



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA**

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MELATONINA
SOBRE MARCADORES DE DAÑO CELULAR EN LA
MUCOSA GÁSTRICA EN CONDICIONES DE
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

PRESENTA:

M. en C. EDUARDO PEÑA MERCADO

DIRECTORA:

DRA. NOHRA E. BELTRÁN VARGAS

ASESORES:

DRA. CLAUDIA H. GONZÁLEZ DE LA ROSA

DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO

DR. MARIO GARCÍA LORENZANA

CIUDAD DE MÉXICO

2021

Jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana para evaluar la tesis que presentó:

Nombre del Alumno: M. en C. Eduardo Peña Mercado

Fecha de aprobación:

Jurado:

Dr. Eustacio Galileo Escobedo González

Presidente

Dr. Emilio Sacristán Rock

Secretario

Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar

Vocal

Esta tesis doctoral fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado de enero 2017 a marzo 2021 principalmente en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 22 del mes septiembre del año 2021, el que suscribe Eduardo Peña Mercado, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente tesis doctoral intitulada; "Evaluación del efecto de la Melatonina sobre marcadores de daño celular en la mucosa gástrica en condiciones de isquemia-reperfusión" realizada bajo la dirección de la Dra. Nohra E. Beltrán Vargas y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: nbeltran@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



M. en C. Eduardo Peña Mercado

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Eduardo Peña Mercado, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta tesis doctoral son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras personas excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



M. en C. Eduardo Peña Mercado

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Eduardo Peña Mercado, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Eduardo Peña Mercado.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Peña Mercado', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a horizontal line extending from the end.

M. en C. Eduardo Peña Mercado

Nombre y firma del alumno

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM.

A la Dra. Nohra E. Beltrán Vargas, directora del trabajo, por su confianza, dedicación, paciencia y apoyo brindado durante mis estudios en Licenciatura, Maestría y Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado por medio de la beca número 340584 durante el periodo de 01 de enero de 2017 al 31 de diciembre de 2020.

Al comité tutorial: Dra. Claudia H. González de la Rosa, Dra. Elena Aréchaga Ocampo y Dr. Mario García Lorenzana por su apoyo, orientación y aportaciones para mejorar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Emilio Sacristán Rock por permitirnos realizar las cirugías en el quirófano experimental del Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica. Al Mtro. Andrés Morón, Mtro. Martín Ramírez y a la Ing. Brenda Galán por brindarnos apoyo para los experimentos.

A la Dra. Concepción Sánchez por permitirnos trabajar en el Laboratorio de Investigación en Biología del desarrollo y teratogénesis experimental del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

A la Dra. Sara Huerta, a la Bióloga Anahis Cruz, a la M. en C. Mayra Montecillo y al Biólogo Experimental Daniel Hernández, por su apoyo para realizar el análisis inmunohistoquímico en la Unidad de Investigación de Enfermedades Hematológicas del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Alejandra Mercado y Antonio Peña, a mis hermanos Cesar y Teresa Peña por su apoyo incondicional, por haber estado siempre conmigo en momentos difíciles.

A Nohra y a Mario por haber guiado mi formación académica y brindarme su amistad durante este trayecto.

A Nancy Viveros por su apoyo ilimitado en mi vida y en mi formación.

A Liliana Neri por estar siempre conmigo y alentarme con sus palabras.

A Claudia, Elena, Jimena, Cynthia, Carlos, Xavier y Rafael por su apoyo, consejos y amistad durante este camino.

A Lizbeth por apoyarme, motivarme y creer siempre en mí. A Alexa y Paola por su amistad.

A todas las personas que compartieron conmigo una etapa de su vida.

Contenido

Resumen.....	XVII
1 Introducción	1
2 Antecedentes	4
2.1 Estado de choque	4
2.2 Fisiopatología del síndrome de disfunción orgánica múltiple	8
2.3 Daño celular generado por isquemia/reperfusión	10
2.4 Daño tisular generado por isquemia/reperfusión.....	12
2.5 Daño en la mucosa gástrica inducido por isquemia/reperfusión.....	13
2.6 Reparación del daño tisular	14
2.7 Melatonina	15
2.8 Efecto de la melatonina sobre el daño en la mucosa gástrica generado por isquemia/reperfusión.....	17
2.9 Bioimpedancia eléctrica	17
2.9.1 Espectroscopía de impedancia eléctrica.....	18
2.9.2 Propiedades eléctricas de los tejidos.....	19
2.9.3 La impedancia como una función de la frecuencia	20
2.9.4 Propiedades eléctricas del tejido isquémico.....	21
2.9.5 Parámetros de impedancia gástrica	24
2.10 Métodos de cuantificación del daño en la mucosa gástrica inducido por I/R.....	26
2.11 Biomarcadores de daño generado por isquemia/reperfusión.....	26
2.11.1 Óxido nítrico sintasa inducible	26
2.11.2 Factor de Necrosis Tumoral – alpha	27
2.11.3 Ciclooxygenasa -2	28
3 Justificación	29
4 Pregunta de investigación	30
5 Hipótesis.....	30
6 Objetivo general	30
7 Objetivos particulares	30
8 Materiales y métodos experimentales	31
8.1 Protocolo de experimentación	31
8.1.1 Definición de la población objetivo.....	31
8.1.2 Diseño estadístico del muestreo	31

