarían por debajo de 1nmol/g²³⁵, 4 horas de isquemia de ambos miembros inferiores daría lugar a acumulación de MDA por encima de los 30nmol/g en el tejido muscular.

También se ha evaluado la cantidad de **Glutación**, como sistema antioxidante endógeno, en tejido muscular sometido a isquemia en extremidad inferior en la rata³¹⁵. Se utiliza el llamado reactivo de Ellman, y se determina la cantidad de glutación de nuevo por espectrofotometría, en micromoles por gramo de tejido³⁷⁵. Parece que una isquemia de 4 horas en ambos miembros inferiores, a las 24 horas de la reperusión, mostraría unos niveles de glutación en tejido muscular en torno a 0,28μmol/g.

Ocasionalmente se ha intentado calcular la viabilidad de un tejido sometido a isquemia a través de la prueba del **Nitroazul de Tetrazolio (NBT)**. En las células viables, el NBT es reducido a una forma insoluble y fuertemente coloreada (formazano) por parte de las enzimas mitocondriales. Esta conversión puede ser cuantificada en base a la coloración en las muestras anatomopatológicas, y se expresa como un índice de actividad mitocondrial. La tinción con NBT ha sido propuesta como indicador del daño por isquemia-reperusión en extremidades³⁵⁷, y de hecho se ha empleado para evaluar la eficacia de algunos tratamientos experimentales^{236, 242}. La determinación suele hacerse a las 12 ó 24 horas de reperusión.

No obstante, la mayoría de los estudios presentados evalúan el daño muscular en base a criterios que podríamos denominar más “morfológicos” o “microscópicos”, principalmente el daño y/o necrosis muscular y el edema.

El daño y/o necrosis muscular se evalúa a nivel microscópico en multitud de estudios antiguos y recientes^{59, 69, 75, 235, 315, 350, 354, 355, 356, 357}. En ocasiones la evaluación se lleva a cabo a través de microscopía electrónica, lo que permite una descripción más exhaustiva de las alteraciones intracelulares en una célula dada pero impide tener una visión general de varias células^{69, 75, 350}. Por ello, la mayoría de los trabajos emplean la microscopía óptica, al permitir una mayor visión de conjunto^{59, 69, 235, 315, 350, 354, 355, 356, 357}. Como se ve, en algunos trabajos se utilizan ambas modalidades de microscopía.

En casi todos los casos, al menos cuando se utiliza la microscopía óptica, los autores no se limitan a describir los cambios detectados, sino que dan una cuantificación del daño global en el conjunto de la pieza. Para ello, lo habitual es indicar el número de fibras dañadas por campo, o con más frecuencia definirlo en porcentaje de fibras musculares dañadas o necrosadas respecto a las sanas, por campo. También es rutinario llevar a cabo esta cuantificación en varios campos distintos, dentro de la misma pieza, y sacar valores de media y desviación estándar. Los criterios morfológicos usuales para considerar una fibra muscular como sana o sin un daño relevante serían unos bordes bien definidos, con una misma textura y uniformidad a lo largo de las fibras, sin agujeros ni saltos, y una correcta visualización de los núcleos pericelulares y las células satélites. Por contra, las células dañadas o necrosadas presentarían bordes rotos o desdibujados, una textura y color no uniforme, agujeros en el citoplasma y núcleos celulares separados o desprendidos (figura 28).

Aunque en ocasiones se ha propuesto describir el daño de cada miocito conforme a distintas gradaciones de daño, actualmente hay una tendencia a diferenciar sólo entre fibras indemnes o fibras dañadas, para tratar de minimizar la subjetividad inherente a los sistemas de estratificación basados en la consideración del observador, y porque parece que sería mucho más efectivo y con mayor validez intra e interobservador³⁵⁶.

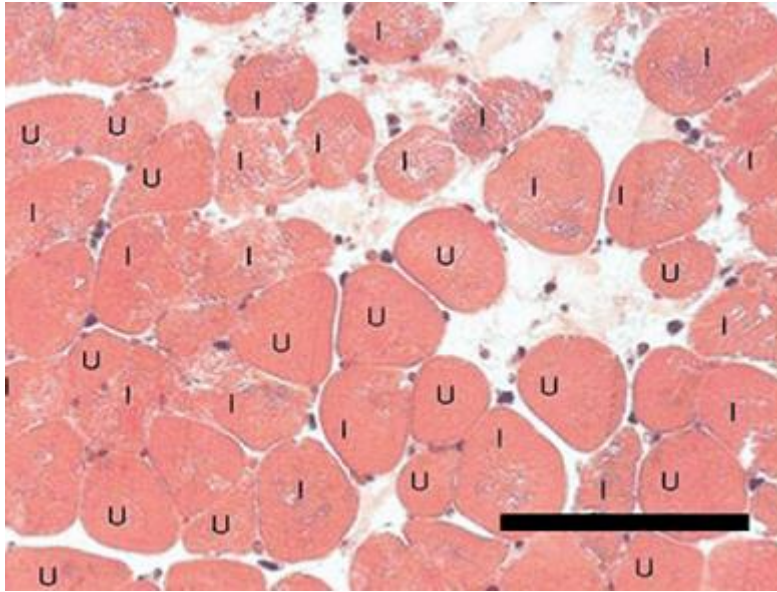


Figura 28. Campo de microscopía óptica donde se evalúa un corte de tejido muscular. Las fibras se clasifican según criterios morfológicos en sanas (U) y dañadas (I).

Tomado de McCormack MC, Kwon E, Eberlin KR, Randolph M, Friend DS, Thomas AC, et al. Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury. *Surgery* 2008; 143(1):126-33

En un modelo murino de 90 minutos de isquemia de extremidades inferiores, una evaluación de corte de músculo gastrocnemio a las 24 horas de perfusión, mostraría en torno a un 25% de fibras dañadas³⁵⁴. En otro estudio que prolonga el tiempo a 2 horas, el porcentaje de fibras lesionadas aumentaría hasta casi un 60%. Además, observando la evolución a las 3 horas, 24 horas y 48 horas de perfusión, se concluye que las 24 horas serían el momento ideal para realizar la evaluación, en tanto que muestran el mayor daño³⁵⁶. La prolongación de la isquemia a 4 horas aumentaría el porcentaje de fibras lesionadas o necrosadas hasta el 80% a las 24 horas de perfusión, aunque en un modelo de conejo²³⁵. En un modelo de rata, para estos últimos tiempos de isquemia y perfusión el porcentaje de fibras completamente necrosadas (excluyendo las sólo dañadas) alcanzaría el 45%³¹⁵.

La medición del **edema** constituye la variable anatomopatológica macroscópica más frecuentemente estudiada en modelos experimentales de isquemia-reperfusión^{235, 314, 351, 354, 355, 357, 361}. Comparada con otros métodos, resulta mucho más fácil de ejecutar, y resulta ser un parámetro que se evalúa de forma rutinaria en la práctica clínica. La cuantificación del edema puede llevarse a cabo de distintas maneras. Es posible calcular el edema de un músculo mediante la comparación de peso inicial o húmedo con el peso seco, tras

deshidratación completa de la pieza^{314, 354}. También se puede comparar directamente el peso total del músculo (gastrocnemio) en relación al tamaño del animal^{235, 351, 355, 357}, o al mismo músculo de la pata contralateral. A pesar de que en la práctica clínica es común calcular el edema midiendo el perímetro de la extremidad, este sistema no es empleado en ninguno de los estudios descritos. Aunque en uno de los trabajos, sí se realiza una comparación del área de la sección del músculo cuádriceps²³⁵.

En estas experiencias, se describe que mientras el ratio peso húmedo / peso seco del gastrocnemio de la rata estaría en torno a 2,6 en condiciones fisiológicas, 3 horas de isquemia seguidas de 24 horas de perfusión incrementarían este ratio hasta un 4,1, un incremento del 58%³⁵⁷. Desde otro punto de vista, una isquemia a tensión controlada de 3 horas daría lugar a un incremento de en torno al 22% del peso del gastrocnemio, respecto a la población general, también a las 24 horas de la perfusión³⁵⁷. En un trabajo con modelo de conejo, el incremento del peso del cuádriceps en la extremidad sometida a 4 horas de isquemia fue de un 38%, en similar proporción al incremento del área de la sección del cuádriceps, siempre respecto a población control²³⁵. Lamentablemente no hay estudios en los que la comparación se haga pareada con la extremidad contralateral en el mismo animal, en aquellos trabajos en los que la isquemia es de sólo una de las patas^{350, 351, 357}.

Como última consideración dentro de este apartado, cabe señalar que aunque antes hemos dicho que la cantidad de PMNs en el tejido muscular sometido a isquemia suele calcularse de forma indirecta en base a la actividad de la MPO, existen algunos estudios en los que se plantea la medición directa de la **infiltración por PMNs** en el tejido sometido a isquemia. Esta medición puede llevarse a cabo realizando un conteo de PMNs por campo o milímetro cuadrado (figura 29)²³⁵. En este trabajo, la densidad leucocitaria en cuádriceps de conejo tras 4 horas de isquemia y 24 horas de perfusión se incrementaría en un 175% respecto a la población control. Esto es, un incremento desde valores fisiológicos de $1,68 \times 10^4$ células/mm² hasta una densidad de $4,63 \times 10^4$ células/mm².

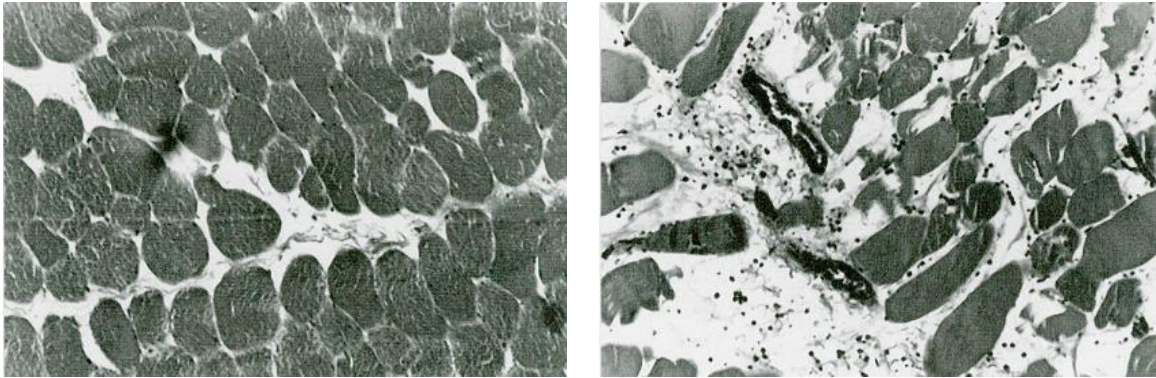


Figura 29. Campos de microscopía óptica en las que se aprecian cortes del músculo recto femoral en población general (izquierda) y tras 4 horas de ischemia y 24 horas de perfusión (derecha). Además de los cambios de la arquitectura fibrilar ya descritos tras una ischemia, puede observarse la abundante infiltración por polimorfonucleares neutrófilos.

Tomado de Deune EG, Koopman R, Smith ME, et al. Prevention of ischemia-reperfusion injury with a synthetic metalloprotein superoxide dismutase mimic, SC52608. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98:711

Recientemente, se están desarrollando técnicas que permiten la observación in vivo, planteándose nuevas formas de evaluar el reclutamiento de neutrófilos, según su comportamiento de quimiotaxis, adhesión y transposición a través del endotelio vascular, aunque su estudio se ha dirigido más a la infiltración leucocitaria tras ejercicio, y no tanto a un modelo de ischemia-reperfusión propiamente dicho³⁷⁶.

Resultados funcionales

Aunque los resultados funcionales estarían entre los de mayor interés en la práctica clínica, una evaluación funcional en el animal de experimentación es más difícilmente realizable en lo respectivo a fuerza, balance articular o cojera, Otros datos funcionales habitualmente considerados en la clínica como el tiempo de retorno a actividades diarias laborales o deportivas, son directamente imposibles de medir en el modelo animal. Las mediciones no invasivas, además, están sujetas a una gran carga subjetiva.

Por ello, las pruebas de recuperación funcional en el animal de experimentación se llevan a cabo habitualmente mediante pruebas objetivas como la **electroestimulación** y la **electroneuromiografía**.

La electroestimulación se lleva a cabo de manera invasiva, con disección del músculo y conexión del mismo con un dinamómetro o transductor de fuerza, midiendo la fuerza contráctil del músculo al someterlo a una estimulación eléctrica. Dicha fuerza se expresaría en Newtons por gramo de músculo³¹⁴. En ese estudio referenciado se aprecia cómo 2,5 horas de isquemia darían lugar a una disminución de fuerza contráctil del tibial anterior en la rata de más del 50% (de unos 2N/g a unos 0,75N/g) en las primeras 12 y 24 horas de reperusión.

Hay estudios electromioneurográficos más completos, en los que además de la fuerza contráctil se evalúa el pico de tensión, el tiempo medio de relajación, la tetanización, o la fatiga. Estos últimos estudios, por el contrario, se realizan en un plazo más largo, de 2 semanas, de acuerdo de la bibliografía^{352, 353}. En los mismos, se aprecian alteraciones en la práctica totalidad de los animales, con una disminución de la fuerza contráctil en gastrocnemios de ratas de hasta el 80% respecto a la extremidad contralateral³⁵³. Sin embargo, en otra experiencia llevada a cabo en extremidades inferiores de rata se apreciaron anormalidades electromiográficas pero sin déficit motor para distintas presiones de 200 a 400mmHg y 1 a 3 horas de isquemia, a las 6 semanas de evolución⁶⁷. Estos resultados resultarían coherentes con la experiencia clínica en isquemia de extremidades¹⁰⁵, tal y como se ha explicado anteriormente.

Hipótesis y Objetivos

Resumen de la situación actual

Recapitulando todo lo expuesto hasta ahora, podemos concluir lo siguiente:

-La realización de una isquemia programada, normalmente mediante la utilización de un manguito neumático, es un procedimiento rutinario en la cirugía de extremidades, en Cirugía Ortopédica y Traumatología. La gran ventaja que aporta es disponer de un campo exangüe, donde es más fácil la disección anatómica e identificación de estructuras. En algunas cirugías, como las realizadas en la mano, la isquemia es prácticamente indispensable.

-Este procedimiento, no obstante, no es inocuo. Produce un daño que puede clasificarse según tres orígenes etiológicos: daño por compresión en los tejidos bajo el manguito; daño por anoxia en los tejidos distales al manguito; y daño local y también sistémico por el síndrome de isquemia-reperfusión, que es el mayor de los tres.

-El síndrome de isquemia-reperfusión ha sido ampliamente descrito y estudiado en multitud de localizaciones y tejidos. Básicamente consiste en una respuesta inmune sistémica, desencadenada por la liberación al torrente sanguíneo de distintos mediadores proinflamatorios y radicales libres de oxígeno, acumulados en un órgano o tejido sometido a un periodo más o menos largo de isquemia, cuando ésta concluye y se inicia la perfusión del mismo.

-En las extremidades, el tejido más susceptible de ser lesionado, por cualquiera de las 3 vías etiológicas, es el músculo. Este tejido es también el principal responsable de las lesiones que pueden darse a nivel sistémico. Especialmente en isquemias muy prolongadas o bajo presiones muy altas (como en el síndrome de aplastamiento), la miolisis masiva precipita la salida al torrente sanguíneo de distintos catabolitos. La hiperpostasemia por toxicidad cardiológica y la mioglobulinemia por toxicidad nefrológica, pueden dar lugar a un compromiso sistémico e incluso la muerte. Pero también en isquemias más cortas con miolisis menos severas, se desencadena igualmente en mayor o menor medida un síndrome de isquemia-reperfusión.

-En isquemias inferiores a 3 horas y a las presiones habituales ejercidas en la isquemia programada de quirófano, son excepcionales las complicaciones sistémicas, pero sí hay un daño local cuantificable. Este daño ha sido documentado a nivel experimental y clínico, en base a parámetros bioquímicos, anatomopatológicos, y funcionales, y es atribuible a las tres vías patogénicas descritas.

-Aunque clásicamente se consideraba despreciable la implicación clínica real de este daño, en los últimos años hay una evidencia clínica creciente en el sentido de que realizar un procedimiento bajo isquemia implica más dolor, más edema, y peor recuperación funcional, en el corto y en el medio plazo, respecto a realizar el mismo procedimiento sin isquemia.

-Las isquemias empleadas habitualmente en la práctica clínica suelen ser de 1 ó 2 horas, pero en ocasiones se alargan hasta acercarse a las 3 horas. Las 3 ó 4 horas de isquemia se considera el límite a partir del cual el daño deja de circunscribirse al área local, y pueden comenzar a aparecer las complicaciones sistémicas. Esto está documentado a nivel experimental, y también de manera clínica tras la experiencia en guerras y catástrofes.

-El reconocimiento de este daño ha dado lugar a la descripción de distintos sistemas para disminuir la morbilidad derivada del uso de manguitos de isquemia, especialmente cuando esta isquemia se instaura de forma programada en el medio hospitalario, en el contexto de una cirugía de miembros. Para combatir el daño secundario a la compresión, se sugiere emplear manguitos anchos y preformados, y emplear fórmulas para realizar la mínima presión necesaria. Buscando disminuir la lesión derivada de la anoxia de tejidos, se recomienda emplear el mínimo tiempo posible de isquemia. Pero actualmente, no se toma ninguna medida para minimizar el daño derivado del Síndrome de isquemia-reperfusión, considerado por otra parte el más relevante.

-A nivel experimental, se están ensayando en aparato locomotor terapias y procedimientos importados del tratamiento de isquemia-reperfusión a nivel visceral, sobre todo cardiaco. Básicamente consisten en terapias de pre y postcondicionamiento consistentes en aplicar periodos cortos de isquemia antes y/o después del periodo mayor de isquemia; y en

utilizar fármacos scavenger o de otro tipo que neutralicen el los radicales libres de oxígeno y mediadores proinflamatorios acumulados en el tejido sometido a isquemia, y liberados con la reperusión al torrente sistémico.

-La evaluación de estos tratamientos a nivel clínico, hasta el momento, se ha llevado a cabo en base al estudio principalmente de indicadores de estrés oxidativo, en el periodo perioperatorio inmediato, y sin evaluación de otras variables más cercanas a las empleadas en la práctica clínica.

-En esta línea de tratamientos experimentales el ácido fólico, con conocidas propiedades antioxidantes, ha demostrado en experiencias previas un efecto protector sobre el síndrome de isquemia-reperusión, al ser administrado previamente a la reperusión, a nivel visceral. Este fármaco tiene la ventaja de ser muy conocido, barato, aplicable por vía parenteral en forma de ácido folínico y sobre todo, tiene la fundamental ventaja de no tener toxicidad descrita, aún a dosis altas.

-La rata es un animal muy similar al humano, en cuanto a ciertas variables fisiológicas como son la tensión arterial o la anatomía de los miembros inferiores. Además, su tejido muscular exhibe una tolerancia a la isquemia muy similar a la descrita en el ser humano. Hay numerosos modelos experimentales que recrean el daño por isquemia y reperusión en extremidades inferiores, pero habitualmente emplean métodos invasivos o bien sistemas de inducción y mantenimiento de la isquemia que no son muy equiparables al manguito neumático utilizado de forma rutinaria sobre personas en la práctica clínica. En ratas, por último, este daño está principalmente definido en base a parámetros bioquímicos y anatomopatológicos, si bien la curva que describen los enzimas musculares tras un daño por isquemia-reperusión difiere respecto al ser humano y sólo está definida parcialmente; el daño a nivel funcional resulta más difícilmente medible, y habitualmente se lleva a cabo en base a electromiografía.

-No hay, por último, un modelo estandarizado de evaluación del daño, lo que dificulta la comparación de distintos tratamientos experimentales. Sí hay algunos estudios que tratan de caracterizar bien distintos aspectos del daño por isquemia-reperusión, y en base a ello

se pueden definir qué parámetros pueden medirse, y en qué momento. El uso de distintos animales de experimentación, distintos sistemas de inducción de la isquemia, y distintos tiempos de isquemia, hace que en muchos casos los estudios no puedan ser comparables o complementarios entre sí más que con algunas reservas.

Hipótesis

Se formulan las siguientes hipótesis sucesivas:

1. En un modelo experimental con ratas, debería de ser posible recrear el daño derivado de la utilización de la isquemia programada en miembros inferiores, utilizando presiones y tiempos equiparables a los empleados en la práctica clínica durante las cirugías que se practican en las extremidades, especialmente en Cirugía Ortopédica y Traumatología.
2. En dicho modelo animal, el daño derivado de la utilización de la isquemia debería de poderse cuantificar mediante parámetros bioquímicos y anatomopatológicos, tal y como se describe en la literatura.
3. La liberación de enzimas musculares tras la miolisis debería alcanzar un pico máximo en plasma de manera constante, definiendo así un momento óptimo para valorar el efecto de cualquier tratamiento experimental.
4. Prolongar el tiempo de isquemia en la extremidad, dentro de un margen, debería mantener el mismo perfil de daño reversible y limitado a lo local. Este incremento del daño serviría para detectar con mayor sensibilidad el posible efecto protector de un tratamiento experimental.
5. Debido a sus propiedades antioxidantes, y de acuerdo con las experiencias previas descritas en la literatura, el pre-tratamiento con ácido folínico debería de ser capaz de disminuir el daño muscular, en términos bioquímicos y anatomopatológicos, provocado por la isquemia de la extremidad inferior, respecto a animales no tratados.

Objetivos

Para dar respuesta a las hipótesis antes formuladas, se plantean los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un sistema de inducción y mantenimiento de isquemia en miembros inferiores en ratas que cumpla las siguientes condiciones:
 - Ser no invasivo, y no añadir ninguna morbilidad adicional al procedimiento de isquemia.
 - Posibilitar una exaguinación previa adecuada.
 - Proporcionar una isquemia con la presión mínima necesaria.
 - Monitorizar la tensión que está realizando.
 - Ser fiable, y mantener una isquemia constante a lo largo del experimento.
 - Ser reproducible, para llevar a cabo el experimento sin ninguna variación entre los distintos animales.
 - Adaptarse adecuadamente al animal del modelo, la rata.
 - Adaptarse, además, a las características individuales de cada rata, a su diámetro y forma de la extremidad.
2. Definir los parámetros a analizar, para cuantificar el daño producido en la extremidad sometida a isquemia, principalmente en tejido muscular, y el eventual daño sistémico.
 - Evaluación bioquímica.
 - Evaluación anatomopatológica.
3. Determinar la morfología de la curva descrita por los distintos parámetros bioquímicos analizados, a lo largo de la reperusión, y con especial atención a los enzimas indicativos de rabdomiolisis. Definir de esta forma el periodo de la reperusión donde las cifras son más altas y cuándo, por tanto, puede ser más interesante evaluar el efecto de eventuales tratamientos experimentales del daño por isquemia-reperusión.
4. Comprobar que el perfil bioquímico de daño sigue siendo similar tras diferentes periodos de isquemia, para cada parámetro bioquímico.

5. Validar este modelo con un conocido antioxidante, el ácido fólico. Se proyecta comparar el efecto que la infusión parenteral de ácido folínico ejerce sobre los parámetros bioquímicos y anatomopatológicos, tras isquemia en un miembro inferior de la rata.

Material y Métodos

Material

En este apartado desarrollamos todo lo respectivo a los animales empleados, el sistema de inducción y mantenimiento de la isquemia, y el fármaco experimental utilizado.

Animales

Para el presente trabajo se han utilizado un total de 101 ratas WAG/RijCrl (*Rattus norvegicus*) macho, con una características homogéneas de edad (adultos jóvenes, con media 4,3 meses; máximo 6 meses; mínimo 2,5 meses) y peso (media 305gr; mínimo 268gr; máximo 345gr). La distribución de los animales, que se explicará en detalle más adelante, se hizo *grosso modo* de la siguiente manera

- 20 individuos para definir la tensión mínima adecuada para asegurar la isquemia.
- 6 individuos para fijar los valores de referencia en la analítica sanguínea (población general).
- 48 individuos para definir el daño a nivel bioquímico, tras 2 y 3 horas de isquemia, y su evolución a lo largo de distintos momentos de la reperusión.
- 6 individuos para llevar a cabo la evaluación del tratamiento experimental, a nivel bioquímico.
- 8 individuos para definir el daño a nivel anatomopatológico tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión, sin tratamiento.
- 8 individuos para evaluar igualmente el daño a nivel anatomopatológico tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión, pero tras el tratamiento experimental.
- 5 individuos que fueron apartados durante la realización de la experiencia, por eventos que supusieran o podrían suponer una alteración de los resultados: 1 fallecimiento posiblemente derivado de complicaciones anestésicas, 2 exposiciones accidentales a mayor

tiempo de isquemia del estipulado, y 2 sospechas razonables de pérdida de la isquemia durante la realización de la misma. Cuando resultó necesario retirar un animal del experimento por estos motivos, se tomó un nuevo animal en sustitución del mismo.

La rata WAG/RijCrl está ampliamente descrita en la literatura y resulta, como hemos detallado anteriormente, el modelo animal más frecuentemente empleado en estudios que evalúan el daño por isquemia-reperfusión sobre tejido muscular, y concretamente en extremidades inferiores.

Para esta tesis, resulta de especial interés resaltar los valores habituales de tensión arterial fisiológica, y que varían en la sistólica entre 75 y 120mmHg y en la diastólica entre 60 y 90mmHg³⁷⁷; más concretamente, se proponen los valores medios de 113mmHg para la sistólica y 81mmHg para la diastólica³⁷⁸.

Es importante destacar asimismo la similitud de la anatomía muscular del miembro inferior de la rata respecto al ser humano, con los mismos grupos musculares, aunque se acepta que la rata tiene en general un mayor desarrollo de los mismos³⁸⁰. Como se ha señalado también durante la introducción, la experiencia experimental nos permite afirmar que el comportamiento de la musculatura de la rata –y otros animales de experimentación- ante un insulto isquémico es perfectamente equiparable al de la musculatura del ser humano, en cuanto a tiempos de tolerancia a la misma^{57, 58, 59, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73}.

Respecto a la evaluación de distintos parámetros bioquímicos, hay que volver a remarcar que en general la rata tiene los mismos procesos bioquímicos que el ser humano, y las mismas enzimas³⁷⁰. Quizás la única excepción de interés para este trabajo sea la diferencia morfológica de la Mioglobina, aunque con una trascendencia más bien de tipo técnico a la hora de su cuantificación, como luego desarrollaremos.

Teniendo, como decimos, una equiparable dotación y comportamiento enzimático, el rango considerado fisiológico de los parámetros bioquímicos más frecuentemente estudiados en la clínica y de particular interés para esta tesis, es igual o casi igual al del ser humano en casi todos los casos. Se detallan en la tabla 6 dichos rangos de normalidad en el ser humano¹³⁸ y en la rata³⁷⁰.

Tabla 6. Valores de referencia de distintos parámetros sanguíneos, en el ser humano y en la rata. Los valores son orientativos, y pueden variar según la técnica empleada o por condiciones ambientales.

	Hombre adulto joven	Rata macho, adulto joven (4-6 meses)
Sodio (Na)	135 a 145 mEq/L	142 a 148 mEq/L
Potasio (K)	3,7 a 5,0 mEq/L	3,8 a 5,2 mEq/L
Cloro (Cl)	102 a 109 mEq/L	94 a 106 mEq/L
Urea	7 a 20 mg/dL	28 a 42 mg/dL
Creatinina (Cr)	0,8 a 1,4 mg/dL	0,7 a 2,2 mg/dL
Fosfatasa Alcalina (FA)	44 a 147 UI/L	82-164 UI/L
Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT)	8 a 30 UI/L	45 a 65 UI/L
Glutamato piruvato transaminasa (GPT)	10 a 32 UI/L	38 a 50 UI/L
Creatin Kinasa (CK)	20 a 195 UI/L	50 a 200 UI/L
Lactato deshidrogenasa (LHD)	100 a 200 UI/L	30 a 80 UI/L

Puede apreciarse que, en casi todos los casos, la rata tiene unos rangos fisiológicos en el límite superior o ligeramente superiores a los considerados para el ser humano.

Además de estas diferencias leves en los valores de referencia, hay discrepancias relevantes en cuanto al comportamiento de las enzimas, con un aumento en sangre y aparición de un pico mucho antes en la rata que en el hombre. Para la presente tesis, cabe volver a remarcar que el pico de CK y LDH parece que podría alcanzarse en torno a las 3 horas de la reperusión, mucho antes de lo que ocurre en el ser humano¹³⁸, según los datos que tenemos en la bibliografía publicada al respecto^{355, 361, 380, 381, 382}.

Sistema para implementar la isquemia

En el primer paso de exanguinar el miembro, se ha utilizado desde el principio una venda elástica tipo tortor, arrollada con cierta tensión en sentido distal a proximal. De este modo se consigue evacuar la práctica totalidad de la sangre contenida en el miembro. Para desarrollar este método no fueron necesarios apenas ensayos, pues se asemeja mucho al sistema de banda de Esmarch empleado en la práctica clínica, y representa un método muy rápido, efectivo, y sencillo de ejecutar. Se ilustra este procedimiento en la figura 30, con el animal acostado sobre el sistema mecánico de cable a tensión que luego describiremos.



Figura 30. Aplicación del tortor a modo de banda de Esmarch.

Sistemas para mantener la isquemia

Durante el desarrollo de esta tesis, se han empleado diferentes métodos para conseguir la isquemia del miembro de la rata, hasta dar con el adecuado. Los motivos de desechar unos y seleccionar el otro los desarrollaremos en Resultados, y a continuación se hará una descripción completa pero concisa de los fundamentos de cada uno de los sistemas.

Banda elástica tipo tortor

La primera aproximación para mantener la isquemia, tras su inducción, consistió en la utilización del tortor utilizado durante la exanguinación, manteniéndolo anudado en la raíz del miembro inferior derecho del animal y aplicando una constricción aproximada que se calcule suficiente para ocluir los vasos arteriales. Puede observarse este sistema en la figura 31.



Figura 31. Tortor anudado a nivel proximal, ejerciendo una función de torniquete.

Anillo elástico

En una línea similar a la banda elástica y a los sistemas de torniquete tipo anillo propuestos en la literatura, se probó asimismo a realizar la isquemia mediante la utilización de anillos elásticos de goma, de distintos diámetros desde 1 a 2 cm, para adaptarse mejor al grosor de la extremidad de distintos animales. Se eligieron los anillos de goma que suelen emplearse a modo de junta tórica en sistemas de grifería. Para poder acomodarse a nivel proximal, el anillo va distendiéndose al deslizarlo a lo largo de la pata, de distal a proximal, de forma que al llegar al punto deseado, la tendencia del anillo a volver a su diámetro original se traduce en una fuerza de compresión, mayor que la tensión arterial sistólica a nivel de los vasos arteriales. Se adjunta una fotografía de este sistema en la figura 32.

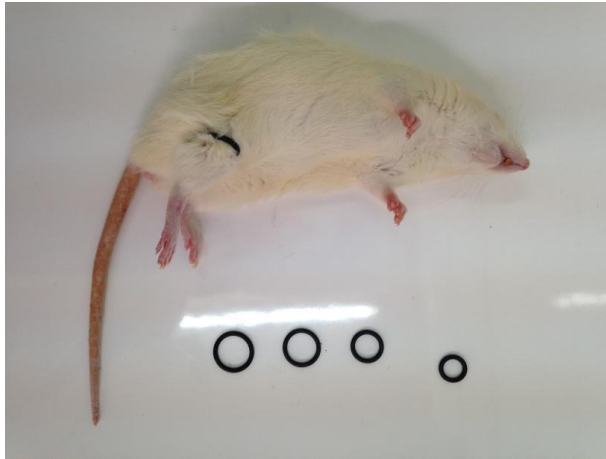


Figura 32. Anillo elástico colocado en la región proximal de la extremidad. En la vecindad de ven otros anillos de diferentes diámetros.

Manguito neumático

Habida cuenta de que es el estándar en la práctica clínica, se hicieron varias tentativas de encontrar a nivel de casas comerciales un manguito que se adaptase a nuestra necesidad, pero sin éxito, pues los modelos más estrechos de uso pediátrico resultaban exageradamente grandes para la extremidad de la rata.

En ese contexto, se llevaron a cabo varios intentos de construir un manguito neumático a pequeña escala, que pudiese adaptarse a la extremidad inferior de la rata. Para ello, se emplearon cámaras de aire de bicicleta, pero incluso las más pequeñas resultaban excesivamente grandes, y los intentos por reducir el tamaño de las mismas fracasaron por dificultades técnicas insalvables. Por este motivo, esta línea de trabajo hubo de ser abandonada y este sistema no llegó a ser probado en los animales.

Dispositivo de aire a presión

A continuación se probó otro dispositivo, también diseñado *ex profeso* para esta tesis, consistente en la aplicación de una fuerza de aire a presión de forma circular sobre el perímetro del miembro con intención, como siempre, de superar la presión arterial sistólica en los vasos y lograr detener el avance de la sangre. Para esto, se desarrolló un aplicador metálico de forma circular, con diámetro interior de 3,5cm y con múltiples perforaciones, que se adaptaba a una pistola de aire a presión. Esta pistola estaba conectada a su vez a un

sistema de aire motriz, capaz de administrar presiones de hasta 8 bar (aprox 6000mmHg). Puede observarse el dispositivo en la figura 33.



Figura 33. Dispositivo de aire a presión. Veáse la pistola conectada al circuito de aire motriz, con control de la presión (izquierda), y el aplicador circular multiperforado para la salida del aire a presión (arriba).

Clampaje de la arteria femoral

En un intento más agresivo, se realizó incluso un clampaje de la arteria femoral, a través de un abordaje quirúrgico bajo anestesia. Tras la disección superficial a nivel inguinal, se localizaba la arteria femoral común, y se ligaba con un clip hemostático de Yassargil.

Dispositivo de cable a tensión

Finalmente se desarrolló, también *ex profeso* para este trabajo, un sistema no invasivo, y que buscaba resolver todos los problemas encontrados con los sistemas anteriores, como se describe en Resultados. Sobre una amplia peana, se dispone una mesa abatible, que permite acomodar al animal anestesiado en una posición de leve tilt izquierdo, para así exponer mejor el miembro inferior derecho. Esta extremidad inferior derecha se desliza entonces a

través del seno creado por un cable que está conectado por ambos extremos a un dinamómetro, suspendido sobre el animal (figura 34).

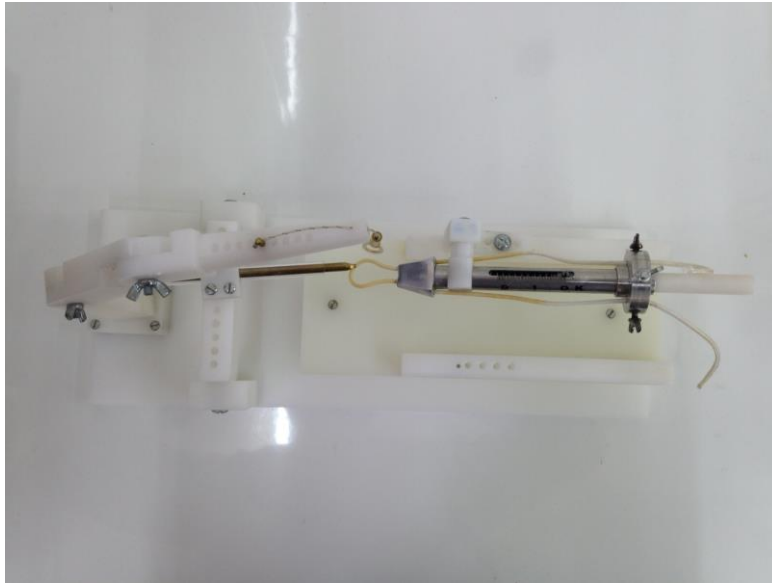


Figura 34. Vista cenital del dispositivo del cable a tensión, donde se pueden apreciar todos sus componentes.

Dicho cable tiene una estructura entrelazada, es prácticamente inextensible en sentido longitudinal, pero tiende a aplanarse ligeramente con la presión, aumentando la superficie de contacto con la masa sobre la que se aplica. Por otra parte, el dinamómetro y el cable están solidarizados a un sistema de émbolo, que traduce la compresión que se hace sobre el mismo a una fuerza de tracción; al colocar una masa a través del seno del cable, la tracción comienza a estrangular la masa y ejercer presión sobre ella. La fuerza de tracción que ejerce el cable al presionar el émbolo aumenta al encontrar la resistencia de la masa estrangulada, y esta fuerza progresivamente mayor se va traduciendo en una escala en el dinamómetro, expresada en Kg de tensión. Unas llaves de seguridad permiten, por una parte, dar la longitud de cuerda deseada para adaptarla al miembro del animal, y por otra parte, bloquear el mecanismo del émbolo una vez alcanzada la tensión deseada (figura 35).



Figura 35. Demostración del funcionamiento del émbolo conectado al dinamómetro y al cable tractor. Obsérvense además las llaves de seguridad, que bloquean a voluntad el deslizamiento del cable y del émbolo.

Finalmente, el aparato cuenta con dos dispositivos auxiliares dirigidos a mantener la estabilidad del cable sobre la masa estrangulada. Por una parte tiene un brazo articulado destinado a asir el cable en el punto opuesto a la posición del dinamómetro; por otra parte, otro brazo articulado similar a una grúa permite realizar una tracción al cenit del miembro sometido a la isquemia (figura 36).

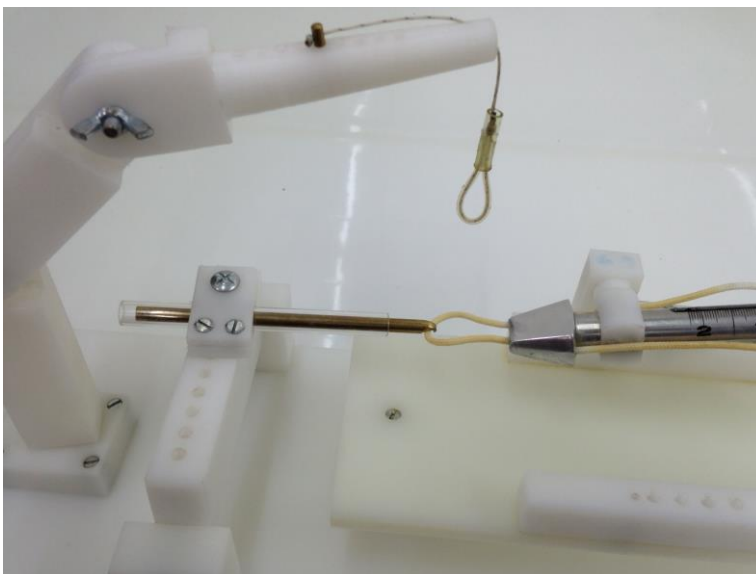


Figura 36. Detalle donde se aprecian los dos brazos articulados dirigidos a bloquear el movimiento de la cuerda, y ejercer tracción al cenit de la extremidad inferior derecha del animal.

Ácido Folínico

Como tratamiento experimental se ha empleado ácido folínico, forma activa del ácido fólico que no requiere conversión enzimática como el ácido fólico, y tiene la posibilidad de ser administrado de forma intravenosa en forma de folinato cálcico. Concretamente se ha utilizado la presentación Folidan ® 50, de Almirall Prodesfarma.

A continuación se indican las principales características del fármaco, y sus indicaciones actuales en la práctica clínica, todo ello según figura en la ficha técnica elaborada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)³⁷⁹.

Se incluye el ácido folínico en el grupo farmacoterapéutico de los agentes desintoxicantes para el tratamiento antineoplásico; código ATC: V03AF03. El folinato cálcico es la sal de calcio del ácido 5-formil tetrahidrofólico. Es un metabolito activo del ácido folínico y una coenzima esencial de la síntesis de ácido nucleico en la terapia citotóxica.

Respecto a la **composición**, cada vial de polvo contiene 50 mg de ácido folínico en forma de folinato cálcico. Después de la reconstitución, la concentración es 10 mg/ml. La vía de administración es intravenosa e intramuscular.

Las **indicaciones clínicas** actuales son las siguientes:

- Disminuir la toxicidad y contrarrestar la acción de los antagonistas del ácido fólico como el metotrexato en terapia citotóxica, y sobredosis. En terapia citotóxica, este proceso es conocido comúnmente como "Rescate con Folinato Cálcico".
- Antídoto para los antagonistas de ácido fólico: trimetrexato, timetropima y pirimetamina.
- En combinación con 5-fluorouracilo en terapia citotóxica (off-label en niños).
- Anemia megaloblástica por deficiencia de folatos (off-label, sólo para casos en los que no es posible emplear ácido fólico por vía oral).

La **posología** aceptada en la práctica clínica es únicamente la administración intravenosa e intramuscular. En caso de administración intravenosa, no deben inyectarse más de 160 mg de folinato cálcico por minuto debido al contenido en calcio de la solución (0,002 mmol de calcio por mg de ácido folínico). Para la perfusión intravenosa, el folinato cálcico puede ser diluido con solución de cloruro de sodio al 0,9% o solución de glucosa al 5%, antes de su uso.

Las **dosís** varían enormemente en función de la patología, y sobre todo, en función de los niveles de metotrexato y otros antifolatos en sangre. En el prospecto figuran dosis desde 6-12 mg/m² hasta 200 mg/m². Aunque no figura en esta ficha, están también aceptadas dosis mucho mayores, de hasta 500mg/m²/6h intravenoso en determinados casos de sarcoma osteogénico metastásico en tratamiento con metotrexate³⁴⁸. Si lo traducimos a peso, para una persona estándar de 1,70m de altura y 70kg de peso, tendremos una superficie corporal de 1,82m². De manera que 12 mg/m² serían 21,84mg (0,31mg/kg). 200 mg/m² serían 364mg (5,20mg/kg). Y 500mg/m² serían 910mg (13mg/kg).

En cuanto a las **contraindicaciones**, se han descrito las siguientes:

- Hipersensibilidad conocida al folinato cálcico, o a cualquiera de los excipientes.
- Anemia perniciosa u otras anemias megaloblásticas debido a la deficiencia de vitamina B12.

Las **precauciones de empleo** se refieren más bien a los fármacos que se dan de forma concomitante:

- El folinato cálcico sólo debe utilizarse con metotrexato o 5-fluorouracilo bajo la supervisión directa de un médico experimentado en el uso de agentes quimioterapéuticos cancerígenos.
- El tratamiento con folinato cálcico puede enmascarar la anemia perniciosa y otras anemias megaloblásticas resultantes de la deficiencia en vitamina B12.

- Muchos productos medicinales citotóxicos -inhibidores directos o indirectos de la síntesis de ADN-conducen a una macrocitosis (hidroxicarbamida, citarabina, mercaptopurina, tioguanina). Dicha macrocitosis no debe tratarse con ácido folínico.
- En pacientes epilépticos tratados con fenobarbital, fenitoína, primidona y succinimidas, existe un riesgo aumentado en la frecuencia de ataques debido a la disminución de las concentraciones plasmáticas de fármacos antiepilépticos. Se recomienda la monitorización clínica, posiblemente la monitorización de las concentraciones plasmáticas y, si es necesario, la adaptación de dosis de fármacos antiepilépticos durante la administración de folinato cálcico y después de la discontinuación.
- El folinato cálcico puede aumentar el riesgo de toxicidad del 5-fluorouracilo, particularmente en ancianos y enfermos debilitados.
- El tratamiento combinado de 5-fluorouracilo/folinato cálcico no debe ser iniciado ni mantenido en pacientes con síntomas de toxicidad gastrointestinal, independientemente de la severidad, hasta que todos estos síntomas hayan desaparecido por completo
- El folinato cálcico no debe mezclarse con 5-fluorouracilo en la misma inyección o perfusión IV.
- La resistencia al metotrexato como resultado de un transporte de membrana disminuido implica también resistencia al rescate con ácido folínico ya que ambos productos medicinales comparten el mismo sistema de transporte.
- Una sobredosis accidental con un antagonista de folatos, como el metotrexato, debe tratarse como una emergencia médica. Cuando el intervalo de tiempo entre la administración de metotrexato y el rescate de folinato cálcico aumenta, disminuye la efectividad del folinato cálcico en contrarrestar la toxicidad.
- El folinato cálcico sólo debe administrarse por inyección intramuscular o intravenosa, y no debe administrarse por vía intratecal. Se ha producido un caso de muerte cuando se

administró ácido folínico por vía intratecal después de una sobredosis intratecal de metotrexato.

También se describe la posibilidad de aparición de las siguientes **interacciones**:

- Cuando el folinato cálcico se administra conjuntamente con un antagonista del ácido fólico (por ejemplo cotrimoxazol, pirimetamina) la eficacia del antagonista del ácido fólico puede ser reducida o neutralizada completamente.
- El folinato cálcico puede disminuir el efecto de las sustancias antiepilépticas: fenobarbital, primidona, fenitoína y succinimidas, y puede aumentar la frecuencia de ataques (puede observarse una disminución de los niveles plasmáticos de fármacos anticonvulsivos de inductores enzimáticos a causa de que el metabolismo hepático se incrementa cuando los folatos son uno de los cofactores)
- La administración concomitante de folinato cálcico con 5-fluorouracilo ha demostrado aumentar la eficacia y toxicidad del 5-fluorouracilo

En relación con su **uso durante el embarazo y lactancia**, no se han realizado estudios clínicos adecuados y bien controlados. Tampoco se han realizado estudios formales con folinato cálcico sobre la toxicidad reproductora en animales. Con todo, no hay indicios de que el ácido fólico induzca efectos dañinos si se administra durante el embarazo. Si durante el embarazo o periodo de lactancia debiera realizarse un tratamiento con metotrexato u otros antagonistas de folatos, no hay limitaciones respecto al uso de folinato cálcico con el objeto de disminuir la toxicidad o contrarrestar los efectos. Se desconoce si el folinato cálcico se excreta en la leche materna. El folinato cálcico puede utilizarse durante la lactancia cuando se considere necesario acorde a las indicaciones terapéuticas.

Atendiendo a los posibles **efectos sobre la capacidad de conducir y utilizar maquinaria**, no hay evidencia de que el folinato cálcico tenga efecto sobre la capacidad de conducir o utilizar máquinas.

Los **efectos adversos** que se ennumeran hacen referencia a la terapia combinada de ácido folínico con Metotrexate, y no al tratamiento sólo con ácido folínico:

- Trastornos del sistema inmune: Muy raros ($< 0,01\%$): reacciones alérgicas, incluyendo reacciones anafilactoides y urticaria.
- Trastornos psiquiátricos: Raros ($0,01-0,1\%$): insomnio, agitación y depresión después de dosis elevadas.
- Trastornos neurológicos: Raros ($0,01-0,1\%$): aumento en la frecuencia de ataques en epilépticos.
- Trastornos generales y condiciones en los lugares de administración: Poco frecuentes ($0,1-1\%$): se ha observado fiebre después de la administración de folinato cálcico como solución para inyección.

No se describe **toxicidad** propiamente dicha con el ácido folínico. No se han reportado secuelas en pacientes que hayan recibido significativamente más folinato cálcico que la dosis recomendada. Sin embargo, cantidades excesivas de folinato cálcico pueden anular el efecto quimioterapéutico de los antagonistas del ácido fólico.