8.2	Diseño experimental	33
8.3	Proceso de captación de información	36
8.3.1	Espectroscopía de impedancia gástrica	36
8.3.2	Técnica histológica	36
8.3.3	Tinción Hematoxilina – Eosina	36
8.3.4	Tinción Ácido Peryódico de Schiff-Azul Alcían	36
8.3.5	Inmunohistoquímica	37
8.3.6	Western blot	37
8.3.7	Ensayo de apoptosis (TUNEL)	37
8.4	Procedimientos	38
8.4.1	Espectros de impedancia gástrica	38
8.4.2	Análisis histológico cualitativo	38
8.4.3	Análisis cuantitativo a partir del ILT	38
8.4.4	Análisis cuantitativo de la tinción de mucinas con técnica de PAS-AA	39
8.4.5	Análisis inmunohistoquímico cuantitativo	40
8.4.6	Análisis inmunofluorescencia ensayo de apoptosis TUNEL	40
8.4.7	Análisis estadístico	40
9	Resultados	41
9.1	Obtención de la escala para asignar la puntuación del ILT	41
9.2	Validación del ILT	43
9.3	Análisis de impedancia gástrica de los grupos Control, Isq 60, 90 y 120 min.	44
9.4	Análisis histológico para identificar el tiempo de isquemia en el cual el daño puede ser revertido	46
9.5	Análisis histológico cuantitativo (ILT)	48
9.6	Efecto de la producción de mucinas en diferentes tiempos de isquemia	48
9.7	Relación entre los parámetros de impedancia gástrica con la puntuación del ILT ...	50
9.8	Obtención del umbral predictivo para identificar el daño irreversible a partir de los parámetros de impedancia y la puntuación del ILT	51
9.9	Análisis inmunohistoquímico de la expresión de iNOS	54
9.10	Análisis inmunohistoquímico de la expresión de TNF α	55
9.11	Análisis inmunohistoquímico de la expresión de COX-2	56
9.12	Detección de apoptosis por medio del ensayo de TUNEL	57
9.13	Detección de Caspasa-3-activa por medio de Western blot	58

9.14	Efecto de la MT sobre las mediciones de los parámetros de impedancia gástrica de los grupos Sham, I/R e I/R+MT	59
9.15	Efecto de la MT sobre el daño en la mucosa gástrica inducido por I/R	60
9.16	Análisis histológico cuantitativo (ILT) de los grupos Sham, I/R e I/R+MT	62
9.17	Efecto de la MT sobre la producción de mucinas en condiciones de I/R	62
9.18	Relación de los parámetros de impedancia gástrica y el ILT de los grupos Sham, I/R e I/R+MT	64
9.19	Efecto de la MT sobre la expresión de iNOS en condiciones de I/R	65
9.20	Efecto de la MT sobre la expresión de TNFα en condiciones de I/R.....	65
9.21	Efecto de la MT sobre la expresión de COX-2 en condiciones de I/R.....	66
9.22	Efecto de la MT sobre la proliferación en condiciones de I/R.....	67
9.23	Efecto de la MT sobre la apoptosis inducida por I/R.....	68
9.24	Efecto de la MT sobre la activación de Caspasa-e inducida por I/R	69
10	Discusión	70
11	Conclusiones	78
12	Perspectivas	79
13	Referencias.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta celular a la isquemia

Figura 2. Síntesis de melatonina

Figura 3. Modelo de un circuito eléctrico en el tejido.

Figura 4. Regiones de dispersión.

Figura 5. Paso de la corriente eléctrica a bajas y a altas frecuencias a través del tejido.

Figura 6. Espectrómetro de impedancia y sonda nasogástrica para medir la impedancia de la mucosa gástrica.

Figura 7. Resistencia - reactancia en voluntarios sanos comparada con pacientes sin isquemia ni complicaciones, con respecto a pacientes que presentaron isquemia prolongada y que desarrollaron complicaciones dentro de los primeros 3 días en la unidad de cuidados intensivos.

Figura 8. Gráfico de Cole-Cole.

Figura 9. Zonas de dispersión en el gráfico de Cole – Cole y parámetros característicos.

Figura 10. Diseño experimental.

Figura 11. Fotomicrografías de cortes transversales de mucosa gástrica de rata.

Figura 12. Gráfica de caja-bigote para asignar la puntuación del índice de lesión tisular.

Figura 13. Curva ROC para categorizar el daño en la mucosa gástrica comparando el grupo control y los grupos experimentales.

Figura 14. Puntuación del ILT para el grupo Control y los experimentales.

Figura 15. Espectros de impedancia gástrica (resistencia y reactancia) y gráfica de Cole-Cole (resistencia vs reactancia) de los grupos Control, Isq 60, 90 y 120min.