Atendiendo a las **propiedades farmacodinámicas**, el folinato cálcico y los antagonistas de folato comparten el mismo sistema de transporte de membrana y compiten por el transporte dentro de las células, estimulando el flujo de antagonistas de folatos. El ácido folínico protege a las células de los efectos del antagonista de folatos mediante la reposición del depósito reducido de folatos. El folinato cálcico sirve como una fuente prereducida de folato H_4 ; puede por tanto eludir el bloqueo de antagonistas de folatos y proporcionar una fuente para las distintas formas de coenzimas del ácido fólico.

Finalmente, hay que señalar lo siguiente respecto a sus propiedades farmacocinéticas:

- Absorción: Después de la administración de la solución acuosa, la disponibilidad sistémica es comparable a una administración intravenosa. Sin embargo, se consiguen menores valores de los niveles plasmáticos máximos (C_{max}).

- **Metabolismo:** El folinato cálcico es un racemato donde la forma-L (L-5-formil-tetrahydrofolato, L-5-formil-THF) es un enantiómero activo. El metabolito mayor del ácido folínico es el ácido 5-metil-tetrahydrofólico (5-metilTHF), enantiómero activo.
- **Distribución:** No se conoce el volumen de distribución del ácido folínico. Los niveles séricos máximos de la sustancia madre (ácido D/L-5-formiltetrahydrofólico, ácido folínico) se alcanzan 10 minutos después de la administración intravenosa. El AUC para el L-5-formil-THF y 5-metil-THF eran $28,4 \pm 3,5$ mg.min/l y 129 ± 112 mg.min/l después de una dosis de 25 mg. El isómero-D inactivo se presenta en una mayor concentración que el L-5-formil-tetrahydrofolato.
- **Eliminación:** La semivida de eliminación es 32-35 minutos para la forma-L activa y 352-485 minutos para la forma-D inactiva, respectivamente. La semivida terminal total de los metabolitos activos es de unas 6 horas (después de la administración intravenosa e intramuscular).
- **Excreción:** 80-90% con la orina (metabolitos 5- y 10-formil-tetrahydrofolatos inactivos), 5-8% con las heces.

Métodos

El manejo de los animales se ha realizado siguiendo la normativa legal según el Real Decreto 1201/2005, protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) que incorpora las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros de la CEE respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, de la Directiva del Consejo 86/609/CEE (Leg. CC.EE. 4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996.

Todo el protocolo experimental que se describe a continuación, fue presentado al Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko

Unibertsitatea, recibiendo su aprobación con el código M20_2015_075_HERRERO DE LA PARTE.

El trabajo con los animales ha sido llevado a cabo en el laboratorio de Cirugía Experimental perteneciente al Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física de la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU).

Protocolo preoperatorio

Las ratas seleccionadas para el experimento se toman del animalario. Son colocadas en cajones individuales, donde pueden moverse libremente y disponen de agua y comida *ad libitum*, con un ambiente controlado a 20-22 °C y humedad relativa del 55%. En este cajón pueden ser transportadas a una sala vecina, preparada con todo lo necesario para realizar la experiencia.

Cada rata es pesada, y numerada en base a la serie o grupo del que forman parte. Se registra su peso (en gramos) y edad (en meses).

Protocolo de inducción de la anestesia

Cada animal es pre-anestesiado mediante la administración de diazepam (15 mg/kg i.p.) y, transcurridos 10 minutos, se les perfunde Ketamina (80 mg/kg i.p.) y medetomidina (0,5 mg/kg i.p.). Tras esta última administración se esperan de nuevo 10 minutos para permitir su absorción, antes de llevar a cabo ningún procedimiento adicional en el animal.

Una vez constatada la anestesia completa de la rata, evaluando el tono residual en la cola, y ausencia de respuesta a la estimulación de las vibrisas faciales o “pelos del bigote”, se le transporta al dispositivo de isquemia previamente descrito.

Inducción de la isquemia

El animal es acostado en decúbito supino sobre la plancha dispuesta a tal efecto. Esta plancha se bascula ligeramente, logrando un leve tilt izquierdo que hace que la extremidad inferior derecha quede discretamente más arriba.

Dicha extremidad inferior derecha es luego deslizada a través del bucle que describe el cable al salir y entrar de nuevo en los raíles dispuestos en paralelo al cuerpo del dinamómetro, como se ha señalado antes (véanse también las figuras 34, 35 y 36).

En este momento el miembro es fijado mediante la utilización de los brazos auxiliares. El brazo superior, a modo de grúa, permite ejercer una leve tracción al miembro a la vez que el bucle que describe el cable, sujeto al segundo brazo que impide su movilización, mantiene la pelvis y la raíz del miembro inferior derecho pegados a la plancha sobre la que descansa el animal.

A continuación, se inicia la exanguinación al mismo tiempo que se comienza a registrar el tiempo de experiencia transcurrido. Según lo ya indicado, esta evacuación de la sangre se ejecuta mediante un vendaje compresivo con un tortor a modo de banda de Esmarch.

Seguidamente, y sin retirar aún el tortor, se comienza a presionar el émbolo conectado al cable y al dinamómetro. Tras cerrarse el cable sobre el muslo del animal, la presión sobre el émbolo se traduce a mayor tensión sobre el cable, que va estrangulando dicho muslo. Se incrementa este esfuerzo hasta alcanzar la tensión deseada en el dinamómetro. Como describiremos en resultados, tras estudiar distintas magnitudes esta tensión se fija en 1kg. En ese momento, se cierra la llave de seguridad, lo que impide que haya desplazamientos del émbolo o del cable, y mantiene la tensión de forma constante. Se ilustra este proceso en la figura 37. Una vez bloqueado el sistema, se retira el tortor.

Todo el proceso, desde el inicio de la exanguinación hasta la activación de la llave de seguridad bloqueando el sistema, dura entre 20 y 30 segundos.

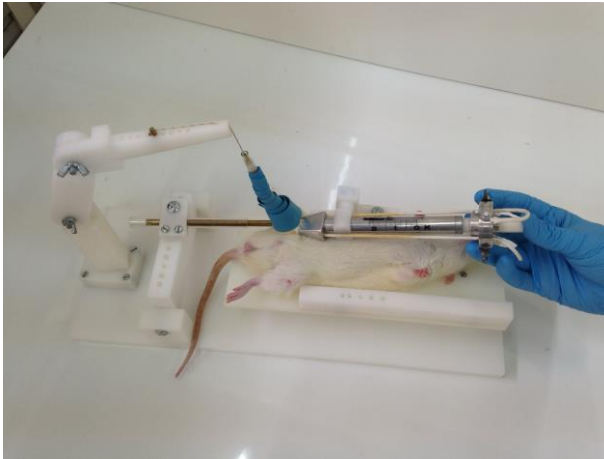


Figura 37. Aparato de inducción de isquemia con el cable a tensión. Al presionar el émbolo se incrementa la presión sobre la pata, bloqueando el paso sanguíneo. La extremidad ha sido previamente exanguinada empleando un tortor a modo de banda de Esmarch.

En este momento, se realiza la primera de varias verificaciones de que se ha obtenido una isquemia completa. Se realiza una comprobación subjetiva y una objetiva. La comprobación subjetiva consiste en el examen de la extremidad, que debe mostrar palidez y ausencia de relleno capilar al presionar los dedos (figura 38).



Figura 38. Aspecto clínico de la extremidad tras el establecimiento de la isquemia. Se observa palidez y ausencia de relleno capilar.

La verificación objetiva se lleva a cabo mediante el examen de la extremidad con una sonda de láser doppler, que no debe mostrar ninguna actividad al ser colocada sobre el territorio de la arteria pedia (figura 39).



Figura 39. Comprobación objetiva de la ausencia de flujo capilar en la extremidad, mediante Laser Doppler. Se mide también el flujo en la extremidad contralateral no sometida a isquemia, como referencia.

Mantenimiento durante el periodo isquémico

Salvo en la primera serie de determinación de la tensión óptima, los animales han sido sometidos a un tiempo de isquemia de 2 ó 3 horas, durante el que requieren una vigilancia. Por ello, el animal es reevaluado cuatro veces por hora, cada 15 minutos.

Por un lado, se comprueba la adecuada anestesia de la rata, de nuevo explorando la existencia de tono o no al levantar y dejar caer la cola y estimulando sus vibrisas faciales. En el raro caso de apreciar una respuesta con dichos exámenes, se administra una dosis de recuerdo de Diazepam, de la mitad de la inicial. Y en el caso aún más raro de volver a presentar actividad antes de terminar el periodo de isquemia, se repite la administración de Ketamina, de nuevo con una dosis de la mitad de la inicial.

Por otra parte, con la misma periodicidad, se lleva a cabo la verificación de la isquemia con los medios subjetivos y objetivos antes descritos. En el raro caso en que se detectase la pérdida de la isquemia, aunque fuera parcial o autolimitada en el tiempo, se suspende la experiencia y se aparta al animal del estudio.

Tratamiento experimental

Sólo en los animales del grupo tratado (según se describe en Series Experimentales más adelante), se realiza la inyección intraperitoneal del ácido folínico, 20 minutos antes de la liberación de la isquemia y del inicio de la reperfusión.

El folato empleado (Folidan ® 50 de Almirall Prodesfarma), se presenta en un vial liofilizado conteniendo 50 mg de ácido folínico, que es revitalizado con 5ml de agua destilada, según se ha señalado anteriormente. Para mayor comodidad, desde esta solución con 10 mg/ ml, se realiza una nueva dilución de 0,5 ml de solución inicial con 5ml de suero salino, logrando una solución nueva con 0,91 mg/dl.

Dado que se realiza un tratamiento experimental con 2,5 mg de ácido folínico por Kg de peso del animal, tenemos que para una rata estándar de 300 gr, inyectaremos 0,75 mg contenidos en 0,82 ml de la solución nueva.

Periodo de reperfusión

Cuando concluye según el cronómetro el tiempo establecido de isquemia para el animal en cuestión, 2 ó 3 horas según las series, se afloja la llave de seguridad y se permite el destensado progresivo del cable soltando lentamente la presión sobre el émbolo conectado al dinamómetro.

Se comprueba clínicamente la reperfusión, que suele ser muy evidente por el desarrollo de una hiperemia reactiva tras el periodo prolongado de isquemia.

El animal es transportado desde el dispositivo de isquemia a su cajón individual, donde es acostado en una posición cómoda. Se le deja agua y comida a su disposición, y se coloca un foco de calor que mantiene una temperatura ambiente de unos 27° C.

En el periodo de recuperación postanestésica, el animal es reevaluado dos veces cada hora, cada 30 minutos.

En aquellas ratas en que la obtención de muestras sanguíneas se lleva a cabo en menos de cuatro horas desde la inducción de la anestesia, sólo se repite la administración de Diazepam y Ketamina, a mitad de dosis de la inicial, en los raros casos en que el animal presentase alguna respuesta con las maniobras de estímulo ya descritas anteriormente.

Sin embargo, en aquellos animales en los que la obtención de muestras está programada para periodos más allá de cuatro horas desde la inducción de la anestesia, no se administra dosis de recuerdo alguna, pese a que muestren respuesta a estímulos. Por el contrario, se les permite despertar y que coman, beban y coman *ad libitum*, y aproximadamente 20 minutos antes de cumplirse el tiempo programado para la obtención de muestras, se reinicia el protocolo anestésico descrito al principio, de igual forma a la descrita para la inducción inicial de la anestesia.

Medida del perímetro de las extremidades

En aquellas ratas en las que se estudia un tiempo de reperusión de 24 horas se realiza, antes del sacrificio y tras la nueva inducción anestésica descrita, una medición del perímetro de ambas extremidades, a nivel proximal en el muslo, aproximadamente en el mismo punto en que se posicionó el cable tensor responsable de la isquemia. Se diferencia la medida del perímetro del muslo en la pata derecha, sometida a isquemia, y la correspondiente a la pata izquierda, como control pareado.

Para estandarizar el proceso, la medición se lleva a cabo siempre con el animal acostado sobre el dispositivo de isquemia, para emplear la tracción a cénit y mantener la extremidad en todo momento en una misma posición. Esta medición se lleva a cabo con un cable igual al utilizado en el aparato de isquemia, con una compresión muy leve para compensar el almohadillado creado por el pelo del animal, en el muslo en un punto inmediatamente distal al ocupado por el cable que realiza la isquemia. Se marca con rotulador el punto en el que el cordel de medición, al completar el perímetro alrededor del muslo, contacta con su

cabo inicial. Esta medida es transportada sobre una regla, donde se realiza la lectura de su longitud en mm, en números enteros. El proceso se muestra en la figura 40.

Este procedimiento se lleva a cabo de igual manera con todos los animales, y siempre por la misma persona. Se mide el perímetro de ambas extremidades.

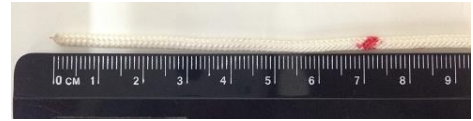


Figura 40. Medida del perímetro del muslo de ambas extremidades.

Toma de las muestras sanguíneas

En los animales sometidos a periodos de reperusión de hasta 6 horas, prolongando la anestesia inicial o induciendo una nueva anestesia según lo descrito, se les practica una laparotomía media, y una punción de la vena cava, para obtener una muestra sanguínea. Se lleva a cabo una extracción de en torno a 3 ml de sangre venosa, considerándose el mínimo aceptable de 2 ml, y el máximo 5 ml, que corresponde a la capacidad máxima de la jeringa empleada (figura 41).

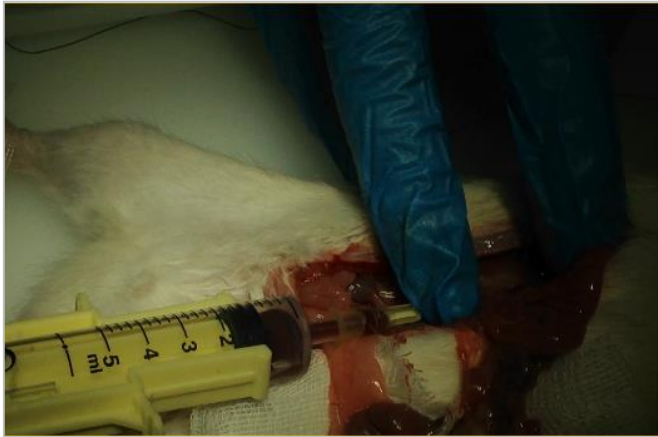


Figura 41. Extracción de sangre venosa, procedente de la vena cava, tras una laparotomía media.

Procesamiento de las muestras sanguíneas

El contenido de la jeringa es inmediatamente transferido a un tubo de 3,5cc de tapón teja, sin aditivos y con gel separador (BD Vacutainer ®), donde reposa durante 10 minutos (figura 42).



Figura 42. Traslado de la sangre venosa extraída a un tubo de tapón teja de 3,5cc.

Con posterioridad, este tubo es introducido en una centrifugadora KS-5200C de Kubota ®, que centrifuga la muestra a 3000 rpm, durante 10 minutos. De esta forma se consigue un sobrenadante de suero, que es pipeteado a un tubo Eppendorf.

Este tubo Eppendorf es conservado en una nevera a 4°C, hasta un máximo de una semana. Antes de expirar ese plazo, la muestra de suero es analizada en la analizadora Cobas 8000 de Roche ® (figura 43). Ésta realiza un examen mediante:

- Electroodos selectivos de ion Na, K y Cl
- Espectrofotometría de Urea, Creatinina, Glutamato-oxalacetato transaminasa, Glutamato-piruvato transaminasa, Fosfatasa Alcalina, Creatin Kinasa y Lactato Deshidrogenasa. Todos los reactivos empleados son de Roche Diagnostics ®.



Figura 43. Vista general del laboratorio con la analizadora Cobas 8000 de Roche®

Obtención de muestras anatomopatológicas

Tras el sacrificio (descrito más adelante) animal es colocado en posición de decúbito prono, exponiendo la parte posterior de las extremidades inferiores, que se mantienen extendidas.

A través de un abordaje posterior directo, se diseca piel y tejido celular subcutáneo hasta exponer la musculatura posterior de la pierna.

Se identifica el tendón del tríceps sural, que es marcado con un punto de seda y seccionado en su inserción distal en el calcáneo. Posteriormente, se localiza y excluye el músculo

sóleo, quedándonos sólo con los vientres musculares del gastrocnemio, siguiendo el recorrido de sus vientres lateral y medial. Al llegar a su inserción tendinosa en la cara posterior de los cóndilos femorales, de nuevo se marcan los extremos con sendos puntos y se desinsertan, completando de esta manera la extracción del músculo gastrocnemio. Puede apreciarse el resultado del procedimiento en la figura 44.



Figura 44. Extracción del músculo gastrocnemio de la extremidad inferior derecha, por un abordaje posterior.

Este procedimiento se repite en ambas extremidades, y el músculo obtenido es pesado en una báscula de precisión (figura 45), antes de sumergir la pieza en un recipiente con Formol al 15%, que a su vez es conservado en nevera a 4°C hasta su procesamiento, según se describe a continuación.

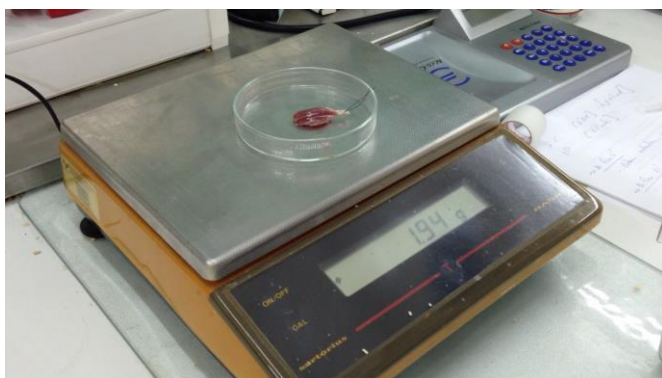


Figura 45. Pesaje del músculo extraído en una báscula de precisión.

Procesamiento de las muestras anatomopatológicas

Una vez extraídos y pesados, los músculos gastrocnemios son sumergidos en una solución de Formaldehído al 10%, y conservados en una nevera a 4°C.

Posteriormente, en cada pieza se practican 3 cortes, obteniendo secciones donde podemos valorar: el vientre muscular medial, el vientre muscular lateral, y el vientre muscular común del gastrocnemio. Una pieza de muestra se expone en la figura 46.

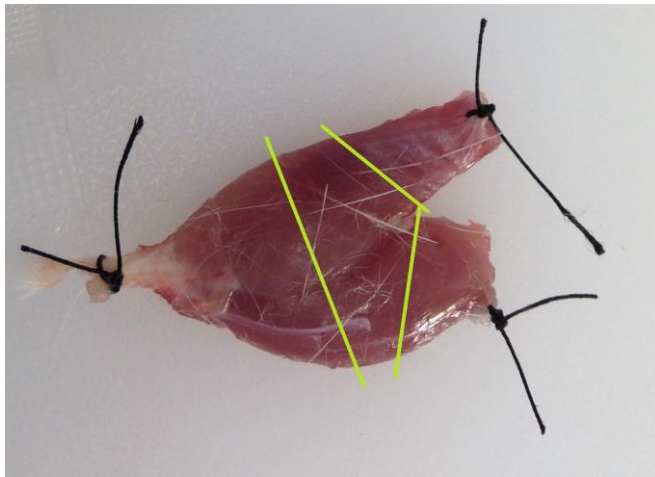


Figura 46. Dibujo sobre una fotografía, donde se muestran los cortes que se practican en cada gastrocnemio extraído.

Las piezas así obtenidas son fijadas con la inmersión sucesiva en alcoholes hasta su inclusión en parafina, con el procesador de tejidos semicerrado Shandon Citadel 1000. Se sigue el procedimiento habitual, que describimos en la tabla 7, a continuación.

Tabla 7. Se detalla el procesamiento de las piezas de anatomía patológica desde la extracción hasta la inclusión en parafina.

Orden	Producto	Tiempo de inmersión
1	Formaldehido 15%	24h mínimo
2	Alcohol 50º	1h30'
3	Alcohol 70º	1h 30'
4	Alcohol 90º	2h
5	Alcohol 100º	3h
6	Xilol a temperatura ambiente	1h
7	Xilol a 60º C	1h
8	Parafina	2h

Las piezas incluidas en parafina son cortadas en láminas de 4µm con un microtomo. Dichas secciones son posteriormente sometidas a tinción de Hematoxilina-Eosina empleando el aparato Shandon Linistain GLX, según el procedimiento que, de manera similar al anterior, exponemos en la tabla 8.

Finalmente, las muestras teñidas son fijadas sobre portas, y almacenadas hasta su examen microscópico.

Tabla 8. Se detalla el procesamiento de las piezas de anatomía patológica durante el proceso de tinción.

Orden	Producto o procedimiento	Tiempo de permanencia
1	Preparación en zona calefactada	5'
2	Xileno	2'
3	Alcohol 100º	1'
4	Alcohol 95º	1'
5	Agua corriente	30''
6	Hematoxilina	4'
7	Agua corriente	30''
8	Alcohol 70º + HCl al 1%	30''
9	Agua corriente	30''
10	Reactante azulante Shandon	1'
11	Agua corriente	30''
12	Alcohol 95º	30''
13	Eosina	30''
14	Alcohol 95º	1'30''
15	Alcohol 100º	1'
16	Xilol	1'

Sacrificio

Cuando se realiza una extracción sanguínea, es esperable que la mayoría de los animales fallezcan por un shock hipovolémico en un plazo breve de tiempo.

Sin embargo, todos ellos son introducidos al terminar la extracción sanguínea y extracción de muestras histopatológicas en una cámara de CO₂ con concentración al 70%, hasta objetivar datos claros de muerte, como ausencia de trabajo cardiorrespiratorio.

Por último, para asegurar la eutanasia, se practica una tracción axial de la columna desde la cola bloqueando con un instrumental la base del cráneo, hasta conseguir una luxación atlo-occipital o cervical alta.

El cadáver es entonces introducido en una bolsa de plástico, que a su vez es transportado a un arcón a -20°C, donde se conserva hasta que es retirado para su incineración.

Exámenes bioquímicos

Las muestras sanguíneas no precisan mayor procesamiento que el descrito. La analizadora Cobas 8000 de Roche ® mide para cada muestra de suero: Na, K, Cl, Urea, Creatinina, Glutamato-oxalacetato transaminasa, Glutamato-piruvato transaminasa, Fosfatasa Alcalina, Creatin Kinasa y Lactato Deshidrogenasa.

Anatomía Patológica

Parámetros macroscópicos

El parámetro macroscópico fundamental es, como hemos dicho antes, el edema, que puede ser cuantificado de diferentes modos. En este caso, se mide en base a dos parámetros: perímetro del muslo con el animal anestesiado, y peso del músculo gastrocnemio tras sacrificio del animal. Ambos exámenes se llevan a cabo a las 24 horas de la reperusión, y de forma bilateral en cada rata, tomando la extremidad izquierda como control pareado de la derecha.

Perímetro del miembro

Se incluye la medición del perímetro del miembro como parámetro anatomopatológico. El procedimiento de medición se mide según ya se ha descrito anteriormente.

A partir de este dato, y asumiendo que la forma de la sección del muslo a nivel de la medición se aproxima mucho al de una circunferencia, conocido el perímetro se realiza el cálculo del área de dicha sección.

Para cada animal, se registra el perímetro de cada muslo, y el área correspondiente a la sección del mismo, derecho e izquierdo. Se realiza la comparación entre ambos, y se registra el porcentaje de incremento del área en la extremidad inferior derecha (sometida a isquemia) respecto a la izquierda (control pareado).

Peso de los gastrocnemios

Se realiza un pesaje de los gastrocnemios extraídos, también según lo ya descrito. De igual manera, se calcula el porcentaje de incremento de peso de la pata derecha (sometida a isquemia) respecto a la izquierda (control pareado), para cada animal.

Parámetros microscópicos

Se incluyen aquí todos los exámenes de microscopía, tras el procesamiento de las muestras. Hemos empleado un sistema de cámara fotográfica digital acoplada a un microscópico óptico, con una lente de aumento x3,3 y una segunda lente de aumento x10 o x20.

Daño/ necrosis muscular

El protocolo de valoración del daño muscular se inspira en la sistemática propuesta por McCormak y cols para la evaluación del daño por isquemia-reperfusión en modelos murinos³⁵⁶.

Para cada pata, disponemos tras el procesamiento de las muestras de 3 cortes, correspondientes a los vientres común, medial y lateral del gastrocnemio. Inicialmente se lleva a cabo un examen general con 33 aumentos, en los que se identifican las áreas

susceptibles de observación, sin artefactos o alteraciones del procesamiento que condicionen una correcta visualización

Sobre estas áreas, se determinan al azar 5 campos de visualización a 66 aumentos, distantes entre sí, para cada uno de los mencionados 3 cortes (figura 47).

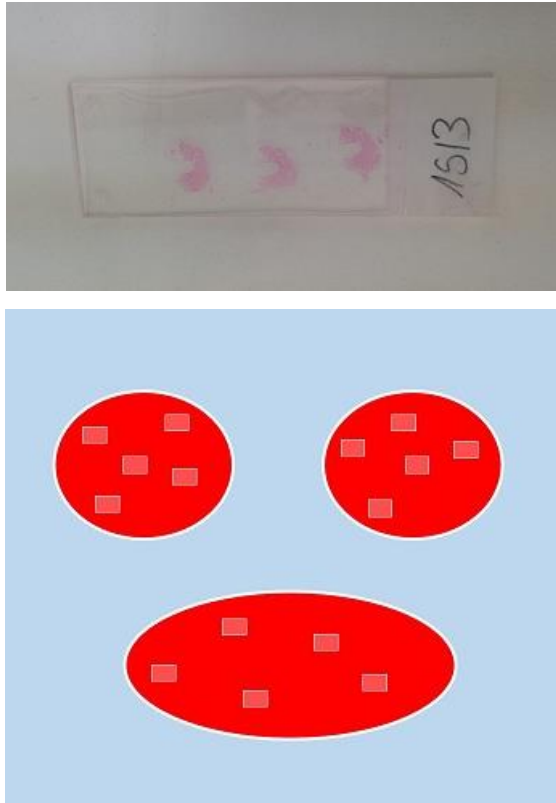


Figura 47. Ejemplo de disposición de los cortes de músculo sobre el porta (arriba).

Representación de la elección al azar de 5 campos separados entre sí, en cada uno de los cortes del músculo (abajo).

En cada uno de estos campos a 66 aumentos, se realiza una fotografía, y se lleva a cabo un conteo de las fibras, y clasificación de las mismas sólo en dos categorías, indemne o dañada, basándose en los siguientes criterios:

-Fibra indemne si presenta bordes bien definidos, con una misma textura y uniformidad a lo largo de la membrana celular, sin agujeros ni saltos, y una correcta visualización de los núcleos pericelulares y las células satélites.

-Fibra dañada si presenta bordes rotos o desdibujados, una textura y color no uniforme, agujeros en el citoplastama y/o núcleos celulares separados o desprendidos.

Se muestra una fotografía de ejemplo de esta clasificación en la figura 48.

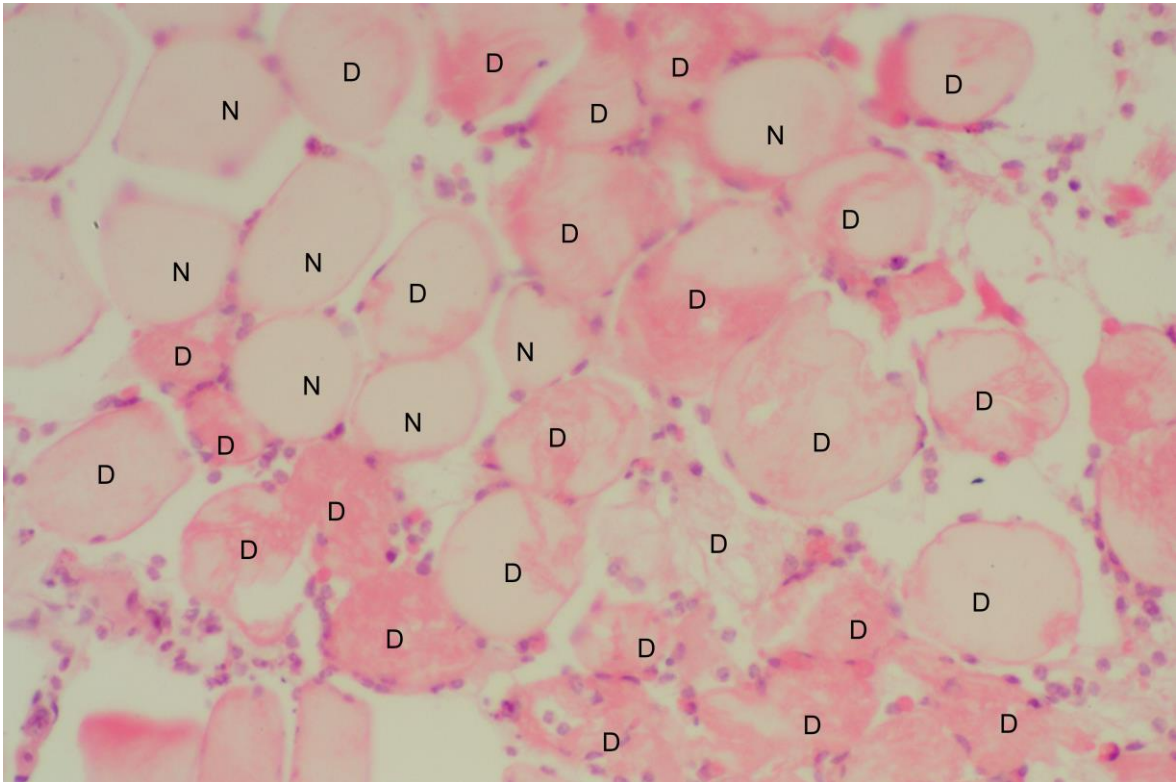


Figura 48. Visualización de un campo de una sección del gastrocnemio común, correspondiente a una rata sometida a 3 horas de isquemia de la extremidad, tras 24 horas desde el fin de la misma. Las fibras se clasifican como no dañada (N) o dañada (D). Obsérvese además una intensa infiltración por PMNs.

El total de fibras indemnes y dañadas se cuantifica sumando los valores correspondientes a cada uno de los cinco campos, en los tres cortes. El resultado total se expresa en forma de porcentaje, resultante del cálculo de fibras dañadas respecto al total de las fibras.

En este caso la comparación de la extremidad sometida a isquemia con la contralateral no sometida a isquemia se plantea inicialmente como referencia de normalidad, en tanto es esperable que no tenga daños o que si existen sean mínimos.

Por último, se establece la comparación que resulta de mayor interés, entre el porcentaje de fibras dañadas en la extremidad sometida a isquemia de animales no sometidos a ningún tratamiento, y de los animales tratados con ácido folínico. La diferencia en el porcentaje de

fibras dañadas puede así ser achacable al eventual efecto protector del tratamiento experimental.

Infiltración por neutrófilos

Para esta valoración se emplea la misma sistemática respecto a la evaluación de fibras dañadas, en lo relativo al establecimiento de 5 ventanas en cada uno de los 3 cortes de la pieza.

En este caso, se realiza un conteo de los PMNs contenidos en cada campo (figura 48) y se calcula la media y desviación estándar de dichas mediciones en el conjunto de la pata.

Teniendo en cuenta que nos interesa valorar el posible efecto del tratamiento con ácido folínico sobre el aumento patológico de la infiltración leucocitaria del músculo sometido a isquemia, más que la magnitud de infiltración fisiológica del mismo, la comparación se establece respecto a los valores de infiltración sólo de la pata sometida a isquemia, entre animales sin tratamiento y aquellos que recibieron el tratamiento experimental.

Grupos experimentales

Los 96 animales incluidos en el estudio se dividen en varios grupos experimentales, cuyo propósito describimos aquí y cuyos resultados expondremos en el siguiente apartado.

Los animales van siendo escogidos aleatoriamente del animalario, según son necesarios para ir completando las distintas series. Aunque siempre tomando animales de características homogéneas: en torno a 4 meses de edad y 300gr de peso.

Serie 0. Determinación de la tensión óptima

En esta primera serie, un total de 20 animales, denominados O.1 a O.20, se someten a incrementos sucesivos de la tensión del cable. Para cada animal, se estudia la existencia o no de una isquemia completa en la extremidad inferior derecha, a tensiones

progresivamente mayores. Dicho estudio se lleva a cabo mediante los signos clínicos y de láser doppler ya descritos.

Serie C. Determinación de parámetros analíticos normales, en población control

Un total de 6 animales son destinados a definir los valores normales o correspondientes a la población a estudio, para los parámetros bioquímicos que van a ser analizados. Dichos animales se identifican como C.1 a C.6.

Serie A. Caracterización bioquímica del daño tras 2 horas de isquemia, evolución cronológica

En la serie A, se busca determinar el daño que se produce en cuanto a parámetros bioquímicos tras un periodo de 2 horas de isquemia, y estudiar el comportamiento evolutivo durante las 6 primeras horas de reperusión. En este caso se emplean 24 animales, que se dividen de la siguiente manera:

-6 animales son sometidos a 2 horas de isquemia, y sacrificados a los 10 minutos de la reperusión. Estas ratas se identifican como A1.1 a A1.6.

-6 animales son sometidos a 2 horas de isquemia, y sacrificados al cabo de una hora de reperusión. Estas ratas se identifican como A2.1 a A2.6.

-6 animales son sometidos a 2 horas de isquemia, y sacrificados a las 3 horas de la reperusión. Estas ratas se identifican como A3.1 a A3.6.

-6 animales son sometidos a 2 horas de isquemia, y sacrificados a las 6 horas de la reperusión. Estas ratas se identifican como A4.1 a A4.6.

Serie B. Caracterización bioquímica del daño tras 3 horas de isquemia, evolución cronológica

En este caso, se trata de caracterizar el daño que se produce en cuanto a parámetros bioquímicos tras un periodo de 3 horas de isquemia, e igualmente estudiar el comportamiento evolutivo durante las 6 primeras horas de reperfusión. De nuevo se emplean 24 animales, que se dividen de la siguiente manera:

-6 animales son sometidos a 3 horas de isquemia, y sacrificados a los 10 minutos de la reperfusión. Estas ratas se identifican como B1.1 a B1.6.

-6 animales son sometidos a 3 horas de isquemia, y sacrificados al cabo de una hora de reperfusión. Estas ratas se identifican como B2.1 a B2.6.

-6 animales son sometidos a 3 horas de isquemia, y sacrificados a las 3 horas de la reperfusión. Estas ratas se identifican como B3.1 a B3.6.

-6 animales son sometidos a 3 horas de isquemia, y sacrificados a las 6 horas de la reperfusión. Estas ratas se identifican como B.1 a B4.6.

Puede apreciarse un esquema de la distribución de las series control (C) y subgrupos de las series A y B en la figura 49.

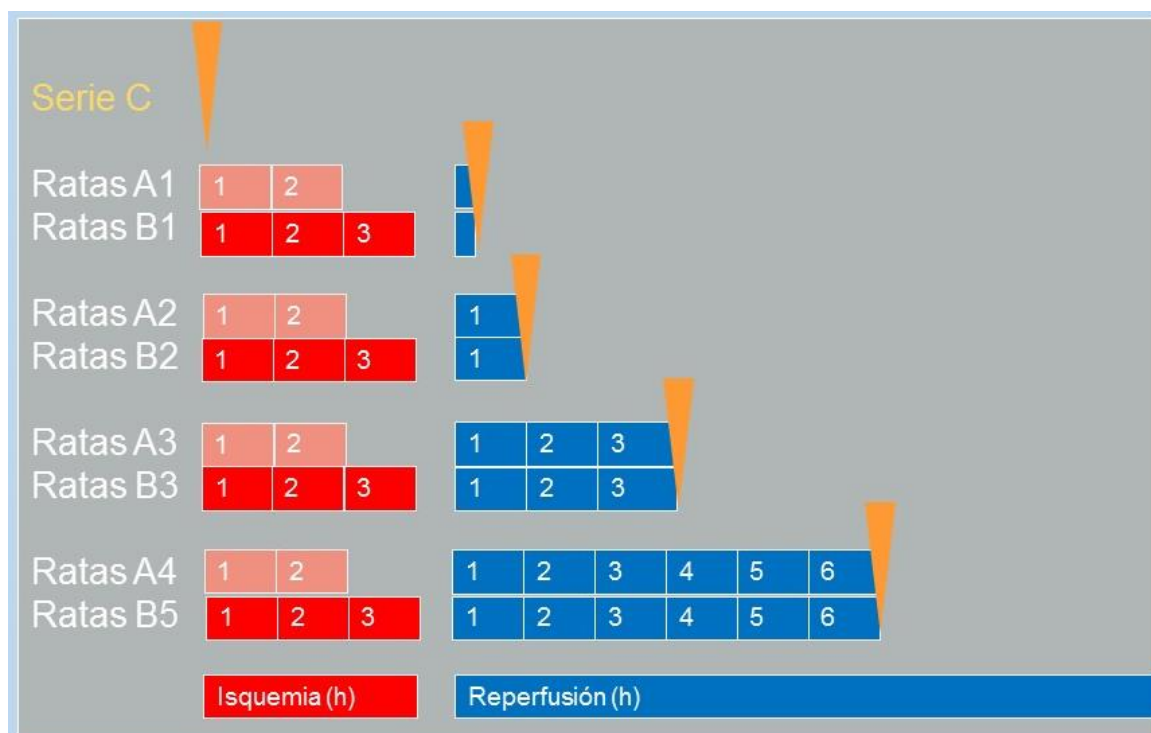


Figura 49. Esquema de la organización temporal de las series C, A y B. Las puntas de flecha naranjas señalan el momento del sacrificio y obtención de muestras sanguíneas.

Serie F. Estudio del efecto bioquímico del ácido fólinico tras 3 horas de isquemia y 3 horas de reperusión

En esta serie, 6 ratas son igualmente sometidas a una isquemia de 3 horas. Pero en este caso, 20 minutos antes del fin de este periodo, se les administra ácido fólinico intraperitoneal según se ha indicado previamente. Transcurridas 3 horas de la reperusión, son sacrificadas con obtención de muestras de sangre.

Los individuos de esta serie se identifican como F.1 a F.6.

Como antes, se adjunta una representación gráfica de la organización temporal de esta serie en la figura 50. Se señala la serie F junto al subgrupo B3 de la serie B, puesto que van a ser los animales con los que se comparen los resultados.

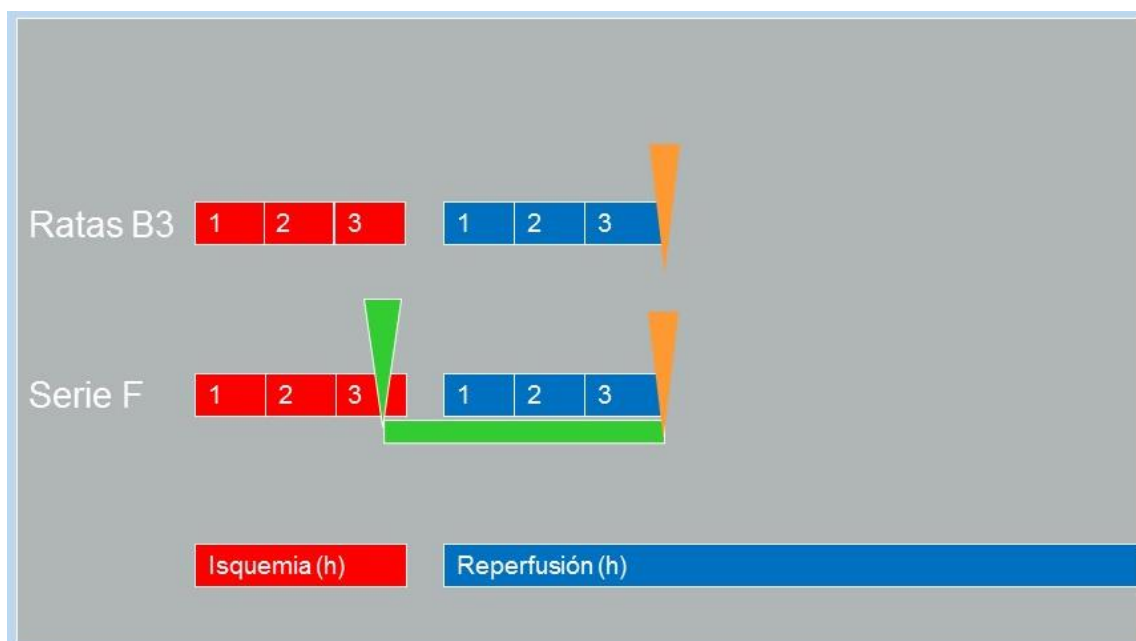


Figura 50. Esquema de la organización temporal de la serie F, y subgrupo B3 de la serie B. Las puntas de flecha naranjas señalan el momento del sacrificio y obtención de muestras sanguíneas, y la punta de flecha y línea verde marcan el momento de la infusión del Ac folínico y su tiempo de actuación antes del sacrificio.

Serie AP.C. Estudio del daño anatomopatológico tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión, en grupo control o no tratado

En la serie AP.C, 8 individuos son sometidos a 3 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión, sin recibir ningún tratamiento. Transcurrido dicho periodo, se lleva a cabo la medición del diámetro del muslo de ambas extremidades, seguidas del sacrificio y extracción de ambos gastrocnemios, para su pesaje y preparación para el estudio microscópico.

Como en los otros grupos, las ratas de este grupo se identifican como AP.C.1 a AP.C.8.

Serie AP.F. Estudio del efecto anatomopatológico del ácido folínico tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión

Finalmente, se somete a los 8 animales de la serie AP.F al mismo procedimiento de 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión, pero administrando el tratamiento experimental con Ac folínico 20 minutos antes del fin del periodo de isquemia.

Las ratas se denominan, en este caso, desde AP.F.1 a AP.F.8.

Podemos ver la representación esquemática de la organización de las series AP.C y AP.F en la figura 51:

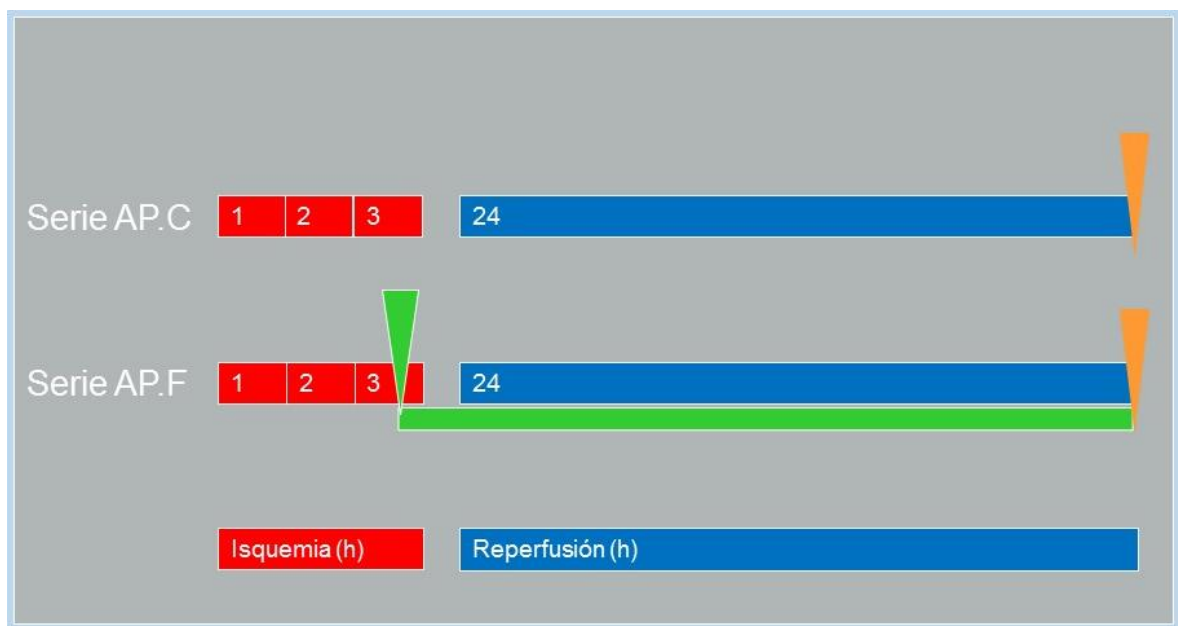


Figura 51. Esquema de la organización temporal de las series AP.C y AP.F. Las puntas de flecha naranjas señalan el momento del sacrificio y obtención de muestras sanguíneas, y la punta de flecha y línea verde marcan el momento de la infusión del Ac folínico y su tiempo de actuación antes del sacrificio.

Estadística

Todos los datos obtenidos son introducidos en un fichero Excel, siguiendo la misma organización y nomenclatura de series, subgrupos e individuos.

Para la elaboración de los estudios estadísticos, conviene remarcar que partimos de una serie de premisas:

- Se comprueba la distribución normal de todos los conjuntos de datos introducidos. Esto es realizado de forma sistemática según el método de Kolmogorov-Smirnov, objetivándose en todas las series una distribución normal de los valores registrados.

- Esto nos posibilita el cálculo de medias y desviación estándar, y el planteamiento de test paramétricos.

- Finalmente, se realiza igualmente de forma previa a otros estudios la comprobación de la homogeneidad de los grupos. Para ello, se estudian como variables independientes la edad y el peso de los individuos participantes de cada una de las series. Tras someter los datos a un examen de la varianza entre las series, se concluye que no hay diferencias relevantes entre series (ni entre subgrupos, en su caso), con $p > 0,05$.

Con el mismo Excel se calculan media y desviación estándar en cada serie y/o subgrupo, según se exponen en el capítulo de resultados.

Los datos obtenidos son transferidos al programa informático GraphPad Prism versión 6.01, en el que se llevan a cabo los siguientes test estadísticos:

- t de student o t test: en la comparación variables independientes entre sí, cuantitativa Vs dicotómica. Cuando esta comparación se realiza repetidamente para un valor dado, a distintos tiempos, se emplea el t test múltiple.

- Análisis de la varianza o ANOVA: en la comparación variables independientes entre sí, cuantitativa Vs no dicotómica.

- Newman-Keuls: test de comparaciones múltiples para comparar las medias de los distintos grupos después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA.

Resultados

Ajuste del modelo experimental

En este apartado recogemos las experiencias y ensayos realizados para definir todas las características del modelo, así como el diseño y construcción del equipo de inducción de isquemia utilizado en el trabajo de tesis doctoral.

Inducción de isquemia en el miembro inferior de la rata

La isquemia utilizada en cirugía ortopédica implica dos actuaciones consecutivas, pero diferentes desde un punto de vista mecánico. La primera es la inducción de la isquemia, con exanginación completa de los tejidos de la extremidad, y la segunda es el mantenimiento de dicha isquemia mediante bloqueo completo del flujo arterial del miembro.

Como se ha descrito en Material y Métodos, desde un primer momento, en nuestros ensayos emulamos la clásica venda de Esmarch empleada en humanos por una pequeña banda elástica, un tortor convencional: su anchura se ajusta bien al tamaño de la extremidad inferior de la rata y su elasticidad permite un manejo sencillo.

Tras varios ensayos preliminares, pudimos comprobar que, tras realizar la exanguinación de la extremidad mediante la aplicación del tortor desde distal a proximal, el riego quedaba completamente anulado y el tejido exangüe:

- No se detectaron pulsos distales
- El laserdopler no detectó flujo capilar
- Manteniendo la mitad proximal del tortor en su sitio, la realización de cortes en la parte más distal de la extremidad no mostró hemorragia alguna

Asegurado este primer elemento de la inducción de isquemia, se acometieron los ensayos orientados a establecer una técnica de bloqueo absoluto del flujo arterial que fuera controlable, fácilmente reproducible y fiable. En este sentido se comenzó con la utilización

de métodos no-invasivos, buscando reproducir el procedimiento habitual en clínica humana.

Los primeros intentos se llevaron a cabo mediante la aplicación de un tortor a nivel inguinal. Pero los ensayos fracasaron por dos motivos:

- Falta de estabilidad. Debido a la abundancia de pelo, así como al perfil marcadamente troncocónico del muslo de la rata, el tortor aplicado a nivel inguinal experimentaba frecuentes desplazamientos y aflojamientos que impedían disponer de un periodo estable de isquemia absoluta suficientemente prolongado.
- La colocación manual del tortor, sin control objetivo de la presión efectuada por el mismo, hacía que hubiera fracasos tanto por exceso como por defecto. Los fracasos en mantener la isquemia resultaron muy fáciles de detectar, pero suponían el fracaso del experimento ya que muy breves periodos de reperusión suponen importantes modificaciones del patrón lesional en el síndrome de isquemia-reperusión. Los excesos de presión suponen daños a las estructuras, también las vasculares, que implican un añadido incontrolado al daño por isquemia; e incluso pueden condicionar la calidad de la reperusión.

A continuación probamos a sustituir el tortor por un anillo de goma. Este sistema buscaba combatir el riesgo de aflojamiento que representaba el tortor, pero también fue desechado porque presentaba numerosos inconvenientes:

- El diámetro del anillo es constante, mientras que el diámetro de la extremidad de cada animal no lo es, lo que lógicamente conducía a realizar presiones mayores en miembros más gruesos y menos en extremidades más delgadas. Aun disponiendo de diferentes diámetros de anillo, la individualización a cada pata resultaba imposible.
- Aunque la presión ejercida pudiera ser bastante constante para un anillo dado, asumiendo que no hubiese diferencias muy groseras en el diámetro de las patas de distintos animales, resultaba imposible saber de qué magnitud era esta, y por ello si

podía resultar equivalente a la realizada por el manguito de presión en la práctica clínica que pretendemos reproducir.

- Finalmente, el riesgo de deslizamiento a causa de la forma tronco-cónica de la extremidad que ya veíamos con el tortor, se veía incluso acentuado al emplear el anillo.

En tercer lugar, diseñamos un sistema de compresión neumática de la extremidad mediante una pistola con un aplicador en anillo multiperforado que lanza chorros de aire a presión sobre la zona inguinal (figura 52). A pesar de las elevadas presiones utilizadas (8 bar; que equivale 6.000 mmHg), el anillo no resultó eficaz para mantener la isquemia. Lo que se puso en evidencia al comprobar un cierto grado de hemorragia tras la realización de un corte con bisturí a nivel del extremo distal del miembro.



Figura 52. Anillo de compresión neumática.

Ante la dificultad encontrada, ensayamos el clampaje reversible de la arteria femoral, mediante disección del vaso a nivel del pliegue inguinal y colocación de un clip de

Yassargil. Si bien el flujo femoral quedó totalmente interrumpido con este abordaje, pudimos observar que la isquemia de la pierna no se mantenía completa debido a la existencia de un importante riego colateral. Esta observación, añadida al alejamiento del modelo clínico (no invasivo) que la técnica implicaba, llevó a desechar este procedimiento.

Por último, se decidió afrontar la construcción de un dispositivo mecánico que asegurara los siguientes elementos:

- Posibilidad de objetivar la fuerza aplicada para la consecución y mantenimiento de la isquemia.
- Estabilidad del dispositivo: tanto espacial, previniendo desplazamientos; como de tensión o fuerza aplicada, constante a lo largo del periodo de isquemia.
- Adaptabilidad a las diferencias anatómicas entre animales (tamaño, diámetro, etc)
- Reproducibilidad de la técnica

Equipo de mantenimiento de la isquemia

Se han construido y desarrollado dos unidades de dicho dispositivo mecánico, con los que se ha logrado mantener de manera fiable, estable, y reproducible la exangüinación provocada mediante la aplicación previa de un tortor de goma en la extremidad. Como se ha descrito en Material y Métodos y puede apreciarse en la figura 53, el equipo consta de:

- Una plancha sobre la que se acuesta al animal, en decúbito supino.
- Un cable o cordel formando un lazo de seno regulable, a través del cual puede deslizarse la extremidad que va a ser sometida a isquemia.
- Un émbolo conectado a dicho cordel y a un dinamómetro. Presionando dicho émbolo, se ejerce una tracción sobre el cable, que se cierra alrededor del miembro y comienza a ejercer presión sobre el mismo, logrando la oclusión de vasos arteriales y el mantenimiento de la isquemia.

- Una llave de seguridad, que bloquea el recorrido del cable, una vez alcanzada la tensión (y por tanto presión) deseada, que desde ese momento se mantiene constante a lo largo de la experiencia.
- Un brazo auxiliar sujetando el cable, y un sistema de tracción al cénit similar a una grúa. Con estos dos elementos, se neutraliza la tendencia al deslizamiento distal del cable, por la mencionada forma tronco-cónica del miembro de la rata, y éste se mantiene estable en el lugar apetecido a lo largo del periodo de isquemia.

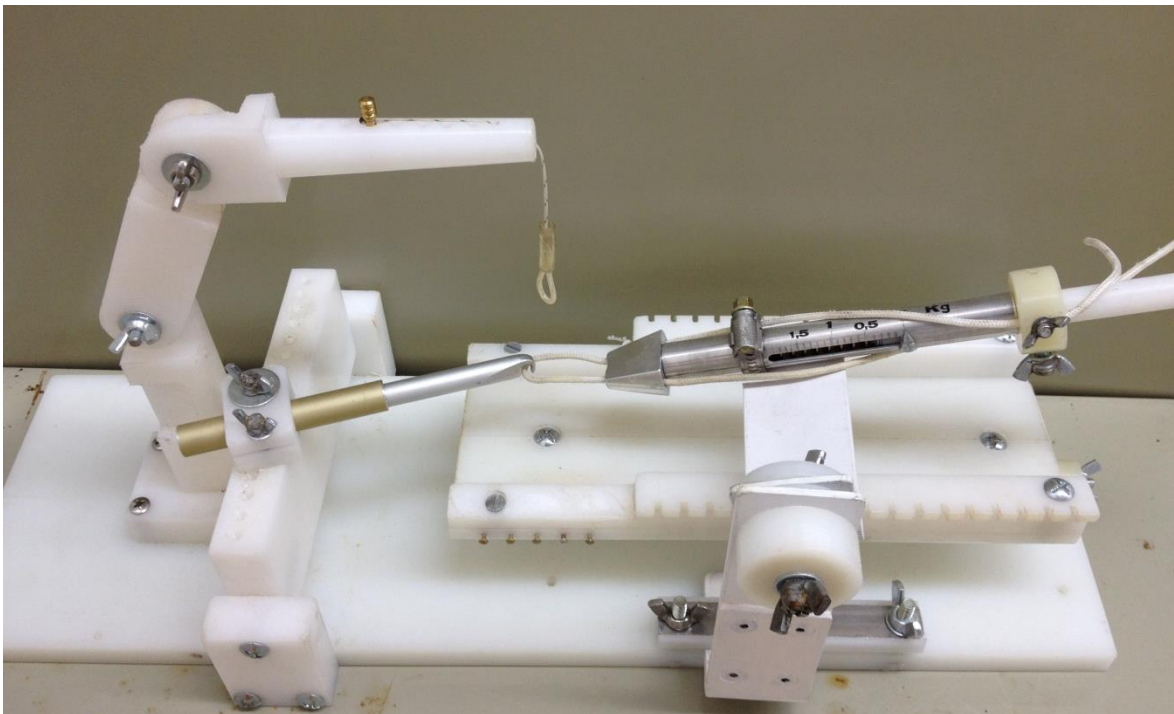




Figura 53. Dispositivo mecánico de cable a tensión para el mantenimiento de la isquemia. Vista inicial (primera fotografía) y en funcionamiento (segunda fotografía).

Dado que el dinamómetro registra la tracción a que el cable somete a la extremidad, resulta de interés la traducción de esta fuerza a la presión ejercida en los tejidos, ya que esto facilita establecer una comparación con la empleada en la práctica clínica. En este sentido, se desarrolla el siguiente razonamiento matemático (veáse asimismo la figura 54):

Siendo:

- a = anchura del miembro sobre la que se ejerce la fuerza, en cm.
- D = diámetro de la masa estrangulada, en cm.
- F_t = fuerza de tensión ejercida por el cable, en gr. Se ejerce desde dos brazos.
- P_c = presión de compresión de tejidos, en gr/cm².

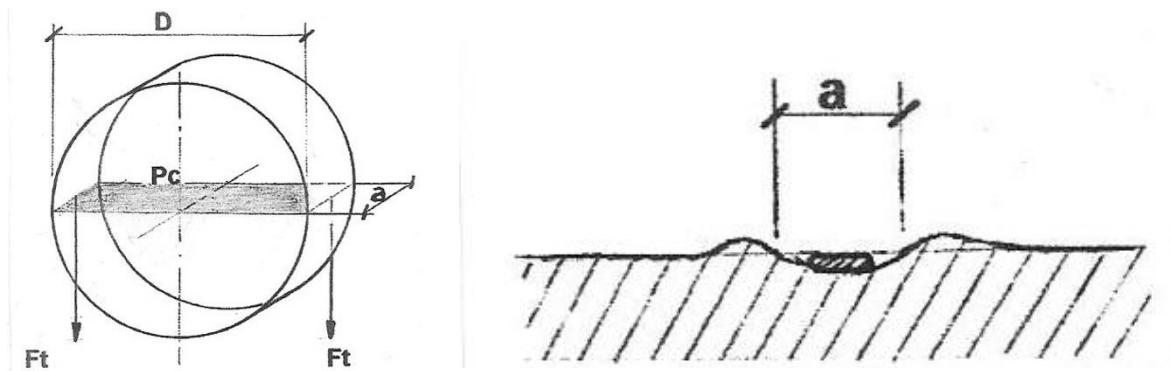


Figura 54. Modelización matemática de la aplicación del torniquete

Y habida cuenta que:

- 1000 mmHg = 1,333 bares
- 1 bar= 1,019 Kg/cm²
- 1 mmHg= 1,358 g/cm².

Entonces tenemos que:

$$P_c \times a \times D = 2F_t$$

O bien, que:

$$F_t = ((1/1,358) \times P_c \times D) / 2 = (P_c \times D) / 2,716$$

Debido al rozamiento propio de la cinta contractora sobre la masa, y a la dispersión de valores de P_c en la sección $D \times a$, y en toda la masa afectada por la presión ejercida por el dispositivo, se impone deducir un coeficiente corrector adecuado recurriendo al ensayo experimental.

Dadas la tensión arterial sistémica media en la rata y las dimensiones de su extremidad inferior, y considerando las magnitudes que se emplean habitualmente en la práctica clínica, se considera que para conseguir una isquemia mantenida en el tiempo es necesario ejercer una presión de entre 250 a 350 mmHg.

Tras la experimentación relatada en el apartado de “Descripción de la presión mínima de oclusión”, tenemos que para un animal estándar con un diámetro medio a nivel de la mitad del fémur de unos 2cm y perímetro de 60mm, se cumple la constricción adecuada con $P_c=300\text{mmHg}$ con un **coeficiente corrector de 2,26**. Así, tendríamos que $(300 \times 2) / 2,716 = 221$. Y que $221 \times 2 \times 2,26 = 998,92$. Por consiguiente para conseguir dichos 300mmHg necesitaríamos una fuerza total tractora de 1000g (1 kg), con un error estimado de $\pm 15\%$.

Descripción de la presión mínima de oclusión

Una vez que dispusimos de un equipamiento fiable para mantener la isquemia, realizamos una serie de experiencias con animales para establecer la tensión (y su consiguiente presión) mínima necesaria a aplicar para cubrir dicho objetivo. Esta experiencia buscaba además comprobar la eficacia y fiabilidad del aparato empleado a los largo de los tiempos de isquemia planificados.

Con este fin, se sometió a 20 ratas a incrementos sucesivos de tensión en su extremidad inferior derecha, a razón de 0,1 kg, comenzando desde 0,5 kg. Según el modelo matemático descrito, y para la rata estándar descrita, estos incrementos de 0.1 kg en la tensión aplicada corresponderían a unos 30 mmHg de presión.

Para cada valor de tensión en cada animal, se realizó una monitorización clínica y a través de Láser Doppler del flujo sanguíneo en la extremidad, como se ha escrito en material y métodos, hasta objetivar una isquemia del miembro completa y mantenida en el tiempo.

Tabla 9. Valores de tensión, presión aproximada, y número y porcentaje de animales con isquemia.

Tensión del cable	Presión aproximada	Animales con isquemia	Porcentaje de isquemia para la tensión del cable
0,5kg	150mmHg	2	10%
0,6kg	180mmHg	13	65%
0,7kg	210mmHg	17	85%
0,8kg	240mmHg	19	95%
0,9kg	270mmHg	20	100%
1kg	300mmHg	20	100%

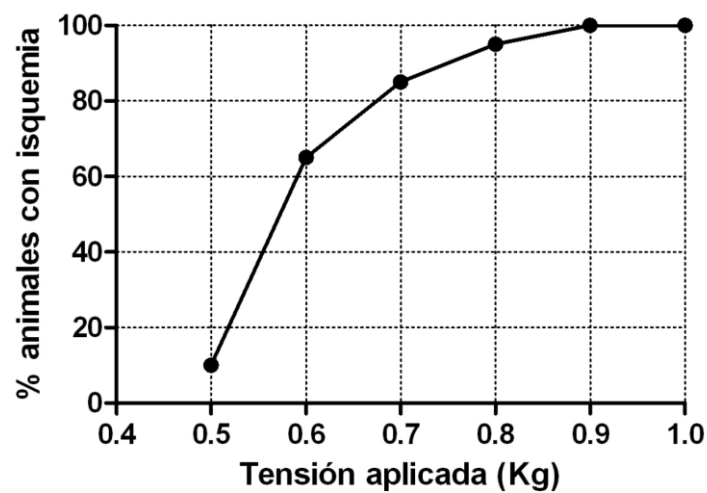


Figura 55. Porcentaje de animales con isquemia mantenida, para cada valor de tensión aplicada.

Como se puede observar en la tabla 9 y la figura 55, con el porcentaje de ratas en las cuales se consigue una isquemia completa y mantenida para cada valor de tensión dado, se define una curva en la que destacan los siguientes puntos:

- Con tensiones de 0.5 kg (150 mmHg), sólo se consigue instaurar la isquemia en una décima parte de los animales.

- La tensión a la que se consigue la isquemia en la mitad de los animales está entre 0.5 y 0.6 kg (aproximadamente 150 y 180 mmHg).

- Para una tensión de 0.8 kg (aproximadamente 240 mmHg), se consigue la isquemia en el 95% (19) de los animales.

- A partir de una tensión de 0.9 kg (aproximadamente 270 mmHg), se consigue la isquemia en el 100% (20) de los animales.

Tras esta serie, se estableció la tensión de 1 kg (presión de aproximadamente 300 mmHg) como estándar a aplicar en las futuras experiencias, al considerarlo un valor capaz de proporcionar con seguridad una isquemia mantenida, y razonablemente cercano al concepto de presión mínima de oclusión arterial en todos los animales de las características de la población a estudio.

Valoración del daño por reperusión

Para valorar el daño experimentado por la extremidad como consecuencia de la isquemia se han realizado estudios anatomopatológicos (daño local directamente medido) y bioquímicos (repercusión general de la isquemia-reperusión y/o manifestación sérica del daño local).

Para el estudio anatomopatológico el tiempo de evaluación está bastante definido en la bibliografía. Sin embargo, al no haber tanta uniformidad en cuanto al tiempo de evaluación del daño a nivel bioquímico, se plantea un estudio previo de la evolución de dicho daño durante la reperusión.

Evolución cronológica del daño

Para tener una idea general sobre las consecuencias de la isquemia absoluta de la extremidad inferior se han realizado estudios tras periodos de 2 o 3 horas de isquemia, seguidas de un máximo de seis horas de perfusión. En estas series se han realizado exclusivamente estudios bioquímicos, orientados a establecer los momentos óptimos de estudio.

Así, se han utilizado 48 animales divididos en dos grupos (serie A con 2 horas de isquemia y serie B con 3 horas de isquemia). En cada uno de ellos se han sacrificado 6 animales en cada momento de estudio: 10 minutos, 1 hora, 3 horas y 6 horas de perfusión. A partir de las muestras de sangre obtenidas en el sacrificio se han cuantificado los valores séricos de: sodio (Na), potasio (K), Cloro (Cl), Urea, Creatinina (Cr), Fosfatasa Alcalina (FA), Glutamato-oxalacetato transaminasa / Aspartato aminotransferasa (GOT / AST), Glutamato-piruvato transaminasa / Alanina aminotransferasa (GPT / ALT), Creatin Kinasa (CK) y Lactato Deshidrogenasa (LDH). Como valores control para estos parámetros se han utilizado los resultados obtenidos del estudio de muestras de sangre obtenidos de seis animales de población general, no sometidos a ningún procedimiento, y de idénticas características en cuanto a edad, peso, sexo (serie O).

Isquemia de 2 horas

Recogemos a continuación los resultados obtenidos, agrupados por categorías en función de su posible relación con el objeto de nuestro estudio: el síndrome de isquemia-reperfusión. Es decir, electrolitos (sodio, potasio y cloro), enzimas inespecíficos (FA, GOT y GPT), y enzimas específicos del daño local muscular (CK y LDH).

Para cada uno de estos apartados se detallan los resultados obtenidos, su representación gráfica y el análisis o comparación estadística entre grupos.

Electrolitos (Na, K, Cl)

En relación al **sodio**, se señalan los valores y desviación estándar para cada tiempo de reperfusión, tras horas de isquemia, en la tabla 10, y su representación gráfica mostrando la evolución en la figura 56. El estudio de estos resultados mediante ANOVA demuestra que no hay modificaciones significativas en ningún momento del postoperatorio respecto a los valores control ($p>0,05$).

Tabla 10. Concentración de Sodio en suero (mEq/l), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	146,7	143,0	142,9	144,5	142,3
D.E.	0,95	4,18	3,02	3,08	2,93

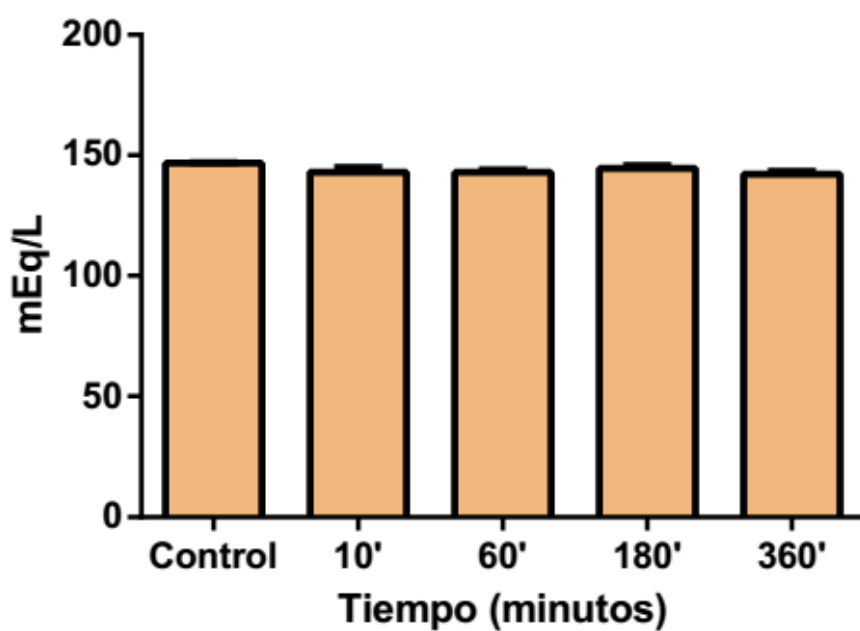


Figura 56. Gráfico representando la evolución de los valores medios de sodio en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 2 horas de isquemia.

Con respecto a los valores séricos del **potasio**, tal y como se puede observar en los datos recogidos en la tabla 11, tras 2 horas de isquemia se encuentran unos valores ligeramente elevados; el análisis mediante ANOVA concluye que esta diferencia alcanza significación estadística ($p=0,045$). Sin embargo, el posterior estudio con el test de Newman-Keuls concluye que el único valor que puede considerarse significativamente elevado respecto al control es la kalemia a las tres horas de reperusión ($p<0,05$). Estos resultados se muestran de manera gráfica en la figura 57.

Tabla 11. Concentración de Potasio en suero (mEq/l), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	4,00	4,68	4,69	4,84	4,57
D.E.	0,45	0,30	0,36	0,64	0,63

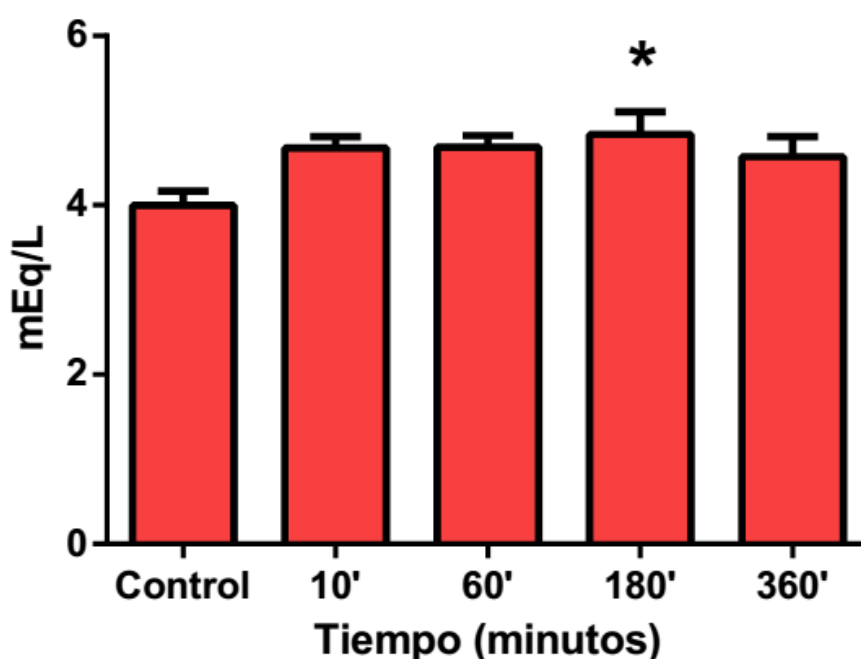


Figura 57. Evolución de los valores medios de potasio en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperusión, tras 2 horas de isquemia. (*) $p<0,05$ respecto al grupo control.

Al igual que ocurrió con el sodio, los valores de **Cloro** tampoco experimentaron modificaciones relevantes, tal y como puede observarse en la tabla 12 y figura 58. El análisis de la varianza confirmó esta apreciación, con $p > 0,05$.

Tabla 12. Concentración de Cloro en suero (mEq/l), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	103,7	99,8	100,4	99,5	98,4
D.E.	1,50	4,76	3,42	2,88	4,10

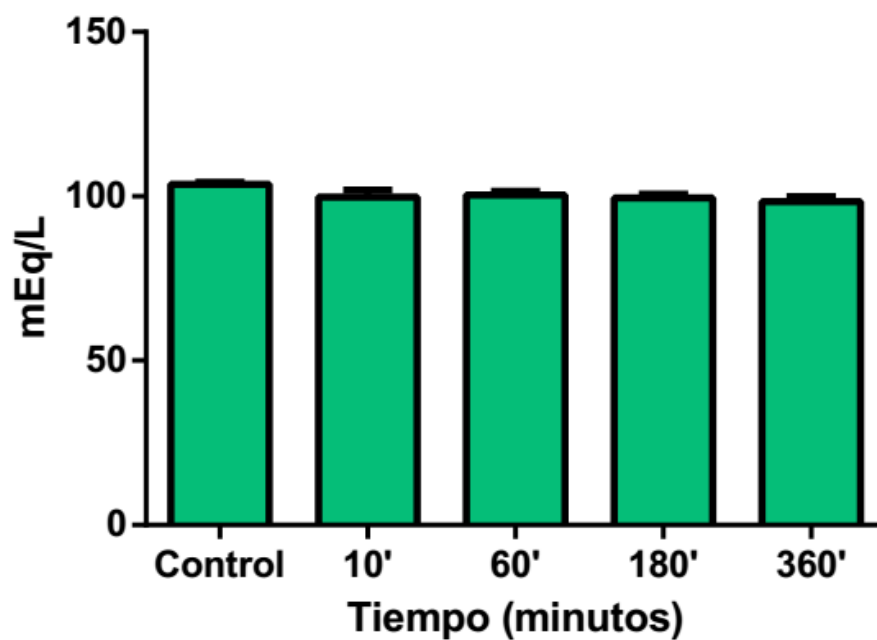


Figura 58. Evolución de los valores medios de cloro en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de perfusión, tras 2 horas de isquemia.

Indicadores de función renal: Urea, Creatinina

Observando las concentraciones de **Urea** en suero durante la reperfusión y tras 2 horas de isquemia, mostrados en la tabla 13, puede observarse que hay un incremento progresivo de los mismos respecto al grupo control. Confirmando esta impresión, el análisis de la varianza concluye que estas diferencias representan una significación estadística clara, con $p < 0,0001$. Al aplicar a continuación el test de Newman-Keuls, se concluye que los valores correspondientes a todos los periodos de reperfusión son significativamente más altos que aquellos del grupo control. Los datos se representan gráficamente en la figura 59.

Tabla 13. Concentración de Urea en suero (mg/gl), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	28	43	50	65	64
D.E.	3,2	8,1	7,8	9,9	15,8

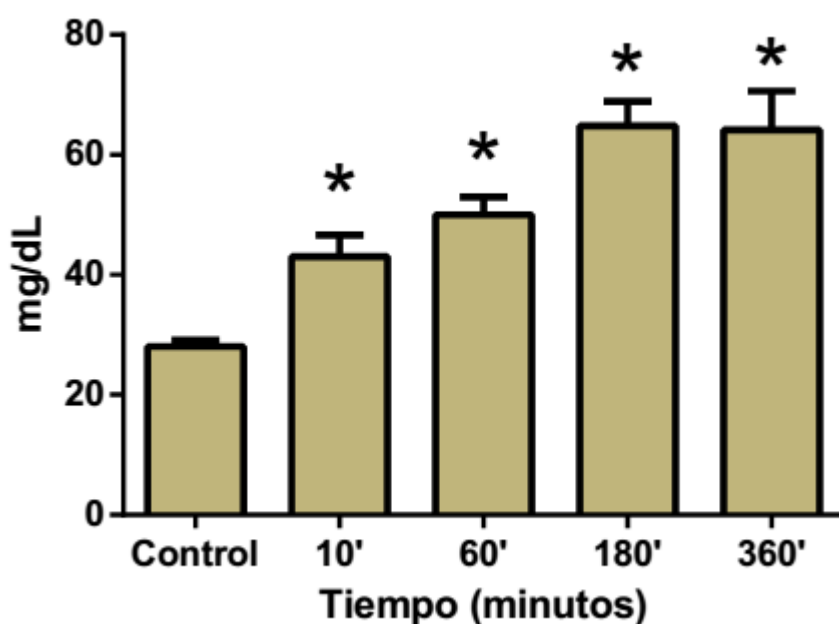


Figura 59. Evolución de los valores medios de Urea en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 2 horas de isquemia.

Cuando analizamos las cifras de **Creatinina**, de nuevo tras dos horas de isquemia, apreciamos que hay un aumento de las mismas durante los periodos de reperfusión estudiados, como se puede apreciar en la tabla 14. Sin embargo, el análisis de la varianza concluye que las diferencias observadas no son estadísticamente significativas, con un valor de $p > 0,05$. Se expone de forma gráfica la evolución de estos valores en la figura 60.

Tabla 14. Concentración de Creatinina en suero (mg/dl), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	0,36	0,60	0,59	0,63	0,43
D.E.	0,06	0,19	0,21	0,24	0,17

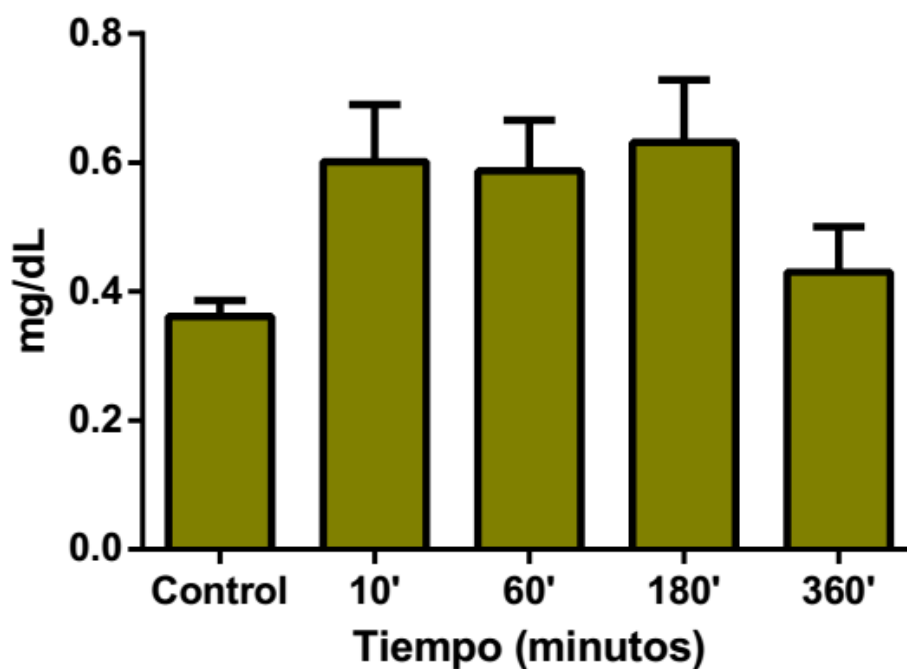


Figura 60. Evolución de los valores medios de Creatinina en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 2 horas de isquemia.

Enzimas séricas inespecíficas: FA, GOT, GPT.

En relación con la **Fosfatasa Alcalina (FA)**, como se señala en la tabla 15, tras 2 horas de isquemia no hay variaciones relevantes en su concentración sérica a lo largo de la reperfusión. El test de ANOVA no muestra variaciones relevantes, con $p > 0,05$. Podemos ver la representación gráfica de esta evolución en la figura 61.

Tabla 15. Concentración de FA en suero (UI/L), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	122	91	88	107	96
D.E.	5,00	29,02	30,95	13,10	33,44

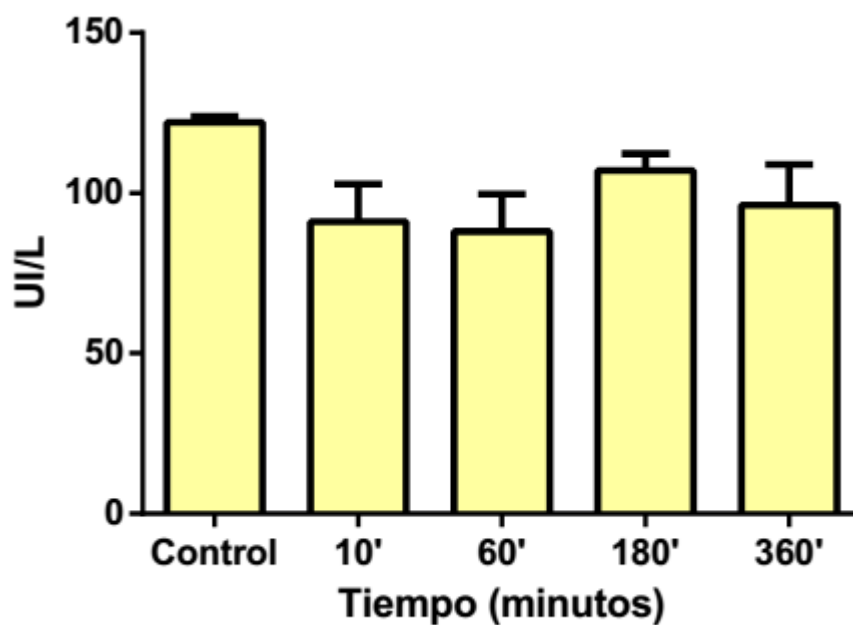


Figura 61. Evolución de los valores medios de Fosfatasa Alcalina en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 2 horas de isquemia.

Si analizamos ahora los valores de **Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT)**, y tal y como podemos observar en la tabla 16, vemos que en los animales sometidos a dos horas de isquemia, hay un aumento muy claro en las concentraciones séricas de GOT, con significación estadística franca en el análisis de la varianza ($p < 0,0001$). Este aumento puede indicar una repercusión sistémica del síndrome de isquemia-reperfusión. Al aplicar el test de Newman-Keuls, se evidencia que el aumento de los valores es significativamente mayor a las tres y seis horas de la perfusión, respecto al grupo control. La representación gráfica de este comportamiento se presenta en la figura 62.

Tabla 16. Concentración de GOT en suero (UI/L), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	51	102	109	307	223
D.E.	2,64	48,69	36,44	93,35	140,80

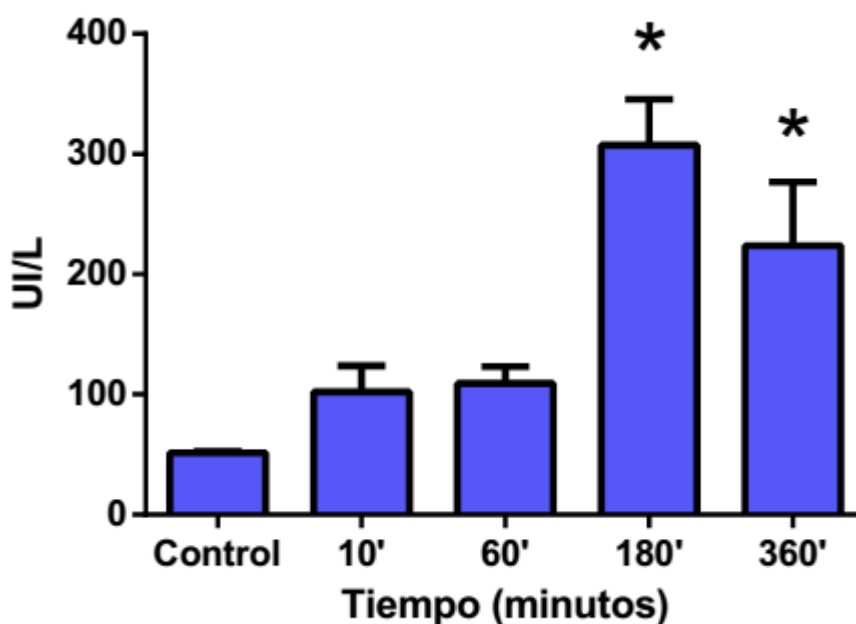


Figura 62. Evolución de los valores medios de Glutamato-oxalacetato transaminasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de perfusión, tras 2 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control

Por último, se exponen en la tabla 17 y figura 63 la media y desviación estándar de los valores de **Glutamato-piruvato transaminasa (GPT)** en suero, tras 2 hora de isquemia a lo largo del periodo de reperfusión estudiado. De nuevo observamos cómo hay un incremento claro a lo largo de la reperfusión, con significación estadística según el test ANOVA, con un valor de $p < 0,0001$. Este aumento también podría explicarse por la repercusión sistémica del síndrome de reperfusión. Cuando realizamos el test de Newman-Keuls, comprobamos cómo de nuevo los valores séricos de GPT son significativamente distintos respecto al grupo control a las tres y seis horas de reperfusión.

Tabla 17. Concentración de GPT en suero (UI/L), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	42	52	55	81	74
D.E.	1,60	2,77	8,96	12,77	23,02

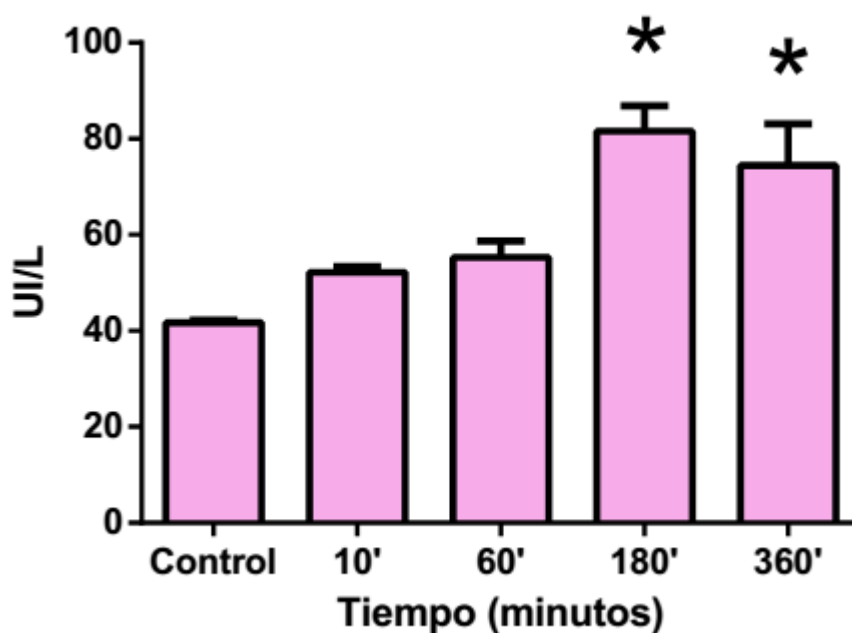


Figura 63. Evolución de los valores medios de Glutamato-piruvato transaminasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 2 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control

Enzimas musculares: CK, LDH.

Al llegar ya a las enzimas más específicas del daño local, muscular, vemos en primer lugar en la tabla 18 cómo la **Creatin Kinasa (CK)**, tras 2 horas de isquemia, exhibe un aumento muy relevante durante todos los momentos de la reperusión, que es de forma clara estadísticamente significativo según el test ANOVA, con $p < 0,0001$. Puede señalarse además que hay un primer incremento brusco con el comienzo de la reperusión, que se mantiene estable a la hora, y que muestra un nuevo aumento con pico a las 3 horas de la reperusión.

Tabla 18. Concentración de CK en suero (UI/L), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	82	3168	3428	6429	3872
D.E.	9	1314	1141	2007	1834

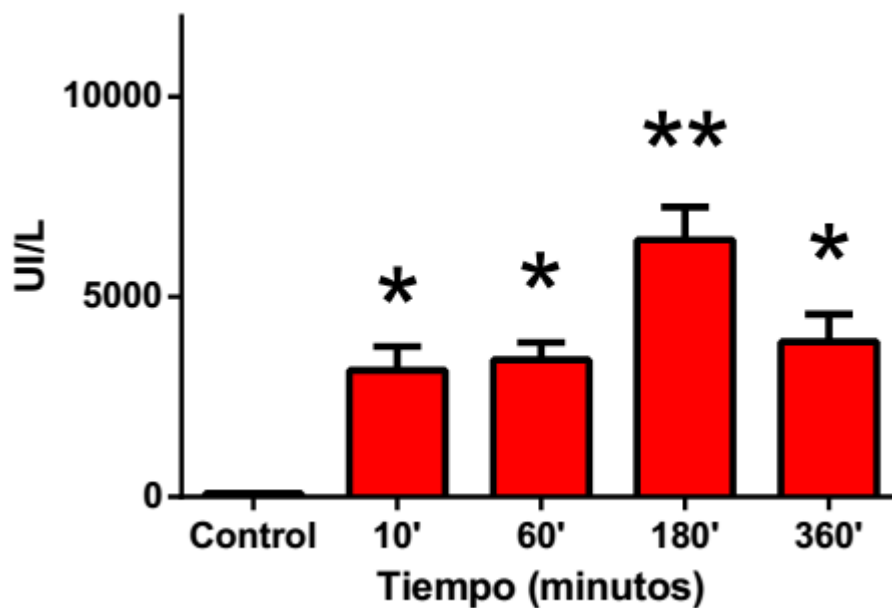


Figura 64. Evolución de los valores medios de Creatin Kinasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperusión, tras 2 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$, respecto a grupo control, () $p < 0,05$, respecto al resto de tiempos de reperusión.**

El test de Newman-Keuls nos indica que los valores séricos son significativamente superiores en todos los subgrupos de reperfusión respecto al grupo control, y además cabe destacar que las cifras presentes a las tres horas de la reperfusión, son también superiores al resto de forma estadísticamente relevante. Como en otros casos, se adjunta la representación gráfica correspondiente en la figura 64.

En lo respectivo a **Lactato Deshidrogenasa (LDH)**, vemos un resultado bastante similar. El análisis de las concentraciones séricas de LDH tras 2 horas de isquemia, muestra a lo largo del periodo de reperfusión, tal y como se expresa en la tabla 19, un incremento ostensible y estadísticamente significativo según el test ANOVA, con valor $p < 0,0001$. Al igual que ocurría con CK, hay un aumento desde los 10 minutos de reperfusión que se mantiene bastante estable a la hora, y un nuevo aumento con valores máximos a las 3 horas. La aplicación del test de Newman-Keuls muestra asimismo que el aumento de los valores séricos de LDH en todos los grupos de reperfusión es significativo respecto al grupo control, y muestra que el pico a las 3 horas es significativamente superior a los correspondientes al resto de periodos de reperfusión analizados. Se ofrece el gráfico ilustrativo de esta evolución en la figura 65.

Tabla 19. Concentración de LDH en suero (UI/L), tras 2 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	44	480	515	1015	609
D.E.	18	199	166	311	251

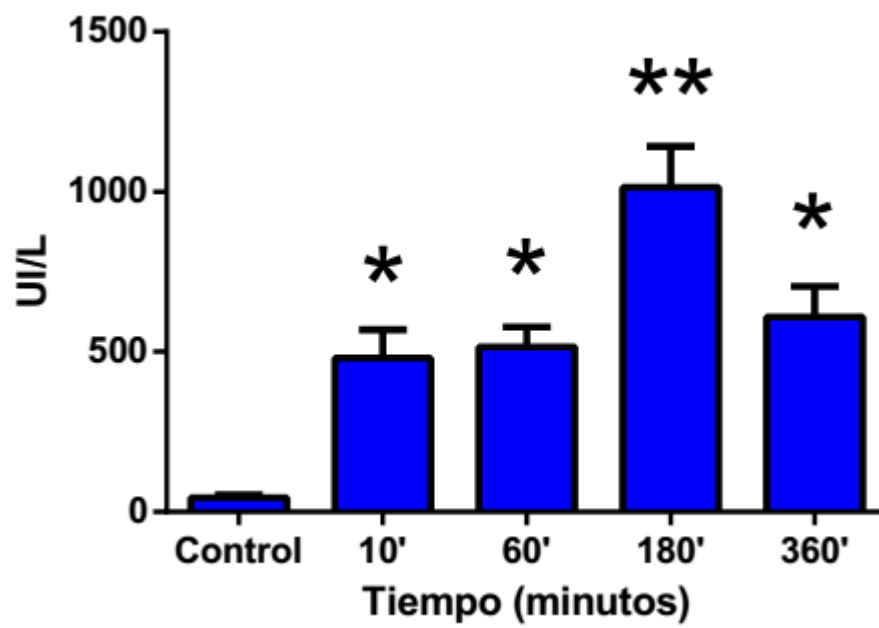


Figura 65. Evolución de los valores medios de Lactato Deshidrogenasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 2 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$, respecto a grupo control, (**) $p < 0,05$, respecto al resto de tiempos de reperfusión.

Isquemia de 3 horas

Mostramos de nuevo los resultados obtenidos agrupados por categorías, de modo similar a lo realizado para las 2 horas de isquemia.

Electrolitos (Na, K, Cl)

Se muestran los valores de media y desviación estándar de las concentraciones de **Sodio** en los sueros obtenidos de las ratas sometidas a 3 horas de isquemia en la tabla 20. Puede observarse que, al igual que ocurría con 2 horas de isquemia, no hay alteraciones relevantes en la natremia, con un análisis de la varianza que arroja una $p > 0,05$. Como siempre, disponemos de la representación gráfica de estos valores en la figura 66.

Tabla 20. Concentración de Sodio en suero (mEq/l), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	146,7	147,2	145,7	142,7	144,3
D.E.	0,95	1,92	2,29	1,75	2,80

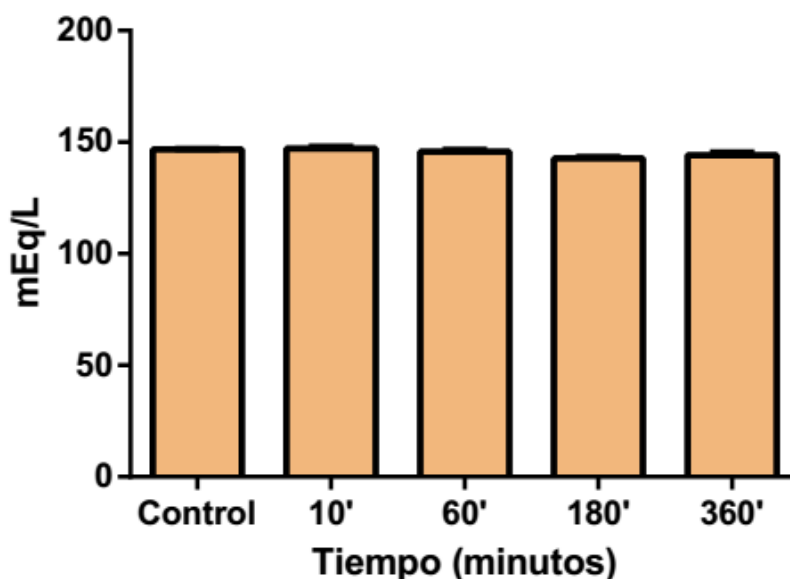


Figura 66. Evolución de los valores medios de sodio en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de perfusión, tras 3 horas de isquemia.

En relación al **Potasio**, cuyas concentraciones en el suero de las ratas sometidas a 3 horas de isquemia se muestran en la tabla 21, hay que señalar que a pesar de que se aprecia un incremento de los valores durante la reperfusión, como ocurría tras 2 horas de isquemia, en este caso no se detectan alteraciones relevantes en la potasemia entre los grupos de reperfusión, con un valor $p > 0,05$ en el test ANOVA. La gráfica ilustrativa de esta evolución se muestra en la figura 67.