Figura 16. Representación gráfica de los parámetros de impedancia de los grupos experimentales.

Figura 17. Fotomicrografías de cortes longitudinales y transversales de mucosa gástrica de los grupos experimentales.

Figura 18. Representación gráfica de la puntuación del ILT de los grupos experimentales.

Figura 19. Fotomicrografías de cortes longitudinales de mucosa gástrica teñidos con PAS-AA de los grupos experimentales.

Figura 20. Representación gráfica de la cuantificación del área AA-positiva y PAS-positiva de los grupos experimentales.

Figura 21. Curva ROC para predecir el grado de lesión en la mucosa gástrica a partir de la puntuación del ILT y los parámetros de impedancia a bajas y altas frecuencias.

Figura 22. Representación gráfica de la regresión lineal segmentada.

Figura 23. Comparación de la puntuación del índice de lesión tisular vs los parámetros de impedancia gástrica a bajas y altas frecuencias (R_L , R_H , X_L y X_H) en un modelo de isquemia prolongada.

Figura 24. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la expresión de iNOS en los grupos experimentales.

Figura 25. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la expresión de TNF α en los grupos experimentales.

Figura 26. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la expresión de COX-2 en los grupos experimentales.

Figura 27. Detección de fragmentación de DNA por técnica de TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*) y representación gráfica de la cuantificación del número de núcleos TUNEL-positivos en los grupos experimentales.

Figura 28. Inmunodetección por Western Blot y análisis cuantitativo de Caspasa-3-activa de los grupos experimentales.

Figura 29. Espectro de impedancia gástrica (resistencia y reactancia) de los grupos Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 30. Representación gráfica de los parámetros de impedancia gástrica (R_L y X_H) de los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 31. Fotomicrografías de corte longitudinal y transversal de mucosa gástrica de los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 32. Representación gráfica de la puntuación del ILT de los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 33. Fotomicrografías de cortes longitudinales de mucosa gástrica teñidos con PAS-AA de los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 34. Comparación de la puntuación del Índice de lesión tisular vs los parámetros de impedancia gástrica (R_L y X_H) en un modelo de I/R por 24 horas.

Figura 35. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la expresión de iNOS en los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 36. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la expresión de TNF α en los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 37. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la expresión de COX-2 en los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 38. Fotomicrografías representativas y representación gráfica de la cuantificación del número de células PCNA-positivas en los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 39. Detección de fragmentación de DNA por técnica de TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*) y representación gráfica de la cuantificación del número de núcleos TUNEL-positivos en los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Figura 40. Inmunodetección por Western Blot y análisis cuantitativo de Caspasa-3-activa de los grupos: I/R e I/R+MT.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de choque y etiología

Tabla 2. Tipos de muerte celular y características morfológicas

Tabla 3. Percentiles 25, 50, 75 y el rango intercuartil (RIC) de las variables cuantificadas

Tabla 4. Escala para indicar la puntuación para cada una de las variables.

Tabla 5. Relación entre los parámetros de impedancia gástrica y la puntuación del índice de lesión tisular (ILT) en los grupos Control, Isq 60, 90 y 120 min

Tabla 6. Análisis de la curva ROC de los parámetros de impedancia gástrica a bajas (R_L , X_L) y altas (R_H , X_H) frecuencias.

Tabla 7. Relación de los parámetros de impedancia gástrica y el índice de lesión tisular (ILT) de los grupos: Sham, I/R e I/R+MT.

Resumen

El estado de choque se refiere a una falla circulatoria potencialmente mortal causada por un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno celular. Una de las complicaciones asociadas a esta condición patológica es el daño en la mucosa gastrointestinal inducido por isquemia e isquemia/reperfusión (I/R), este tipo de lesión está estrechamente relacionado con una alta mortalidad en pacientes en estado crítico, la cual es atribuible, en parte, a la falta de un método diagnóstico que permita evidenciar de manera temprana el grado de lesión inducido por isquemia en este tipo de pacientes. Cuando la mucosa gastrointestinal se encuentra dañada puede presentarse la traslocación de bacterias hacia el torrente sanguíneo, lo que puede desencadenar un proceso de sepsis e inducir síndrome de disfunción orgánica múltiple.

Una alternativa terapéutica para reducir el grado de lesión inducido por I/R es la administración de melatonina (MT), la cual ha demostrado tener efectos gastroprotectores en modelos de I/R atribuidos a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas.

Para identificar alteraciones tempranas en la mucosa gástrica inducidas por isquemia en este tipo de pacientes, se ha propuesto el uso de la espectroscopía de impedancia eléctrica (EIE), la cual es el estudio de las propiedades eléctricas pasivas del tejido biológico en función de la frecuencia. La impedancia es el efecto total de 2 dimensiones ortogonales separadas: la resistencia eléctrica (R) que restringe el flujo de electrones y disipa energía y la reactancia eléctrica (X) que es la capacidad de las membranas de almacenar y liberar energía. La EIE permite caracterizar tejidos e identificar la progresión del daño tisular inducido por condiciones isquémicas.