Tabla 21. Concentración de Potasio en suero (mEq/l), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	3,99	4,59	4,83	4,76	4,52
D.E.	0,45	0,67	0,51	0,83	0,18

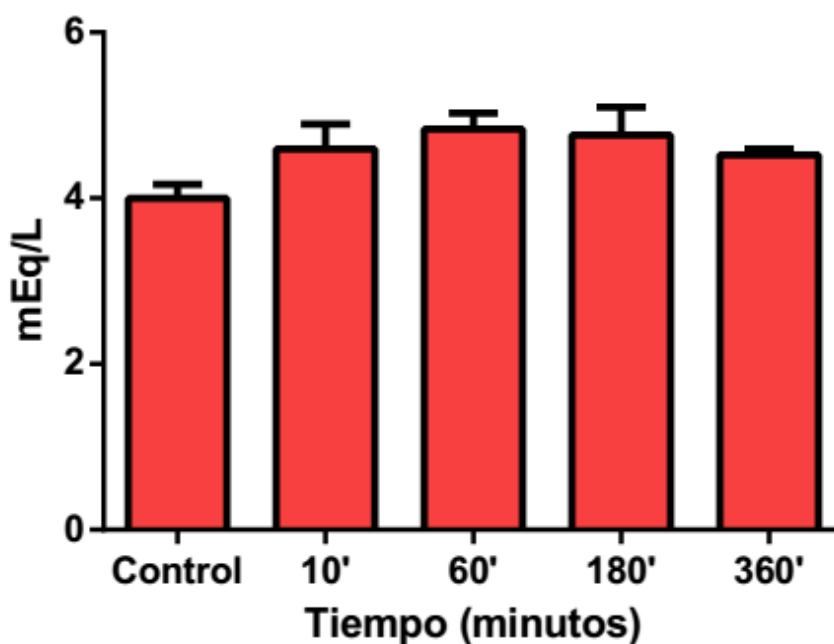


Figura 67. Evolución de los valores medios de potasio en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 3 horas de isquemia.

Finalmente, y en relación al **Cloro**, señalamos sus concentraciones y desviación estándar a lo largo de la reperusión y tras 3 horas de isquemia, en la tabla 22. Como puede apreciarse no hay variaciones llamativas, y de hecho el análisis de los datos, llevado a cabo mediante el test ANOVA, no detecta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, con $p>0,05$. Se representan gráficamente los mismos en la figura 68.

Tabla 22. Concentración de Potasio en suero (mEq/l), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	103,7	102,6	102,4	99,3	101,7
D.E.	1,50	1,52	3,10	2,01	1,86

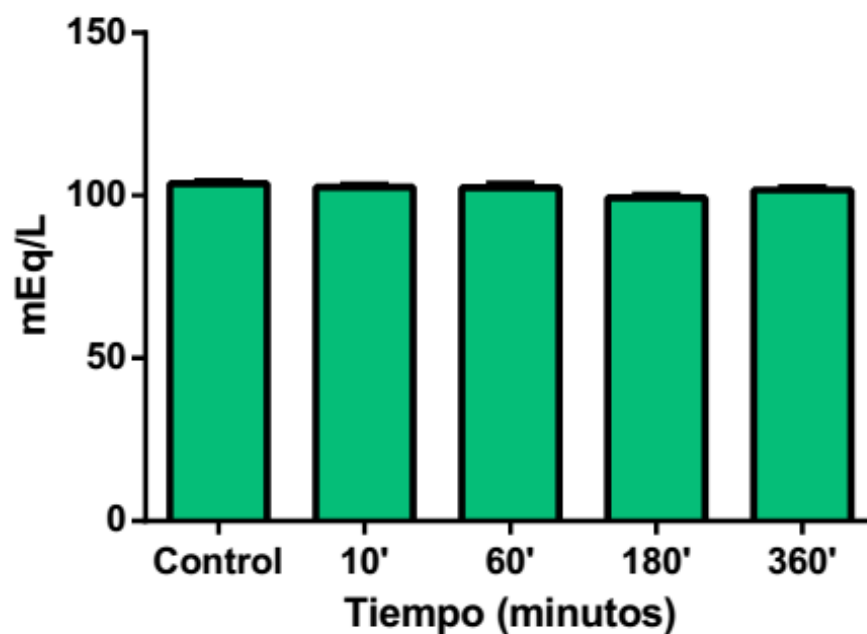


Figura 68. Evolución de los valores medios de cloro en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperusión, tras 3 horas de isquemia.

Indicadores de función renal: Urea, Creatinina

Tras 3 horas de isquemia, se ha observado un aumento progresivo en las concentraciones de **Urea** en suero (tabla 23), que podrían sugerir un sufrimiento renal en las primeras horas de perfusión, más marcado que tras 2 horas de isquemia. El análisis de la varianza concluye que las diferencias observadas alcanzan una muy elevada significación estadística ($P < 0,0001$).

Tabla 23. Concentración de Urea en suero (mg/dl), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	28	39	44	68	64
D.E.	3,2	5,4	6,0	3,6	16,3

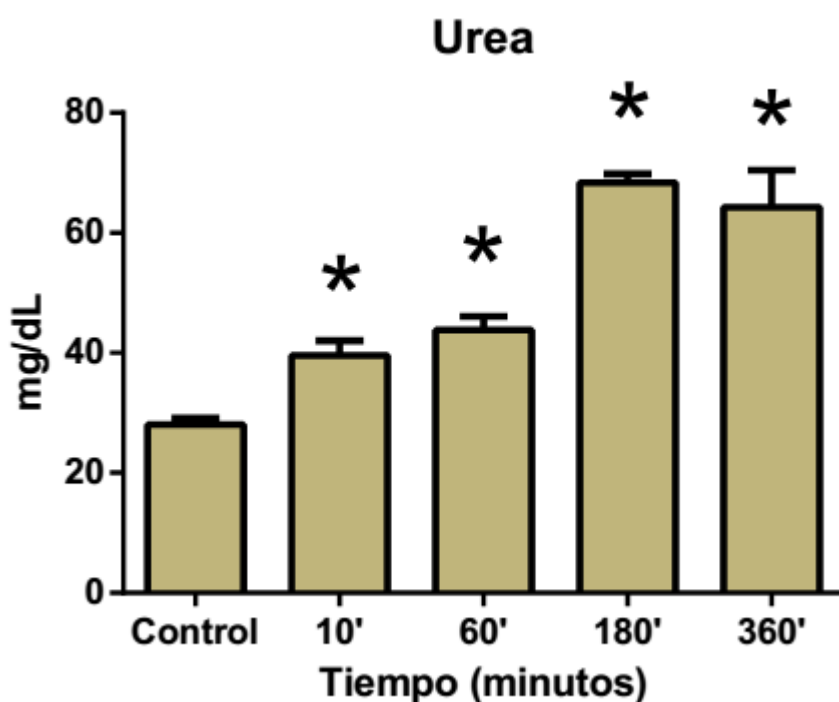


Figura 69. Evolución de los valores medios de Urea en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de perfusión, tras 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control.

El análisis subsiguiente mediante el test de Newman-Keuls concluye que todas las diferencias de todos los grupos de perfusión son significativas respecto al control; y los valores tras 180 y 360 minutos, son significativamente superiores respecto a los valores de los tiempos anteriores. Los resultados se muestran de manera gráfica en la figura 69.

Un comportamiento similar se observa en la evolución de las cifras de **Creatinina**, tras 3 horas de isquemia, que aparece aumentada desde los primeros momentos de la perfusión (tabla 24). El análisis de la varianza concluye que las diferencias observadas, a diferencia de lo que ocurría tras 2 de isquemia, en este caso sí alcanzan significación estadística, con un valor de $p=0,0009$. La elevación de las cifras de creatinina la hora y a las tres horas es significativa respecto al control, según el test de Newman-Keuls; que también concluye que el descenso observado a las seis horas no alcanza significación estadística. Este patrón evolutivo se ve con claridad en la figura 70.

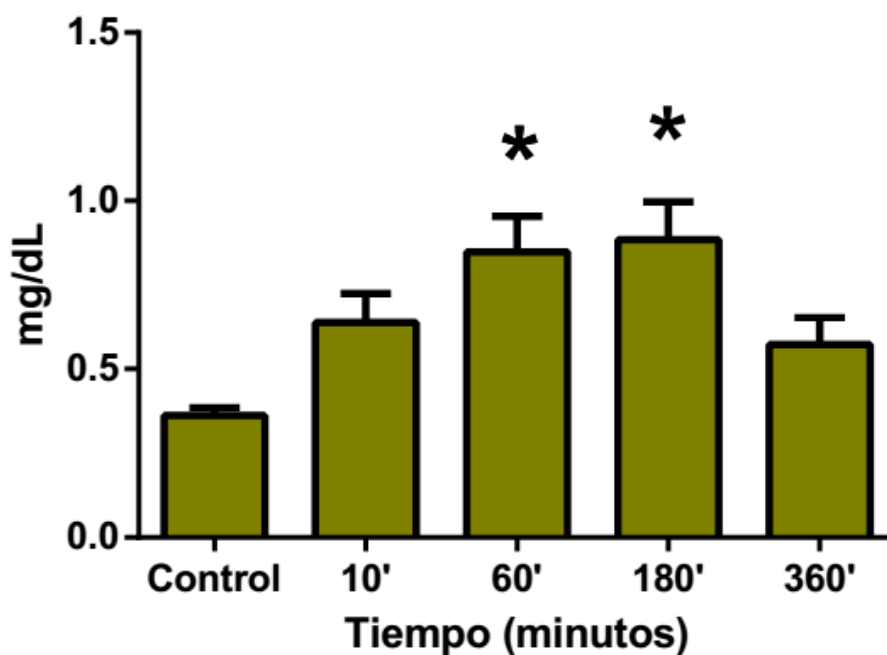


Figura 70. Evolución de los valores medios de Creatinina en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de perfusión, tras 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Tabla 24. Concentración de Creatinina en suero (mg/dl), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	0,36	0,63	0,84	0,88	0,57
D.E.	0,06	0,19	0,28	0,27	0,21

Enzimas séricas inespecíficas: FA, GOT, GPT.

Se señalan los valores medios y desviación estándar de las concentraciones de **Fosfatasa Alcalina (FA)** del grupo control y de los distintos grupos de reperusión en la tabla 25. Como puede apreciarse, no hay variaciones llamativas entre los grupos, y en este sentido el test ANOVA confirma que no hay diferencias con significación estadísticas, con una $p > 0,05$. Estos valores aparecen asimismo representados durante su evolución en la figura 71.

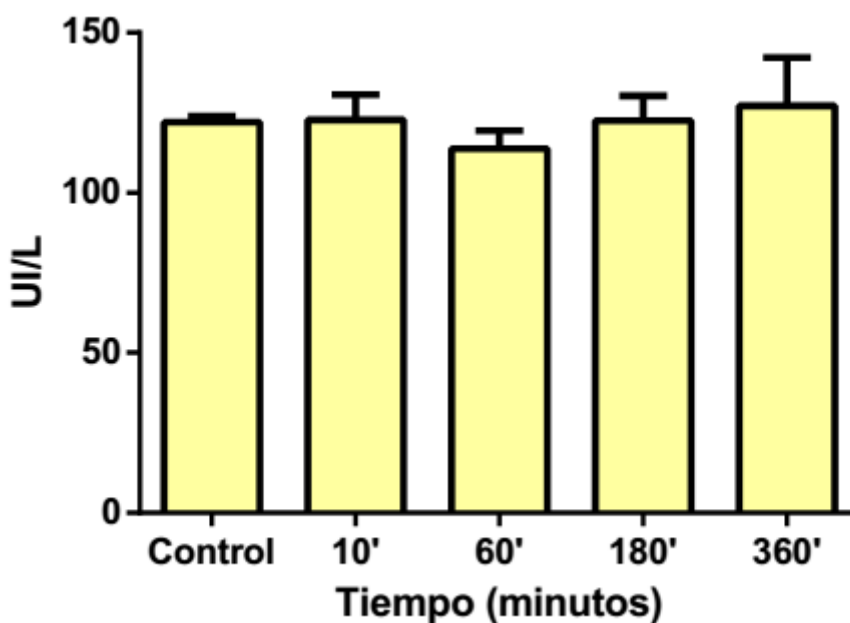


Figura 71. Evolución de los valores medios de Fosfatasa Alcalina en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperusión, tras 3 horas de isquemia.

Tabla 25. Concentración de FA en suero (UI/L), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	122	123	114	122	127
D.E.	5,00	17,77	14,83	19,17	37,18

Al llegar al análisis de las concentraciones de **Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT)** tras 3 horas de isquemia, cuyos valores pueden observarse en la tabla 26, percibimos que hay un aumento relevante lo largo de la reperfusión, especialmente en los dos últimos periodos estudiados a los 180 y 360 minutos. El análisis de la varianza confirma esta percepción, estableciendo la existencia de diferencias significativas, con un valor de $p < 0,0001$. El ulterior examen con el test de Newman-Keuls indica que todos los grupos de reperfusión exhiben valores significativamente más altos que el grupo control, y además que las cifras alcanzadas a las 3 y 6 horas de la reperfusión son asimismo significativamente mayores que los correspondientes a periodos más tempranos de la misma. Estos hallazgos mostrarían de forma más marcada la afectación sistémica derivada del síndrome de isquemia-reperfusión, que ya se apreciaba a continuación de la isquemia de 2 horas. La representación plástica de esta evolución se muestra en la figura 72.

Tabla 26. Concentración de GOT en suero (UI/L), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	51	157	174	360	307
D.E.	2,64	70,33	69,43	88,54	93,35

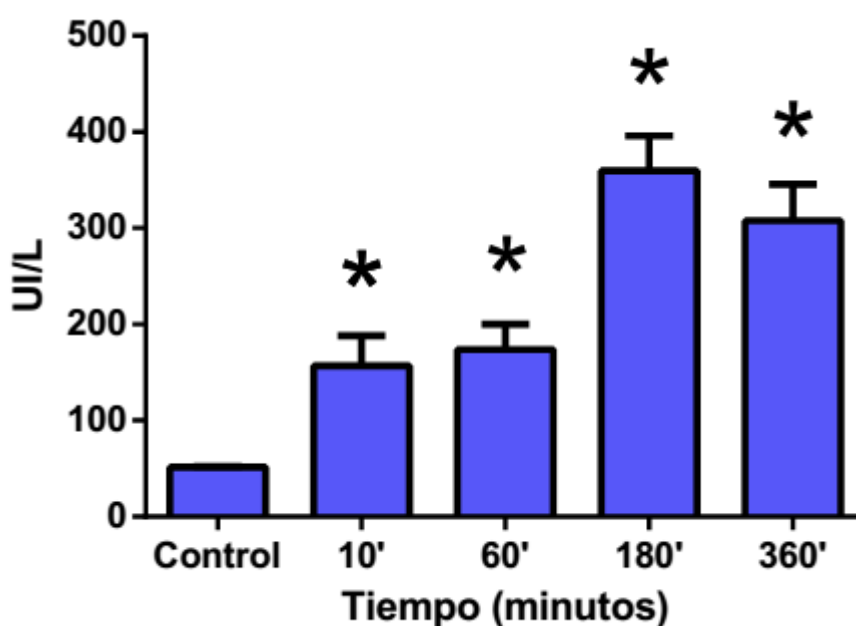


Figura 72. Evolución de los valores medios de Glutamato-oxalacetato transaminasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperusión, tras 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control

Finalmente, se indican las concentraciones medias de **Glutamato-piruvato transaminasa (GPT)** tras 3 horas de isquemia y su desviación estándar en la tabla 27. En la misma, podemos objetivar cómo las concentraciones de GPT en suero se incrementan de forma clara a lo largo del periodo de reperusión. En esta línea, el análisis de la varianza confirma la existencia de diferencias significativas entre grupos, con una $p = 0,0008$. El posterior análisis con el test de Newman-Keuls halla que los valores correspondientes a los grupos de 3 y 6 horas de reperusión son significativamente mayores que aquellos correspondientes al grupo control. Como se ve, se trata de un comportamiento muy similar al descrito tras 2 horas de isquemia, aunque en este caso con valores más altos. Puede apreciarse lo descrito en la figura 73.

Tabla 27. Concentración de GPT en suero (UI/L), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	42	67	67	90	79
D.E.	1,60	18,10	21,73	13,19	26,10

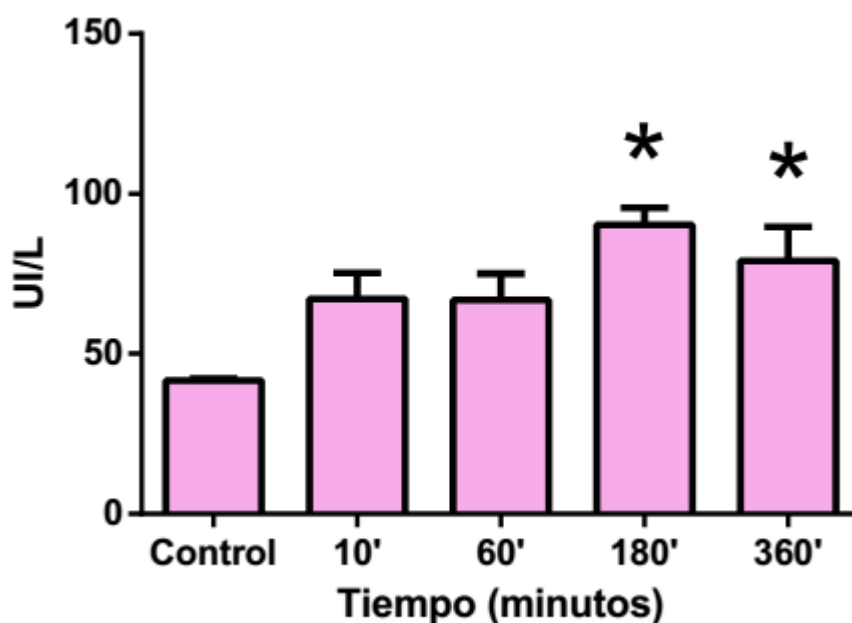


Figura 73. Evolución de los valores medios de Glutamato-oxalacetato transaminasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperusión, tras 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control

Enzimas musculares: CK, LDH.

Tras 3 horas de isquemia, se reproduce, aumentado, el patrón visto a las 2 horas, respecto a **Creatin Kinasa (CK)**: como se aprecia en la tabla 28, hay un aumento muy relevante y estadísticamente significativo de la concentración en suero de CK en los grupos de reperusión respecto al grupo control. El análisis de la varianza refleja la existencia de diferencias entre grupos con una muy alta significación estadísticas ($p < 0,0001$). Cabe

señalar de nuevo cómo desde el principio de la reperfusión se observa un incremento de las concentraciones de CK, que sufren un nuevo aumento hasta alcanzar su pico a las 3 horas de la reperfusión, para de nuevo disminuir a las 6 horas. Al aplicar el test de Newman-Keuls, obtenemos que todos los grupos de reperfusión tienen valores significativamente más altos respecto al grupo control; pero además, hay que destacar que también se comprueba que el pico a las 3 horas representa valores significativamente mayores respecto al resto de grupos de la reperfusión. Puede observarse lo mencionado de una forma gráfica en la figura 74.

Tabla 28. Concentración de CK en suero (UI/L), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	82	4870	4784	9459	5796
D.E.	90	1623	3019	1467	3140

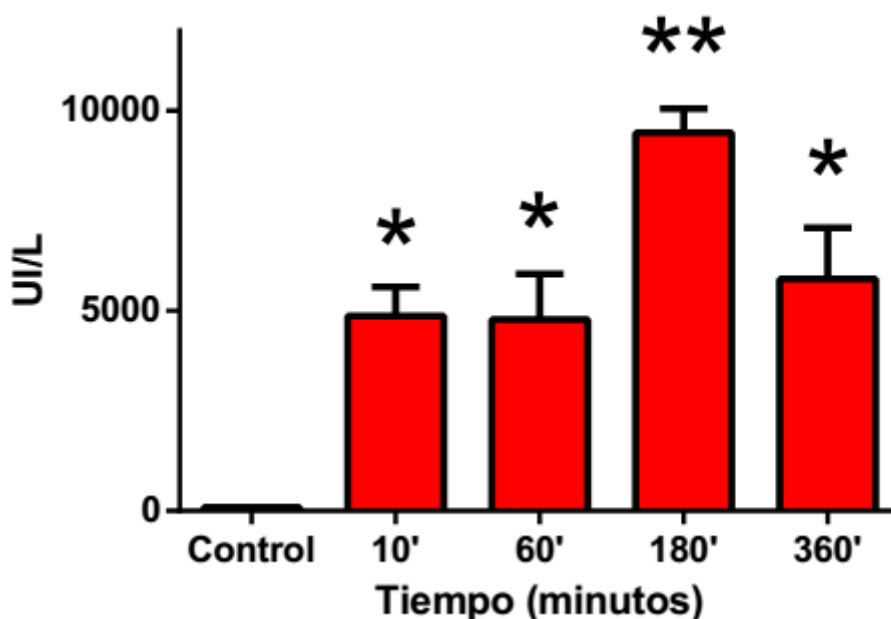


Figura 74. Evolución de los valores medios de Creatin Kinasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$, respecto a grupo control, () $p < 0,05$, respecto al resto de tiempos de reperfusión.**

Finalmente, y respecto a **Lactato Deshidrogenasa (LDH)** vemos de nuevo repetido de nuevo el patrón de aumento de en sangre durante todo el periodo de reperfusión estudiado, y con un pico máximo a las 3 horas de reperfusión (tabla 29). Una vez más, el test ANOVA detecta diferencias entre los grupos con significación clara ($p < 0,0001$), y el test de Newman-Keuls concluye que todos los grupos de reperfusión muestran concentraciones de LDH significativamente mayores que el grupo control, y también que los valores alcanzados a las 3 horas son significativamente más altos que los correspondientes a cualquier otro momento estudiado de la reperfusión. Como en el resto de ocasiones, se realiza la representación gráfica de este comportamiento, en la figura 75.

Tabla 29. Concentración de LDH en suero (UI/L), tras 3 horas de isquemia.

	Control	10'	60'	180'	360'
Media	44	770	684	1395	937
D.E.	18	376	385	262	393

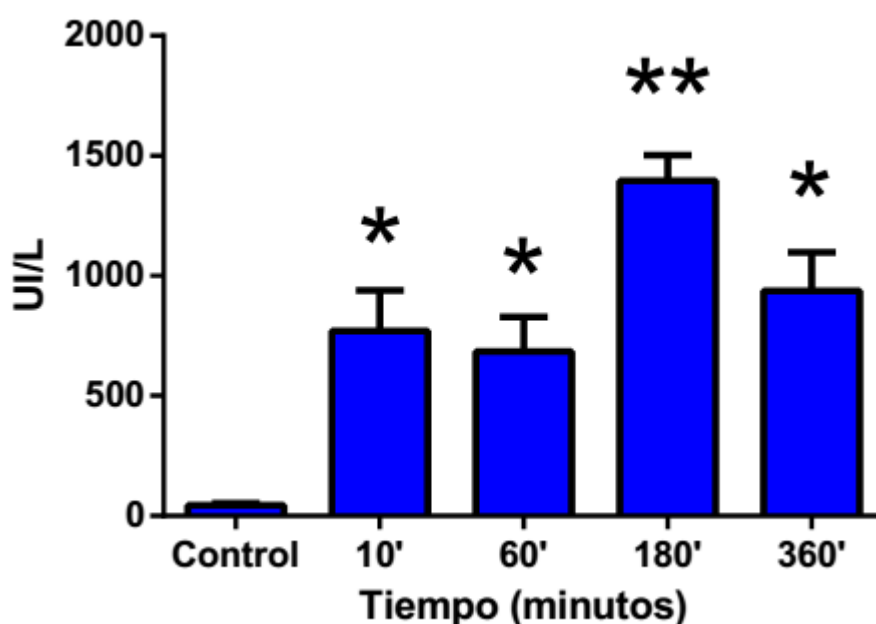


Figura 75. Evolución de los valores medios de Lactato Deshidrogenasa en suero para los animales del grupo control y para los correspondientes a cada periodo de reperfusión, tras 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$, respecto a grupo control, () $p < 0,05$, respecto al resto de tiempos de reperfusión.**

Cambios atribuibles a la prolongación de la isquemia

En este apartado comparamos el perfil evolutivo del daño durante la reperfusión en los dos modelos de isquemia estudiados: dos horas y tres horas de isquemia, respectivamente. El objetivo de este análisis es decidir cuáles son los momentos más relevantes de cara a poner en evidencia el efecto que los tratamientos puedan ejercer sobre el patrón de daño.

Electrolitos: Na, K, Cl

Respecto al **Sodio**, como ya se ha señalado, no hay alteraciones relevantes dentro de cada serie de 2 y 3 horas, con respecto a los animales sanos. Si ahora comparamos la evolución de los valores durante la reperfusión entre las series correspondientes a 2 y 3 horas de isquemia (figura 76), las diferencias que se aprecian (especialmente durante la primera hora) no alcanzan significación estadística, en el t test múltiple ($p > 0,05$). De hecho, conviene recordar que en todo momento los niveles de natremia registrados se encuentran dentro de los rangos de normalidad.

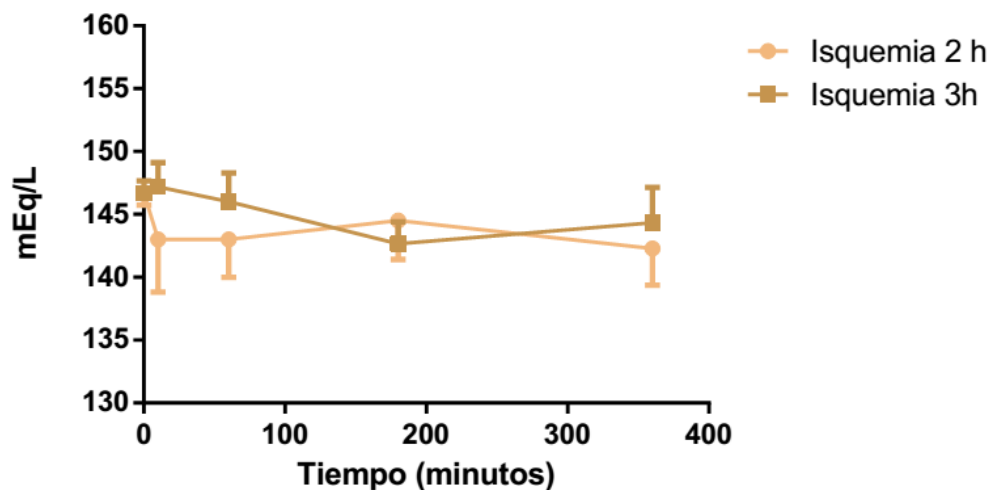


Figura 76. Evolución de los valores medios y desviación estándar de sodio en suero para los animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia, para los distintos tiempos de reperfusión.

Al igual que ocurría con el Sodio, la evolución del **Potasio** en suero no muestra apenas variaciones (figura 77), y las escasas diferencias observables entre los dos grupos (tras una hora de perfusión) no alcanzan significación estadística ($p>0,05$).

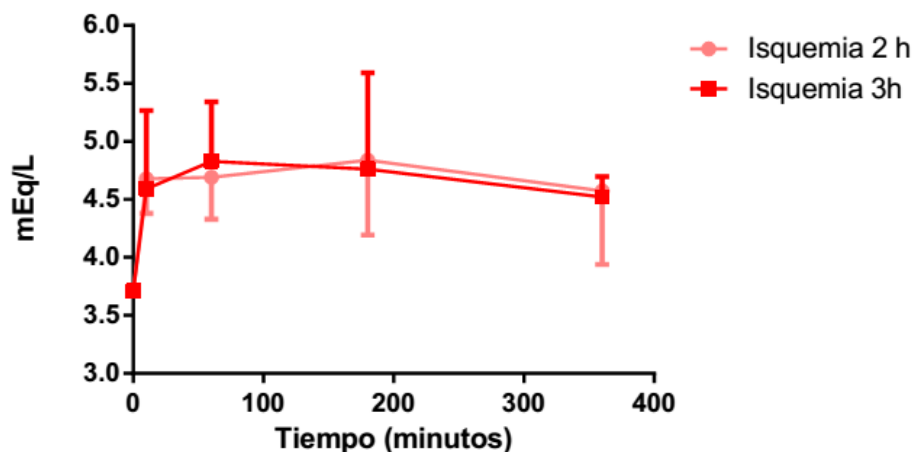


Figura 77. Evolución de los valores de potasio en los animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia.

Finalmente, en lo que respecta al último ion analizado, vemos que no hay alteraciones relevantes en los valores de **Cloro** en suero ($p>0,05$); ni durante la perfusión como se ha comentado anteriormente, ni comparando cada tiempo de perfusión para los distintos tiempos de isquemia de dos y tres horas (figura 78).

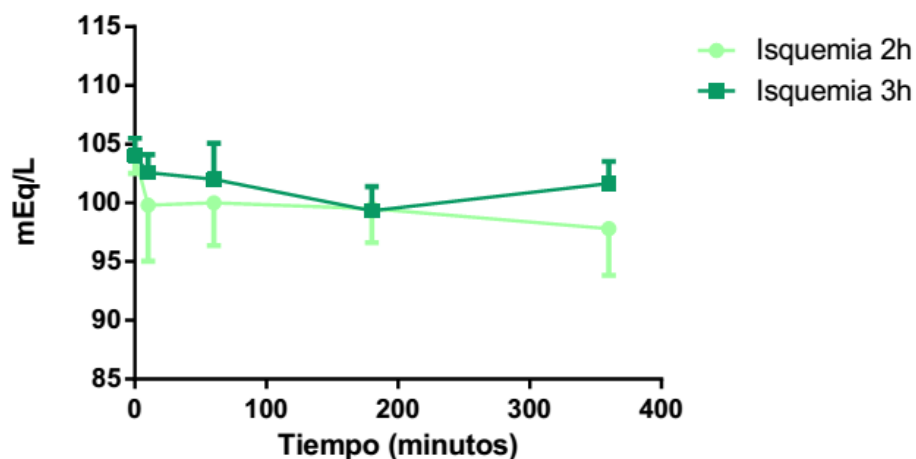


Figura 78. Evolución de los valores de Cloro en animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia.

Indicadores de función renal: Urea, Creatinina

Analizando la evolución de las concentraciones de **Urea** en sangre, vemos cómo tanto tras 2 como 3 horas de isquemia, hay un aumento progresivo a lo largo de la reperfusión, que recordemos alcanza significación estadística en el caso de la isquemia de tres horas de duración. En ambos casos la curva descrita durante la reperfusión es muy similar, y orienta como hemos mencionado a un leve daño renal durante las primeras horas tras la isquemia.

De hecho, el estudio estadístico de estos resultados confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos curvas, al aplicar el t test múltiple (figura 79).

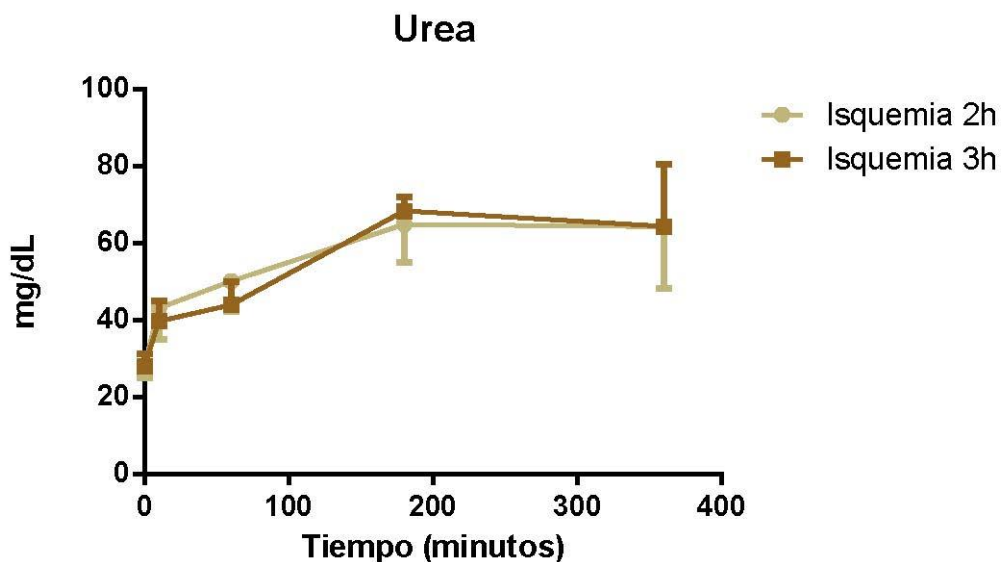


Figura 79. Evolución de los valores medios y desviación estándar de Urea en suero para los animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia, para los distintos tiempos de reperfusión.

En el caso de la **Creatinina**, los valores durante la reperfusión están significativamente aumentados respecto a los animales no intervenidos durante toda la reperfusión en ambos grupos experimentales. Pero, además, y a diferencia de lo que ocurre con la Urea, los animales sometidos a tres horas de isquemia presentan valores de creatinina en suero mayores que los encontrados en los animales sometidos únicamente a dos horas de

isquemia. La diferencia es más acusada al final de la primera y tercera horas de evolución (figura 80), reduciéndose hasta no alcanzar significación estadística al final del periodo de observación (6 horas).

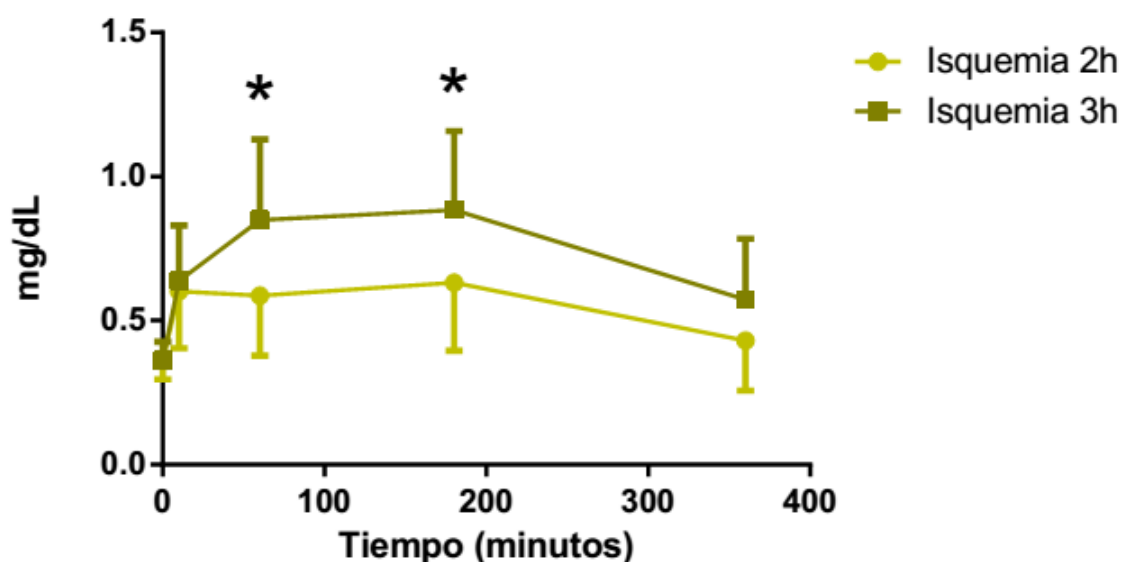


Figura 80. Evolución de los valores medios y desviación estándar de Creatinina en suero para los animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia, para los distintos tiempos de reperusión. (*) $p < 0,05$

Enzimas inespecíficas: FA, GOT, GPT.

Con respecto a la **Fosfatasa Alcalina**, conviene recordar que ninguno de los dos grupos presentó elevaciones significativas de su concentración durante el periodo de estudio. En todo caso, en el grupo sometido a dos horas de isquemia, los niveles del enzima se situaron por debajo de los controles sanos, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística.

Sin embargo, tal y como se parecía en la figura 81, la curva que representa los valores del grupo de tres horas de isquemia se sitúa en todo momento claramente separada –y por encima– de la de los animales sometidos a dos horas de isquemia. El estudio estadístico

mediante t test múltiple mostró que las diferencias observadas son significativas en cada uno de los momentos en que se midió la concentración sérica del enzima ($p < 0,05$).

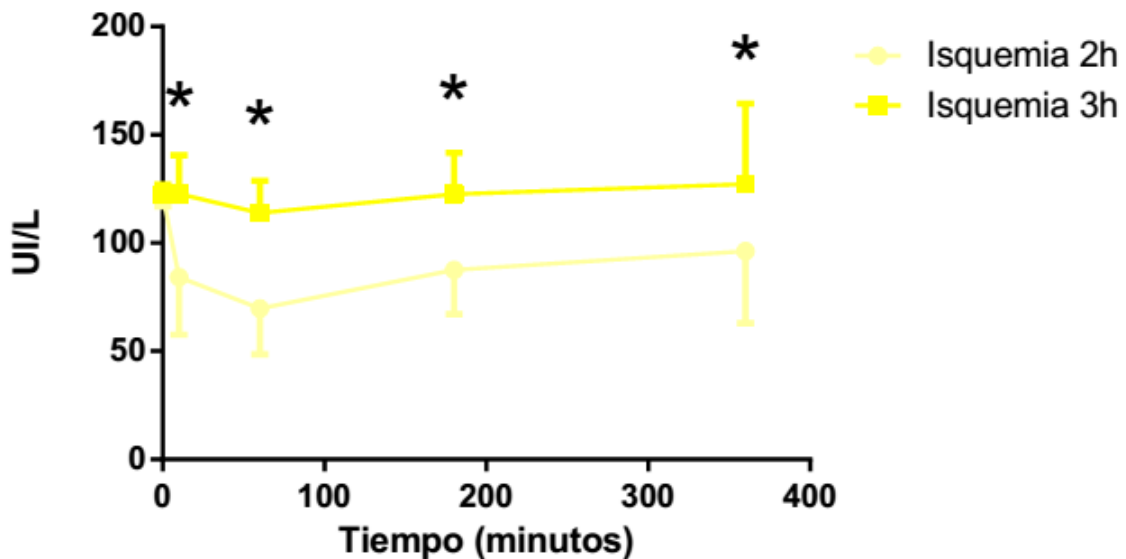


Figura 81. Evolución de los valores medios y desviación estándar de Fosfatasa Alcalina en suero para los animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia, para los distintos tiempos de reperfusión. (*) $p < 0,05$

Analizando la evolución de las concentraciones de **Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT)** en suero, vemos cómo tanto tras dos como tres horas de isquemia, hay un aumento progresivo a lo largo de seguimiento; que, como hemos dicho, alcanzaba significación estadística en la segunda mitad del tiempo de reperfusión estudiado. En ambos casos la curva descrita durante la reperfusión es muy similar, y orienta como hemos mencionado a un leve daño sistémico por el síndrome de isquemia-reperfusión en las primeras horas.

A pesar de los valores este enzima para el grupo de tres horas de isquemia se sitúan en todo momento por encima de los del grupo de dos horas, las diferencias no alcanzan significación estadística. Y ello a pesar de que mientras que en el grupo de dos horas se alcanza una meseta tras tres horas de reperfusión, en el grupo de tres horas se mantiene la pendiente creciente, como puede apreciarse en la figura 82.

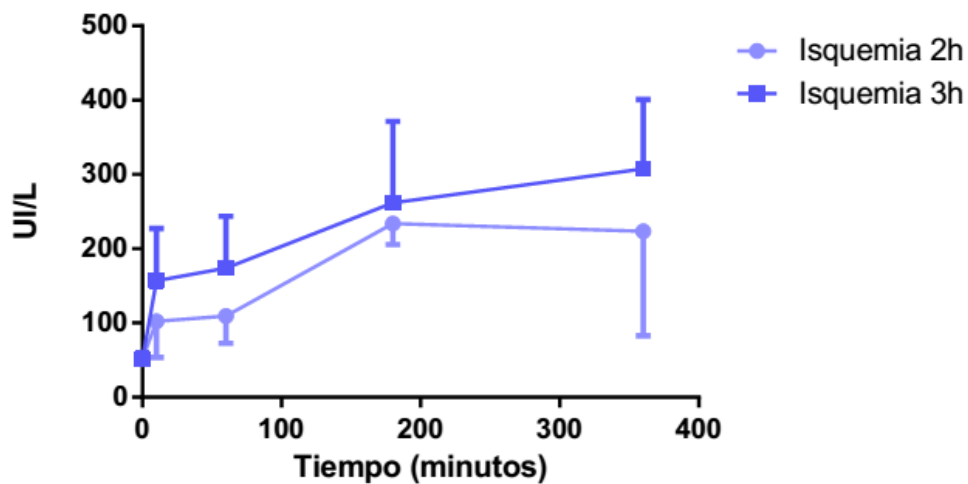


Figura 82. Evolución de los valores de GOT en animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia.

Finalmente, si observamos el evolutivo de las concentraciones de **Glutamato-piruvato transaminasa (GPT)**, comprobamos cómo de nuevo se repite el mismo patrón que con la GOT: la curva del grupo de tres horas de isquemia se sitúa en todo momento por encima de la curva del grupo de dos horas de isquemia, pero las diferencias no alcanzan significación estadística en el t test múltiple (figura 83). La diferencia en este caso radica en que al final del periodo de estudio los valores se igualan en los dos grupos.

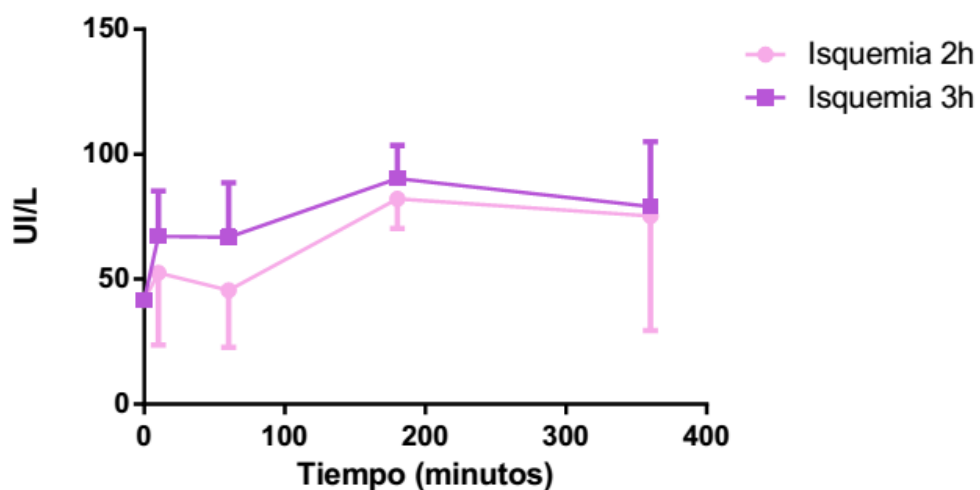


Figura 83. Evolución de los valores de GPT en animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia.

Enzimas musculares: CK, LDH

Analizando el enzima más selectivo de daño muscular, **Creatin Kinasa (CK)**, vemos cómo tanto tras 2 horas como tras 3 horas de isquemia, se reproduce el mismo patrón que en las enzimas inespecíficas: un primer aumento brusco de la concentración en suero desde los primeros momentos de la reperfusión, con un incremento posterior progresivo hasta alcanzar un pico a las 3 horas, para después comenzar un descenso al final del periodo estudiado, como se aprecia en la figura 84. El pico de las 3 horas de reperfusión, además, es significativamente mayor cuando comparamos los animales sometidos a 3 horas de isquemia frente a aquellos que solo experimentaron 2 horas de isquemia ($p<0,05$).

Es importante remarcar cómo durante la evolución de la concentración de CK, con patrón repetido tras 2 y 3 horas de isquemia, ésta muestra su máximo aumento a las 3 horas de la reperfusión, con valores que son, aproximadamente, el doble de los observados durante todo el tiempo de reperfusión.

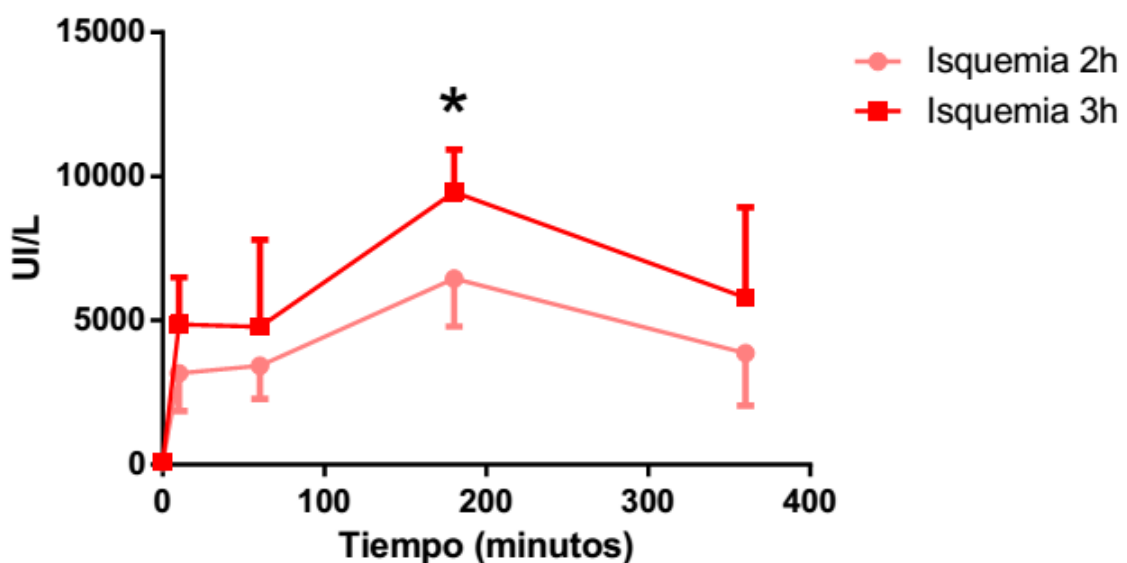


Figura 84. Evolución de los valores de CK en animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia. (*) $p<0,05$.

En el caso de la **Lactato Deshidrogenasa (LDH)** pasa algo similar a lo visto con la Creatin Kinasa, aunque no sea un enzima tan específico de tejido muscular. Se repite, tras 2 y 3 horas de isquemia, el mismo patrón de aumento notable desde los primeros momentos de la reperfusión, con valores que casi se doblan hasta alcanzar un pico a las 3 horas de reperfusión, en ambos casos. Además, se puede apreciar como los animales sometidos a tres horas de isquemia presentan valores más elevados que los sometidos sólo a dos horas de isquemia (figura 85). El análisis estadístico de nuestros resultados concluye que estas diferencias alcanzan significación estadística en las mediciones realizadas a las tres horas de reperfusión. O sea, en ambos grupos experimentales existe un pico a las tres horas; y en los animales sometidos una isquemia más larga el pico es significativamente más elevado.