En este trabajo se propuso un Índice de lesión tisular (ILT) que permite categorizar el grado de lesión inducido por I/R, para esto, se consideró la cuantificación de variables patológicas que afectan directamente las mediciones en los parámetros de impedancia.

Después, se analizaron los cambios en los parámetros de impedancia, las alteraciones tisulares y moleculares que nos permiten identificar el tiempo de isquemia en el cual la mucosa gástrica todavía mantiene su función de barrera. Los resultados mostraron que el daño tisular generado por un tiempo de isquemia mayor a 60 min induce la pérdida de la función de barrera en la mucosa gástrica por lo que el tratamiento farmacológico a partir de los 60 min de isquemia podría reducir el grado de lesión inducido por reperfusión.

Posteriormente, se evaluó el efecto del tratamiento con MT sobre las propiedades eléctricas, el grado de lesión, la expresión de marcadores de proceso inflamatorio, proliferación y apoptosis en la mucosa gástrica en condiciones de I/R. Se demostró que el tratamiento con MT aceleró el proceso de regeneración sobre lesiones moderadas inducidas en la mucosa gástrica por I/R al reducir el proceso inflamatorio y la muerte celular apoptótica. El proceso regenerativo inducido por la MT causó una disminución en las mediciones de los

parámetros de impedancia gástrica relacionados con el proceso inflamatorio y el daño celular.

1 Introducción

La falla orgánica múltiple es un síndrome clínico generado por varios estímulos y puede ser una consecuencia de la hipoperfusión tisular con hipoxia celular, disfunción metabólica y alteraciones en procesos bioenergéticos. El Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (SDOM) es considerado como la principal causa de morbilidad y mortalidad, con una incidencia del 72 % en pacientes en estado crítico dentro de las primeras 24 h de estancia en la unidad de cuidados intensivos (Sakr et al., 2012).

El estado de choque se refiere a una falla circulatoria potencialmente mortal causada por un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno celular. En pacientes en estado crítico se realiza el monitoreo de signos vitales, pruebas de coagulación y procedimientos hematopoyéticos para identificarlo. Sin embargo, existen dificultades para diagnosticarlo ya que los cambios fisiológicos que se presentan son sutiles (Lier et al., 2018), esto, debido a que en el organismo se activan mecanismos de compensación con los cuales se redistribuye la sangre hacia órganos vitales, generando isquemia gastrointestinal inducida por vasoconstricción en la circulación esplácnica (Lelubre & Vincent, 2018).

La lesión gastrointestinal por isquemia/reperfusión (I/R) es considerada como el factor inicial del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y el SDOM, el cual resulta en una alta mortalidad en la práctica clínica. Este tipo de lesión puede provocar disfunción de la barrera epitelial y al mismo tiempo causar daño grave a la mucosa, que aunado al inmunocompromiso presentado en pacientes en estado crítico, son la principal causa de complicaciones graves y muerte (Asrani et al., 2020). Este tipo de lesión está asociada con altas tasas de mortalidad que van del 60 al 90%, las cuales no han cambiado en los últimos 70 años. La alta mortalidad es atribuible, en parte, a la falta de una prueba diagnóstica predictiva que permita la detección temprana en aquellos pacientes con alto riesgo de isquemia gastrointestinal (Khadaroo et al., 2017).

El tratamiento en este tipo de pacientes está enfocado en perfundir nuevamente los tejidos afectados (Kislitsina et al., 2019); sin embargo, el retraso en la detección de los signos asociados al compromiso hemodinámico en el organismo, la demora en el tratamiento y el mismo tratamiento pueden precipitar el desarrollo de una lesión en el tracto gastrointestinal (Asrani et al., 2020). Como consecuencia, bacterias y mediadores tóxicos liberados de la mucosa lesionada pueden ser transportados a través de la circulación y de los ganglios linfáticos mesentéricos aumentando la posibilidad de sepsis y finalmente, provocar SDOM (Lelubre & Vincent, 2018).

Debido a las dificultades para diagnosticar de manera temprana la isquemia gastrointestinal, se ha propuesto el uso de la espectroscopía de impedancia eléctrica (EIE). La EIE es el estudio de las propiedades eléctricas pasivas del tejido biológico en función de la frecuencia. La impedancia es el efecto total de 2 dimensiones ortogonales separadas: la resistencia eléctrica (R) que restringe el flujo de electrones y disipa energía y la reactancia

eléctrica (X) que es la capacidad de las membranas de almacenar y liberar energía (Beltran et al., 2013). La EIE permite caracterizar tejidos e identificar la progresión del daño tisular inducido por condiciones isquémicas. En condiciones de privación de oxígeno, el edema celular es uno de los efectos tempranos que pueden identificarse por esta técnica. Si se excede la duración crítica, que varía según el tipo de órgano o célula, se producen alteraciones a nivel de las membranas que inducen la muerte, por lo que el grado de lesión está determinado por la magnitud y la duración de la isquemia (Wu et al., 2018). Los cambios en el volumen intra y extracelular, así como alteraciones en la integridad de las membranas celulares afectan directamente la R y la X, respectivamente. Nuestro equipo de trabajo ha utilizado la EIE para monitorizar y detectar el grado de lesión en la mucosa gástrica asociado a condiciones isquémicas en pacientes en estado crítico y en modelos murinos. En estos estudios, se ha observado el mayor incremento en la resistencia y la reactancia a bajas frecuencias en los pacientes isquémicos con complicaciones con respecto a los voluntarios sanos, pero la reactancia es más consistente y es el parámetro eléctrico más sensible al daño tisular (Beltran et al., 2010; Beltran et al., 2013).