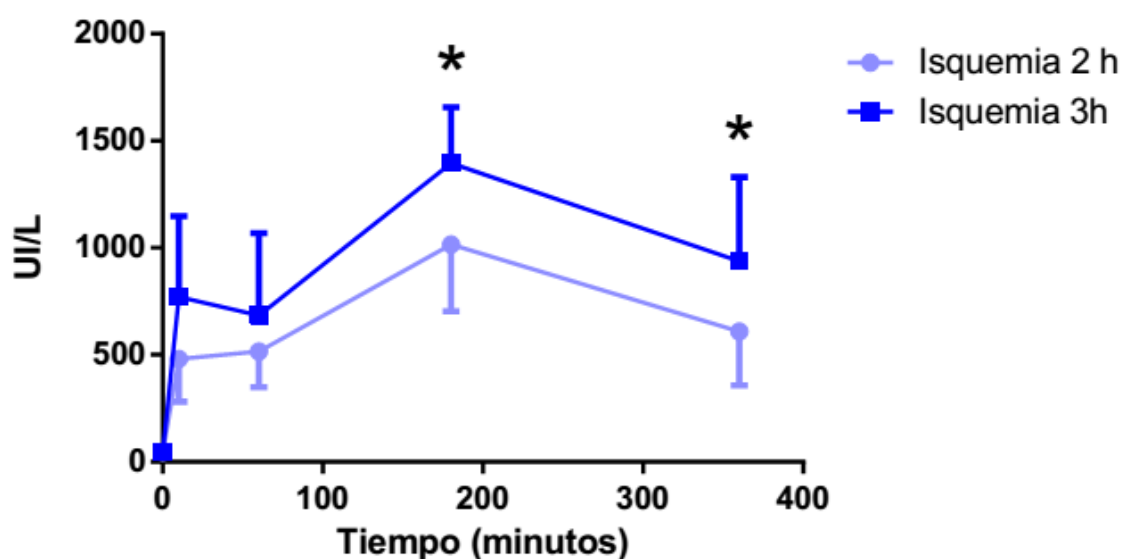


Figura 85. Evolución de los valores de LDH en animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia. (*) $p < 0,05$.

Pretratamiento con ácido folínico

Una vez establecido que, en nuestro modelo experimental, se producen cambios bioquímicos compatibles con daño muscular y que son más evidentes a las 3 horas de la reperusión, procedimos a estudiar el efecto que el pretratamiento de los animales con ácido folínico pudiera originar sobre el referido patrón de daño por isquemia-reperusión.

Se registran, de nuevo agrupados por categorías, los valores de Na, K, Cl, Urea, Creatinina, FA, GOT, GPT, CK y LDH. Se realiza el estudio en animales sometidos a 3 horas de isquemia de extremidad inferior derecha, comparando animales sin tratamiento y animales pre-tratados con Ac Fólico, utilizando muestras de sangre obtenidas a las 3 horas de reperusión.

Modificaciones en bioquímica sanguínea

En primer lugar, recogemos los resultados obtenidos en los estudios de bioquímica sanguínea, respetando el orden de exposición seguido en los apartados precedentes.

Electrolitos: Na, K, Cl

En cuanto a los iones estudiados, sólo el potasio había presentado una ligera modificación como consecuencia de la isquemia, por lo que no era de esperar encontrar modificaciones por el pretratamiento con ácido fólico.

Sodio (Na)

Así pues, al igual que los periodos de isquemia ensayados no mostraban alteraciones relevantes de los niveles de natremia respecto a la población general, el grupo de pre-tratamiento con Ac Fólico tampoco muestra diferencias respecto al grupo no tratado en el test de Student ($143 \pm 1,7$ vs $143 \pm 1,8$). Dichos valores se representan en la figura 86.

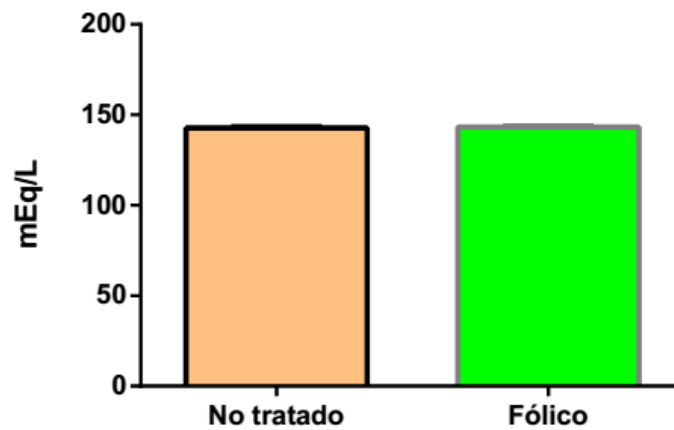


Figura 86. Valores medios de sodio en suero.

Potasio (K)

En lo referente a la potasemia, comparando los animales no tratados con aquellos pre-tratados con Ac Fólico, se puede observar que tras tres horas de isquemia y tres horas de reperfusión en el grupo tratado hay un valor medio de potasio en suero menor respecto al grupo no tratado ($4,3 \pm 0,2$ vs $4,7 \pm 0,83$); sin embargo, esta diferencia no alcanza significación estadística ($p=0,11$). Si bien es cierto que la cifra obtenida en la serie pretratada está más próxima a la fisiológica del grupo control representando a la población general ($4,0 \pm 0,4$) que a la del grupo no tratado (figura 87).

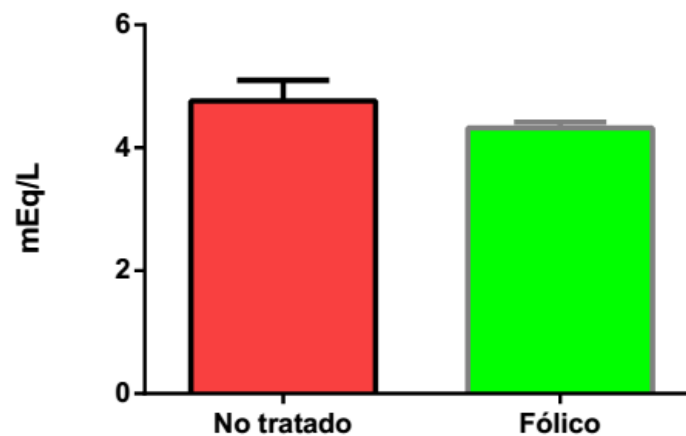


Figura 87. Valores medios de potasio en suero.

Cloro (Cl)

Terminando el grupo de los iones, vemos que los valores de cloro en suero tampoco muestran variaciones relevantes entre los animales no tratados y los animales del grupo tratado con ácido fólico ($99 \pm 2,1$ vs $99 \pm 2,7$) (figura 88), de modo similar a como ocurría con el sodio y el potasio, al aplicar la t de Student ($P > 0.05$).

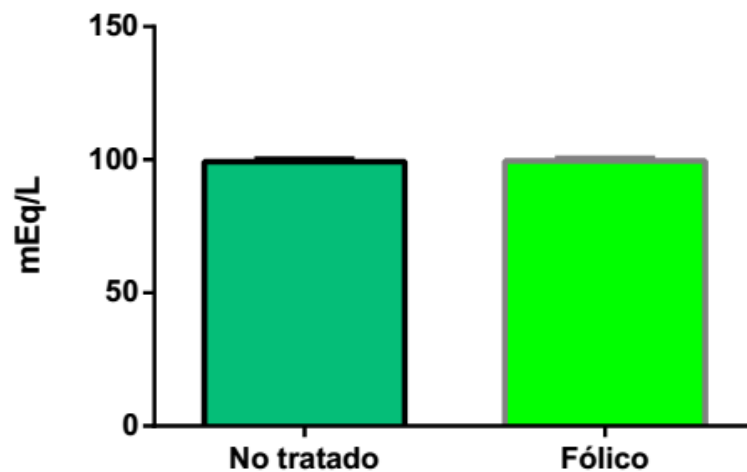


Figura 88. Valores medios de Cloro en suero.

Indicadores de función renal: Urea, Cr

Urea

El pretratamiento con ácido fólico no ha modificado los valores de urea en suero, tras 3 horas de isquemia, medidos después de 3 horas de perfusión: $62,2 \pm 7,6$ vs $64,8 \pm 9,9$ mg/dl (figura 89).

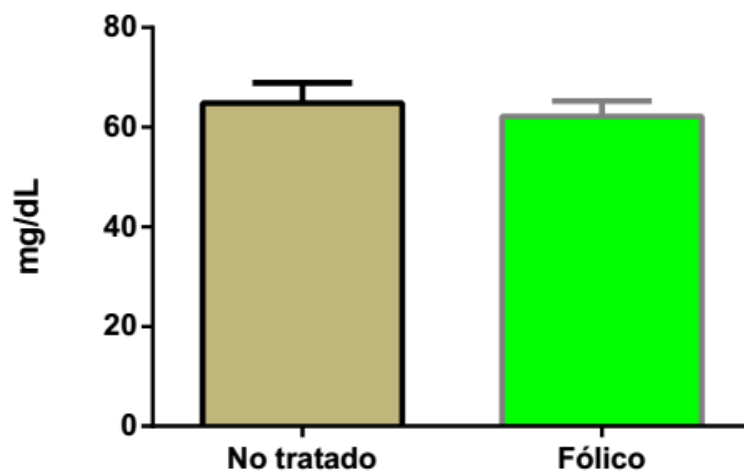


Figura 89. Valores medios de Urea en suero y su desviación estándar, para los animales del grupo no tratado y para los animales pre-tratados con Ac Fólico.

Creatinina (Cr)

La creatinina ha tenido un comportamiento similar, con un ligero aumento del valor medio a las tres horas de reperfusión tras un periodo de tres horas de isquemia ($0,73 \pm 0,3$ vs $0,63 \pm 0,23$ mg/dl), aunque sin alcanzar significación estadística en la t de Student.

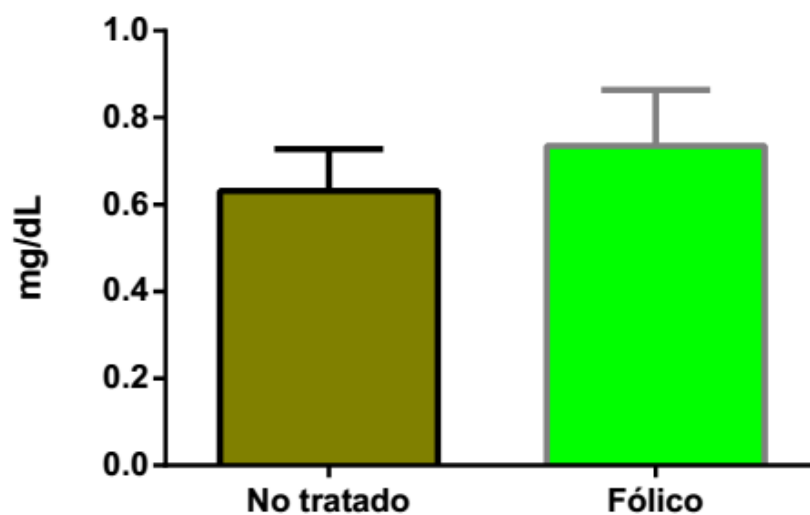


Figura 90. Valores medios de Creatinina en suero y su desviación estándar, para los animales del grupo no tratado y para los animales pre-tratados con Ac Fólico.

Enzimas inespecíficas: FA, GOT, GPT.

Las enzimas estudiadas en este apartado habían presentado elevaciones relevantes como consecuencia de la isquemia.

Fosfatasa Alcalina (FA)

Tal y como se aprecia en la figura 91, el pretratamiento de los animales con ácido fólico ha dado lugar a un descenso significativo en el test t de Student ($p=0,0141$) de las cifras séricas de fosfatasa alcalina respecto a los animales no tratados ($97\pm14,5$ vs $123\pm19,2$ UI/L) (figura 90). Esta reducción (que supone un 20,5%) se produce a pesar de que en los animales no tratados las cifras son completamente normales, a la vista de lo obtenido en animales control sanos ($122\pm5,1$ UI/L).

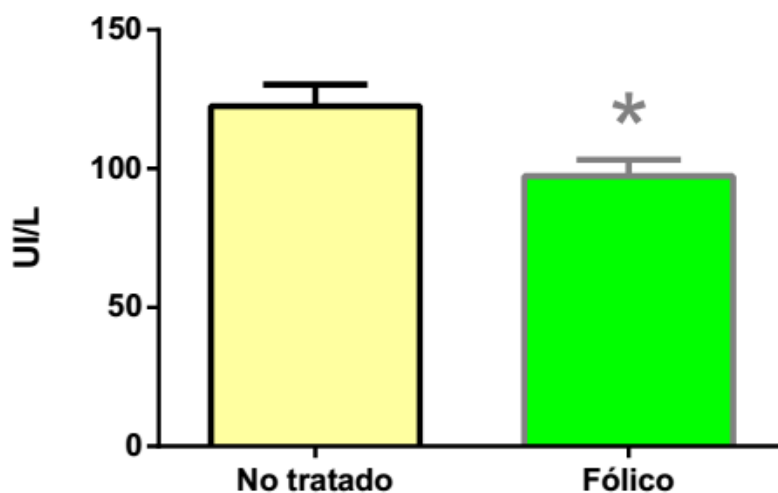


Figura 91. Valores medios de Fosfatasa Alcalina en suero. (*) $p<0,05$.

GOT

El pretratamiento con ácido fólico también ha modificado significativamente los niveles séricos de Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), medidos a las tres horas de restablecer el flujo sanguíneo en la extremidad isquémica ($p=0,0039$). El efecto es clínicamente relevante, ya que supone una reducción del 34,7% (234 ± 28 vs 360 ± 89 UI/L) (figura 92). Con todo, las cifras de GOT siguen estando significativamente elevadas comparándolas con lo registrado en animales control sanos ($51,4\pm2,6$ UI/L).

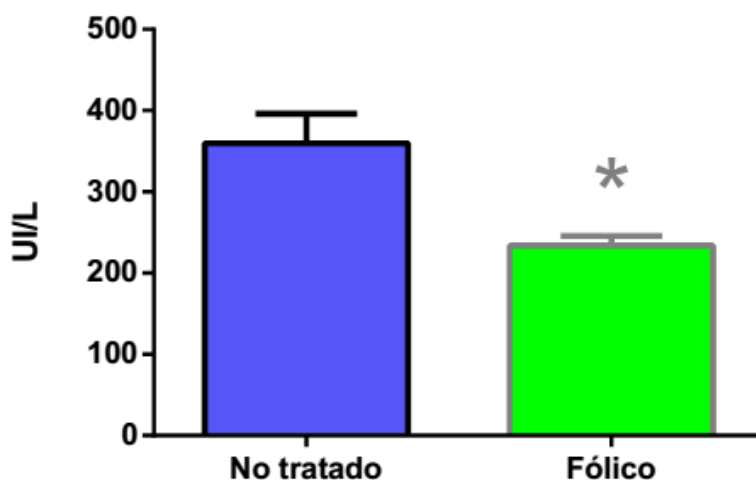


Figura 92. Valores medios de GOT en suero. (*) $p < 0,05$.

GPT

Finalmente, respecto a los niveles de Glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en suero, vemos que los animales pre-tratados con Ac Fólico mostraron una disminución del 30.4% respecto a los animales del grupo no tratado, que resultó ser estadísticamente significativa ($63 \pm 6,1$ vs $90 \pm 13,2$ UI/L; $p = 0,0005$). Esta reducción es clínicamente relevante, ya que supone casi un 30%, pero no alcanzó las cifras normales del animal sano ($41,7 \pm 1,6$ UI/L).

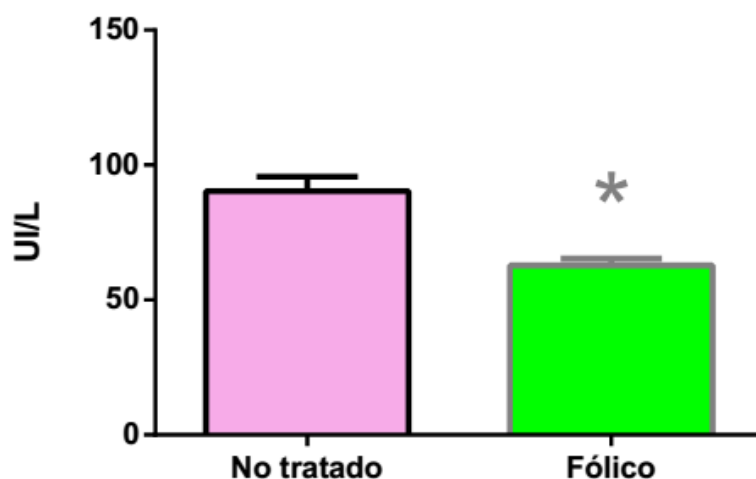


Figura 93. Gráfico representando los valores medios de GPT en suero. (*) $p < 0,001$

Enzimas musculares: CK, LDH.

Creatin Kinasa (CK)

Al llegar al análisis de los enzimas indicadores de daño muscular, podemos observar que las concentraciones de CK en suero en los animales pre-tratados con Ac Fólico mostraron una disminución del 31.7% respecto a los animales no tratados (6456 ± 1662 vs 9459 ± 1467 UI/L) (figura 94). Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,0039$), si bien los valores distan mucho de haberse normalizado ($82,2 \pm 9,4$ UI/L).

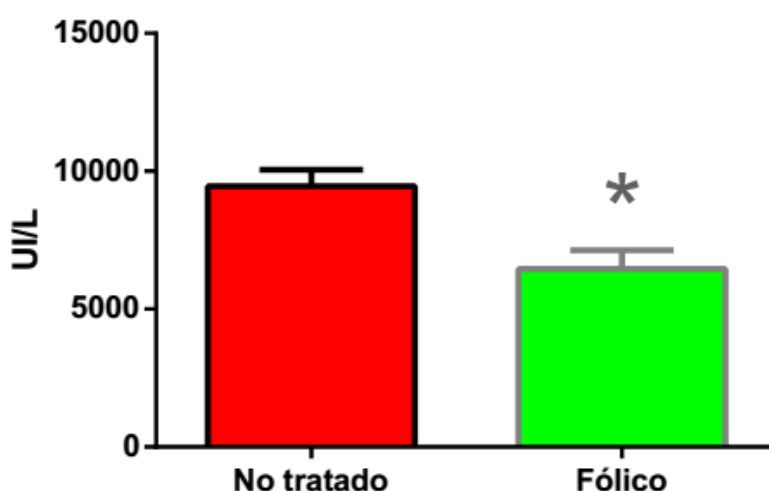


Figura 94. Valores medios de CK en suero. (*) $p < 0,01$.

Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Al analizar los valores de LDH vemos un comportamiento muy similar al de la CK. Se objetiva que los animales pre-tratados con Ac Fólico mostraron un descenso de los niveles medios de LDH del 40.3% (832 ± 204 vs 1395 ± 262 UI/L) (figura 95), respecto a los animales del grupo no tratado, alcanzando significación estadística en el t test ($p=0,001$). De nuevo nos encontramos con un descenso relevante de los niveles séricos del enzima, pero sin que se pueda hablar de una reversión completa del daño, ya que las cifras de los animales sanos se situaron en torno a una media de $44,8 \pm 18,8$ UI/L).

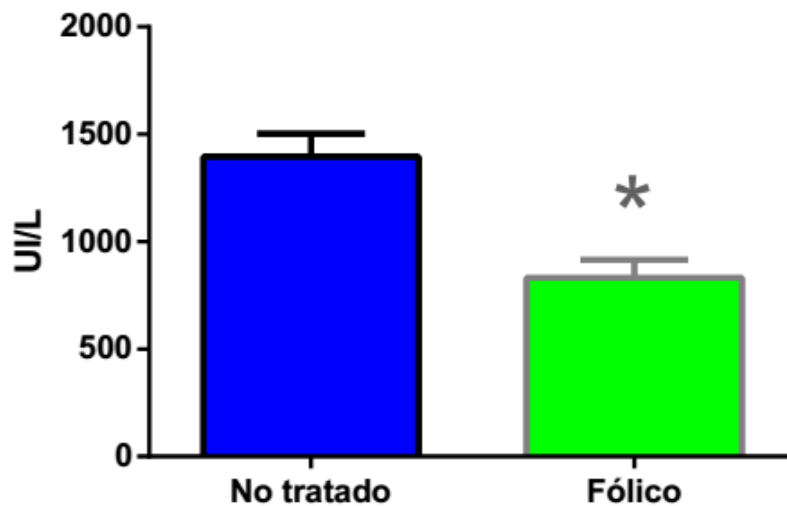


Figura 95. Valores medios de LDH en suero. (*) $p < 0,01$.

Estudios anatomopatológicos

El estudio anatomopatológico incluye parámetros macroscópicos y microscópicos. Entre los primeros se han estudiado el perímetro de la extremidad y el peso de los músculos gastrocnemios, como indicadores indirectos de edema.

Perímetro de la extremidad

Al concluir las primeras 24 horas tras restablecer el flujo sanguíneo de la pata isquémica, se ha registrado el perímetro del muslo de ambas patas en cada animal. Así, se ha podido utilizar el perímetro de la pata izquierda (no sometida a isquemia) como control “emparejado” de la pata sometida a isquemia y reperusión (derecha).

A partir de este dato se ha calculado el área de sección de la extremidad, y se ha establecido el porcentaje de variación respecto a la extremidad no sometida a isquemia, que, como hemos dicho, se ha utilizado como control interno.

Se muestran en tablas los perímetros medidos y el cálculo del radio y área de la sección del miembro, tanto para el grupo no tratado (tabla 30), como para el grupo pretratado con ácido fólico (tabla 31).

Tabla 30. Perímetro, radio y área de la sección del miembro, comparando izquierdo y derecho, en los animales del grupo no tratado.

Animal	Perímetros (mm)		Diámetros (mm)		Área de sección (mm2)		
	Izq	Dcha	Izq	Dcha	Izq	Dcha	Incremento
1	48	54	15,3	17,2	183	232	26,6%
2	56	62	17,8	19,7	250	306	22,6%
3	47	52	15,0	16,6	176	215	22,4%
4	49	58	16,0	18,5	191	268	40,1%
5	55	66	17,5	21,0	241	347	44,0%
6	56	65	17,8	20,7	250	336	34,7%
7	57	61	18,1	19,4	259	296	14,5%
8	50	58	15,9	18,5	199	268	34,6%
Media	52,25	59,5	16,6	18,9	217	283	29,9%

Tabla 31. Perímetro, radio y área de la sección del miembro, comparando izquierdo y derecho, en los animales del grupo tratamiento.

Animal	Perímetros (mm)		Diámetros (mm)		Área de sección (mm2)		
	Izq	Dcha	Izq	Dcha	Izq	Dcha	Incremento
1	52	54	16,6	17,2	215	232	7,8%
2	57	61	18,1	19,4	259	296	14,5%
3	54	60	17,2	16,6	232	286	23, 5%
4	56	64	17,8	18,5	250	326	30,6%
5	57	62	18,1	19,7	259	306	18,3%
6	65	66	20,7	21,0	336	347	3,1%
Media	56,83	61,17	18, 1	19,5	258	299	17,4%

Al comparar los dos grupos, vemos que entre los animales tratados hay un menor incremento del área de sección en el muslo de la extremidad sometida a isquemia, respecto a la sana ($17,37\% \pm 9,23$ vs $29,9\% \pm 10,0$). Véase también la figura 96. La diferencia entre ambos grupos alcanza significación estadística $p=0.0054$.

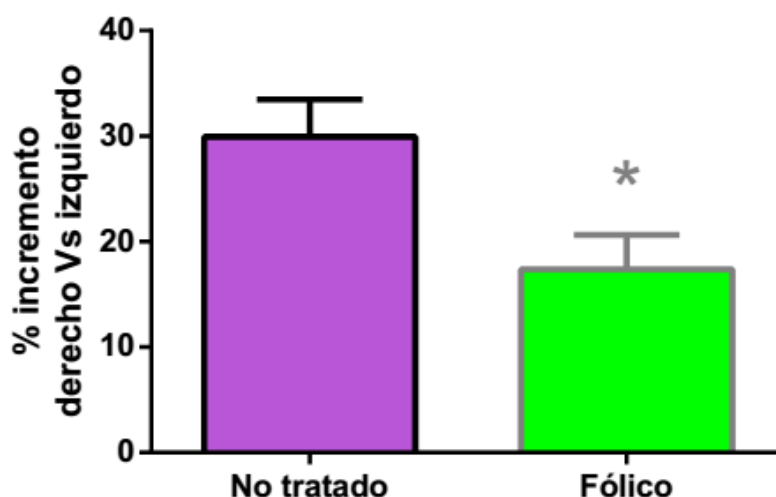


Figura 96. Incremento del área de sección del muslo de la de la extremidad sometida a una isquemia de 3 horas, respecto a la extremidad inferior no sometida a isquemia. (*) $p<0,05$.

Peso de los gastrocnemios

Una segunda valoración macroscópica del daño post-isquemia ha sido la evaluación del incremento relativo del peso de los gastrocnemios. Al igual que con el perímetro, se ha utilizado el miembro no sometido a isquemia con control “emparejado” del miembro lesionado. Como con el parámetro anterior, la medición se ha realizado transcurridas 24 horas desde la restauración del flujo sanguíneo a la extremidad isquémica.

Se indican en las tablas siguientes los valores de peso de los gastrocnemios, tras su extracción, y el incremento relativo del izquierdo respecto al derecho, tanto para el grupo no tratado (tabla 32), como para el grupo pretratado con ácido fólico (tabla 33).

Tabla 32. Peso del músculo gastrocnemio en los animales del grupo no tratado.

Animal	Peso (gr)		Incremento (%)
	Izquierdo	Derecho	
1	1,65	1,73	4,84
2	1,93	2,21	14,51
3	1,64	1,78	8,54
4	1,91	2,06	7,85
5	1,96	2,19	11,73
6	1,90	2,12	11,58
7	1,82	1,98	8,79
8	1,66	1,81	9,04
Media	1,81	1,98	9,46

Tabla 33. Peso del músculo gastrocnemio en los animales del grupo tratado.

Animal	Peso (gr)		Incremento (%)
	Izquierdo	Derecho	
1	1,86	1,91	2,68
2	1,87	1,93	3,21
3	1,59	1,66	4,40
4	1,63	1,87	14,72
5	1,72	2,01	16,86
6	1,88	1,98	5,32
Media	1,75	1,89	7,87

Al realizar la comparación entre los grupos, vemos que entre los animales tratados hay un menor incremento del peso de los gastrocnemios de la extremidad sometida a isquemia, respecto a la sana ($7,87 \pm 6,2$ vs $9,46 \pm 3,3$). Sin embargo, en este caso, la diferencia entre grupos no llega a alcanzar significación estadística ($p > 0,05$), debido a la importante variabilidad de los datos. Se ilustran estos hallazgos de forma gráfica en la figura 97.

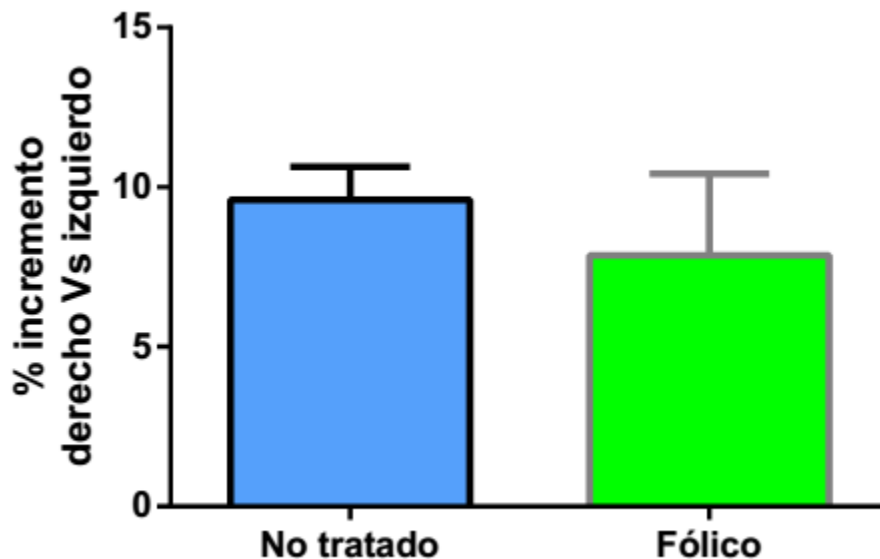


Figura 97. Incremento del peso del músculo gastrocnemio de la de la extremidad sometida a 3 h. de isquemia respecto a la extremidad no sometida a isquemia, entre los animales no tratados y los tratados con ácido fólico.

Estudio microscópico

El estudio de las secciones histológicas, teñidas con hematoxilina-eosina, nos ha permitido valorar la cantidad de fibras musculares dañadas o necrosadas, así como la intensidad de la infiltración de neutrófilos.

Evaluación de la cantidad de fibras musculares dañadas o necrosadas

Como se ha señalado en material y métodos, las piezas histológicas, correspondientes al músculo gastrocnemio de la extremidad inferior sometida a isquemia, han sido analizadas

en múltiples campos de microscopía óptica a 66 aumentos, y el daño se ha cuantificado en función del número de fibras musculares dañadas respecto al total de fibras de cada campo.

Vemos que tras 3 horas de isquemia y 24 horas de perfusión, un $65,5 \pm 14,1\%$ de las fibras del músculo gastrocnemio presenta algún daño entre los animales no sometidos a ningún tratamiento, y que el pre-tratamiento con ácido fólico disminuye esta cifra hasta el $52,1 \pm 20,6\%$. Esta diferencia, además, resulta ser estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0,001$ al aplicar el test t de student (tabla 34 y figura 98).

Tabla 34. Media de fibras dañadas e indemnes en los animales no tratados y en los tratados con ácido fólico, en gastrocnemios de la extremidad inferior derecha.

	Fibras dañadas	Fibras indemnes	% de fibras dañadas
Sin tratamiento	28,8	15,3	65,5%
Ac fólico	18,1	19,9	52,1%

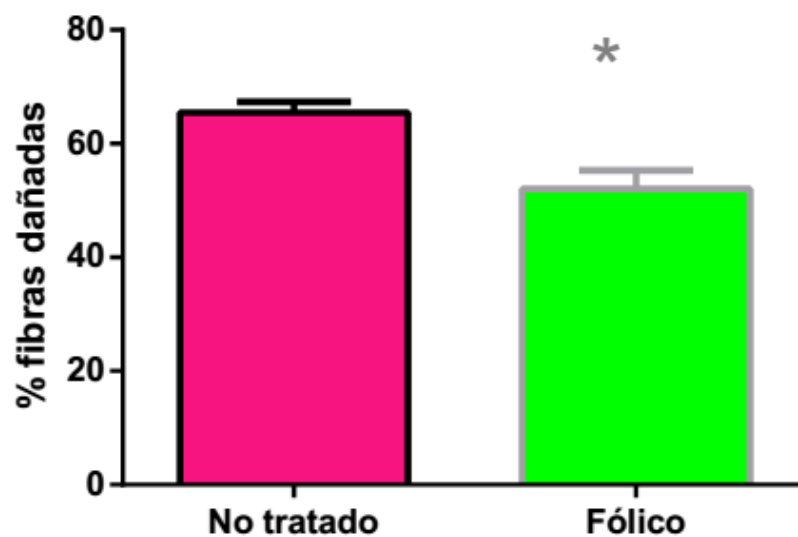


Figura 98. Porcentaje de fibras musculares que presentan algún daño, en músculo gastrocnemio, tras 3 horas de isquemia y 24 hroas de perfusión. (*) $p < 0,001$.

Evaluación de la infiltración por neutrófilos

En este caso, se cuantifica la infiltración por polimorfonucleares neutrófilos mediante el conteo de los mismos en cada campo de microscopía electrónica a 66 aumentos, en músculo gastrocnemio de la extremidad inferior derecha.

Tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión, la media de PMNs por campo asciende a $55,2 \pm 20,4$ en los animales que no recibieron ningún tratamiento, y esta cifra disminuye a $41,7 \pm 15,4$ en los animales pre-tratados con ácido folínico. El análisis de esta diferencia mediante t de student muestra una significación estadística de la misma, con $p < 0,001$. Si trasladamos estos valores a densidad por mm^2 , tendríamos unos valores de $4,52 \times 10^4$ células/ mm^2 en los animales no tratados, y $3,42 \times 10^4$ células/ mm^2 en los animales tratados con ácido folínico.

Estos datos de muestran en la figura 99.

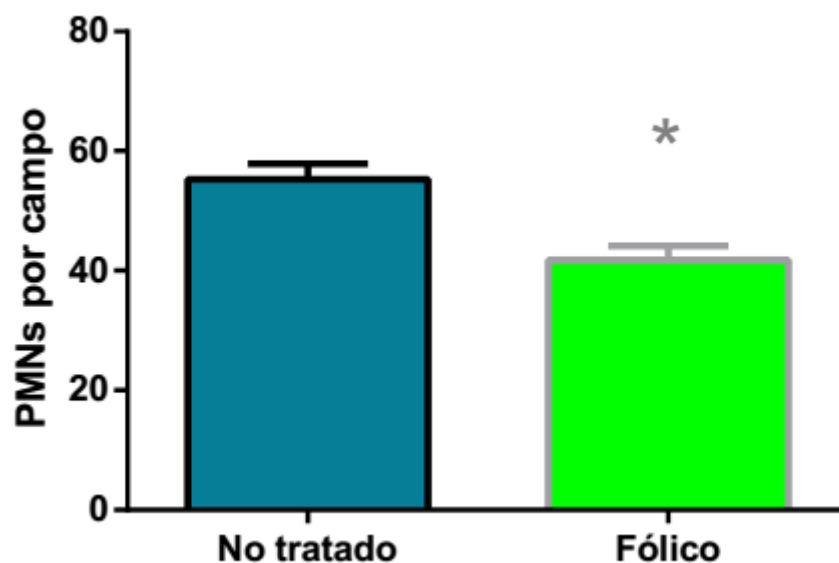


Figura 99. PMNs por campo a 66 aumentos, en músculo gastrocnemio, tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperusión. (*) $p < 0,001$.

Discusión

Comentarios sobre la idoneidad del modelo experimental

En este apartado hacemos un repaso de las razones que nos han llevado a definir el modelo experimental utilizado en la tesis, con atención también a lo publicado en otros trabajos similares.

Idoneidad de emplear un modelo animal

Hemos ido señalando cómo el daño por el síndrome de isquemia-reperfusión de extremidades en isquemias como las realizadas habitualmente en Cirugía Ortopédica y Traumatología está cobrando un interés creciente. Ello es debido a la percepción de que existen diferencias entre pacientes sometidos a una cirugía dada, al emplear o no un manguito neumático^{31, 33, 77, 79, 81, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214}.

Por este motivo, se han propuesto diversos tratamientos experimentales, que han sido ensayados en modelos animales^{235, 236, 237, 242, 245, 246, 265, 270, 273, 274, 277, 279, 280, 281, 283, 285, 286, 278, 287, 288, 310, 314, 315, 316}. Y a pesar de que en la bibliografía se han propuesto diferentes modelos experimentales^{59, 65, 67, 69, 75, 70, 75, 235, 246, 315, 350, 351, 352, 353, 354, 356, 361, 357} lo cierto es que no hay un modelo estándar, ni hay uniformidad en cuanto a variables fundamentales como son el método de inducción y mantenimiento de la isquemia, las variables a considerar o el momento en que deben ser estudiadas, entre otras. Esto dificulta enormemente valorar la validez y eficacia de dichos tratamientos.

Es probable que las anteriores sean algunas de las razones para explicar la relativamente escasa riqueza de tratamientos experimentales ensayados en la práctica clínica^{248, 249, 250, 257, 259, 260, 268, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 311, 360, 362}. En casi todos los casos, se ha tratado de comparar el efecto de los distintos fármacos que pueden ser empleados durante la inducción y mantenimiento de una anestesia o, como mucho, el efecto de sustancias sin toxicidad o con mínima toxicidad descrita, como el ácido ascórbico o la N-acetil-cisteína. Además, en estos casos la evaluación de los tratamientos se ha llevado a cabo casi siempre

en el postoperatorio inmediato, recurriendo a variables también medibles de forma inmediata tras el fin de la isquemia.

Lo anterior nos lleva a concluir que, probablemente, lo más lógico sería desarrollar con claridad un modelo experimental bien definido, sobre el que puedan ensayarse eventuales tratamientos experimentales. Tenemos el inconveniente de que si deseamos estudiar sólo el efecto de la isquemia, no podemos aprovechar la experiencia obtenida de los pacientes que se someten a la isquemia para una cirugía, porque esta última dificultaría enormemente que pudiésemos asegurar qué parte del daño total corresponde sólo a la primera. Y desde luego, no es planteable someter a multitud de individuos a un procedimiento cruento, como es la isquemia, sólo para caracterizarla. Además, la caracterización completa del daño con datos bioquímicos y anatomopatológicos hace necesario llevar a cabo exámenes invasivos, cuando no directamente mutilantes. Por todo ello, la prudencia y el sentido común hacen que nos dirijamos hacia un modelo animal, donde podamos diseñar a voluntad la duración de la isquemia, o los estudios que llevemos a cabo para cuantificar el daño que se derive de la misma, y sobre el que en un momento dado podamos plantearnos tratamientos experimentales.

Idoneidad de la rata como modelo experimental

De entre todos los animales empleados en experimentación, hemos optado en este trabajo por la rata. Las razones para ello han sido varias, y las vamos a exponer a continuación.

La primera y más importante razón es la similitud entre la rata y el ser humano. Como hemos descrito anteriormente, la anatomía de la musculatura de la extremidad inferior de la rata es perfectamente equiparable a la del hombre, con los mismos grupos musculares³⁸⁰. La tolerancia del tejido muscular ante la isquemia es también equivalente, teniendo en cuenta lo descrito en múltiples estudios clínicos y experimentales; y las alteraciones bioquímicas y anatomopatológicas son igualmente similares, siempre teniendo en cuenta lo descrito en estudios clínicos en el ser humano y estudios experimentales en la rata^{50, 57, 58}.

59, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73. Otro parámetro relevante para esta tesis, como es la tensión arterial, está también en un rango equivalente al del ser humano^{377, 378}.

En la elección de la rata como animal de experimentación también han sido determinantes las facilidades logísticas que ofrece. Su rápido ritmo de reproducción y crecimiento hacen que tengan una amplia disponibilidad, y su pequeño tamaño facilita su transporte y manipulación y disminuye la cantidad de los fármacos necesarios para su anestesia.

Finalmente, la rata representa el animal más ampliamente utilizado a nivel experimental, en términos generales. En el caso concreto de la isquemia-reperfusión de extremidades, el repaso de la bibliografía nos muestra de igual manera a la rata como animal de experimentación preferido^{21, 27, 58, 67, 68, 265, 270, 271, 272, 273, 277, 278, 280, 281, 283, 285, 286, 287, 288, 314, 352, 354, 355, 356, 357}. Finalmente, la experiencia personal y del Laboratorio de Cirugía Experimental de la UPV-EHU en la que se ha desarrollado el trabajo, es mucho mayor con la rata que con cualquier otro animal. De hecho, como se ha señalado antes, las experiencias previas de tratamiento experimental con ácido fólico en isquemia-reperfusión en territorio mesentérico fueron llevadas a cabo en la rata^{336, 337, 338}.

Quizás uno de los mayores inconvenientes de la rata para esta tesis es, paradójicamente, su pequeño tamaño. Aunque hemos destacado cómo el reducido volumen y peso facilitan su manejo en general, este mismo volumen reducido hace que no puedan ser empleados en las extremidades el dispositivo habitualmente utilizado en el ser humano para el mantenimiento de la isquemia, el manguito neumático. La elección de la rata conlleva, pues, la necesidad de adecuar el sistema de implantación y mantenimiento de la isquemia a sus dimensiones.

Idoneidad de emplear la extremidad inferior

Una vez elegida la rata como modelo animal, restaba decidir en cuál de las extremidades se llevaría a cabo la experiencia de isquemia reperfusión. En este caso, la bibliografía es muy orientativa, pues todos los trabajos en los que se lleva a cabo una isquemia en la rata

emplean la extremidad inferior^{21, 27, 58, 67, 68, 265, 270, 271, 272, 273, 277, 278, 280, 281, 283, 285, 286, 287, 288, 314, 352, 354, 355, 356, 357}.

La razón principal que puede argumentarse en favor del uso de extremidades inferiores probablemente radica en su mayor tamaño y musculación respecto a las extremidades superiores. El mayor tamaño, por una parte, facilita la aplicación de dispositivos de isquemia y la disección y la toma de muestras de anatomía patológica. Y la mayor musculación resulta interesante desde el momento en que deseamos evaluar el daño en el tejido más sensible a la isquemia y cuya lesión tiene mayores implicaciones patológicas, el muscular.

Idoneidad del dispositivo de inducción y mantenimiento de la isquemia

Hemos visto al principio de este trabajo cómo a lo largo de la historia se han ido depurando los sistemas para instaurar la isquemia, hasta el desarrollo del maguito neumático, que constituye el *gold standard* en la práctica clínica^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 20, 21}.

Sin embargo, el manguito neumático parece sólo planteable en animales de un cierto tamaño, en los que pueda plantearse la adecuación de modelos pediátricos. Así, hemos revisado trabajos en los que se aplicaba un manguito de presión a monos, perros, gatos o conejos^{57, 59, 66, 70, 71, 72, 73, 75, 350}. En la introducción hemos hecho mención a algunos trabajos en los que se indica el uso de manguitos en la rata^{67, 277, 352}. Llama la atención cómo casi todos los estudios que emplean el manguito en la rata son relativamente antiguos, de finales de los años 80, y cómo la mayoría de trabajos actuales se decantan por sistemas de anillos o tubos elásticos^{316, 354, 355, 356}.

Con todo, nuestra primera intención fue implementar un sistema de manguito de isquemia para la rata, basándonos en el *gold standard* clínico. No obstante, hemos mencionado también cómo nuestros intentos por encontrar un manguito de isquemia adaptable a la rata a partir de modelos pediátricos estrechos fracasaron, pues incluso los modelos más

pequeños resultaban excesivamente voluminosos. Tampoco nos resultó posible construir para la experiencia un manguito suficientemente estrecho, a partir de cámaras de aire.

Si tomamos la referencia, a la que hemos hecho mención, de que el manguito de isquemia debiera tener una anchura igual o levemente superior al radio de la sección de la extremidad sobre la que se aplica^{53, 54}, tenemos que para un hombre adulto, con un perímetro en el muslo de 56 cm, el radio sería de 9 cm, y el manguito habría de ser de esa anchura o levemente superior. Trasladando esto a la rata, comprobamos cómo en nuestra experiencia la escala respecto al ser humano ha resultado ser prácticamente de 1:10, con una media de perímetro en las patas no sometidas a isquemia de 56,83 mm. Este perímetro nos da de nuevo un radio cercano a los 9 mm, que sería la anchura a partir de la cual diseñar el manguito. Incluso, puede decirse que este cálculo está realizado al alza, ya que el perímetro de los animales se mide en el periodo de reperfusión tras una isquemia, y ya hemos señalado cómo esto da lugar a una hiperemia y aumento del edema no sólo en la pata sometida a la isquemia, sino también en menor medida en la contralateral.

Algunos de los investigadores que han empleado el manguito de isquemia en ratas hablan de una anchura de 15 mm⁶⁷, que sería un 67% superior a ese radio calculado al alza. Aunque no disponemos de fotos en los que veamos el dispositivo, sí disponemos de un dibujo (figura 23), en el que quizás cabría decir que el manguito resulta, en línea con lo mencionado, excesivamente ancho para la extremidad de la rata.

Por ello, nos planteamos otra serie de sistemas para conseguir una isquemia, de entrada siempre partiendo de la experiencia clínica.

La aplicación de una goma elástica tipo tortor a modo de banda de Esmarch es un sistema rápido, sencillo y barato de llevar a cabo la isquemia. Sin embargo, presenta un gran inconveniente, que es el no control de la presión que se ejerce. Hemos visto cómo en la práctica clínica el uso de la banda de Esmarch, que llegó a ser el estándar durante décadas, se ha asociado a un mayor riesgo de complicaciones^{216, 217, 218}, y cómo su uso se ha ido restringiendo de manera que en la actualidad es prácticamente residual^{11, 21, 27, 28 114}. En el caso concreto de la rata, además, se añade el hecho de que la forma troncocónica de la pata

y la existencia del pelaje lleva a la movilización del tortor y pérdida de la isquemia con gran facilidad. Por estas razones, se ha desechado este sistema para la realización de la tesis.

El sistema de un anillo de compresión, por el contrario, está hasta cierto punto en alza en la práctica clínica. Los dispositivos con un anillo de silicona asociado a una venda tubular se han empleado en extremidad inferior y sobre todo extremidad superior, con buenos resultados según algunas series cortas^{46, 47, 48}. Las principales razones que pueden explicar esta popularidad serían quizás la comodidad y rapidez del sistema, sobre todo para cirugías rápidas en extremidades superiores. También hay que reconocer que la posibilidad de instaurar la isquemia a nivel más proximal de lo que permiten los manguitos neumáticos puede ser de una utilidad indiscutible en algunos casos concretos⁴⁷. Como no disponemos de series largas de casos, no tenemos evidencia para asegurar que el manguito neumático es más seguro y menos dañino que estos sistemas de anillo, pero el conocimiento que tenemos de la fisiopatología del daño por el uso de dispositivos de isquemia invita a pensar en ese sentido, por dos razones principales. En primer lugar, hemos visto como la experiencia experimental orienta a que los manguitos estrechos serían más dañinos para los tejidos subyacentes^{12, 51, 52}. Y en segundo lugar y más importante, tenemos evidencia clara de que las sobrepresiones resultan claramente nocivas sin aportar ninguna ventaja^{21, 27, 57, 58, 59}. De hecho, las mejoras llevadas a cabo en el diseño y aplicación de manguitos están orientadas a minimizar la presión hasta acercarnos al punto de Presión Mínima de Oclusión^{51, 52, 56, 60, 61, 62}. Y con los anillos de isquemia, aunque tengamos guías orientativas para escoger entre distintos tamaños en función de la tensión arterial o el perímetro de la extremidad^{47, 48}, no hay posibilidad de saber con seguridad qué presión estamos ejerciendo, ni mucho menos nos permite variar la misma durante la cirugía, ante eventuales cambios de la tensión arterial. De ahí que al igual que producen sobrepresiones, en otros momentos estos dispositivos pueden resultar insuficientes y ser incompetentes para mantener la isquemia, como se ha comunicado que ha ocurrido en varias ocasiones en la práctica clínica⁴⁸. Por estas razones, es difícil no percibir el uso de los sistemas de anillo-venda tubular como un cierto retroceso a sistemas más primitivos del tipo de la banda de Esmarch.