Diversos factores están relacionados con la patogénesis del daño inducido por I/R, los cuales incluyen disfunción en el metabolismo energético, estrés oxidativo y nitrosativo, disfunción de enzimas antioxidantes, sobrecarga de calcio, apoptosis, producción de mediadores inflamatorios (citocinas, prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno) (Meng et al., 2020).

La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es una enzima independiente de calcio, la cual se expresa durante el proceso inflamatorio y condiciones hipóxicas. La sobreproducción de óxido nítrico (NO) en condiciones de reperfusión ha sido estrechamente relacionada con un incremento en el daño tisular en los tejidos afectados (Guo et al., 2019). El factor de necrosis tumoral- α (TNF α) es una citocina producida principalmente por macrófagos. Esta citocina juega un papel clave en condiciones patológicas como infecciones, lesiones, inflamación y desarrollo de tumores. Una vez liberada por los macrófagos activa otras células inmunes y media la producción de otras citocinas proinflamatorias. Además, se ha reportado que el incremento en la expresión de TNF α inducida por hipoxia aumenta la permeabilidad de células epiteliales intestinales y del tracto respiratorio *in vitro*, facilitando la difusión de antígenos bacterianos y toxinas que pueden causar inflamación (Bercier & Grenier, 2019). Mientras que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima que ha sido señalada como un marcador de proceso inflamatorio, debido a que su inducción es regulada por agentes inflamatorios como son endotoxinas y citocinas, además se ha identificado su incremento en condiciones de I/R gastrointestinal (Omayone et al., 2020).

La lesión por I/R gastrointestinal siempre va seguida de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales para reconstruir adecuadamente el epitelio; sin embargo, la insuficiente proliferación y regeneración para rescatar completamente la función de barrera

de la mucosa gastrointestinal puede verse reflejada en la alta tasa de mortalidad en la práctica clínica (Ji et al., 2019).

La melatonina (MT) (N-acetil 5-metoxitriptamina) es una hormona secretada por la glándula pineal que tiene un amplio papel regulador. Se han demostrado diversas funciones fisiológicas de la MT, incluida la regulación del ciclo circadiano y endocrino, antiinflamatorio, analgésico, ansiolítico y antioxidante (D'Angelo., 2020). La MT ha sido detectada en diferentes tejidos extrapineales incluyendo cerebro, plexos coroideos, retina, cristalino, cóclea, tracto gastrointestinal, piel, ovarios, linfocitos, macrófagos y células endoteliales. En el tracto gastrointestinal, la MT es producida en las células enterocromáfines y es independiente del ciclo circadiano (Ferlazzo et al., 2020), regula el transporte de iones y agua, proliferación epitelial, secreción de ácido y motilidad (Zhang et al., 2015).

En estudios preclínicos, se ha demostrado que tanto el pretratamiento (preventivo) como el tratamiento (correctivo) con MT, tiene efectos gastroprotectores después de inducir lesiones agudas en la mucosa gástrica por I/R; debido a sus propiedades antioxidantes, reduce el estrés oxidativo, incrementa la activación de enzimas antioxidantes y la producción de prostaglandinas, además de disminuir en la infiltración de neutrófilos y la apoptosis de células de la mucosa gástrica (Shahrokhi et al., 2016; Mubarak et al., 2018).

2 Antecedentes

2.1 Estado de choque

El estado de choque es un síndrome en el cual una deficiencia aguda de la perfusión tisular vital debido a la disfunción hemodinámica conduce al deterioro metabólico y funcional progresivo que, de no ser revertido, conduce a la muerte. En pacientes en estado crítico se realiza el monitoreo de signos vitales, pruebas de coagulación y procedimientos hematopoyéticos para identificarlo. Sin embargo, existen dificultades para diagnosticarlo ya que los cambios fisiológicos que se presentan son sutiles (Lier et al., 2018), esto, debido a que en el organismo se activan mecanismos de compensación con los cuales se redistribuye la sangre hacia órganos vitales, generando isquemia gastrointestinal inducida por vasoconstricción en la circulación esplácnica (Lelubre & Vincent, 2018). La incidencia anual del choque de cualquier etiología es de 0.3 a 0.7 por 1000 pacientes, siendo el choque hemorrágico el tipo más común en la unidad de cuidados intensivos (Taghavi & Askari, 2021). Existen diferentes tipos de choque los cuales son mencionados a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Tipos de choque y etiología

Tipo de choque	Característica	Etiología
Hipovolémico Subtipo: Hemorrágico	Disminución del volumen circulante	Vómito, diarrea, uso excesivo de diuréticos, hemorragias, sepsis, quemaduras.
Cardiogénico	Perfusión inadecuada debido a disfunción cardíaca	Infarto al miocardio, miocarditis, endocarditis, cardiomiopatía, arritmias, embolia pulmonar.
Circulatorio	Incapacidad del sistema vascular de irrigar adecuadamente los tejidos y órganos periféricos	Disminución del volumen sanguíneo, obstrucción del flujo sanguíneo, vasodilatación con redistribución del flujo.
Obstructivo	Obstrucción mecánica del flujo sanguíneo	Aneurisma desecante aórtico, taponamiento cardíaco, neumotórax.
Distributivo	Disfunción vasomotora	Pérdida del tono vasomotor, fármacos vasodilatadores, hipotensión, sepsis, lesión medular.
Neurogénico	Disfunción vasomotora	Lesiones cerebrales, anestesia general, hipoxia, falta de glucosa.
Anafiláctico	Secreción de sustancias vasodilatadoras y aumento de la permeabilidad capilar	Alergias farmacológicas o alimentarias.
Séptico	Infección grave y respuesta sistémica	Bacterias, hongos, virus.

El choque hipovolémico es el tipo más común de choque en niños debido a enfermedades diarreicas en el mundo en desarrollo (Taghavi & Askari, 2021). Este tipo de choque se

caracteriza por un volumen intravascular reducido, es decir, una precarga reducida, se produce cuando se pierde entre el 15 y el 20% del volumen sanguíneo circulante en forma aguda, como consecuencia, genera un gasto cardíaco insuficiente para mantener el metabolismo celular (Lier et al., 2018). El choque hipovolémico ocurre como resultado de la pérdida de sangre o del líquido extracelular la cual puede ocurrir cuando hay vómitos retracts, diarrea, terapia con diuréticos, quemaduras u otras lesiones cutáneas, obstrucción intestinal, pancreatitis, obstrucción de un sistema venoso mayor o cualquier otra condición patológica que resulte en una respuesta inflamatoria masiva (Taghavi & Askari, 2021). En caso de hemorragia, se puede presentar choque hemorrágico, que es clasificado como un subconjunto del choque hipovolémico, el cual se debe al agotamiento del volumen intravascular a través de la pérdida de sangre hasta el punto de no poder igualar la demanda de oxígeno de los tejidos (Hooper & Armstrong, 2020). La lesión traumática es, con mucho, la causa más común de choque hemorrágico. Otras causas incluyen sangrado gastrointestinal, sangrado de un embarazo ectópico, sangrado por intervención quirúrgica o sangrado vaginal (Taghavi & Askari, 2021).

El choque cardiogénico es una condición clínica de perfusión tisular inadecuada debido a la disfunción cardíaca y ocurre cuando la disfunción sistólica o diastólica de la acción del bombeo del corazón produce una disminución del gasto cardíaco (Simko & Culleiton, 2020). La causa más frecuente es el infarto al miocardio y puede producirse después de otras clases de choque asociados con el flujo sanguíneo inadecuado en los vasos coronarios o ser resultado de las sustancias secretadas por los tejidos isquémicos que comprometen la función del corazón (Porth, 2010). Otras causas del choque cardiogénico incluyen miocarditis, endocarditis, cardiomiopatía, ruptura cardíaca, arritmias, embolia pulmonar, taponamiento cardíaco, sobredosis de drogas o envenenamiento con sustancias que afectan la capacidad de bombeo del corazón (Simko & Culleiton, 2020).

El choque circulatorio puede describirse como la incapacidad del sistema vascular de aportar una irrigación adecuada a los tejidos y órganos periféricos. Esta afección no es una enfermedad específica sino un síndrome que puede desarrollarse durante la evolución de muchos trastornos que pueden ser fatales y puede ser consecuencia de una disminución del volumen sanguíneo (choque hipovolémico), una obstrucción del flujo sanguíneo en el aparato circulatorio (choque obstructivo) o una vasodilatación con redistribución del flujo (choque distributivo). El choque circulatorio produce respuestas fisiológicas compensatorias que terminan por descompensar los diversos estados de choque si no se instituye el tratamiento apropiado de forma urgente (Porth, 2010).

El choque obstructivo es producido por la obstrucción mecánica del flujo de sangre que corre por la circulación central; puede asociarse con varias etiologías, por ejemplo, aneurisma disecante de aorta, taponamiento cardíaco, neumotórax o evisceración de los contenidos abdominales en la cavidad torácica debido a la ruptura de un hemidiafragma. Se

ha observado que la embolia pulmonar es la causa más frecuente en este tipo de choque (Porth, 2010).