En experimentación animal, el sistema de anillos, tubos o gomas elásticos parece el más popular y más frecuentemente utilizado en los últimos tiempos, al menos en modelos murinos^{316, 354, 355, 356}. Es probable que esto se deba a que son sistemas rápidos, baratos, y que emplean en muchos casos materiales fácilmente disponibles en un medio asistencial, como las gomas de los *brackets* dentales, las ligaduras de hemorroides, o el aplicador de estas últimas³⁵⁴. En nuestra experiencia, el uso de anillos elásticos como los empleados en juntas tóricas en grifería ofrecen el mismo servicio, o quizás incluso mejor, en el sentido de que se trata de gomas más gruesas, que distribuirían la presión sobre más superficie de tejido, y se aproximarían algo más a la anchura deseada equivalente al radio de la sección de la extremidad. Sin embargo, ya hemos comentado que percibimos dos problemas muy relevantes con este sistema. El primero, que de nuevo representa un sistema en el que no somos capaces de saber ni controlar la presión que estamos realizando, con un riesgo muy alto de someter al miembro a sobrepresiones innecesarias. Y el segundo, que la morfología troncocónica de la extremidad inferior de la rata y probablemente también el pelaje hacen que este tipo de dispositivo sea poco estable, y tienda a deslizarse en sentido distal, perdiéndose la estandarización del procedimiento en los distintos animales, e incluso perdiéndose la isquemia en muchas ocasiones. Estas razones nos llevaron a desechar este sistema pese a que, como hemos dicho, es uno de los más populares en la actualidad en el estudio del daño por isquemia-reperfusion en la extremidad inferior de modelos murinos.

También hemos visto ampliamente descritos en la literatura métodos invasivos, en los que se practica una disección del animal y se bloquea el flujo de una arteria con un clamp vascular^{265, 270, 271, 273, 274, 279, 281, 283, 285, 286}. Para una isquemia absoluta de la extremidad, se ha propuesto una ligadura de aorta infrarrenal o iliaca primitiva²⁷¹, dado que el clampaje de la arteria femoral común no es suficiente para bloquear todo el riego de la extremidad inferior. En otros casos, sobre todo en experimentación más dirigida a colgajos en Cirugía Plástica, se ha llevado a cabo el clampaje del pedículo vascular de un músculo^{265, 273, 274, 279, 281, 283, 285, 286}. En el desarrollo de esta tesis hemos hecho la prueba de colocar un clip vascular en la arteria femoral común comprobando cómo efectivamente la circulación contralateral, objetivada clínicamente y mediante láser doppler, impide disponer de un escenario de isquemia completa como la que se consigue en la práctica clínica con el

manguito de presión. En cualquiera de los casos, el carácter agresivo de este sistema lo aleja, a mi entender, del modelo clínico que se pretende emular, de forma que fue descartado para la realización del trabajo.

En un intento de conseguir un sistema válido y siguiendo las sugerencias de un ingeniero, se llevó a cabo el desarrollo de la pistola con aplicador circular para expulsar aire a altas presiones sobre la raíz del miembro del animal. Además de que el sistema resultó no ser efectivo, no cabe duda de que requería un voluminoso aparataje, y sobre todo, que suponía utilizar un sistema que nunca ha sido empleado en la práctica clínica ni experimental, hasta donde ha llegado mi búsqueda. De manera que fue una línea de trabajo rápidamente desechada.

En realidad, para el desarrollo del sistema empleado en esta tesis, que hemos denominado sistema de cable a tensión, nuestra inspiración ha sido el dispositivo de Torniquete de Tensión Controlada (TTC) propuesto por Bonheur y cols en 2004³⁵⁷. En ese trabajo, estos autores se encuentran con las dificultades que hemos ido ennumerando para disponer de un sistema de inducción de isquemia en un modelo murino –en su caso el ratón–, que fuera no invasivo, eficaz, controlable en el sentido de no realizar sobrepresiones y con una presión (tensión) estable, y finalmente reproducible con las mismas propiedades en distintos animales. Aunque no disponemos de una fotografía del TTC, los autores lo describen como un dispositivo consistente en una goma elástica, conectada a un hilo de seda que conectaría la goma con un cabestrante que va ejerciendo tensión con una manivela, tensión que quedaría registrada en un sistema digital. Por otra parte, los autores refieren que en el ratón es suficiente una tensión de 0,2kg.

En nuestro caso, intentamos desarrollar un sistema similar al TTC pero introduciendo lo que entendimos como mejoras. Por una parte, hicimos una búsqueda de distintos materiales y grosores para dar con las mejores características para el cable que transmitiría la tensión y la convertiría en presión sobre la pata. Finalmente, las propiedades del cable empleado, con mínima extensibilidad en sentido longitudinal pero cierto aplanamiento al comprimirse sobre la extremidad, nos parecieron ideales para transmitir adecuadamente la fuerza de tensión ejercida por el émbolo y la distribución homogénea sobre la masa estangulada,

respectivamente. Hemos hecho mención a que el perímetro de los animales empleados estaría cerca de los 60 mm, y que por tanto el radio y la anchura ideal del dispositivo de isquemia rondaría los 9 mm. En el caso del cable a tensión, tras su aplanamiento una vez aplicado, hemos visto que ejerce una presión efectiva sobre una superficie cercana a los 10mm, lo que nos parece una anchura muy conveniente. Otras mejoras muy interesantes, desde nuestro punto de vista, se refieren a la estabilización del cable en el mismo punto de la extremidad durante todo el periodo de isquemia, y en todos los animales. La mesa basculante, el aplicador del cable, la tracción al cénit y la palanca de estabilización del cable colaboran a que la experiencia se reproduzca siempre de la misma manera.

Podría llamar la atención la mayor tensión que hemos requerido en nuestro modelo, de 1 kg, respecto a los 0,2 kg de los que hablan los desarrolladores del TTC³⁵⁷. Creo que hay varias razones que lo explican. La principal, probablemente, radica en la diferencia de tamaños entre la rata y el ratón, que se traduce en una necesidad de tensión muy menor para conseguir la misma presión efectiva, en el caso del ratón. Si aplicamos el razonamiento matemático antes presentado para convertir tensión en presión, y si asumiésemos que el ratón tuviese un diámetro de muslo de la mitad que la rata –esto es, de 1cm- y deseásemos alcanzar 300mmHg, tenemos que:

$$F_t = ((1/1,358) \times P_c \times D) / 2 = (P_c \times D) / 2,716$$

$$F_t = 300 \times 1 / 2,716 = 110,45$$

Con aplicación del coeficiente corrector antes aplicado, de 2,26, resulta que:

$$F_t \text{ real} = 110,45 \times 2,26 = 250\text{g} \text{ ó } 0.25\text{kg}$$

Resultado que parece bastante congruente con lo expuesto en el artículo de Bonheur.

Además, podrían influir en la diferencia de tensiones entre los modelos la dispersión de la fuerza tractora por la deformación de la goma empleada en aquel trabajo, un diferente grosor del cable estrangulador (probablemente menor en proporción), o un diferente lugar de aplicación en la extremidad, entre multitud de otros factores. Con todo, consideramos que ambos sistemas son bastante equivalentes, y representan el mejor sustitutivo del

manguito de isquemia en animales pequeños, en tanto que sistema no invasivo, fiable, reproducible, y capaz de ofrecer un control muy fiable de la tensión –y por tanto, presión– que está ejerciendo.

Idoneidad de los parámetros de valoración del daño

Realizaremos ahora un breve repaso de las variables medidas en esta tesis, y la relación con otros estudios publicados, explicando en cada caso por qué se toman unas y se desechan otras, así como el esquema temporal y la metodología empleada en su medición.

Evaluación de la microvascularización

En la literatura hemos visto varios estudios donde se evalúa la microvascularización como parámetro de daño por isquemia-reperfusión^{354, 357} y para evaluar tratamientos experimentales²⁴⁵. En dichos trabajos, se emplean aparatos de última generación, que no precisan sondas, y que dan una imagen doppler con cuantificación de flujo en el conjunto de una o ambas extremidades inferiores (laser Doppler imager de Moor Instruments, Wilmington, DE) (figuras 24 y 26).

Esta exploración, aún siendo potencialmente de interés, está sin embargo condicionada por el dispositivo con el que la medición se lleva a cabo. Para la realización de esta tesis hemos empleado un aparato clásico, con registro a través de sonda. Además, este aparato muestra tendencia a alteraciones en la medición con mínimos defectos en la técnica, aumentando mucho la posibilidad de medidas erróneas si la manipulación no es perfecta e igual en todos los animales.

Teniendo en cuenta esta limitación, no nos ha parecido indicado introducir la medición con láser doppler en un sentido cuantitativo, sino que hemos limitado el uso del mismo a un aspecto cualitativo de monitorizar que las isquemias que realizábamos fuesen completas, sin ninguna actividad doppler. Y hemos descartado el uso del dispositivo durante el periodo de perfusión, centrándonos en otros marcadores a la hora de evaluar el daño.

Indicadores inmediatos de daño celular

Englobamos en este grupo al conjunto heterogéneo de sustancias que denotan un estrés oxidativo y/o sufrimiento celular, y que se caracterizan por ser medidas en el periodo de reperusión inmediata. Hemos señalado que los más habitualmente medidos son la albúmina modificada por la isquemia (IMA), los isoprostanos-iosfuranos y el malondialdehído (MDA)^{250, 297, 298, 299, 301, 302, 304}.

En general, las anteriores pueden tener un papel complementario en la cuantificación del daño por isquemia-reperusión, pero al remontarse al inicio inmediato del proceso, nada más comenzar la reperusión, implican probablemente una mayor dificultad para traducir sus alteraciones en cambios patológicos tangibles.

Resulta significativo que estos parámetros se han evaluado ampliamente en estudios clínicos, en los que se pretendía evaluar el papel de distintos fármacos –sobre todo anestésicos–, en el contexto de cirugías programadas de extremidades, y que no están tan difundidas entre las variables habitualmente consideradas en los modelos animales experimentales de isquemia-reperusión de miembros inferiores. Estos trabajos clínicos, además, están casi siempre publicados en revistas del ámbito de la Anestesiología y/o realizados por Anestesiólogos^{248, 249, 250, 257, 297, 298, 299, 300, 302, 304}.

Por ello, parece razonable pensar que el hecho de que se haya evaluado el daño utilizando variables tan inmediatas puede estar favorecido por que hayan sido Anestesiólogos quienes han realizado la mayoría de estos ensayos experimentales. Tal circunstancia se explicaría porque el paciente está bajo supervisión directa del Anestesiólogo sólo en las primeras horas del postoperatorio, pasando posteriormente a planta de hospitalización, a cargo de otro servicio, habitualmente el de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Ello dificultaría a los autores del trabajo estudiar variables más tangibles del daño, como el aumento de enzimas musculares, cambios anatomopatológicos, y menos aún variables funcionales como el edema, balance articular, o dolor residual.

Así que teniendo en cuenta que las señaladas son variables cuya medición es bastante costosa, que su alteración tiene una más difícil traducción clínica, y que su uso preferente

en estudios clínicos puede estar muy favorecida por criterios logísticos, no han sido incluidas para la realización de esta tesis.

Enzimas musculares

Hemos considerado Creatin Kinasa y Lactato Deshidrogenasa como las enzimas más específicas del tejido muscular.

La CK constituye, en la práctica clínica, el principal marcador de sufrimiento muscular y, de hecho, el diagnóstico de rabdomiolisis se lleva a cabo básicamente en función de sus valores en sangre^{64, 98, 141, 371}. Su uso se extiende a cualquier condición en la que haya un daño sobre tejido muscular: contusiones, síndrome de aplastamiento, isquemia aguda, miopatías congénitas o adquiridas, miolisis como efecto adverso de determinados hipolipemiantes etc. La LDH se considera asimismo un indicador de rabdomiolisis, aunque menos específico¹⁴¹.

En experimentación, la CK se incluye como una de las variables más importantes entre las herramientas de valoración del daño muscular en los estudios clásicos de los años 70 y 80 de caracterización y cuantificación del daño derivado de la isquemia-reperfusión en periodos similares a los empleados en la práctica clínica^{65,70}.

Posteriormente, llama la atención que al pasar de dicha caracterización del daño a comenzar a plantear tratamientos experimentales, empiezan a emplearse otros indicadores, como la microvascularización o los que hemos denominado marcadores inmediatos de daño celular, y que hemos analizado un poco más arriba. Y al volver de nuevo a la clínica, en general no se retoma la medición de CK (y LDH) como indicador del daño muscular. Sólo hay un artículo que lo hace, midiendo el efecto de la dexmedetomidina tras cirugías bajo isquemia de la extremidad superior, pero con unos resultados que no son muy valorables en tanto que sólo mide CK y LDH hasta los 15 minutos de reperfusión³⁰¹, cuando resulta que, como hemos repasado antes, en el ser humano el pico de dichas enzimas se alcanza a partir de las 24 horas.

En dos trabajos experimentales recientes, sin embargo, se proponen sendos modelos experimentales, que han servido de inspiración para diseñar esta tesis, en los que se lleva a

cabo una cuantificación bioquímica del daño por isquemia-reperfusión en extremidades inferiores en rata y ratón^{355, 361}. En estos estudios, CK y LDH son las principales enzimas analizadas como indicadores de la rabdomiolisis. En uno de ellos³⁵⁵, además, se establece el patrón temporal de aumento de dichas enzimas, lo que analizaremos enseguida.

Mioglobina

Ya hemos hecho referencia a la importancia de la Mioglobina (Mb) en la patogénesis del daño renal tras una rabdomiolisis. Cuando esta rabdomiolisis es una cierta consideración, como ocurre en un *crush syndrome*, la determinación de la Mb llega a tener valor pronóstico en lo que se refiere a deterioro de la función renal y sus ulteriores consecuencias^{64, 98, 141, 371}.

En investigación, la Mb es analizada en el estudio ya varias veces mencionado³⁵⁵, que modeliza en el ratón el daño por rabdomiolisis masiva en el contexto precisamente de un *crush syndrome*.

Aunque por tanto la Mb tiene más interés de cara a las consecuencias de la miolisis sobre el riñón y que, si nos ceñimos estrictamente a la valoración del daño muscular, la CK tiene un mayor valor, no deja de ser un parámetro de innegable interés.

Sin embargo, la determinación de la Mioglobina de la rata presenta importantes escollos. El primero consiste en que, a diferencia de lo que ocurre con las enzimas, su concentración no puede ser determinada por espectrofotometría, sino que ha de recurrirse a técnicas de inmunoensayo, con utilización de anticuerpos. El segundo problema, entonces, aparece por las pequeñas diferencias que presenta la Mb de la rata respecto a la Mb humana, y que condicionan que el Kit ELISA de determinación de Mb empleado en la práctica clínica, no sea válido en la rata.

Este problema técnico ha condicionado que no incluyamos la Mb entre las variables a determinar. Sin embargo, creemos que su exclusión no supone un defecto relevante en el estudio, ya que su inclusión apenas añadiría nada a la información sobre el daño muscular que ya proporcionan CK y LDH. Por otra parte, al presentarse el pico máximo de la Mb en un momento anterior al de la CK y LDH, hubiera obligado a multiplicar las

determinaciones (y número de animales) en más puntos de la reperusión. Y por último, su interés principal, alertar sobre el riesgo de que se produzca afectación renal, no parece ser tan interesante en este trabajo, puesto que los animales se exponen a tiempos de isquemia en los que en teoría la repercusión sistémica es mínima. De hecho, los marcadores de sufrimiento renal Urea y Creatinina no aumentaron en ningún momento de forma clínicamente relevante, tal y como se detalla en el apartado de resultados.

Otros parámetros analíticos

Agrupamos aquí el resto de parámetros analizados en los exámenes analíticos: iones, enzimas ubicuas y marcadores de la función renal.

En cuanto a los iones, se registran sodio, potasio y cloro. No esperábamos encontrar alteraciones muy llamativas, dado el tiempo aplicado de isquemia, pero sí contemplábamos descubrir una leve hiperpotasemia, como se aprecia en otros estudios similares en la rata^{355, 361}. En cualquiera de los casos, el estudio de estos iones se lleva a cabo de forma sistemática en cualquier analítica, y nos parecía oportuno incluíros en nuestro trabajo.

No hemos introducido, por el contrario, los indicadores de equilibrio ácido base, como niveles de Lactato, pH, o anión GAP. Aunque su estudio parece muy razonable en modelos de isquemia muy prolongada y/o con grandes compresiones³⁵⁵, para isquemias de duración y a presión similares a las empleadas en la cirugía de extremidades es la propia experiencia clínica la que nos sugiere que no hay alteraciones relevantes en el equilibrio ácido-base, y que las pequeñas variaciones que pueden encontrarse son autolimitadas y no tienen ninguna trascendencia patológica^{82, 226, 227, 228, 229}. Los estudios experimentales reproducen dicha normalización rápida espontánea, también incluso tras 3 horas^{69,70} y 4 horas de isquemia⁶⁶.

Bajo el nombre de enzimas ubicuas agrupamos todas las enzimas no específicas del tejido muscular. Entre ellas, hemos decidido incluir en el estudio las transaminasas GOT y GPT, presentes en las baterías habitualmente utilizadas en la práctica clínica. Mientras la GOT puede llamarse con más propiedad ubicua, la GPT es bastante específica del tejido hepático. Ambas enzimas son contempladas en un modelo experimental de isquemia de 3

horas de miembro inferior en la rata³⁶¹. Además, hemos decidido incluir la fosfatasa alcalina (FA), que siendo ubicua, es particularmente alta en tejido óseo. A pesar de que no hemos visto estudios de isquemia-reperfusión de extremidades en que se mida la FA, sí tenemos experiencia previa en isquemias viscerales³³⁸. En este caso, nos planteamos que el mismo insulto que sufre el músculo lo sufriría el hueso en la extremidad sometida a isquemia, aunque tenga una tolerancia mucho mayor a la misma⁵⁰. Y desde ese punto de vista, la FA podría ser un indicador de dicho daño.

Por otra parte, hemos medido los marcadores de función renal Urea y Creatinina (Cr). Aunque, como hemos dicho, para los tiempos de isquemia empleados no era de esperar un daño renal relevante, se trata de dos parámetros también presentes en cualquier batería analítica habitual, y nos ha parecido oportuno incluirlos para completar la descripción bioquímica del daño. Por otra parte, y aunque no hay toxicidad descrita para el ácido fólico (ni folínico), podríamos detectar cualquier mínimo sufrimiento renal adicional por el uso del tratamiento experimental. Son valores que también se miden en otros modelos experimentales de isquemia-reperfusión de extremidades inferiores en animal^{70, 355, 361}.

Por último, no hemos incluido parámetros de hematimetría por dos motivos. Primero, porque aunque una isquemia muy prolongada sí puede dar lugar a una hemoconcentración y plaquetopenia relevantes³⁵⁵, la experiencia clínica nos demuestra que tales alteraciones no se presentan para tiempos de isquemia de 2-3 horas, como las que nos ocupan^{82, 226, 227, 228, 229}. De hecho, los estudios experimentales ya clásicos también apuntan en dicha dirección^{66, 69, 70}. Y en segundo lugar porque, de la bibliografía³⁷⁰ y de nuestra experiencia previa en isquemia-reperfusión visceral^{336, 337, 338}, sabemos que los parámetros hematimétricos de la rata no presentan tantas similitudes respecto al ser humano como lo hacen los iones y los parámetros generales de bioquímica como los arriba señalados. Los valores bastante diferentes que estos animales presentan de forma fisiológica, hacen que la extrapolación de los resultados resulte más difícil.

Parámetros anatomopatológicos

La evaluación del daño anatomopatológico es probablemente el apartado en donde encontramos una mayor heterogenicidad en la literatura.

Hay varios protocolos de determinación de sustancias mediante espectrofotometría, tras procesamientos normalmente complejos y económicamente costosos. Tal es el caso de la determinación de MPO^{314, 315, 355}, indicador indirecto de la infiltración del tejido por PMNs. También de la MDA, empleado ocasionalmente en suero como medidor inmediato del daño pero que también ha sido determinado en tejidos a las 24 horas de la reperusión^{235,315}. Y también por espectofotometría se puede determinar el Glutathión, con la misma interpretación³¹⁵.

La prueba del **Nitroazul de Tetrazolio (NBT)** es un medidor de viabilidad celular que también ha sido empleado en modelos de isquemia-reperusión de extremidades en modelo animal^{236, 242, 357}.

Todos los métodos anteriores han sido descartados por varios motivos. Primero, por la heterogenicidad de los parámetros medidos. Segundo, porque representan indicadores de daño que no se emplean habitualmente en la práctica clínica, y desde este punto de vista, pueden presentar unos resultados más difícilmente interpretables. Y finalmente, porque en todos los casos implican unos procedimientos técnicamente dificultosos y con un elevado coste económico.

Por el contrario, hemos preferido fijarnos en otros parámetros más tangibles, y que por otra parte son los mayoritarios en la bibliografía. A nivel microscópico, la visualización y cuantificación directa del daño celular y la cuantificación de la infiltración leucocitaria. Y a nivel macroscópico, la determinación del edema tisular.

Así, la cuantificación del daño mediante la visualización directa de la musculatura sometida a isquemia es un procedimiento habitual en los estudios experimentales^{59, 69, 235, 315, 350, 354, 355, 356, 357}. Un problema habitual en dicha cuantificación del daño es la subjetividad que se deriva de requerir una interpretación de lo visualizado en los cortes. Por este motivo, se ha propuesto un sistema que simplifica la clasificación de las fibras en dañadas o no dañadas, según los criterios señalados en material y métodos, inspirados en un estudio que trata de sistematizar la interpretación del daño por isquemia-reperusión en modelos murinos³⁵⁶. Además, se plantea la medición de varios campos en cada corte de

cada pieza, tal y como se propugna en dicho estudio, con ánimo de aumentar la fiabilidad del resultado, haciendo la media de todas las mediciones llevadas a cabo.

También a nivel microscópico hemos querido cuantificar la infiltración de la musculatura por PMNs. Aunque en este contexto muchos estudios llevan a cabo dicha cuantificación mediante la determinación de la Mieloperoxiadasa (MPO) producida por aquellos^{314, 315, 355}, consideramos que se trata de un sistema indirecto y sobre todo técnicamente complejo y caro. Por contra, es posible llevar a cabo un cálculo razonablemente preciso de la infiltración leucocitaria, cuantificando la densidad de PMNs en función del número de estas células por campo o mm cuadrado²³⁵, y es éste el sistema que hemos preferido emplear para la tesis.

Por último, hemos querido incluir en el estudio el parámetro macroscópico fundamental en la evaluación del daño por isquemia-reperfusión, el edema. Además de ser evaluado ampliamente a nivel experimental^{235, 314, 351, 354, 355, 357, 361}, resulta una variable muy tangible, en tanto que empleada sistemáticamente en la práctica clínica. Además, resulta fácilmente ejecutable y no requiere de grandes medios técnicos.

La cuestión más problemática en la medición del edema es la variabilidad de medios con que puede llevarse a cabo. Mientras en la práctica clínica suele emplearse la medición de perímetros, como sistema no invasivo, en experimentación tiende a llevarse a cabo una determinación del peso muscular, tras extraer el músculo a estudio^{314, 354, 235, 351, 355, 357}.

Dadas las facilidades en la medición y la tangibilidad del edema como indicador del daño, hemos querido realizar ambos tipos de mediciones en esta tesis.

Por un lado, se han medido los perímetros de las extremidades, y se ha ejecutado una conversión de dicho perímetro al área aproximada de la sección, asumiendo una forma de la extremidad cercana a la circunferencia. Hemos llevado cabo la medición a nivel del muslo y hemos hecho la comparativa de las áreas de la sección de la extremidad, inspirándonos en el único trabajo que realiza una estimación similar²³⁵.

Por otra parte, también se ha determinado el edema en función del peso. En este caso, hay consenso en emplear el tríceps sural, o bien sólo el músculo gastrocnemio o sural^{314, 354, 351, 355, 357}. Como en esta tesis sólo hacemos la isquemia en la extremidad inferior derecha, hemos dispuesto en cada rata de un control pareado, la extremidad inferior izquierda. En la valoración invasiva del edema hemos optado por medir sólo el gastrocnemio, como músculo principal en la pantorrilla de la rata, y hemos llevado a cabo una medición directa del peso húmedo, valorando el incremento respecto a la extremidad contralateral. Consideramos esta medición del incremento del peso como una forma de medición del edema igualmente válida respecto a la comparación de peso húmedo/ peso seco, con una interpretación más fácil y directa y siendo técnicamente mucho menos engorrosa respecto a esa última.

Pruebas funcionales

Ya hemos hablado de que los resultados funcionales son probablemente los de mayor interés en la clínica, al menos en lo relativo al daño por isquemia-reperfusión de extremidades. Sin embargo, la evaluación funcional en el animal de experimentación es muy difícil y está sometida a una enorme subjetividad. Parámetros valorables en la práctica clínica como el dolor postoperatorio, tiempo de ingreso, balance articular, o pruebas de recuperación funcional son irrealizables en la rata. En cambio, sí son realizables estudios de electromiografía, como hemos descrito en la revisión de la bibliografía^{314, 352, 353}. A pesar de que no está establecida claramente la relación entre alteraciones electromiográficas con esos otros parámetros funcionales que hemos mencionado, resulta un estudio que puede aportar más información y caracterizar de forma más completa el daño por isquemia-reperfusión. Por último, presenta también la problemática de no tener definido el momento óptimo de realización de las pruebas, lo que añade más complejidad a la hora de plantear un estudio de estas características.

En cualquiera de los casos, la ejecución de dichas pruebas requiere de un aparataje muy específico, del que por desgracia no disponemos en el Laboratorio de Cirugía Experimental de la UPV-EHU, por lo que hemos desechado realizar este tipo de pruebas para la realización de la tesis.

Idoneidad del esquema temporal

Tiempo de isquemia

Primeramente, era necesario plantear un tiempo de isquemia del miembro inferior en la rata. En este caso, hemos querido movernos en un equilibrio: realizar un daño lo más parecido al ocasionado en la práctica clínica, pero por otra parte de la mayor magnitud posible dentro de este rango, para facilitar el descubrimiento de diferencias al aplicar un tratamiento experimental.

Así, lo lógico nos parece restringirnos a un tiempo de isquemia en el que el daño sea local, y no haya expectativa de daño sistémico. Dicho límite está establecido entre las 3 y las 4 horas, en la experiencia clínica y experimental, como hemos expuesto en numerosas ocasiones. Sin embargo, en la práctica habitual se suele preferir no sobrepasar las 2 horas. En base a esto, tomamos la decisión de realizar series experimentales de 2 y 3 horas de isquemia, con el fin de asegurarnos de que el perfil de daño es similar en ambos casos, restringido a lo local, pero lógicamente mayor a las 3 horas de isquemia. Una vez realizada dicha comparación –que analizaremos en seguida– es cuando optamos por el plazo de 3 horas de isquemia para evaluar el tratamiento experimental, ya que siendo el daño local más intenso, sería lógico que se descubriesen con mayor facilidad las diferencias achacables al efecto protector de dicho tratamiento experimental.

Tiempo de reperfusión

En cuanto a la evaluación de resultados durante la reperfusión, la revisión de los estudios sobre la isquemia-reperfusión de extremidades inferiores en rata nos permite concluir que hay bastante consenso respecto al tiempo óptimo de medición de algunas variables.

Así, los que hemos denominado marcadores inmediatos de daño, principalmente indicadores de estrés oxidativo (medición directa de RLO³⁶³, SOD y glutatión²⁴⁰, hipoxantina³⁰¹, IMA, DMA y otros^{250, 297, 298, 299, 301, 302, 304}), se miden en el periodo inmediato de la reperfusión, hasta 20 minutos tras la liberación de la isquemia. Ninguno de tales marcadores ha sido empleado en este trabajo.

También hay consenso en lo respectivo a la anatomía patológica, y puede afirmarse que el conjunto de los estudios consultados que miden cualquier tipo de variable anatomopatológica micro o macroscópica en animal de experimentación, lo hacen a las 24 horas de concluido el insulto isquémico^{59, 69, 75, 235, 236, 242,314, 315, 350, 351, 354, 355, 356, 357, 361}. Habida cuenta de esta homogeneidad, para el estudio de esta tesis también se han realizado los estudios de Anatomía Patológica al cabo de dicho plazo de 24 horas.

Sin embargo, el consenso anterior no es tan claro a la hora de definir el momento óptimo de medición de los distintos parámetros incluídos en la bioquímica, especialmente de las enzimas más específicas del tejido muscular CK y LDH.

En uno de los pocos estudios que miden CK y LDH tras isquemia-reperfusión de extremidades en la rata, se toma de forma aleatoria o al menos no justificada el plazo de 4 horas de la perfusión, para la medición de parámetros analíticos³⁶¹. Sin embargo, resulta más clarificador otro estudio, también en ratas, pero que busca caracterizar el daño tras isquemias mucho más prolongadas que las empleadas en la clínica, más en un contexto de síndrome de aplastamiento o *crush syndrome*³⁵⁵. En este último, se plantea un estudio seriado en que se definen distintos grupos para evaluar el daño a nivel bioquímico a la hora, 3 horas, y 24 horas de la perfusión. Al comparar los valores a dichos tiempos de isquemia, vemos que las magnitudes más grandes de CK y LDH se detectan a las 3 horas de perfusión.

Con estos precedentes, nos pareció oportuno dedicar una primera parte del trabajo a definir con mayor precisión la curva descrita por estas enzimas. Por una parte, estableciendo más puntos de evaluación. Y por otra parte, aplicado a tiempos y presiones de isquemias equiparables a las realizadas en las isquemias programadas de cirugía de miembros.

Valoración de los resultados

Validez del dispositivo de cable a tensión

Toda la primera parte experimental de esta tesis doctoral estuvo dedicada al desarrollo del sistema de inducción y mantenimiento de la isquemia más adecuado. Por eso, dimos mucha importancia a la validación del sistema de cable a tensión antes de iniciar los estudios de caracterización del daño por isquemia-reperfusión y de evaluación del tratamiento experimental con ácido folínico.

La definición de la magnitud necesaria para mantener la isquemia ha mostrado ser suficiente. En las 97 ratas empleadas en el trabajo, sólo hubo dos casos en los que se detectó una pérdida de la palidez cutánea del miembro sometido a isquemia. Este hallazgo, que no se acompañó de una existencia de pulsos distales o evidencia a actividad continuada en el láser doppler, parece orientar a una pérdida puntual de la isquemia, probablemente por un aumento relevante de la tensión arterial en una ventana de anestesia más superficial y quizás con aparición de dolor. Estos animales fueron apartados del estudio. De cualquier modo, estas dos pérdidas puntuales de la isquemia pueden considerarse, incluso, como la demostración de que la presión ejercida se situó cerca de la Presión Mínima de Oclusión, que es lo que buscábamos con el desarrollo del dispositivo.

Por lo demás, el sistema de cable a tensión mostró una gran facilidad a la hora del posicionamiento y manipulación de los animales. Todo el proceso de colocación, exanguinación e instauración de la tensión necesaria para la isquemia se llevó a cabo en cada animal en unos 30 segundos. El proceso de retirada del dispositivo isquemante, una vez concluido el tiempo de isquemia fijado, resultó aún más rápido.

Por último, no detectamos ninguna movilización del cable. Es más, en los pocos casos de animales que en momentos de evaluación mostraban un estado de anestesia más superficial, incluso con movimientos de la cola, de la cabeza o de las extremidades superiores o inferior izquierda, no se apreció el mínimo desplazamiento del cable ni de la extremidad inferior derecha.

Todo ello creo que nos permite concluir que el sistema de cable a tensión, además de ser reproducible y controlable, puede ser definido como un sistema muy fiable para la inducción de isquemia-reperfusión en la rata de laboratorio.

Evolución de parámetros bioquímicos durante la perfusión

En primera instancia, nos interesaba caracterizar el comportamiento de los distintos parámetros bioquímicos contemplados a lo largo de la perfusión. Con ánimo de dar una aproximación más fiable, se establecen hasta 4 momentos de evaluación, desde la perfusión inmediata hasta las 6 horas.

Dejando para siguientes apartados el análisis de los valores de cada variable, en este analizaremos las curvas descritas por las mismas, con especial atención a las enzimas musculares.

Como cabía esperar, no ha habido alteraciones evolutivas relevantes en cuanto a los iones Na, K y Cl, con un comportamiento básicamente plano.

Los marcadores de función renal Urea y Cr tienen una diferente evolución. Mientras en el caso de la Urea hay un aumento que, sin ser llamativo, no remite al final del tiempo de perfusión estudiado, en el caso de la Cr el mayor aumento se ha observado entre la hora y las tres horas de perfusión, tendiendo sus valores a la normalización hacia las 6 horas.

Con las enzimas no específicas de tejido muscular el comportamiento también es distinto en cada caso. FA, aun con diferencias entre los animales sometidos a 2 y 3 horas de isquemia, muestra un comportamiento esencialmente plano, sin altibajos durante la perfusión. GOT, por el contrario, muestra una tendencia al aumento a lo largo del tiempo de perfusión, con valores similares a las 3 y las 6 horas de perfusión. GPT, por último, dibuja una curva similar, donde podría haber unos valores máximos a las 3 horas, pero sin una tendencia clara a la baja a las 6 horas de perfusión.

Finalmente, las enzimas musculares CK y LDH muestran un comportamiento muy similar entre ellas, y cuando comparamos 2 y 3 horas de isquemia. Estas enzimas aumentan muy bruscamente con el inicio de la reperfusión, perfilan una meseta entre los 10 minutos y la hora de evolución, y describen un pico muy claro a las 3 horas, con posterior descenso y tendencia aparente a la normalización hacia las 6 horas de evolución.

Este aspecto de la curva parece muy compatible con el descrito por Murata y cols en su modelo de *crush syndrome*³⁵⁵. Creemos, sin embargo, que nuestro modelo nos da más garantías, ya que el pico de enzimas musculares se define con claridad entre la hora y las 6 horas, y no entre la hora y las 24 horas del modelo de Murata y cols. No podemos asegurar, desde luego, que dicho pico no pueda estar produciéndose en algún otro momento dentro de dicha orquilla entre la hora y las 6 horas de la reperfusión (Sagara y cols proponen 4 horas³⁶¹), pero sí podemos afirmar que las 3 horas de la misma constituyen un tiempo muy adecuado para valorar el aumento total de las enzimas CK y LDH tras un daño de isquemia-reperfusión en extremidades en la rata.

La morfología de esta curva en los primeros tramos de la reperfusión da pie, por otra parte, a proponer una posible distribución del daño a lo largo del tiempo. El aumento brusco de enzimas musculares con la reperfusión inmediata, la meseta hasta la hora, y el segundo aumento pronunciado hasta alcanzar un pico a las 3 horas de la reperfusión podría explicarse por diferencias temporales en la producción del daño.

Así, podemos suponer que la compresión del tejido muscular y la anoxia del mismo van provocando una miolisis durante el periodo de isquemia. Esta miolisis daría lugar a su vez a una salida al espacio extracelular de grandes cantidades de CK y LDH, que pasarían de forma inmediata al torrente sanguíneo con el retorno del riego, y que se detectarían por tanto desde los primeros instantes de la reperfusión. Por tanto, no es descabellado pensar que los niveles de CK y LDH detectados a los 10 minutos e incluso una hora de reperfusión sean debidos principalmente a los mecanismos patogénicos de la compresión y la anoxia.

Con posterioridad al retorno del flujo sanguíneo, sabemos que se desencadena el tercer mecanismo etiopatogénico, correspondiente al Síndrome de isquemia-reperfusión. Como hemos ido desarrollando durante todo este trabajo, el mismo requiere de la activación del sistema inmune en base a los metabolitos y radicales libres de oxígeno acumulados durante el tiempo de isquemia. Aunque resultaría imposible cuantificar qué porcentaje del daño corresponde a cada uno de los 3 mecanismos etiopatogénicos, parece plausible pensar que el segundo incremento de valores de CK y LDH entre la hora y las 3 horas de la perfusión, pudiese estar principalmente justificado precisamente por el Síndrome de isquemia-reperfusión, toda vez que es el mecanismo que sigue presente, una vez la compresión y anoxia de tejidos desaparece al liberar el torniquete. A ese respecto, y teniendo las gráficas delante, hay que llamar la atención de que el incremento desde la hora de la perfusión hasta las 3 horas es prácticamente de la misma magnitud que el existente entre los valores basales y los correspondientes a la perfusión inmediata. O, dicho de otra manera y siguiendo el razonamiento desarrollado, que el síndrome de isquemia-reperfusión sería responsable de doblar el daño que habrían provocado juntos la compresión y la anoxia de tejidos.

Son esos valores más altos a las 3 horas y esa sospecha de que el mecanismo principalmente implicado en su génesis es el síndrome de isquemia-reperfusión –dentro de los tres actores responsables– los que nos hacen concluir que, para este trabajo y otros que se planteen a futuro, la evaluación de tratamientos experimentales que busquen combatir dicho síndrome debería tener lugar en ese plazo de 3 horas de perfusión, tras isquemias de 2-3 horas como las realizadas en la práctica clínica en cirugías de extremidades.

Variaciones bioquímicas con el incremento del tiempo de isquemia de 2 a 3 horas

Nos parecía muy importante la caracterización del daño de forma evolutiva tanto para periodos de 2 como de 3 horas de isquemia. Ya hemos señalado reiteradamente que la bibliografía apunta de forma inequívoca en el sentido de que el tipo de daño sigue

circunscribiéndose a lo local y sigue siendo reversible a las 3 horas de isquemia, pero la tradición vigente en la clínica sigue siendo no prolongar las isquemias más allá de las 2 horas. Esta última nos pareció razón suficiente para comprobar experimentalmente que el perfil de daño fuera de mayor magnitud pero perfectamente equiparable en el caso de las 3 horas, y que los hallazgos descritos para 3 horas de isquemia fueran por tanto aplicables a isquemias más cortas como las usadas en la práctica clínica.

En este sentido, conviene remitir al lector de nuevo a las gráficas comparativas señaladas en el apartado de resultados, con especial interés a las últimas, con las curvas descritas por las enzimas musculares.

En relación a los iones, podemos decir que la prolongación del tiempo de isquemia de 2 a 3 horas no trae consigo variaciones relevantes.

Lo mismo cabe decir de la Urea, con un perfil y unos valores casi idénticos en ambos casos. La Creatinina, en cambio, sí muestra unas magnitudes más altas cuando la isquemia es de 3 horas, pero la curva que se dibuja en ambos casos es muy similar.

La FA se mantiene durante todo el seguimiento con unos valores un 50% más bajos, aproximadamente, en el caso de la isquemia de 2 horas, pero con el mismo perfil que a las 3 horas, prácticamente plano. GOT y GPT exhiben el comportamiento antes descrito, con aumento progresivo durante todo el periodo de seguimiento en la GOT, y con un amago de retorno a los niveles iniciales en la GPT a las 6 horas de la reperusión, de forma muy simétrica al comparar 2 y 3 horas de isquemia. GPT y GOT, por último, reproducen una morfología similar a las descritas por CK y LDH, con la misma interpretación que explicamos para estas últimas.

Finalmente, las enzimas musculares presentan un perfil que también se ha descrito, y que como se aprecia en las figuras correspondientes, está reproducido de forma casi igual al comparar periodos de isquemia de 2 y de 3 horas. Manteniendo la simetría, en el caso de la isquemia de 3 horas de duración, los valores de CK y LDH son aproximadamente un 50% mayores respecto a los hallados tras 2 horas de isquemia. Dicha proporción se mantiene al alcanzar los valores máximos, a las 3 horas de reperusión.

El estudio de todos los parámetros anteriores no lleva a concluir lo esperado, es decir, que el perfil del daño tras 3 horas de isquemia es perfectamente equiparable al producido a las 2 horas, aunque con magnitudes lógicamente mayores. Dado que en la presente tesis se busca desarrollar un modelo donde el efecto protector de tratamientos experimentales tenga la repercusión más visible, se establece emplear las 3 horas de isquemia en la valoración de los mismos.

Examen del daño a nivel bioquímico, con y sin tratamiento

Entraremos en esta sección a realizar una valoración crítica del significado de las alteraciones descubiertas a nivel bioquímico, así como los cambios apreciados tras el tratamiento experimental con ácido folínico.

Respecto a los electrolitos, ya hemos mostrado y comentado que presentan cambios mínimos. Podríamos hablar de un muy leve aumento de la potasemia, alcanzándose valores de 4,83 mEq/l a las la hora de reperusión, y 4,76m Eq/l a las 3 horas de reperusión, tras 3 horas de isquemia, en animales no tratados. Este leve aumento del potasio tiende a regresar al final del periodo de reperusión. En los animales tratados, para el mismo periodo el potasio alcanza unos niveles menos elevados de 4,3 mEq/l. En cualquier caso, en todo momento nos moveríamos dentro del rango considerado fisiológico en la rata (4,0 a 5,2 mEq/l), y lejos de los 6 mEq/l descritos en una isquemia de 3 horas, pero a tensión no controlada y aplicada de forma bilateral³⁶¹ y más aún de los 8,9 mEq/l vistos en el modelo de síndrome de aplastamiento con isquemia bilateral de 5 horas a tensión no controlada³⁵⁵. En ese contexto, el leve aumento de la potasemia respecto a la población control (4,04 mEq/l) cabría encuadrarlo en el contexto de una rabdomiolisis, pero que no llega a provocar una hiperpotasemia *sensu stricto*. El hallazgo apoya la idea de que las 3 horas de isquemia no provocan alteraciones sistémicas.

Atendiendo a los marcadores renales, también podríamos hablar de un leve deterioro de la función renal, tras 3 horas de isquemia, en relación a los animales sanos. Tanto urea como

creatinina exhiben unos valores que prácticamente duplican los basales, a las 3 horas de la reperfusión ($68 \pm 3,6$ Vs $28 \pm 3,2$ y $0,88 \pm 0,27$ Vs $0,36 \pm 0,06$ mEq/L respectivamente). Estas diferencias alcanzan significación estadística, en ambos casos. En el caso de la urea, se trata de cifras que superan la horquilla considerada como fisiológica en la rata (28 a 42 mg/dL), mientras que para la creatinina quedan muy lejos del considerado límite máximo de la normalidad (0,7 a 2,2 mg/dL). Los valores de urea registrados son muy similares a los descritos para el mismo tiempo de isquemia, por Sagara y cols, aunque en dicho estudio la isquemia se lleva a cabo en ambas extremidades y la evaluación tiene lugar más tarde, a las 4 horas de la reperfusión³⁶¹.

El aumento de la concentración de urea tiene, por tanto, significación estadística, y debe tenerse en cuenta, en tanto a las 3 horas dicha concentración supera en un 62% el considerado límite máximo de la normalidad. La experiencia clínica y la forma de la curva, que parece iniciar un leve descenso hacia las 6 horas de la reperfusión, invitan a pensar que este hallazgo pueda tener poca traducción patológica. En nuestra experiencia, el pretratamiento con ácido folínico no tiene ningún efecto relevante sobre estos parámetros, con valores de urea y creatinina similares al grupo no tratado, que se encuentran lejos de la significación estadística.

En conclusión, podemos decir que la rabdomiolisis ocasionada por la colocación del torniquete conlleva un aumento leve de las cifras de urea y creatinina, con dudosa traducción clínica. Y que el tratamiento con ácido folínico no parece tener ningún efecto – protector ni deletéreo– sobre la función renal.

Decidimos incluir la FA como un posible marcador del daño óseo por la isquemia-reperfusión. Los resultados, sin embargos, han resultado completamente anodinos. Ha resultado curioso el hallazgo de valores más bajos respecto a la población control, sólo en los animales sometidos a dos horas de isquemia, aún sin alcanzar significación estadística. También hay un descenso, que en este caso llega a alcanzar significación estadística, al comprar la FA de los animales tratados respecto a los no tratados, a las 3 horas de isquemia tras 3 horas de reperfusión ($97 \pm 14,5$ vs $123 \pm 19,2$ UI/L). En cualquiera de los casos, en todo momento las cifras de FA se mantienen dentro de las consideradas fisiológicas en la rata

(82 a 164 UI/L). Por ello, hemos concluido que la FA no tiene valor en el estudio del daño por isquemia-reperfusión de extremidades en la rata.

La GOT ha exhibido un aumento muy marcado tras la isquemia de 2 y 3 horas de la extremidad inferior, con pico a las 3 horas de perfusión ($307,5 \pm 93,35$ y $359,8 \pm 88,54$ UI/L, respectivamente). En ambos casos se trata de un aumento estadísticamente significativo respecto a los valores del grupo control ($51,43 \pm 2,64$ UI/L) y lejos de los considerados en rango fisiológico (45 a 65 UI/L). Los valores son de nuevo similares a los publicados por Sagara y cols³⁶¹. El tratamiento con ácido folínico consigue un descenso de en torno al 35% de la concentración de GOT (hasta $234 \pm 28,32$), con significación estadística, y probablemente más trascendencia clínica.

La interpretación de GOT puede ser más difícil que en otros marcadores. Al tratarse de una enzima presente en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, el aumento provocado por la isquemia-reperfusión podría ser achacado tanto al daño local como a una eventual repercusión sistémica, incluyendo el tejido hepático, aunque teniendo en cuenta todo lo dicho hasta ahora, parece razonable considerar que el origen fundamental sea el daño local. Sea como fuere, el ácido folínico mostraría también en el caso de la GOT un efecto protector.

El estudio de la otra transaminasa estudiada, la GPT, ofrece datos algo diferentes. Aunque tras la isquemia de 2 y 3 horas hay un aumento, con valores máximos a las 3 horas, dicho aumento es mucho más moderado que en el caso de la GOT. Así, tenemos que los valores de población general fueron de $41,7 \pm 1,6$ UI/L, y el aumento máximo (ocurrido tras 3 horas de isquemia y 3 horas de perfusión) alcanzaron $90 \pm 13,2$ UI/L. Teniendo en cuenta que se condieran fisiológicos niveles de 38 a 50 UI/L, se trata de un ascenso mucho menos notable que el registrado para la GOT. De nuevo, el tratamiento con ácido folínico consigue moderar aún más este aumento, limitándolo en un 30%, hasta $63 \pm 6,1$ UI/L, de forma estadísticamente significativa.

Estos resultados pueden explicarse de la siguiente manera. Siendo la GPT una enzima bastante selectiva del hígado, su aumento moderado traduciría probablemente un leve daño

por repercusión sistémica de la isquemia-reperfusión de extremidades. La comparación con GOT, ubicua y presente en el músculo y cuyo incremento es mucho más intenso, nos confirmaría en la idea de que la mayor parte del mismo hay que achacarlo al daño local y no a la repercusión sistémica. Independientemente de la localización probablemente remota del daño que representa el aumento de la GPT, vemos cómo el ácido folínico es capaz de limitar este aumento en la misma proporción (en torno a una tercera parte) en que lo hace para la GOT.

Finalmente analizaremos los resultados de las enzimas musculares CK y LDH, que ya hemos señalado como las que consideramos más importantes para esta tesis por su especificidad a la hora de cuantificar a nivel bioquímico el daño sobre el tejido muscular. Recordemos que los valores considerados fisiológicos son de 50 a 200 UI/L en el caso de CK y de 30 a 80 para LDH.

En ambos casos, se muestra un aumento pronunciadísimo, con la morfología que hemos escrito de “doble daño”, uno inicial reflejo de la miolisis por compresión e isquemia y el segundo que se le suma durante la reperfusión.