El choque distributivo, vasodilatador o normovolémico se caracteriza por una vasodilatación arteriolar excesiva que provoca la disminución de la resistencia vascular sistémica con la hipotensión resultante que conduce a una perfusión periférica inadecuada (Kislitsina et al., 2019). El tono vascular se pierde a causa de 2 razones principales: la disminución del control simpático del tono vasomotor y la presencia de sustancias vasodilatadoras en la sangre. Este tipo de choque también puede desencadenarse como consecuencia de hipotensión grave asociado a hemorragia, lo que se conoce como choque irreversible o fase tardía del choque hemorrágico. La sepsis es la causa más común del choque distributivo. También puede ocurrir después de una cirugía cardiovascular, lesión de medula espinal o surgir como consecuencia de anafilaxia o hipoperfusión prolongada. El manejo del choque distributivo implica el tratamiento de la causa subyacente, la reanimación del volumen y la infusión de vasopresores para mantener una presión sanguínea. Los médicos usan frecuentemente vasopresores catecolaminérgicos (noradrenalina, epinefrina, dopamina, dobutamina). Sin embargo, las catecolaminas tienen efectos adversos que incluyen isquemia y arritmias miocárdicas que pueden afectar los resultados (McIntyre et al., 2018).

Tres tipos de choque comparten el patrón circulatorio básico de la forma distributiva: el neurogénico, el anafiláctico y el séptico (Porth, 2010).

El choque neurogénico se produce por la disminución del control simpático del tono vascular como resultado de un defecto en el centro vasomotor del tronco encefálico o en la producción de los impulsos eferentes que controlan los vasos sanguíneos. La producción de impulsos en el centro vasomotor puede bloquearse por lesiones cerebrales, la acción de depresores, anestesia general, hipoxia o falta de glucosa. A diferencia de lo que se observa en el choque hipovolémico, en el neurogénico la frecuencia cardíaca suele ser menor que la normal y la piel está seca y caliente. Este tipo de choque es raro y por lo general transitorio (Porth, 2010).

El choque anafiláctico es un síndrome clínico que representa la reacción alérgica más grave. Ésta corresponde a un proceso inmunitario que desencadena la secreción de sustancias vasodilatadoras en la sangre, como histamina. Estas sustancias producen la vasodilatación de arteriolas y vénulas, así como un gran aumento en la permeabilidad capilar. Con frecuencia la respuesta vascular se asocia con edema laríngeo y broncoespasmos que pueden ser fatales, colapso circulatorio, contracción del músculo gastrointestinal, urticaria y angioedema (Porth, 2010).

El choque séptico es el tipo de choque más común, se asocia con infección grave y una respuesta sistémica contra la infección. A diferencia de otros tipos de choque, éste suele asociarse con complicaciones como insuficiencia pulmonar, coagulación intravascular

diseminada y SDOM. Además, se diferencia del choque hipovolémico y cardiogénico por presentar un gasto cardíaco normal o aumentado y una baja resistencia vascular sistémica. Independientemente de la causa, las tasas de mortalidad de los pacientes con choque siguen siendo altas, que van del 40% al 60% para aquellos con choque séptico y se acercan al 40% para aquellos con choque hemorrágico (Wacker & Winters, 2014). En pacientes que se encuentran en choque séptico, se ha identificado una disminución importante en la producción de melatonina, lo que se relaciona con la gravedad de la sepsis, trastornos del sueño y delirio que se asocian con mayor mortalidad (Mistraletti et al., 2019).

En un estado temprano del choque, se produce una redistribución importante del flujo sanguíneo. La adaptación del sistema circulatorio a la hemorragia severa mantiene el flujo sanguíneo del sistema nervioso central y corazón, mientras que la sangre se desvía de otros lechos vasculares (piel, músculo esquelético, estómago, intestino, riñón) que pueden tolerar más fácilmente periodos de isquemia. La hipovolemia aguda compensada adecuadamente por la respuesta neuroendocrina es llamada choque compensatorio. A nivel celular, el choque compensatorio ocurre cuando la disminución del transporte arterial de oxígeno disminuye de manera crítica y los tejidos usan la vía anaerobia como fuente de energía. Bajo estas condiciones, la función celular se mantiene mientras que el rendimiento combinado de fuentes aeróbicas y anaeróbicas de energía proporcionen suficiente ATP para la síntesis de proteínas y procesos contráctiles. Varios tejidos son más resistentes a la hipoxia que otros. El intestino parece ser particularmente sensible a la disminución de la perfusión. La mucosa gástrica e intestinal muestra evidencia de metabolismo anaeróbico antes de que la disminución en el consumo de oxígeno sistémico sea detectada (Egan & Johnson, 2020; Taghavi & Askari, 2021).

El choque descompensado resulta en el daño tisular irreversible y ocurre cuando el suministro aeróbico y anaeróbico de ATP es insuficiente para mantener la función celular. Fallan las bombas de transporte iónico asociadas a membranas, en particular aquellas asociadas con la regulación de calcio y sodio, resultando en edema celular y la pérdida de la integridad membranal. Entre otros mecanismos que conducen a daño celular irreversible durante la hipoxia se encuentran la disminución de energía celular, acidosis celular y generación de ROS. Durante esta etapa, si la pérdida de volumen continúa o la resucitación con fluidos es inadecuada se desarrolla un círculo vicioso que conlleva al daño tisular irreversible y a la falla orgánica (Caraballo & Jaimes, 2019).