Ya a los 10 minutos de reperfusión, 2 horas de isquemia llevan a unas cifras de CK de 3168 ± 1314 UI/L y de LDH de $480,2 \pm 199,1$ UI/L. Podríamos hacer una comparación con el único estudio clínico que mide CK y LDH tras isquemia-reperfusión, ya que hace la medición tan sólo a los 15 minutos tras la isquemia, probablemente en el contexto de que los autores del estudio son anestesiólogos (Yagmurdur y cols)³⁰¹. En este estudio, se registran unos valores de CK en torno a 700 UI/L y de LDH de unos 390 UI/L. Esta discrepancia de valores, sobre todo en lo respectivo a CK, podría explicarse por las siguientes circunstancias, que implican que la comparación deba ser hecha con muchísimas reservas:

- El estudio clínico de Yagmurdur y cols se lleva a cabo sobre pacientes sometidos a cirugías de mano, en las que se emplea una isquemia de miembro superior. El miembro superior tiene un mucho menor volumen muscular, disminuyendo la cantidad de CK.

-Las isquemias duran de media 60 minutos, la mitad de tiempo que la llevada a cabo en esta tesis.

-La cirugía habitual llevada a cabo sobre la mano no implica en términos generales un aumento adicional de la CK, en tanto en la mano encontramos sólo musculatura intrínseca, y los tejidos implicados durante la cirugía suelen ser el celular subcutáneo, y eventualmente ligamentos, tendones o nervios. Sin embargo, quizás si pueda justificar un ascenso relativo de LDH respecto a CK.

-Si tenemos en cuenta que el pico de CK se alcanza en el ser humano a las 24-72 horas y en la rata ocurre a las 3 horas, es razonable pensar que si la morfología de la curva es similar, en el caso del ser humano 15 minutos es un tiempo cortísimo para evaluar dicho incremento, y son esperables valores mucho menores que en el caso de la rata para el mismo plazo.

Desplazándonos hacia los valores máximos, tras 3 horas de isquemia y 3 horas de la reperusión, descubrimos en la rata cifras de CK de 9459 ± 1467 UI/L y de LDH $1015 \pm 310,8$ UI/L. Aunque puedan parecer magnitudes muy altas, no lo son tanto si lo comparamos con la bibliografía publicada al respecto. En dicha bibliografía, por desgracia, no se contempla LDH y sólo se mide CK. En el trabajo de Sagara y cols³⁶¹, tras 3 horas de isquemia y 4 horas de reperusión, la CK medida alcanza casi las 31000 UI/L, tres veces más que en nuestra experiencia. Esta diferencia puede explicarse por los siguientes motivos:

-La isquemia se lleva a cabo en el trabajo de Sagara y cols en las dos extremidades inferiores de la rata. Podríamos hacer la aproximación de que cada extremidad justificaría en torno a 15000 UI/L, pero con toda reserva porque estaríamos obviando un probable efecto sinérgico de ambas isquemias.

-En el estudio de Sagara y cols no se emplea un sistema que controle la presión a la que se hace la isquemia, sino que se utilizan gomas elásticas. El torniquete de diseño estrecho y la probable sobrepresión que se realiza pueden explicar también los valores más altos de CK.

-En este trabajo, por último, la medición de CK se lleva a cabo a las 4 horas de reperfusión. De nuestra experiencia inferimos que el pico enzimático tiene lugar en la vecindad de las 3 horas, pero no podemos tener seguridad al respecto. Esta diferencia en el tiempo de evaluación también puede justificar las diferencias entre el trabajo de Sagara y cols y el nuestro.

Por otra parte, si atendemos a los resultados del trabajo de Murata y cols³⁵⁵, vemos que las cifras de CK se disparan hasta casi 45000 UI/L, más de cuatro veces los valores detectados en esta tesis. De nuevo, hay varias razones que justifican esta diferencia:

-Murata y cols plantean un modelo de síndrome de aplastamiento, en ambas extremidades inferiores, con isquemias mucho más prolongadas -de 5 horas- y con un sistema de torniquete con muy probable sobrepresión.

-El tiempo de isquemia de 5 horas nos pone en un escenario de daño local irreversible y repercusión sistémica notable, lo que es muy diferente del modelo que se ha pretendido emular en esta tesis.

Con las salvedades descritas, que obligan a tomar cualquier comparación con muchas reservas, creemos que puede afirmarse que los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a aumento de enzimas musculares -sobre todo CK- tras un daño de isquemia-reperfusión en la rata, son compatibles con los resultados publicados al respecto en otros estudios experimentales con diseño parecido.

Consideramos que los resultados obtenidos en los animales tratados con ácido fólico respecto a este aumento de enzimas musculares son de muchísimo interés. Si respecto a enzimas no específicas como GOT y GPT habíamos hallado una reducción de los valores máximos de una tercera parte, en el caso de CK y LDH nos encontramos con una situación muy similar. Tras 3 horas de isquemia y 3 horas de reperfusión, descubrimos que el pretratamiento con ácido fólico modera en un 32% el pico de CK (de 9459 ± 1467 a 6456 ± 1662 UI/L) y en un 40% el pico de LDH (1395 ± 262 a 832 ± 204 UI/L), en ambos casos de forma estadísticamente significativa. De estos datos, cabe concluir que a nivel bioquímico el tratamiento experimental con ácido fólico consigue disminuir de forma

cuantitativamente notable y estadísticamente significativa, el daño ocasionado por el síndrome de isquemia-reperfusión en un miembro inferior en la rata.

Examen del daño a nivel anatomopatológico, con y sin tratamiento

Como hemos dicho, el daño a nivel anatomopatológico se ha explorado desde criterios macroscópicos y microscópicos.

A nivel macroscópico se ha estudiado el edema como variable de mayor interés, empleando dos criterios para su medición: el perímetro y área de sección y el peso de gastrocnemios del miembro sometido a isquemia respecto al sano.

En nuestra experiencia, 3 horas de isquemia ocasionan, en la evaluación a las 24 horas de la reperfusión, un incremento del área de sección del muslo de casi el 30%, respecto a la extremidad contralateral. Dicha cifra parece compatible con el estudio experimental sobre conejo que emplea esta sistemática de medición, si bien lo hace selectivamente en el cuádriceps y no en toda la extremidad²³⁵. En dicho trabajo, Deune y cols encuentran un incremento del 38% tras 4 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión, aunque tomando como referencia la población general y no la pata contralateral. En cualquier caso, el tratamiento experimental muestra disminuir de forma significativa dicho incremento de la sección, hasta un 17,4%, lo que parece indicar un papel protector relevante del ácido folínico del daño por isquemia-reperfusión, también en términos de anatomía patológica macroscópica.

Si consideramos la otra medición realizada para cuantificar el edema, comprobamos que en nuestro trabajo 3 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión resultan en un incremento del peso de la musculatura gastrocnemia de casi un 10% respecto a la pata contralateral. En el trabajo con una sistemática más parecida, el de Bonheur y cols³⁵⁷ describen un aumento del peso de 22%, en modelo murino, tras 3 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión, y con su dispositivo de torniquete de tensión controlada. Comparando los resultados, ciertamente llama la atención semejante diferencia. Entre las causas que pueden

justificarla, al menos en parte, habría que considerar que Bonheur utiliza ratones y no ratas, y sobre todo que lleva a cabo la comparación entre las medias del miembro isquémico y las medias de la población general, y no de forma pareada con la pata sana en cada animal. Otros trabajos que se fijan en el ratio peso húmedo/ peso seco^{314, 354} resultan más difícilmente comparables a nuestra experiencia.

Por otra parte, atendiendo al peso de los gastocnemios, el pre-tratamiento con ácido folínico sigue mostrando un efecto protector, disminuyendo el incremento del peso del miembro isquémico respecto al no sometido a isquemia a menos del 8%. Sin embargo, en este caso la diferencia no llega a alcanzar diferencias estadísticamente significativas, en gran parte debido a la gran variabilidad encontrada en las mediciones de los animales del grupo tratamiento, y que hemos mostrado en Resultados. Es probable que hiciera falta un estudio con un mayor tamaño muestral para conseguir mostrar significación estadística de la diferencia, pero para este trabajo baste decir que los resultados orientan en el sentido de que el ácido fólico consigue disminuir el edema de la extremidad sometida al daño por isquemia-reperfusión.

En cuanto a los parámetros microscópicos, hemos identificado en el músculo gastrocnemio de la extremidad inferior derecha de la rata un $65,5 \pm 14,1\%$ de fibras dañadas, tras 3 horas de isquemia y 24 horas de perfusión. Esta cuantificación se ha llevado a cabo de acuerdo a la sistemática propuesta por McCormack y cols³⁵⁶, considerada más efectiva y con mayor validez intra e interobservador que otros sistemas de graduación del daño.

Dicho 65,5% de fibras con algún daño tras 3 horas de isquemia parece ser coherente con el 25% detectado tras 90 minutos³⁵⁴ y el 80% detectado tras 4 horas²³⁵. Esta cifra, sin embargo, podría parecer muy cercana al escaso 60% de fibras dañadas que describen McCormack y cols tras 2 horas de isquemia³⁵⁶. Creemos que el daño similar detectado en nuestro trabajo tras 3 horas de isquemia se debe principalmente a nuestro dispositivo de cable a tensión, que minimiza el daño por compresión respecto al sistema de anillo elástico utilizado por los mencionados autores.

La disminución estadísticamente significativa de la cantidad de células musculares dañadas hasta un $52,1 \pm 20,6\%$, tras el tratamiento con ácido folínico orienta de forma clara a un efecto protector del mismo frente al daño por isquemia-reperfusión.

Por último, respecto a la infiltración leucocitaria, en nuestra experiencia 3 horas de isquemia en el tejido muscular de la rata implican una media de 55,3 PMNs por campo a 66 aumentos, lo que equivaldría a una densidad de aproximadamente $4,52 \times 10^4$ células/mm², que parece coherente con la densidad de $4,63 \times 10^4$ células/mm² para 4 horas de isquemia descrita por Deune y cols²³⁵, aunque en este caso en modelo de conejo y sobre músculo cuádriceps.

Hemos observado cómo el tratamiento con ácido fólico disminuía esta infiltración en casi un 25%, hasta 41,7 PMNs por campo, de un modo estadísticamente significativo. Este hallazgo parece apoyar junto con todos los anteriores la hipótesis de que el ácido folínico tiene un efecto protector frente a la isquemia-reperfusión de miembros.

Comparación con otros tratamientos experimentales

Debido a la enorme variabilidad en cuanto a modelo animal, tiempos de isquemia, dispositivos de instauración de la isquemia, tratamientos propuestos, y sistemática de medición de resultados, la comparación entre los resultados publicados con diferentes tratamientos experimentales y los hallados con el ácido folínico en esta tesis resulta prácticamente imposible. Pero intentaremos, en este apartado, hacer una revisión de los resultados que hemos ido mencionando durante la introducción, desde la perspectiva de nuestra experiencia.

-Deune y cols defienden el uso de un equivalente sintético de la SOD, SC52608. De entre las variables que contemplan, nos interesan especialmente las referidas a la anatomía patológica. Los autores indican que el tratamiento con SC52608 no disminuye el área de sección del cuádriceps ni el peso del mismo, y de hecho hasta aumentaría este último en un 13%, aunque de forma estadísticamente no significativa. Por el contrario, sí se encuentra

una disminución significativa de la infiltración leucocitaria del 42%. La principal crítica que puede hacerse a este estudio es que sólo estudia la isquemia de forma aislada en el cuádriceps, y no en el conjunto de la extremidad. De hecho, ya hemos señalado que otros autores ponen en duda la utilidad de SC52608 in vivo, en modelos animales^{236, 237} y en la práctica clínica²³⁸.

-En un estudio similar al anterior, en cuádriceps de conejo, Hickey y cols²³⁷ analizan otros tratamientos propuestos históricamente, como SOD, Catalasa o Alopurinol. Su conclusión es que estos tratamientos no son eficaces en el control del daño por isquemia-reperfusion, en base a parámetros bastante completos bioquímicos y anatomopatológicos. Aunque a este trabajo se le puede hacer básicamente la misma crítica que al estudio de Deune, en cuanto a lo metodológico, el hecho es que dichos tratamientos parecen haber sido abandonados en la investigación terapéutica de control del daño por isquemia-reperfusion en animales.

-La melatonina parece ser un tratamiento prometedor. Tiene a su favor, como el ácido fólico, que no tiene toxicidad descrita, aun a dosis altas. Los estudios experimentales muestran que la melatonina podría disminuir en hasta un 69% la cantidad de citocromo C mitocondrial, que es considerada una proteína indicadora de la actividad apoptótica, y además atenuaría la alteración de la microvascularización^{245, 246}. Por desgracia, no hay estudios, hasta donde ha llegado nuestra revisión, que evalúen la melatonina en base a parámetros bioquímicos o anatomopatológicos más “tangibles” o similares a los empleados en esta tesis. Sin embargo, sí contamos con un estudio clínico, en el que la melatonina parece demostrar un descenso significativo en la percepción del dolor durante el periodo de isquemia, y un tiempo mayor hasta necesitar el primer rescate analgésico durante la reperfusion³⁶². Sería muy interesante disponer de estudios experimentales que cuantifiquen de manera más completa el aparente efecto protector de la melatonina en isquemia-reperfusion de miembros, así como estudios clínicos que evaluaran otras variables clínicas y funcionales como balance articular, edema, o tiempos de ingreso y de recuperación de actividades habituales.

-En cuanto a la N acetil cisteína (NAC), hemos hablado de estudios clínicos que muestran una disminución en la concentración de malondialdehído (MDA) en membrana sinovial tras cirugías de extremidad inferior bajo isquemia, en pacientes tratados con NAC²⁵¹. Aunque ya hemos mencionado que el MDA está considerado como un marcador de la peroxidación lipídica, sin más parámetros de valoración del daño es difícil saber con seguridad la relevancia de dicho hallazgo aislado, y si puede tener alguna traducción clínica. En otros estudios clínicos, se estudia en función de marcadores inmediatos de estrés redox y en combinación con otros tratamientos, dificultando la interpretación del papel de la NAC^{248, 249, 250}. En general, parece que serían necesario comenzar con estudios experimentales con una medición más completa y sistemática de parámetros de daño por isquemia-reperfusión para evaluar el efecto real de la NAC, antes de seguir con estudios clínicos, y menos en combinación con otros tratamientos.

-Algo similar puede decirse, probablemente, del manitol. Existen algunos estudios clínicos no suficientemente respaldados por una experiencia experimental. En el trabajo de Westman y cols²⁵⁵, parece que el manitol no tendría un efecto protector ante un daño por isquemia-reperfusión asociado a cirugías de artroplastia de rodilla, aunque los parámetros de medición de ese daño se hacen en base sólo a la concentración de determinadas sustancias en tejido muscular obtenido en la perfusión inmediata, como fosfocreatina, lactato o glutatión, lo que probablemente puede considerarse insuficiente para llegar a conclusiones consistentes.

-El ácido ascórbico también podría considerarse un tratamiento interesante considerando su escasa toxicidad potencial. Lee y cols²⁵⁷ estudian el efecto de la administración de altas dosis de ácido ascórbico en pacientes sometidos a una cirugía de artroplastia de rodilla bajo isquemia. De nuevo, la evaluación se hace cuantificando la concentración de ciertas sustancias en la sinovial de los pacientes, obtenida en la perfusión inmediata. Los hallazgos de niveles significativamente menores de MDA y troponinas en la sinovial de los pacientes que recibieron ácido ascórbico son prometedores, pero son probablemente incompletos. Una vez más, es probable que el ácido ascórbico debiera ser ensayado de forma experimental en un modelo de daño puro por isquemia-reperfusión y con una batería

compelta de parámetros de valoración del daño, para hablar con má seguridad de un eventual efecto protector frente al mismo.

-Otra vitamina, la vit E o alfa-tocoferol, también ha sido propuesta y ensayada clínicamente contra el daño por isquemia-reperfusión. En un trabajo clínico²⁶⁰ que evalúa el daño muscular en extremidades inferiores tras isquemia y perfusión, en el contexto de cirugías sobre la aorta abdominal, no sólo se aprecia una disminución de las concentraciones de MDA en músculo en los pacientes pre-tratados con alfa-tocoferol, sino también menor necrosis muscular y menor infiltración de neutrófilos en muestras de anatomía patológica. El comentario a este respecto sería similar a lo referidos para los anteriores tratamientos, en el sentido de ser necesarios estudios previos de respaldo a nivel experimental. En el caso concreto del alfa-tocoferol, se añade una diferencia relevante respecto al ácido ascórbico, la melatonina, o el ácido fólico, y es que se trata de una sustancia liposoluble con riesgo de intoxicación. Esto hace que quizás sea prudente apostar antes por otros antioxidantes más seguros.

-Las técnicas de condicionamiento presentan un gran potencial, y de hecho es un campo de intensa investigación en la actualidad. El mayor volumen de investigación se centra, no obstante, en la isquemia-reperfusión visceral, muchas veces en el contexto de cirugías de transplante. Con todo, la cantidad de estudios experimentales sobre tejido muscular también es ingente, y los resultados parecen apuntar en el sentido de una actividad protectora clara frente al daño por isquemia-reperfusión. Aún así, creo oportuno hacer algunas consideraciones desde la perspectiva de nuestro estudio:

- Casi todos los estudios de condicionamiento isquémico en extremidades están llevados a cabo desde el ámbito de la Cirugía Plástica, y en muchos casos en el contexto del estudio de la viabilidad de flaps y pedículos. Ello hace que la isquemia-reperfusión se recree mediante la ligadura temporal del pedículo de un músculo o grupo muscular aislado, lo que nos aleja del modelo de isquemia por aplicación de un manguito o torniquete en toda la extremidad.
- Los parámetros de evaluación del daño entran mayoritariamente en la categoría de los que hemos denominado marcadores inmediatos de daño, y no hemos identificado

ninguno que mida enzimas musculares como CK, que representan el método más frecuentemente empleado en la práctica clínica a la hora de evaluar una rabdomiolisis. Esto hace que, una vez más, consideremos necesario el desarrollo de modelos que emulen la isquemia que se instaura en la cirugía de miembros, y que valoren el daño en función de parámetros completos bioquímicos y anatomopatológicos.

- Tanto el preconditionamiento isquémico como el postcondicionamiento o reperusión intermitente presentan un inconveniente importante a la hora de plantear una traslación a la práctica clínica, y es el tiempo que requieren para su ejecución. Hemos señalado que no hay consenso respecto al número de ciclos y su duración, pero que parece que los mejores resultados los conseguiríamos con un preconditionamiento consistente en 3 a 5 ciclos de 10 minutos^{269, 270}. Esto supondría que tendríamos que empezar a realizar el preconditionamiento en el paciente casi una hora antes de comenzar la cirugía, lo que probablemente representa un importante desafío logístico, y un escollo relevante a la hora de su implantación clínica. En este sentido, la administración de un fármaco que pudiese tener una eficacia similar sería con seguridad mucho más fácilmente adoptado en el funcionamiento diario de un quirófono.

-En referencia al Propofol y otros anestésicos estudiados en la práctica clínica, cabe hacer una observación general: por desgracia, todos ellos miden el impacto de los tratamientos en el periodo inmediato a la reperusión, y estudiando marcadores indicativos del estrés oxidativo como el MDA, también muy inmediatos. Esto hace que resulte difícil estimar si existe una variación en el daño “real” causado, y menos si éste llega a tener una repercusión clínica. No cabe duda de que, disponiendo de distintos fármacos para la inducción y mantenimiento de la isquemia, conocer si algunos presentan un efecto protector frente al daño por isquemia-reperusión sería de un enorme interés. Y en este caso no es imprescindible la experimentación animal previa en el sentido de seguridad del paciente, pues no hablamos de nuevos tratamientos, sino de elegir entre los distintos anestésicos que se emplean habitualmente. Sin embargo, en aras a una mejor descripción de dicho papel protector frente a la isquemia-reperusión, sería muy interesante estudiar

dichos fármacos a nivel experimental, permitiendo un análisis completo a nivel bioquímico y sobre todo anatomopatológico, difícilmente planteables en la clínica. Y finalmente, en caso de plantear directamente estudios clínicos, lo ideal sería buscar variables clínicas y funcionales como las que ya hemos ennumerado en varias ocasiones: dolor, tiempo de ingreso, edema, recuperación de balance articular y muscular, o reincorporación al trabajo o a actividades deportivas. Esto último vendría muy facilitado por la constitución de equipos multidisciplinares que impliquen a Anestesiólogos y Cirujanos Ortopédicos, de manera que se pueda realizar un seguimiento del paciente no sólo en el periodo perioperatorio, sino también en el medio plazo, con valoración de variables como las mencionadas.

-También hemos mencionado la posibilidad de emplear nitritos como terapia experimental, habida cuenta de su implicación en la regulación de la microvascularización, y de la experiencia en isquemias viscerales. En este sentido, a nivel experimental en isquemias de extremidades se han llevado a cabo estudios agresivos con perfusión intraarterial de ion nitrito, lo que parece mejorar parámetros microvasculares pero sin que dispongamos de otros indicadores bioquímicos o anatomopatológicos de daño muscular³¹⁰. El planteamiento de la administración de óxido nítrico en la práctica clínica al que hemos hecho referencia³¹¹, por último, parece alejarse del perfil de fármaco sin toxicidad –como los antioxidantes- o que va a ser empleado de todas formas –como los distintos agentes anestésicos-, por lo que parece una línea de investigación menos interesante.

-Las estatinas como pravastatina o simvastatina son otra familia de fármacos que se muestran prometedores en la profilaxis del daño por isquemia-reperfusión. A diferencia de otros tratamientos propuestos con el mismo fin, las estatinas han sido evaluadas en función de parámetros sólidos anatomopatológicos como son el edema, el daño celular, o la infiltración leucocitaria del músculo^{314, 315, 316}. La mayor pega que podría ponerse a los estudios hasta ahora realizados consistiría en que el dispositivo de inducción y mantenimiento de la isquemia no tiene las mejores características (anillo elástico), y que su diseño estrecho e imposibilidad de regular la presión realizada puede producir un daño inadvertidamente mayor que el que lleva a cabo el manguito neumático en la práctica

clínica. También pueden plantearse mejoras en los estudios en el sentido de valorar variables bioquímicas, principalmente CK, en tanto que enzima más representativa y aplicada en la clínica a la hora de valorar la miolisis. Por último, aunque se cuenta con una amplia experiencia en el uso de las estatinas y pueden considerarse fármacos relativamente seguros, no están exentos de efectos adversos y toxicidad potencial, lo que puede suponer un hándicap a la hora de plantear su traslación desde la experimentación a la práctica clínica, y les pone en una situación de desventaja respecto a fármacos como el ácido fólico o la melatonina.

-Finalmente, bajo el epígrafe de “otros tratamientos” hemos incluido el uso de oxígeno hiperbárico, de la hipotermia, o el ácido sulfhídrico. Todos ellos comparten una escasa bibliografía al respecto, y una dificultad técnica y/o peligros potenciales altos. Habida cuenta de que el daño que se pretende evitar para isquemias como las realizadas habitualmente en Cirugía Ortopédica es sutil y puede tener consecuencias funcionales pero no implicación sistémica, los mencionados representan probablemente estrategias terapéuticas exageradamente agresivas.

Conclusión general del análisis de la bibliografía

He querido dejar este último apartado para realizar algunas reflexiones desarrolladas a partir del repaso de toda la bibliografía, y tras la realización de este trabajo de tesis doctoral.

Remontándonos al inicio del interés por el daño ocasionado por el uso de torniquetes o manguitos de isquemia, con el desarrollo a partir de los daños 70 de modelos experimentales animales, resulta llamativo cómo la mayoría de estos estudios clásicos midiendo el daño causado por un manguito de isquemia se recogen en revistas de Cirugía Ortopédica y Traumatología. En estos modelos, se consideran con mayor frecuencia variables de más fácil traducción clínica como son el aumento de enzimas musculares, o de daño caracterizable por anatomía patológica, así como estudios de electromiografía.

Sin embargo, es también en los años 70 cuando comienza a conocerse con mayor detalle la etiología del daño, y el papel central que tiene en el mismo el denominado síndrome de isquemia-reperfusión. Esta experiencia proviene más bien del ámbito de las isquemias viscerales, en miocardio, pulmón, hígado, intestinos o riñón, lo que creo que tiene trascendencia en el posterior desarrollo de modelos de isquemia-reperfusión en extremidades, como analizaremos enseguida.

En este contexto, comienzan a proponerse tratamientos experimentales, y modelos experimentales en los que ensayarlos. Entre los primeros tratamientos ensayados estarían los llamados antioxidantes o *scavengers*, mientras que las técnicas de condicionamiento isquémico aparecen a partir de finales de los 80.

La propuesta de estos tratamientos experimentales van acompañados del desarrollo de modelos experimentales animales. En estos, hay una gran variabilidad respecto al modo en que se evalúa el daño, aunque las isquemias en distintas localizaciones comienzan a medirse en función de determinadas sustancias presentes en todos los tejidos con sufrimiento isquémico, como son los que hemos denominado marcadores de estrés oxidativo, de medición inmediata tras la perfusión.

Creo que la generalización de dichos parámetros en la caracterización del daño por isquemia-reperfusión a nivel general, ha llevado a que a nivel particular de la isquemia-reperfusión de tejido muscular en extremidades se valoren casi siempre sólo los mismos, y que se haya perdido en casi todos los trabajos el que a nivel clínico es el marcador más específico y utilizado en la caracterización de una rabdomiolisis, la Creatin Kinasa. Probablemente, tampoco haya ayudado el que dicho parámetro necesite prolongar el tiempo de estudio para ser medido, y que de hecho no tenga un momento de medición claramente definido en la literatura. En ese sentido, el trabajo de Murata y cols³⁵⁷ definiendo la curva enzimática en las primeras 24 horas de la perfusión, aún tratándose de un modelo de síndrome de aplastamiento, ha resultado de un enorme interés. En cambio, sí ha habido un cierto consenso u homogeneidad a la hora de establecer una sistemática de medición del daño a nivel anatomopatológico.

Por otra parte, considero también muy plausible que la generalización en trabajos de laboratorio de dichos parámetros de medición inmediata tras la reperfusión, han animado a la investigación clínica de la actividad de distintos fármacos en la isquemia-reperfusión de extremidades en base a esos mismos parámetros. Desde este punto de vista, la Anestesiología ha sacado un enorme partido de los mismos, en tanto que son muchos los trabajos clínicos llevados a cabo por anestesiólogos, que tienen la posibilidad de evaluar el resultado de un determinado fármaco o actuación terapéutica en una cirugía de extremidades bajo isquemia, en cuanto a protección del daño por reperfusión. Lamentablemente, no se puede decir que los traumatólogos hayamos tenido el mismo interés demostrado por los anestesiólogos, porque apenas hay trabajos realizados desde la óptica de la Cirugía Ortopédica y Traumatología o desde un abordaje multidisciplinar, y creo que a esto se debe en gran medida el que no se contemplen marcadores de daño más tangibles, aunque de medición más tardía, y menos aún resultados finales (dolor, recuperación funcional), que representan en definitiva lo que más nos debería interesar.

En cuanto a los aspectos técnicos de la isquemia, se diferencian los trabajos llevados a cabo en el ámbito de la Cirugía Plástica o Vascular, que tienden a hacer isquemias más largas, con medios invasivos, y en el caso de los estudios de Cirugía Plástica, más centrados en el clampaje de músculos o grupos musculares que de toda la extremidad. En nuestro caso, nos hemos fijado más en los estudios que tratan de emular la isquemia de toda la extremidad, en los tiempos usualmente empleados en cirugías de extremidad en la práctica clínica. Mientras el uso de sistemas de presión no controlada ha sido y sigue siendo el procedimiento habitual para lograr la isquemia, el dispositivo de torniquete a tensión controlada de Bonheur³⁵⁷ representa un medio mucho más parecido al manguito de presión, por lo que creo que puede considerarse una enorme aportación al desarrollo de un modelo más similar al escenario clínico que se pretende reproducir.

Lamentablemente, y para concluir, hay que señalar que existe una distancia muy grande entre los estudios experimentales y los ensayos a nivel clínico en lo que respecta al tratamiento por isquemia-reperfusión en extremidades, y no se percibe una continuidad que es absolutamente necesaria, entre el laboratorio y el hospital. De esta manera, ocurre que

muchos estudios experimentales tienen un diseño o una valoración de resultados que resultan difícilmente traducibles a la clínica, o que en algunos trabajos clínicos se eche en falta respaldo de experiencia investigadora previa sobre animales que ayude a juzgar los hallazgos clínicos con mayor seguridad.

Extrapolación de resultados

Traslación de la experiencia experimental a la clínica

El paso desde el terreno experimental a la clínica presenta siempre una serie de dificultades y limitaciones.

Con el desarrollo de nuestro modelo experimental, creo que nos hemos aproximado mucho a la imitación del daño que se deriva por la isquemia-reperfusión en las cirugías sobre miembros que hacemos de forma habitual en el medio hospitalario. Si embargo, hay que tener presentes las limitaciones inherentes a nuestro trabajo experimental:

-La rata representa un campo de pruebas excelente, y hemos analizado cómo la rata tiene unos parámetros anatómicos y fisiológicos especialmente similares al ser humano. Sin embargo, muchos de los hallazgos encontrados en esta tesis podrían variar en la práctica clínica, y de hecho, como comentaremos seguidamente, probablemente no tiene sentido plantearse realizar las mismas mediciones que hemos hecho en la rata, en el ser humano.

-Partiendo de que la isquemia que se hace en quirófano siempre va acompañada de un procedimiento quirúrgico que alteraría cualquier hallazgo respecto a la isquemia pura. Las analíticas seriadas en muchos casos no son necesarias en la práctica clínica. Y finalmente, la realización de estudios de anatomía patológica no son planteables salvo si las muestras se tomasen en el propio acto quirúrgico, sin dar tiempo a un periodo de reperfusión.

-En realidad, las variables que más nos interesaría valorar en la práctica clínica, son precisamente aquellas que no podemos evaluar a nivel del animal de experimentación: dolor en el corto y medio plazo, tiempo de ingreso, edema, recuperación de balances articular y muscular, recuperación funcional en base a escalas de valoración *ad hoc*, o tiempo de reincorporación a actividades básicas de la vida diaria, laborales o deportivas.

Desde el punto de vista de lo expuesto, parece razonable plantear que, en el caso de la isquemia-reperfusión de extremidades a tiempos y presiones como los empleados en la práctica operatoria habitual, el papel de la experimentación sería definir el daño y evaluar

eventuales tratamientos experimentales en función de una serie de parámetros básicamente bioquímicos y anatomopatológicos. Mientras que a nivel clínico, la determinación de la efectividad de un eventual tratamiento que hubiese demostrado un papel protector en lo referente a dichos parámetros vendría dada por la traducción clínica “real” de tales hallazgos.

En ese sentido, consideramos que el modelo experimental desarrollado en esta tesis satisface las hipótesis y objetivos propuestos, y constituye la base sobre la que ha podido validarse el efecto protector de ácido folínico en isquemia-reperfusión de miembros.

Posibilidades de traslación del tratamiento experimental a la práctica clínica

Una vez llevada a cabo esta primera validación del ácido folínico en un modelo animal, puede plantearse su traslación al ser humano.

Este paso, siempre complicado, podría verse muy favorecido en el caso concreto del ácido folínico por dos circunstancias:

-En primer lugar, que en el caso que nos ocupa no debería mostrar superioridad sobre otro tratamiento ya aceptado y vigente, sino que vendría a cubrir un vacío, en tanto que actualmente no se realiza ningún tipo de profilaxis del daño por isquemia-reperfusión de extremidades en la práctica habitual.

-En segundo lugar, que el ácido fólico y sus derivados cumplen todos los criterios para que los podemos considerar como un fármaco “ideal”. Decimos esto en el sentido de que hablaríamos de un fármaco ampliamente conocido, que no tiene toxicidad, es barato, y es fácil de administrar.

Nuestra previsión, una vez aprobada esta tesis, será intentar llevar nuestra experiencia experimental a la clínica, siempre de acuerdo a las indicaciones del Comité Ético del Hospital. En su caso, diseñaríamos un estudio más orientado a las variables clínicas o

finales a las que hemos hecho mención anteriormente, y que nos orientasen a determinar si la mejoría del daño a nivel de variables bioquímicas y anatomopatológicas en la rata, demostrasen una mejora clínica relevante en el ser humano.

Líneas futuras de investigación

Con el desarrollo y validación del modelo experimental expuesto en esta tesis, creemos que en el futuro resultará de enorme interés plantear estudios en los que se evalúe, con la misma sistemática, algunos de los tratamientos que se han expuesto en la bibliografía.

De todos los mencionados, nos parecen de especial interés la melatonina y el condicionamiento isquémico, por su carácter no agresivo, y por los prometedores resultados de los que disponemos al respecto a nivel experimental. Creemos que las estas terapias experimentales se verán caracterizadas con mayor exhaustividad respecto a lo publicado en la bibliografía, con la aplicación de las mismas en nuestro modelo experimental.

En este sentido, las líneas futuras de investigación al respecto en el Laboratorio de Cirugía Experimental de la UPV-EHU vayan probablemente en el sentido de estudiar el efecto tanto de la melatonina como de técnicas de condicionamiento isquémico, y de la comparación entre ellas y en relación con el ácido folínico. En un segundo tiempo, es muy probable que ensayemos un posible efecto sinérgico al combinar dos o más de estas estrategias terapéuticas.

Conclusiones generales

Al concluir la tesis, podemos concluir que ha confirmado las hipótesis planteadas, satisfaciendo los objetivos que nos habíamos marcado para ello.

-El dispositivo de isquemia desarrollado para la ocasión –sin ser un manguito neumático– consigue recrear de forma fiable el daño que se deriva del uso del manguito neumático en la práctica clínica, para tiempos y a presiones equiparables a las empleadas en la práctica quirúrgica habitual. Para ello, ha cumplido los objetivos marcados de ser no invasivo, no añadir ninguna morbilidad adicional al proceso, facilitar una isquemia fiable a presión controlada, adaptarse al modelo animal, y ser reproducible.

-El daño que se deriva de la isquemia-reperfusión lograda con este sistema, ha conseguido ser definido en base a unos parámetros bioquímicos y anatomopatológicos bien definidos, y con unos resultados consistentes durante toda la experiencia.

-Se ha conseguido, además, mejorar la caracterización del daño a nivel bioquímico, en especial en lo respectivo a las enzimas musculares CK y LDH, poco empleadas en los estudios experimentales pero básicas en la evaluación de la rabdomiolisis en la práctica clínica. Para conseguir este objetivo, se ha estudiado el comportamiento evolutivo de los distintos parámetros sanguíneos tras la isquemia y a lo largo de la perfusión.

-En base a dichos parámetros bioquímicos, se ha comprobado a nivel experimental cómo el perfil del daño es similar tras 2 y 3 horas de isquemia. Esto confirma la experiencia clínica y experimental, y nos permite establecer un modelo de 3 horas de isquemia como representativo de un daño sólo local, pero que permite tener mayor sensibilidad a la hora de detectar una función protectora de eventuales tratamientos experimentales.

-Finalmente, todo el modelo ha sido validado mediante la evaluación del efecto de un conocido antioxidante, el ácido fólico en su forma activa de ácido folínico. Los resultados obtenidos, además, nos permiten definir a este fármaco como un agente con una actividad protectora muy relevante frente al daño por isquemia-reperfusión en extremidades inferiores, en cuanto a parámetros bioquímicos y anatomopatológicos.

-A futuro, se abre la posibilidad de evaluar sobre este modelo ya desarrollado y validado, tratamientos experimentales propuestos en la bibliografía, u otros para los que se puede considerar plausible esta propiedad. Este trabajo da pie, también, a plantear el estudio del efecto del ácido folínico en la práctica clínica, al ser un fármaco seguro, sin toxicidad, y que serviría para cubrir un vacío en el tratamiento actual de los pacientes que van a ser sometidos a una isquemia programada para una cirugía de extremidades.

Bibliografía

1. Adams F, editor. The genuine works of Hippocrates translated from the greek with a preliminary discourse and annotation. Section "On the Articulations". Sydenham Society. W Wood and company. London, 1849
2. Johnson T. The Works of that famous chirurgion Ambrose Pare, translated out of latine and compared with the French. TH Cotes and R. Young, Reprinted by Milford, Boston. 1968
3. Klenerman L. The tourniquet in surgery. *J Bone Joint Surg Br* 1962; 44:937–43
4. Thompson CJ. The evolution and development of surgical instruments. *British Journal of Surgery*. 1938; 25(100):726–34
5. Lister BJ, Cameron HC. The collected papers of joseph baron lister: the antiseptic system. Surgery. Addresses. Index. The Clarendon Press, 1909
6. Esmarch, JFA. The surgeon's handbook on the treatment of wounded in war. English translation by H. H. Clutton. Sampson Low, Marston, Searle & Rivington. London, 1878
7. Ribera Sans, J. Estudios monográficos de cirugía española. Prólogo de E. Escribano. Madrid, 1916
8. Schmieden V. Curso de operatoria quirúrgica. 2º edición. Ed Labor. Barcelona, 1923
9. Cushing H. Pneumatic Tourniquets: with especial reference to their use in craniotomies. *Medical News* 1904; 84: 577
10. Wakai A, Winter DC, Street JT, Redmond PH. Pneumatic tourniquets in extremity surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9(5):345–351
11. Odisson A, Finsen V. Toruniquet use and its complications in Norway. *J Bone Joint Surg* 2006; 88:1090–2
12. Crenshaw AG, Hargens AR, Gershuni DH, Rydevik B. Wide tourniquet cuffs more effective at lower inflation pressures. *Acta Orthop Scand*. 1988; 59(4):447–51
13. Kravetz RE. The tourniquet. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(12):3425
14. Tarlowe MH, Swan KG. The death of Gen. Albert Sidney Johnson. *Bull Am Coll Surg* 1998; 83(5):15–23
15. Coupland RM, Molde A, Navein J. Care in the field for victims of weapons of war: a report from the workshop organised by the ICRC on pre-hospital care for war and mine-injured. International Committee of the Red Cross. Geneva, 2001.
16. Mabry RL. Tourniquet use on the battlefield. *Mil Med* 2006; 171(5):352–6
17. Bellamy RF. The causes of death in conventional land warfare: implications for combat casualty care research. *Mil Med* 1984; 149(2):55–62
18. Sebesta J. Special lessons learned from Iraq. *Surg Clin North Am* 2006; 86(3):711–26
19. Doyle GS, Taillac PP. Tourniquets: a review of current use with proposals for expanded prehospital use. *Prehosp Emerg Care* 2008; 12:241–56
20. McEwen JA. Complications of and improvements in pneumatic tourniquets used in surgery. *Med Instrum* 1981; 15(4):253–7
21. Estebe JP, Davies JM, Richebe P. The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia–reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol* 2011; 28(6):404–11
22. Swan KG, Wright DS, Barbagiovanni SS, Swan BC, Swan KG. Tourniquets revisited. *J Trauma* 2009; 66(3):672–5
23. Karalezli N, Ogun CO, Ogun TC, Yildirim S, Tuncay I. Wrist tourniquet: the most patient-friendly way of bloodless hand surgery. *J Trauma* 2007; 62 (3):750–4
24. Rudkin AK, Rudkin GE, Dracopoulos GC. Acceptability of ankle tourniquet use in midfoot and forefoot surgery: audit of 1000 cases. *Foot Ankle Int* 2004; 25(11):788–94
25. Derner R, Buckholz J. Surgical hemostasis by pneumatic ankle tourniquet during 3027 podiatric operations. *J Foot Ankle Surg* 1995; 34(3):236–46
26. Odinson A, Finsen V. The position of the tourniquet on the upper limb. *J Bone Joint Surg Br* 2002; 84(2):202–4

27. Fitzgibbons PG, DiGiovanni C, Hares S, Akelman E. Safe tourniquet use: a review of the evidence. *J Am Acad Orthop Surg* 2012; 20:310-19
28. Sharma JP, Salhotra R. Tourniquets in orthopedic surgery. *Indian J Orthop* 2012; 46(4):377-83
29. Flatt AE. Tourniquet time in hand surgery. *Arch Surg* 1972; 104(2):190-2
30. Whitehead DJ, MacDonald SJ. TKA sans tourniquet: let it bleed: opposes. *Orthopedics* 2011; 34(9):497-9
31. Konrad G, Markmiller M, Lenich A, Mayr E, Rüter A. Tourniquets may increase postoperative swelling and pain after internal fixation of ankle fractures. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 433:189-94
32. Hoogeslag RAG, Brouwer RW, van Raay JJ. The value of tourniquet use for visibility during arthroscopy of the knee: a double-blind, randomized controlled trial. *Arthrosc J Arthroscopy Relat Surg* 2010; 26(9):S67-72
33. Smith TO, Hing CB. Should tourniquets be used in upper limb surgery? A systematic review and meta-analysis. *Acta Orthop Belg* 2009; 75(3):289-96
34. Tetro AM, Rudan JF, Iorio R, Healy WL. Tourniquet use during total knee arthroplasty did not reduce total blood loss. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83(8):1282
35. Smith TO, Hing CB. Is a tourniquet beneficial in total knee replacement? A meta-analysis and systematic review. *Knee* 2010; 17:141-7
36. Doyle GS, Taillac PP. Tourniquets: a review of current use with proposals for expanded prehospital use. *Prehosp Emerg Care*. 2008; 12(2):241-56.
37. Thomson AE, Doupe J. Some factors affecting the auscultatory measurement of arterial blood pressures. *Canadian J Res* 1949; 27:72-80
38. Shaw JA, Murray DG. The relationship between tourniquet pressure and underlying soft-tissue pressure in the thigh. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64:1148-52
39. Blønd L, Jensen NV, Søb Nielsen NH. Clinical consequence of different exsanguination methods in hand surgery: a double-blind randomized study. *J Hand Surg Eur* 2008; 33:475-7
40. Cox C, Yao J. Tourniquet usage in upper extremity surgery. *J Hand Surg* 2010; 35(8):1360-1.
41. Lu CW, Chen YS, Wang MJ. Massive pulmonary embolism after application of Esmarch bandage. *Anesth Analg* 2004; 98:1187-9
42. Blønd L, Madsen L. Bone marrow perfusion in healthy subjects assessed by scintigraphy after application of a tourniquet. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:460-4
43. Garabekyan T, Oliashirazi A, Winters K. The value of immediate preoperative vascular examination in at-risk patient for total knee arthroplasty. *Orthopedics* 2011; 34:52
44. Finsen V, Kasseth AM. Tourniquets in forefoot surgery: less pain when placed at the ankle. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79(1):99-101
45. Karalezli N, Ogun CO, Ogun TC, Yildirim S, Tuncay I. Wrist tourniquet: the most patient-friendly way of bloodless hand surgery. *J Trauma* 2007; 62(3):750-4
46. Norman D, Greenfield I, Ghayeb N, Peled E, Dayan L. Use of a new exsanguination tourniquet in internal fixation of distal radius fractures. *Tech Hand Up Extrem Surg* 2009; 13(4):173-5
47. Eidelman M, Katzman A, Bialik V. A novel elastic exsanguination tourniquet as an alternative to the pneumatic cuff in pediatric orthopedic limb surgery. *J Pediatr Orthop B* 2006; 15(5):379-84
48. Orlbay H, Unlu RE, Kerem M, Sensoz O. Clinical experiences with a new tourniquet device. *Ann Plast Surg* 2006; 56(6):616-21
49. Rhys-Davies NC, Stotter AT. The Rhys-Davies exsanguinator. *Ann R Coll Surg Engl* 1985; 67(3):193-5
50. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury* 2012; 43(6):670-5
51. Younger AS, McEwen JA, Inkpen K. Wide contoured thigh cuffs and automated limb occlusion measurement allow lower tourniquet pressures. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 428:286-93

52. Reilly CW, McEwen JA, Leveille L, Perdios A, Mulpuri K. Minimizing tourniquet pressure in pediatric anterior cruciate ligament reconstructive surgery: A blinded, prospective randomized controlled trial. *J Pediatr Orthop* 2009; 29(3):275-80
53. McEwen JA, Kelly DL, Jordanowski T, Inkpen K. Tourniquet safety in lower leg applications. *Orthop Nurs* 2002; 21(5):61-2
54. Pedowitz RA, Gershuni DH, Botte MJ, Kuiper S, Rydevik BL, Hargens AR. The use of lower tourniquet inflation pressures in extremity surgery facilitated by curved and wide tourniquets and an integrated cuff inflation system. *Clin Orthop Relat Res* 1993; 287:237-44
55. Mc Laren AC, Rorabeck CH. The pressure distribution under tourniquets. *J Bone Joint Surg Am* 1985; 67:433-38
56. Tuncali B, Karci A, Tuncali BE, Mavioglu O, Ozkan M, Bacakoglu AK, et al. A new method for estimating arterial occlusion pressure in optimizing pneumatic tourniquet inflation pressure. *Anesth Analg* 2006; 102(6):1752-7
57. Ochoa J, Fowler TJ, Gilliatt RW. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J Anat* 1972; 113(3):433-55
58. Rorabeck CH. Tourniquet-induced nerve ischemia: An experimental investigation. *J Trauma* 1980; 20(4):280-6
59. Pedowitz RA. Tourniquet-induced neuromuscular injury: A recent review of rabbit and clinical experiments. *Acta Orthop Scand Suppl* 1991; 245:1-33
60. Crenshaw AH. Surgical techniques and approaches. *Campbell's operative orthopaedics*. 1998; 1:3-122
61. Graham B, Breault MJ, McEwen JA, McGraw RW. Occlusion of arterial flow in the extremities at subsystolic pressures through the use of wide tourniquet cuffs. *Clin Orthop Relat Res* 1993; (286):257-61
62. Ishii Y, Noguchi H, Takeda M. Clinical use of a new tourniquet system for foot and ankle surgery. *Int Orthop* 2010; 34:355-9
63. DeBaKey ME, Simeone FA. Battle injuries of the arteries in World War II: an analysis of 2471 cases. *Ann Surg* 1946; 123(4):534-79
64. Better OS. The crush syndrome revisited (1940-1990). *Nephron* 1990; 55(2):97-103
65. Heppenstall RB, Balderston R, Goodwin C. Pathophysiologic effects distal to a tourniquet in the dog. *J Trauma* 1979; 19(4):234-8
66. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM. Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62(3):385-388
67. Nitz AJ, Dobner JJ, Matulionis DH. Pneumatic tourniquet application and nerve integrity: Motor function and electrophysiology. *Exp Neurol* 1986; 94(2):264-79
68. Patterson S, Klenerman L, Biswas M, Rhodes A. The effect of pneumatic tourniquets on skeletal muscle physiology. *Acta Orthop Scand* 1981; 52(2):171-5
69. Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, Park YS, Sokolow D. Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery: A biochemical and ultrastructural study. *J Bone Joint Surg Am* 1985; 67(2):303-14
70. Chiu D, Wang HH, Blumenthal MR. Creatine phosphokinase release as a measure of tourniquet effect on skeletal muscle. *Arch Surg* 1976; 111(1):71-4
71. Jacobson MD, Pedowitz RA, Oyama BK, Tryon B, Gershuni DH. Muscle functional deficits after tourniquet ischemia. *Am J Sports Med* 1994; 22(3): 372-7
72. Mohler LR, Pedowitz RA, Lopez MA, Gershuni DH. Effects of tourniquet compression on neuromuscular function. *Clin Orthop Relat Res* 1999; (359):213-20
73. Heppenstall RB, Scott R, Sapega A, Park YS, Chance B. A comparative study of the tolerance of skeletal muscle to ischemia: Tourniquet application compared with acute compartment syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68(6):820-8

74. Pedowitz RA, Gershuni DH, Schmidt AH, Fridén J, Rydevik BL, Hargens AR. Muscle injury induced beneath and distal to a pneumatic tourniquet: A quantitative animal study of effects of tourniquet pressure and duration. *J Hand Surg Am* 1991; 16(4):610-21
75. Patterson S, Klenerman L. The effect of pneumatic tourniquets on the ultrastructure of skeletal muscle. *J Bone Joint Surg Br* 1979; 61(2):178-83
76. Day RL, Zale BE. The effect of tourniquets on muscle enzymes during foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg* 1993; 32:280-5
77. Daniel DM, Lumkang G, Stone ML, Pedowitz RA: Effects of tourniquet use in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1995; 11(3):307-11
78. Horlocker TT, Hebl JR, Gali B, Jankowski CJ, Burkle CM, Berry DJ. Anesthetic, patient, and surgical risk factors for neurologic complications after prolonged total tourniquet time during total knee arthroplasty. *Anesth Analg* 2006; 102(3):950-5
79. Arciero RA, Scoville CR, Hayda RA, Snyder RJ. The effect of tourniquet use in anterior cruciate ligament reconstruction: A prospective, randomized study. *Am J Sports Med* 1996; 24(6):758-64
80. Zan PF, Yang Y, Fu D, Yu X, Li GD . Releasing of tourniquet before wound closure or not in total knee arthroplasty: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Arthroplasty* 2015; 30(1):31-7
81. Kirkley A, Rampersaud R, Griffin S, Amendola A, Litchfield R, Fowler P. Tourniquet versus no tourniquet use in routine knee arthroscopy: A prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Arthroscopy* 2000; 16(2):121-6
82. Kokki H, Väättäin U, Miettinen H, Parviainen A, Könönen M, Partanen J. Tourniquet-induced ENMG changes in arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: A comparison of low and high-pressure tourniquet systems. *Ann Chir Gynaecol* 2000; 89(4):313-7
83. Lin L, Wang L, Bai Y, Zheng L, Zhao X, Xiong X, Jin L, Ji W, Wang W. Pulmonary gas exchange impairment following tourniquet deflation: A prospective, single-blind clinical trial. *Orthopedics* 2010; 33(6):395
84. Vandenbussche E, Duranthon LD, Couturier M, Pidhorz L, Augereau B. The effect of tourniquet use in total knee arthroplasty. *Int Orthop* 2002; 26(5): 306-9
85. Weingarden SI, Louis DL, Waylonis GW. Electromyographic changes in postmeniscectomy patients: Role of the pneumatic tourniquet. *Jama* 1979; 241(12):1248-50
86. Estebe JP. The pneumatic tourniquet. *Surgical Techniques in Orthopaedics and Traumatology (EFORT)*. Ed Elsevier. 2002:55-010
87. Estebe JP, Malledant Y. Pneumatic tourniquets in orthopedics. *Ann Fr Anesth Reanim* 1996; 15:162-78.
88. Olivecrona C, Tidermark J, Hamberg P, Ponzer S, Cederfjäll C. Skin protection underneath the pneumatic tourniquet during total knee arthroplasty: a randomized controlled trial of 92 patients. *Acta Orthop* 2006; 77(3):519-23
89. Jeyaseelan S, Stevenson TM, Pfitzner J. Tourniquet failure and arterial calcification. Case report and theoretical dangers. *Anaesthesia* 1981; 36(1):48-50
90. Rajpura A, Somanchi BV, Muir LT. The effect of tourniquet padding on the efficiency of tourniquets of the upper limb. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89(4):532-4
91. Hubik DJ, Connors A, Cleland H. Iatrogenic chemical burns associated with tourniquet use and prep solution. *ANZ J Surg* 2009; 79:762
92. Chiang YC, Lin TS, Yeh MC. Povidone-iodine-related burn under the tourniquet of a child: a case report and literature review. *J Plast Reconst Aesthet Surg* 2011; 64:412-5
93. Rudolph H, Gaertner J. Hautschaeden nach Verwendung von Blutleeremanschetten. *Unfallchirurgie* 1990; 16(5):244-51
94. Koval KJ, Egol KA, Polatsch DB, Baskies MA, Homman JP, Hiebert RN. Tape blisters following hip surgery. A prospective, randomized study of two types of tape. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85(10):1884-7

95. Newman RJ, Muirhead A. A safe and effective low pressure tourniquet. A prospective evaluation. *J Bone Joint Surg Br* 1986; 68(4):625–8
96. Dickinson JC, Bailey BN. Chemical burns beneath tourniquets. *Br Med J* 1988;297 (6662):1513
97. Roth KE, Mandryka B, Maier GS, Maus U, Berres M, Rompe JD, et al. In-vivo analysis of epicutaneous pressure distribution beneath a femoral tourniquet--an observational study. *BMC Musculoskelet Disord* 2015; 16(1):1-6
98. Smith J, Greaves I. Crush injury and crush syndrome: a review. *J Trauma* 2003; 54(5):S226-30
99. Mohler LR, Pedowitz RA, Ohara WM, Oyama BK, Lopez MA, Gershuni DH. Effects of an antioxidant in a rabbit model of tourniquet-induced skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1996; 60(1):23-8
100. Nitz AJ, Dobner JJ. Upper extremity tourniquet effects in carpal tunnel release. *J Hand Surg Am* 1989; 14:499-504
101. Dobner JJ, Nitz AJ. Postmeniscectomy tourniquet palsy and functional sequelae. *Am J Sports Med* 1982; 10:211-4
102. Noordijn S, McEwen JA, Kragh JF, Eisen A, Masri BA. Surgical tourniquets in orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91:2958-67
103. Nitz AJ, Matulionis DH. Ultrastructural changes in rat peripheral nerve following pneumatic tourniquet compression. *J Neurosurg* 1982; 57(5):660-6
104. Pedowitz RA, Nordborg C, Rosenqvist AL, Rydevik BL. Nerve function and structure beneath and distal to a pneumatic tourniquet applied to rabbit hindlimbs. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1991; 25(2):109-120
105. Saunders KC, Louis DL, Weingarden SI, Waylonis GW. Effect of tourniquet time on postoperative quadriceps function. *Clin Orthop Relat Res* 1979; 143:194-9
106. Gavriely N. Surgical tourniquets in orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92(5):1318-23
107. Drosos GI, Stavropoulos NI, Kazakos K, Tripsianis G, Ververidis A, Verettas DA. Silicone ring versus pneumatic cuff tourniquet: A comparative quantitative study in healthy individuals. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011; 131(4):447-54
108. Mittal P, Shenoy S, Sandhu JS. Effect of different cuff widths on the motor nerve conduction of the median nerve: An experimental study. *J Orthop Surg Res* 2008; 3:1
109. Clarke MT, Longstaff L, Edwards D, Rushton N. Tourniquet-induced wound hypoxia after total knee replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83:40-4
110. Papaioannou N, Kalivas L, Kalavritinos J, Tsourvakas S. Tissue concentrations of third-generation cephalosporins (ceftazidime and ceftriaxone) in lower extremity tissues using a tourniquet. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994; 113(3):167–9
111. Friedman RJ, Friedrich LV, White RL, Kays MB, Brundage DM, Graham J. Antibiotic prophylaxis and tourniquet inflation in total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 260:17–23
112. Bannister GC, Auchincloss JM, Johnson DP, Newman JH. The timing of tourniquet application in relation to prophylactic antibiotic administration. *J Bone Joint Surg Br* 1988; 70(2):322–4
113. Akinyoola AL, Adegbehingbe OO, Odunsi A. Timing of antibiotic prophylaxis in tourniquet surgery. *J Foot Ankle Surg* 2011; 50(4):374–6
114. Saied A, Mousavi AA, Arabnejad F, Heshmati AA. Tourniquet in surgery of the limbs: a review of history, types and complications. *Iran Red Crescent Med J* 2015; 17(2):e9588
115. Bosco JA, Slover JD, Haas JP. Monografías AAOS-SECOT 2012, N°2: Infecciones. Coord: Horwich DS, Cordero J. Capítulo 2: Estrategias perioperatorias para la disminución de infecciones: un enfoque amplio basado en evidencias. Ed. SECOT. ISBN: 978-84-695-4612-3
116. Gilliam JN, Streeter RN, Papich MG, Washburn KE, Payton ME. Pharmacokinetics of florfenicol in serum and synovial fluid after regional intravenous perfusion in the distal portion of the hind limb of adult cows. *Am J Vet Res* 2008; 69:997-1004

117. Soriano A, Bori G, García-Ramiro S, Martinez-Pastor JC, Miana T, Codina C, et al. Timing of antibiotic prophylaxis for primary total knee arthroplasty performed during ischemia. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1009-14
118. Haglund U, Lungren O. Intestinal ischemia and shock factors. *Fed Proc* 1978; 37(13): 2729-33
119. Ahmed SM, Ahmad R, Case R, Spencer RF. A study of microbial colonization of orthopaedic tourniquets. *Ann R Coll Surg Engl* 2009; 91(2):131-4
120. Brennan SA, Walls RJ, Smyth E, Mulla TA, O'Byrne JM. Tourniquets and exsanguinators: a potential source of infection in the orthopedic operating theater? *Acta Orthop* 2009; 80(2):251-5
121. Sahu SK, Tudu B, Mall PK. Microbial colonisation of orthopaedic tourniquets: a potential risk for surgical site infection. *Indian J Med Microbiol* 2015; 33(5):115
122. Thompson SM, Middleton M, Farook M, Cameron-Smith A, Bone S, Hassan A. The effect of sterile versus non-sterile tourniquets on microbiological colonisation in lower limb surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 2011; 93(8): 589-590
123. Aglietti P, Baldini A, Vena LM, Abbate R, Fedi S, Falciani M. Effect of tourniquet on activation of coagulation in total knee replacement. *Clin Orthop* 2000; 371:169-77
124. Li B, Wen Y, Wu H, Qian Q, Lin X, Zhao H. The effect of tourniquet use on hidden blood loss in total knee arthroplasty. *Int Orthop* 2009; 33(5):1263-8
125. Hirota K, Hashimoto H, Kabara S, Tsubo T, Sato Y, Ishihara H, Matsuki A. The relationship between tourniquet time and pulmonary emboli in patients undergoing knee arthroscopic surgeries. *Anesth Analg* 2001; 93(3):776-80
126. Padala PR, Rouholamin E, Mehta RL. The role of drains and tourniquet in primary total knee replacement: a comparative study of TKR performed with drains and tourniquet versus no drains and adrenaline and saline infiltration. *J Knee Surg* 2004; 17:24-7
127. Valli H, Rosenberg PH, Kytta J, Nurminen M. Arterial hypertension associated with the use of tourniquet with either general or regional anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1987; 31(4):279-83
128. Gupta K, Aggarwal N, Rao M, Verma UC, Anand R. Re-emphasizing the importance of tourniquet time: severe myocardial depression following tourniquet deflation. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52(6):873
129. Demers C, Marcoux S, Ginsberg JS, Laroche F, Cloutier R, Poulin J. Incidence of venographically proved deep vein thrombosis after knee arthroscopy. *Arch Intern Med* 1998; 158(1):47-50
130. Kato N, Nakanishi K, Yoshino S, Ogawa R. Abnormal echogenic findings detected by transesophageal echocardiography and cardiorespiratory impairment during total knee arthroplasty with tourniquet. *Anesthesiology* 2002; 97(5):1123-8
131. Nishiguchi M, Takamura N, Abe Y, Kono M, Shindo H, Aoyagi K. Pilot study on the use of tourniquet: a risk factor for pulmonary thromboembolism after total knee arthroplasty. *Thromb Res* 2005; 115:271-6
132. Jules-Elysee K, Blanck TJ, Catravas JD, Chimento G, Miric A, Kahn R. Angiotensin-converting enzyme activity: a novel way of assessing pulmonary changes during total knee arthroplasty. *Anesth Analg* 2004; 99(4):1018-22
133. Reikeras O, Clementsen T. Thrombosis markers in hip versus knee arthroplasty: a pilot study. *J Orthop Surg* 2009; 17:291-5
134. Kageyama K, Nakajima Y, Shibasaki M, Hashimoto S, Mizobe T. Increased platelet, leukocyte, and endothelial cell activity are associated with increased coagulability in patients after knee arthroplasty. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4):738-45
135. Johnson GJ, Leis LA, Bach RR. Tissue factor activity of blood mononuclear cells increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost* 2009; 102:728-34
136. Katsumata S, Nagashima M, Kato K, Tachihara A, Wauke K, Saito S. Changes in coagulation fibrinolysis marker and neutrophil elastase following the use of tourniquet during total knee arthroplasty and influence of neutrophil elastase on thromboembolism. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49(4):510-6

137. Sparling RJ, Murray AW, Choksey M. Raised intracranial pressure associated with hypercarbia after tourniquet release. *Br J Neurosurg* 1993; 7:75–7
138. Guyton CG, Hall JE. Tratado de fisiología médica fisiología. 11º edición. Elsevier, 2006. ISBN 9788481749267
139. López JR, Rojas B, González MA, Terzic A. Myoplasmic Ca^{2+} concentration during exertional rhabdomyolysis. *Lancet* 1995; 345(8947):424–5.
140. Mela L. Mitochondrial function in shock, ischemia and hypoxia. *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia*. Williams and Wilkins Company. Baltimore, 1982.
141. Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. *Crit Care Clin* 2004; 20(1):171–9
142. Varani J, Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock* 1994; 2(5):311–9
143. Westlin WF, Gimbrone MA. Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation. *Am J Pathol* 1993; 142:117–28
144. Ascer E, Gennaro M, Cupo S, Mohan C. Do cytokines play a role in skeletal muscle ischemia and reperfusion? *J Cardiovasc Surg* 1992; 33:588–92
145. Ascer E, Mohan C, Gennaro M, Cupo S. Interleukin-1 and thromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Ann Vasc Surg* 1992; 6:69–73
146. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements for tumor necrosis-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol* 1993; 143(2):453–63
147. Yi ES, Ulich TR. Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *Am J Pathol* 1992; 140:659–63
148. Zhang F, Hu EC, Gerzenshtein J, Lei MP, Lineaweaver WC. The expression of proinflammatory cytokines in the rat muscle flap with ischemia–reperfusion injury. *Ann Plast Surg* 2005; 54(3):313–7
149. Zhang F, Hu EC, Topp S, Lei M, Chen W, Lineaweaver WC. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. *J Reconstr Microsurg* 2006; 22(8):641–7
150. Berrón R, Penagos M, Zaragoza JM, Rodríguez J, Blancas L. El sistema del complemento. Vías clásica y de la lectina que se une a la manosa. *Alergia e Inmunol Pediatr* 2003; 12(2):46–52
151. Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol* 1999; 19:173–98
152. Rubin BB, Smith AN, Liauw SH, Isenman DA, Romaschin AD, Walker PM. Complement activation and white cell sequestration in postischemia skeletal muscle. *Am J Physiol* 1990; 259(2):H525–31
153. Hansch GM, Seitz M, Betz M. Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor inducing cell proliferation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82:317–20
154. Hänsch GM, Seitz M, Martinotti G, Betz M, Rauterberg EW, Gemsa D. Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E_2 , and thromboxane in response to late complement components. *J Immunol* 1984; 133(4):2145–50
155. Kyriakides C, Austen W, Wang Y, Favuzza J, Kobzik L, Moore FD, et al. Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex. *Am J Physiol* 1999; 277(6):C1263–8
156. Kyriakides C, Austen WG, Wang Y, Favuzza J, Moore FD, Hechtman HB. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000; 48(1):32–8

157. Kyriakides C, Wang Y, Austen WG, Favuzza J, Kobzik L, Marsh H. Moderation of skeletal muscle reperfusion injury by a sLe(x)-glycosylated complement inhibitory protein. *Am J Physiol* 2001; 281:C224–30
158. Lindsay TF, Hill JA, Ortiz FE, Rudolph A, Valeri CR, Hechtman HB, et al. Blockade of complement activation prevents local and pulmonary albumin leak after lower torso ischemia–reperfusion. *Ann Surg* 1992; 216(6):677–83
159. Nielsen EW, Mollnes TE, Harlan JM, Winn RK. C1-inhibitor reduces the ischemia–reperfusion injury of skeletal muscles in mice after aortic cross-clamping. *Scand J Immunol* 2002; 56:588–92
160. Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. A potent C5a receptor antagonist inhibits markers of local and remote organ injury following tourniquet-induced limb ischemia–reperfusion in rats. *J Surg Res* 2004; 116:81–90
161. Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:351–9
162. Heideman M, Norder-Hansson B, Bengtson A, Mollnes TE. Terminal complement complexes and anaphylatoxins in septic and ischemic patients. *Arch Surg* 1988; 123:188–92
163. Huberman A. Biología de los Radicales de Oxígeno. En: Díaz-Zagoya DC, Hicks-Gómez JJ: Bioquímica. México. Ed. Interamericana-Mc Graw Hill, 1995. ISBN 9789682521003
164. Mc Cord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985; 17:159-62
165. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surg* 1983; 94:407-11
166. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia–reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255(6):H1269-75
167. Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism, a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol* 1999; 14:1321–40
168. Smith JK, Carden DL, Korthuis RJ. Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989; 257(6):H1782-9
169. Mc Cord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983; 94:407-11
170. Brawn K, Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand* 1980; 492:9-18
171. Gilbert D, Gerschman R, Cohen J, Sherwood W. “The influence of high oxygen pressures on viscosity of solutions of sodium desoxyribonucleic acid and sodium alginate. *J Am Chem Soc* 1957; 79:5677-80
172. Matsumara G, Herp A, Pigman W. Depolymerisation of hyaluronic acid by autooxidants and radiations. *Radiat Res* 1966; 28:735-52
173. Allen J, Goodman D, Besarab A, Rasmussen H. Studies on biochemical basis of oxygen toxicity. *Biochem Biophys Acta* 1973; 320:334-40
174. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12): 1819-28
175. Peters J, Foote C. Chemistry of superoxide ion. Reaction with hydroperoxides. *J Am Chem Soc* 1976; 98: 873-5
176. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 9:14S–22
177. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999; 49:91–102
178. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 2007; 28(8):340-5
179. Babior BM. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 2002; 4(11):1023-4
180. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry* 2004; 69:4–9

181. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92:3007–17
182. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77:598–625
183. Wright DG, Gallin JI. A functional differentiation of human neutrophil granules: generation of C5a by a specific (secondary) granule product and inactivation of C5a by azurophil (primary) granule products. *J Immunol* 1977; 119:1068–76
184. Oseas R, Yang HH, Baehner RL, Boxer LA. Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood* 1981; 57:939–45
185. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, et al. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 1994;83: 1640–9
186. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320:365–76
187. Harris NR. Opposing effects of L-NAME on capillary filtration rate in the presence or absence of neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 273:1320-5
188. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthius RJ. Inflammatory responses to ischemia, and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998; 179:169–87
189. Gonzalez D. Crush Syndrome. *Crit Care Med* 2005; 33(1):S34-41
190. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190(3):255-66
191. Fantini GA, Conte MS. Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg* 1995; 61:316-9
192. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 1996; 79: 560-9
193. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Wolitzky BA, Granger DN. Endothelial cell adhesion molecule expression in gene targeted mice. *Am J Physiol* 1997; 273:1903-8
194. Foulds S, Mireskandari M, Kalu P, Jackson W, Cheshire NJ, Mansfield AO, et al. Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res* 1998; 75(2):170-6
195. Upperman JS, Deitch EA, Guo W, Lu Q, Xu D. Posthemorrhagic shock mesenteric lymph is cytotoxic to endothelial cells and activates neutrophils. *Shock* 1998; 10:407-14
196. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2529-34
197. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirc* 1997; 4:359-67
198. Bulkley GB. Mesenteric vascular insufficiency. *Curr Probl Surg* 1997; 34:943-90
199. Bruner, JM. Safety factors in the use of the pneumatic tourniquet for hemostasis in surgery of the hand. *J Bone Joint Surg* 1951; 33:221-4
200. Kam PC, Kavanagh R, Yoong FF. The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia* 2001; 56:534–45
201. Tai TW, Chang CW, Lai KA, Lin CJ, Yang CY. Effects of tourniquet use on blood loss and soft-tissue damage in total knee arthroplasty: a randomized controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2012; 94(24):2209-15
202. Liu D, Graham D, Gillies K, Gillies RM. Effects of tourniquet use on quadriceps function and pain in TKA. *Knee Surg Relat Res* 2014; 26(4):207-13
203. Schache MB, McClelland JA, Webster KE. Lower limb strength following total knee arthroplasty: a systematic review. *Knee* 2014; 21(1):12-20
204. Kumar N, Yadav C, Singh S, Kumar A, Vaithlingam A, Yadav S. Evaluation of pain in bilateral total knee replacement with and without tourniquet; a prospective randomized control trial. *J Clin Orthop Trauma* 2015; 6(2):85–8

205. Dennis DA, Kittelson AJ, Yang CC, Miner TM, Kim RH, Stevens-Lapsley JE. Does tourniquet use in TKA affect recovery of lower extremity strength and function? A randomized trial. *Clin Orthop Relat Res* 2016; 474(1):69-77
206. Ledin H, Aspenberg P, Good L. Tourniquet use in total knee replacement does not improve fixation, but appears to reduce final range of motion. *Acta Orthop* 2012; 83:499-503
207. Smith TO, Hing CB. The efficacy of the tourniquet in foot and ankle surgery? A systematic review and meta-analysis. *Foot Ankle Surg* 2010; 16(1):3-8.
208. Saied A, Zyaei A. Tourniquet use during plating of acute extraarticular tibial fractures: effects on final results of the operation. *J Trauma* 2010; 69(6):E94-7
209. Omeroglu H, Gunel U, Bicimoglu A, Tabak AY, Ucaner A, Guney O. The relationship between the use of tourniquet and the intensity of postoperative pain in surgically treated malleolar fractures. *Foot Ankle Int* 1997; 18(12):798-802
210. Omeroglu H, Ucaner A, Tabak AY, Guney O, Bicimoglu A, Gunel U. The effect of using a tourniquet on the intensity of postoperative pain in forearm fractures. A randomized study in 32 surgically treated patients. *Int Orthop* 1998; 22(6):369-73
211. Zhang W, Li N, Chen S, Tan Y, Al-Aidaros M, Chen L. The effects of a tourniquet used in total knee arthroplasty: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2014; 9:13
212. Chen S, Li J, Peng H, Zhou J, Fang H, Zheng H. The influence of a half-course tourniquet strategy on peri-operative blood loss and early functional recovery in primary total knee arthroplasty. *Int Orthop* 2014; 38: 355-9
213. Ejaz A, Laursen AC, Kappel A, Laursen BM, Jakobsen T, Rasmussen S, Nielsen PT. Faster recovery without the use of a tourniquet in total knee arthroplasty. *Acta Orthop* 2014; 85:422-6
214. Parvizi J, Diaz-Ledezma C. Total knee replacement with the use of a tourniquet: more pros than cons. *Bone Joint J* 2013; 95(11S):133-4.
215. Maffulli N, Testa V, Capasso G. Use of a tourniquet in the internal fixation of fractures of the distal part of the fibula. A prospective, randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75(5):700-3
216. Pollard BJ, Lovelock HA, Jones RM. Fatal pulmonary embolism secondary to limb exsanguination. *Anesthesiology* 1983; 58(4):373-4
217. Samaan HA. Pulmonary embolism under general anaesthesia, following Esmarch bandage in injuries of lower limb. *Anaesthesia* 1970; 25(3):445
218. Darmanis S, Papanikolaou A, Pavlakis D. Fatal intra-operative pulmonary embolism following application of an Esmarch bandage. *Injury* 2002; 33(9):761-4
219. Abdel-Salam A, Eyres KS. Effects of tourniquet during total knee arthroplasty. A prospective randomised study. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77(2):250-3
220. Reikeras O, Clemensen T. Time course of thrombosis and fibrinolysis in total knee arthroplasty with tourniquet application. Local versus systemic activations. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 28(4):425-8
221. Wauke K, Nagashima M, Kato N, Ogawa R, Yoshino S. Comparative study between thromboembolism and total knee arthroplasty with or without tourniquet in rheumatoid arthritis patients. *Arch Orthop Trauma Surg* 2002; 122(8):442-6
222. Fukuda A, Hasegawa M, Kato K, Shi D, Sudo A, Uchida A. Effect of tourniquet application on deep vein thrombosis after total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007; 127(8):671-5
223. Hirota K, Hashimoto H, Tsubo T, Ishihara H, Matsuki A. Quantification and comparison of pulmonary emboli formation after pneumatic tourniquet release in patients undergoing reconstruction of anterior cruciate ligament and total knee arthroplasty. *Anesth Analg* 2002; 94(6):1633-8
224. Hernandez AJ, de Almeida AM, Favaro E, Sguizzato GT. The influence of tourniquet use and operative time on the incidence of deep vein thrombosis in total knee arthroplasty. *Clinics* 2012; 67(9):1053-7
225. Fahmy NR, Patel DG. Hemostatic changes and postoperative deep-vein thrombosis associated with use of a pneumatic tourniquet. *J Bone Joint Surg Am* 1981; 63(3):461-5

226. Déry R, Pelletier J, Jacques A, Clavet M, Houde JJ. Metabolic changes induced in the limb during tourniquet ischaemia. *Can Anaesth Soc J* 1965; 12(4):367-78
227. Müller M, Schmid R, Nieszpaur-Los M, Fassolt A, Lönnroth P, Fasching P, Eichler HG. Key metabolite kinetics in human skeletal muscle during ischaemia and reperfusion: Measurement by microdialysis. *Eur J Clin Invest* 1995; 25(8):601-7
228. Mathru M, Dries DJ, Barnes L, Tonino P, Sukhani R, Rooney MW. Tourniquet induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery: An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. *Anesthesiology* 1996; 84(1):14-22
229. Korth U, Merkel G, Fernandez FF, Jandewerth O, Dogan G, Koch T, Klein J. Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology* 2000; 93(6):1407-12
230. Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-55
231. Mc Cord JM, Keele BB, Fridovich I. An enzyme base theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 1974; 41:35-97
232. Sumner JB, Dounce AL. Crystalline catalase. *Science* 1937; 85(2206):366-7
233. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Phys Rev* 1970; 50(3):319-75
234. Cisneros E. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Invest Biome* 1995; 14(1):0
235. Deune EG, Koopman R, Smith ME, Hong SP, Ozbek MR, Khouri RK. Prevention of ischemia-reperfusion injury with a synthetic metalloprotein superoxide dismutase mimic, SC52608. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98(4):711-8
236. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle. *J Surg Res* 2011; 171(1):175-82
237. Hickey MJ, Knight KR, Lepore DA, Hurley JV, Morrison WA. Influence of post-ischemic administration of oxygen free radical antagonists on ischemic injury to rabbit skeletal muscle. *Microsurgery* 1996; 17(9):517-23
238. Flaherty J, Pitt B, Gruber J, Heuser R, Rothbaum D, Burwell L et al. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89(5):1982-91
239. Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, et al. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharm Exp Ther* 2001; 298(3):894-9
240. Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993; 91(2):456-64
241. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58(1):87-114
242. Reimer KA, Jennings RB. Failure of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol to limit infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1985; 71(5):1069-75
243. Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sainz RM, Mayo JC, Leon J. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol* 2004; 56(2):159-70
244. Chen LJ, Gao YQ, Li XJ, Shen DH, Sun FY. Melatonin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. *J Pineal Res* 2005; 39(1):34-42
245. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res* 2005; 39(1):57-65
246. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Zhang X, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J Surg Res* 2011; 171(1):108-13
247. Burks H, Peukert S. Analogue-Based Drug Discovery II. Ed. Fischer J, Ganellin CR. *Chem Med Chem* 2011; 7(1):171

248. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, Atay OA, Doral MN, Salman MA, Kilinç K, Aypar U. Effect of low-dose N-acetyl-cysteine infusion on tourniquet-induced ischaemiareperfusion injury in arthroscopic knee surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49(6): 847–51
249. Koca K, Yurttas Y, Cayci T, Bilgic S, Kaldirim U, Durusu M. The role of preconditioning and N-acetylcysteine on oxidative stress resulting from tourniquet-induced ischemia-reperfusion in arthroscopic knee surgery. *J Trauma* 2011; 70(3):717–23
250. Erturk E, Cekic B, Geze S, Kosucu M, Coskun I, Eroglu A. Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Anaesth* 2009; 26(4):279–84
251. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek* 2004; 57(9-10):453-5
252. Cruz J, Minoja G, Okuchi K, Facco E. Successful use of the new high-dose mannitol treatment in patients with Glasgow Coma Scale scores of 3 and bilateral abnormal pupillary widening: a randomized trial. *J Neurosurg* 2004; 100(3):376-83
253. Shah DM, Bock DE, Darling RC, Chang BB, Kupinski AM, Leather RP. Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia-reperfusion injuries in humans. *Cardiovasc Surg* 1996; 4(1):97-100
254. Liu JH, Chen MM, Huang JW, Wann H, Ho LK, Pan WH, et al. Therapeutic effects and mechanisms of action of mannitol during H₂O₂-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26(3):249-57
255. Westman B, Weidenhielm L, Rooyackers O, Fredriksson K, Wernerman J, Hammarqvist F. Knee replacement surgery as a human clinical model of the effects of ischaemia/reperfusion upon skeletal muscle. *Clinical Science* 2007; 113:313–8
256. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radic Biol Med* 1986; 2(2):419-44
257. Lee JY, Kim CJ, Chung MY. Effect of high-dose vitamin C on oxygen free radical production and myocardial enzyme after tourniquet ischaemia-reperfusion injury during bilateral total knee replacement. *J Int Med Res* 2010; 38:1519–29
258. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiology Biochem* 2001; 57(2):43–56
259. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(1):16-21
260. Novelli GP, Adembri C, Gandini E, Orlandini SZ, Papucci L, Formigli L et al. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg*. 1997; 173(3):206-9
261. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5):1124-36
262. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or late stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88(3):1264-72
263. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72(6):1293-9
264. Wang WZ, Guo SZ, Anderson GL, Miller FN. The initiating factors of late preconditioning in the microcirculation of skeletal muscle. *J Surg Res* 2001; 99(1):92-9
265. Wang WZ, Fang XH, Stepheson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. NOSs upregulation attenuates vascular endothelial dysfunction in the late phase of ischemic preconditioning in skeletal muscle. *J Orthop Res* 2004; 22(3):578-85
266. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 342(8866):276-7
267. Heizmann O, Meimarakis G, Volk A, Matz D, Oertli D, Schauer RJ. Ischemic preconditioning-induced hyperperfusion correlates with hepatoprotection after liver resection. *World J Gastroenterol* 2010; 16(15):1871-8

268. Murphy T, Walsh PM, Doran PP, Mulhall KJ. Transcriptional responses in the adaptation to ischemia-reperfusion injury: A study of the effect of ischemic preconditioning in total knee arthroplasty patients. *J Transl Med* 2010; 8:46
269. Zahir TM, Zahir KS, Syed SA, Restifo RJ, Thomson JG. Ischemic preconditioning of musculocutaneous flaps: effects of ischemia cycle length and number of cycles. *Ann Plast Surg* 1998; 40(4):430-5
270. Saita Y, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *Br J Plast Surg* 2002; 55(3):241-5
271. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, Pottecher J. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 2012; 55(2):497-505
272. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury: a review. *J Surg Res* 2008; 150(2):304-30
273. Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(1):58-65
274. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109(4):1344-51
275. Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, Scott JR, Albion CD, Forbes TL. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(3):371-9
276. Kocman EA, Ozatik O, Sahin A, Guney T, Kose AA, Dag I, et al. Effects of ischemic preconditioning protocols on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2015; 193(2):942-52
277. Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB, Carlsen RC. The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(7):1767-75
278. Lepore DA, Morrison WA. Ischemic preconditioning: lack of delayed protection against skeletal muscle ischemia reperfusion. *Microsurgery* 2000; 20(7):350-5
279. Bushell AJ, Klennerman L, Taylor S, Davies H, Grierson I, Helliwell TR, et al. Ischaemic preconditioning of skeletal muscle. Protection against the structural changes induced by ischaemia/reperfusion injury. *J Bone Joint Surg Br* 2002; 84(8):1184-8
280. Kuntscher MV, Kastell T, Engel H, Gebhard MM, Heitmann C, Germann G. Late remote ischemic preconditioning in rat muscle and adipocutaneous flap models. *Ann Plast Surg* 2003; 51(1):84-90
281. Badhwar A, Dungey AA, Harris KA, Scott JA, McCarter SD, Scott JR. Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. *J Surg Res* 2003; 109(1):62-7
282. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(4):H1435-43
283. Zhang F, Oswald T, Holt J, Gerzenshtein J, Lei MP, Lineaweaver WC. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann Plast Surg* 2004; 52(6):609-13
284. Harralson T, Grossi FV, Quan EE, Tecimer T, Perez-Abadia G, Anderson G, et al. Ischemic preconditioning of skeletal muscle: duration of late-phase protection. *Ann Plast Surg* 2005; 55(2):216-22
285. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte-endothelial cell interactions: role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J* 2006; 70(8):1070-5
286. Webster RS, Montero EF, Fagundes DJ, Zettler CG, Coiro J. The role of ischemic preconditioning at the gracilis muscle of rats in the early phase of reperfusion injury. *Acta Cir Bras* 2006; 21(2):80-6
287. Schoen M, Rotter R, Gierer P, Gradl G, Strauss U, Jonas L, et al. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma* 2007; 63(4):788-97

288. Szabó A, Varga R, Keresztes M, Vízler C, Németh I, Rázga Z, et al. Ischemic limb preconditioning downregulates systemic inflammatory activation. *J Orthop Res* 2009; 27(7):897-902
289. Wang WZ, Anderson G, Firrell JC, Tsai TM. Ischemic preconditioning versus intermittent reperfusion to improve blood flow to a vascular isolated skeletal muscle flap of rats. *J Trauma* 1998; 45(5):953-9
290. Khanna A, Cowled PA, Fitridge RA. Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: Current controversies (research review). *J Surg Res* 2005; 128(1):98-107
291. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ.. Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. *Circulation* 2006; 113(7):1015-9
292. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: Efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295(2):R681-9
293. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth* 2015; 114(2):204-16
294. Park, JW, Kang JW, Jeon WJ Na HS. Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery* 2010; 30: 223-9
295. Lintz JA, Dalio MB, Joviliano EE, Piccinato CE. Ischemic pre and postconditioning in skeletal muscle injury produced by ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras* 2013; 28(6):441-6
296. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth*. 1992; 68(6):613-8
297. Cheng YJ, Wang YP, Chien CT, Chen CF. Small-dose propofol sedation attenuates the formation of reactive oxygen species in tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury under spinal anesthesia. *Anesth Analg* 2002; 94(6):1617-20
298. Aldemir O, Celebi H, Cevik C, Duzgun E. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anaesth Scand* 2001; 45(10):1221-5
299. Arnaoutoglou H, Vretzakis G, Souliotis D, Cambili M, Galaris D, Papadopoulos G. The effects of propofol or sevoflurane on free radical production after tourniquet induced ischaemia reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Belg* 2007; 58:3-6
300. Turan R, Yagmurdu H, Kavutcu M, Dikmen B. Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur J Anaesth* 2007; 24(2):185-9
301. Yagmurdu H, Ozcan N, Dokumaci F, Kilinc K, Yilmaz F, Basar H. Dexmedetomidine reduces the ischemia-reperfusion injury markers during upper extremity surgery with tourniquet. *J Hand Surg* 2008; 33(6): 941-7
302. Bostankolu E, Ayoglu H, Yurtlu S, Okay RD, Erdogan G, Deniz Y. Dexmedetomidine did not reduce the effects of tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury during general anesthesia. *Kaohsiung J Med Sci* 2013; 29(2):75-81
303. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, Doral MN, Kilinc K, Aypar U. Ketamine sedation during spinal anesthesia for arthroscopic knee surgery reduced the ischemia-reperfusion injury markers. *Anesth Analg* 2005; 101(3):904-9
304. Mas E, Barden AE, Corcoran TB, Phillips M, Roberts LJ, Mori TA. Effects of spinal or general anesthesia on F(2)-isoprostanes and isofurans during ischemia/reperfusion of the leg in patients undergoing knee replacement surgery. *Free Radical Bio Med* 2011; 50(9):1171-6
305. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003; 9(12):1498-505
306. Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin mediated nitrite reduction. *J Biol Chem* 2003; 278(47):46349-56

307. van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, et al. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev* 2009; 29(5):683-741
308. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, et al. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* 2007; 204:2089.
309. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, et al. Nitrite anion provides potent cytoprotective and anti-apoptotic effects as adjunctive therapy to reperfusion for acute myocardial infarction. *Circulation* 2008; 117(9):2986-102
310. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Zhang X, Williams SJ, Baynosa RC, et al. Nitrite attenuates I/R induced microcirculatory alterations and mitochondrial dysfunction in microvasculature. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128(4):279-87
311. Mathru M, Huda R, Solanki DR, Hays S, Lang JD. Inhaled nitric oxide attenuates reperfusion inflammatory responses in humans. *Anesthesiology* 2007; 106(2):275–282
312. Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, Moore TH, Burke M, Davey Smith G, et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1:CD004816
313. Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 2004; 15(5):251-8
314. Dillon JP, Laing AJ, Chandler JR, Wang JH, McGuinness A, Redmond HP. Pravastatin attenuates tourniquet-induced skeletal muscle ischemia reperfusion injury. *Acta Orthop* 2006; 77(1):27-32
315. Köksoy C, Oziş E, Cakmak A, Yazgan U, Okcu-Heper A, Köksoy A, et al. Simvastatin pretreatment reduces the severity of limb ischemia in an experimental diabetes model. *J Vas Surg* 2007; 45(3):590-6
316. Cowled PA, Khanna A, Laws PE, Field JB, Varelias A, Fitridge RA. Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg Res* 2007; 141(2):267-76
317. Jones SR, Carpin KM, Woodward SM, Khiabani KT, Stephenson LL, Wang WZ, et al. Hyperbaric oxygen inhibits ischemia-reperfusion induced neutrophil CD18 Polarization by a nitric oxide mechanism. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(2):403-11
318. Kawamura N, Schmelzer JD, Wang Y, Schmeichel AM, Low PA. The therapeutic window of hypothermic neuroprotection in experimental ischemic neuropathy: protection in ischemic neuropathy and potential deterioration in later reperfusion phase. *Exp Neurol* 2005; 185(2):305–12
319. Henderson PW, Jimenez N, Ruffino J, Sohn AM, Weinstein AL, Krijgh DD, et al. Therapeutic delivery of hydrogen sulfide for salvage of ischemic skeletal muscle after the onset of critical ischemia. *J Vasc Surg* 2011; 53(3):785-91
320. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000; 71(1-2):121–138
321. Gross RL, Reid JV, Newberne PM, Burgess B, Marston R, Hift W. Depressed cell-mediated immunity in megaloblastic anemia due to folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 1975; 28(3):225-32
322. Blencowe H, Cousens S, Modell B, Lawn J. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* 2010; 39(1):110-21
323. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989; 262(20):2847-52
324. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007; 13(2):163–74
325. Altmäe S, Stavreus-Evers A, Ruiz JR, Laanpere M, Syvänen T, Yngve A, et al. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertil. Steril.* 2010; 94(1):130-7
326. Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol* 2005; 19(1):59–65

327. Christen WG, Glynn RJ, Chew EY, Albert CM, Manson JE. Folic acid, pyridoxine, and cyanocobalamin combination treatment and age-related macular degeneration in women: the Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 2009; 169(4):335–41
328. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer* 2005; 113(5):825–8
329. Wang R, Zheng Y, Huang JY, Zhang AQ, Zhou YH, Wang JN. Folate intake, serum folate levels, and prostate cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *BMC Public Health* 2014; 14(1):1326
330. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92:2825–30
331. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. *Lancet* 2013; 381(9871):1029–36
332. Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Arch Intern Med* 2010; 170(18):1622–31
333. Bazzano LA. No effect of folic acid supplementation on cardiovascular events, cancer or mortality after 5 years in people at increased cardiovascular risk, although homocysteine levels are reduced. *Evid Based Med* 2011; 16(4):117–8
334. Frei E, Jaffe N, Tattersall MH, Pitman S, Parker L. New approaches to cancer chemotherapy with methotrexate. *N Engl J Med* 1975; 292(16):846–51
335. Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363(9410):675–81
336. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Apecechea A, Méndez JJ. Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperfusión. *Cir Esp* 1992; 51: 262–5
337. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Ortiz J, Méndez JJ. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidantes en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enferm Dig* 1991; 80:237–41
338. San Cristóbal, Cearra I, Otero B, Martínez-Astorquiza T, Marín H, García-Alonso I. El flujo como indicador del efecto terapéutico del ácido folínico en la isquemia-reperfusión. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(1): 25–32
339. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourdain D, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1999; 276:1567–73
340. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:276–82
341. Wajima T, Shimizu S, Hiroi T, Ishii M, Kiuchi Y. Reduction of myocardial infarct size by tetrahydrobiopterin: possible involvement of mitochondrial KATP channels activation through nitric oxide production. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47(2):243–9
342. Moat SJ, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Lang D. Folic acid reverses endothelial dysfunction induced by inhibition of tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 2006; 530(3):250–8
343. Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86(11):1129–34
344. Shirodaria C, Antoniades C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM, et al. Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2007; 115(17):2262–70

345. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2001; 15;30(12):1390-9
346. Duffy ME, Hoey L, Hughes CF, Strain JJ, Rankin A, Souverein OW, et al. Biomarker responses to folic acid intervention in healthy adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2014; 99(1):96-106
347. Moat SJ, Madhavan A, Taylor SY, Payne N, Allen RH, Stabler SP, et al. High- but not low-dose folic acid improves endothelial function in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2006; 36(12):850-9
348. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. *Pediamécum*. Edición 2015. Ácido folínico. Disponible en: <http://www.pediamecum.es>. Consultado por última vez en Marzo 2016
349. J N Hathcock. Vitamins and minerals: efficacy and safety. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(2):427-37
350. Bushell A, Klenerman L, Davies H, Grierson I, Jackson MJ. Ischemia reperfusion-induced muscle damage: Protective effect of corticosteroids and antioxidants in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1996; 67(4):393-8
351. Duarte JA, Glöser S, Remião F, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, et al. Administration of tourniquet: I. Are edema and oxidative stress related to each other and to the duration of ischemia in reperfused skeletal muscle? *Arch Orthop Trauma Surg* 1997; 116(1-2):97-100
352. Fish JS, McKee NH, Pynn BR, Kuzon WM, Plyley MJ. Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia. *J Surg Res* 1989; 47(4):365-70
353. Gersoff WK, Ruwe P, Jokl P, Panjabi M. The effect of tourniquet pressure on muscle function. *Am J Sports Med* 1989; 17(1):123-7
354. Crawford RS, Hashmi FF, Jones JE, Albadawi H, McCormack M, Eberlin K, et al. A novel model of acute murine hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(2):830-7
355. Murata I, Ooi K, Sasaki H, Kimura S, Ohtake K, Ueda H, et al. Characterization of systemic and histologic injury after crush syndrome and intervals of reperfusion in a small animal model. *J Trauma*. 2011; 70(6):1453-63
356. McCormack MC, Kwon E, Eberlin KR, Randolph M, Friend DS, Thomas AC, et al. Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury. *Surgery* 2008; 143(1):126-33
357. Bonheur JA, Albadawi H, Patton GM, Watkins MT. A noninvasive murine model of hind limb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2004; 116(1):55-63
358. Teng D, Hornberger TA. Optimal temperature for hypothermia intervention in mouse model of skeletal muscle ischemia reperfusion injury. *Cell Mol Bioeng* 2011; 4(4):717-23
359. Van M, Olguner C, Koca U, Sişman AR, Muratli K, Karci A, et al. Ischaemic preconditioning attenuates haemodynamic response and lipid peroxidation in lower-extremity surgery with unilateral pneumatic tourniquet application: a clinical pilot study. *Adv Therap* 2008; 25(4): 355–66
360. Lin LN, Wang LR, Wang WT, Jin LL, Zhao XY, Zheng LP, et al. Ischemic preconditioning attenuates pulmonary dysfunction after unilateral thigh tourniquet-induced ischemia-reperfusion. *Anesth Analg* 2010; 111(2):539–43
361. Sagara G, Ogikubo O, Takeyama, Tada T, Suzuki N, Okamoto H. Comparison of effects of ischemia period in rat limb ischemia/reperfusion injury. *Nagoya Med J* 2009; 50:83-91
362. Mowafi HA, Ismail SA. Melatonin improves tourniquet tolerance and enhances postoperative analgesia in patients receiving intravenous regional anesthesia. *Anesth Analg* 2008; 107(4) 1422–6
363. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. New York, 1999
364. Refaai MA, Wright RW, Parvin CA, Gronowski AM, Scott MG, Eby CS. Ischemia-modified albumin increases after skeletal muscle ischemia during arthroscopic knee surgery. *Clin Chim Acta* 2006; 366(1-2):264–8

365. Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ, et al. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity: an animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1992; 90:2502–7
366. Mori TA, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. An improved method for the measurement of urinary and plasma F2-isoprostanes using gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 268(1):117–125
367. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000; 19(4):311–5
368. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366:1-15
369. Holt S, Moore K. Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: The role of myoglobin. *Exp Nephrol* 2000; 8(2):72-6
370. Bolant B, Calvo MA, Cejalvo D, Gimeno L, Gimeno O, Ouris M. Hematología y bioquímica clínica de la rata. *Research in Surgery* 1983; 3: 29-36 y 1990; 4: 12-20.
371. Russell T. Acute renal failure to rhabdomyolysis: pathophysiology, diagnostic, and collaborative management. *Nephrol Nurs J* 2005; 32(4):409-17
372. Brancaccio P, Giuseppe L. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48:757-67.
373. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78(3):206–9
374. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86:271-8
375. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999; 178(2):147-50
376. Nunes-Silva A, Bernardes PTT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, et al. Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e96464.
377. Pass D, Freeth G. The rat. *Anzccart news* 1993; 6(4):1-4
378. Flores PL et al. A non-invasive methods to record vital signs in rats. *Vet Max* 2002; 33(2):179-87
379. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica del Folidan. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/60118/FT_60118.pdf. Consultado por última vez el 15 de Abril de 2016.
380. Chace Greene E. *Anatomy of the rat*. Hafner Press. New York, 1963
381. Laurence AS. Serum myoglobin and creatine kinase following surgery. *Br J Anaesth* 2000; 84(6):763-6
382. Cohen RG, Katz JA, Skrepnik NV. The relationship between skeletal muscle serum markers and primary THA: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467(7):1747-52