Los signos y síntomas del choque reflejan un suministro de oxígeno deteriorado y una perfusión orgánica disminuida. En un choque leve, la compensación fisiológica podría enmascarar estos déficits, lo que inicialmente da lugar a síntomas inespecíficos como malestar, debilidad y fatiga. A medida que el choque progresa y el paciente se descompensa, surgen signos y síntomas más clásicos que incluyen alteraciones en el estado mental, taquicardia, hipoxemia, disminución de la producción de orina e hipotensión. La perfusión inadecuada puede ocurrir a pesar de una lectura normal de la presión arterial,

especialmente en pacientes con hipertensión preexistente. Independientemente del mecanismo subyacente del choque, sino se reconoce y revierte la alteración de la perfusión y el suministro de oxígeno, la disfunción orgánica, la necrosis tisular y la muerte se producen rápidamente (Wacker & Winters, 2014).

El efecto general de un suministro de oxígeno sistémico inadecuado tiene implicaciones importantes para el metabolismo de los tejidos, aumentando la glucólisis anaerobia. Esto da como resultado una mayor producción de lactato como un subproducto del metabolismo del piruvato, ya que una menor cantidad entra al ciclo de Krebs. La hiperlactatemia, definida como una concentración sérica >2 mmol/L, se asocia con un mayor riesgo de muerte en pacientes con sepsis. El lactato se usa comúnmente como un indicador del estado de perfusión de los pacientes y su medición secuencial se incluye en el enfoque recomendado para este tipo de pacientes (Caraballo & Jaimes, 2019).

2.2 Fisiopatología del síndrome de disfunción orgánica múltiple

El SDOM se define como una disfunción fisiológica progresiva de 2 o más órganos en pacientes con enfermedades agudas, su etiología es compleja y depende de los factores del paciente, los factores de lesión y los factores de tratamiento. Puede desarrollarse en pacientes traumatizados después de un choque hemorrágico y posterior a la reanimación en el SRIS lo que puede inducir daño por reperfusión. El SDOM permanece como la causa principal de muerte en unidades de cuidados intensivos con una mortalidad entre 30% y 80% (Baez, 2019).

El choque hemorrágico es una condición patológica que causa disminución de la presión sanguínea, así como una baja perfusión en órganos viscerales. El suministro de sangre principalmente mantiene la función cerebral y cardíaca, dejando la circulación esplácnica con un suministro sanguíneo disminuido. La mucosa gastrointestinal es el primer sitio afectado durante el choque hemorrágico (Du et al., 2015). La isquemia gastrointestinal aguda afecta ampliamente a pacientes en estado crítico en las áreas de trauma, trasplante, cirugía cardíaca, choque y sepsis. Este tipo de lesión está asociada con altas tasas de mortalidad que van del 60 al 90%, las cuales no han cambiado en los últimos 70 años. La alta mortalidad es atribuible, en parte, a la falta de una prueba diagnóstica predictiva que pueda facilitar la detección temprana en aquellos pacientes con alto riesgo de isquemia gastrointestinal. Esto particularmente es relevante en aquellos que están en estado crítico donde los síntomas clásicos del dolor abdominal se ocultan debido a la sedación y la ventilación mecánica. Un diagnóstico anticipado puede dar como resultado un tratamiento más temprano que posiblemente prevenga la necesidad de cirugía o si la cirugía estuviera indicada, ocurriría antes, reduciendo la morbilidad y mortalidad. En pacientes en estado crítico, se ha demostrado que los marcadores convencionales de isquemia intestinal, lactato sérico y recuento de glóbulos blancos carecen de sensibilidad y especificidad (Salim et al., 2017); mientras que pruebas de diagnóstico, como la tomografía o la angiografía, exponen

a los pacientes al riesgo de nefropatía por contraste y tampoco son definitivas (Khadaroo et al., 2017).

La lesión gastrointestinal por isquemia/reperfusión (I/R) es considerada como el factor inicial del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y el SDOM, el cual resulta en una alta mortalidad en la práctica clínica. Este tipo de lesión puede provocar disfunción de la barrera epitelial y al mismo tiempo causar daño grave a la mucosa, que aunado al inmunocompromiso presentado en pacientes en estado crítico, son la principal causa de complicaciones graves y muerte (Asrani et al., 2020).

En las fases tempranas de la lesión, el daño tisular se caracteriza por la producción y liberación de una variedad de patrones moleculares asociados a daño (PMAD) que inducen a una respuesta inflamatoria temprana (Asrani et al., 2020; Du et al., 2015; Guisasola et al., 2015). El tratamiento en este tipo de pacientes está enfocado en perfundir nuevamente los tejidos afectados (Kislitsina et al., 2019); sin embargo, el retraso en la detección de los signos asociados al compromiso hemodinámico en el organismo, la demora en el tratamiento y el mismo tratamiento pueden precipitar el desarrollo de una lesión en el tracto gastrointestinal (Asrani et al., 2020). Como consecuencia, bacterias y mediadores tóxicos liberados de la mucosa lesionada pueden ser transportados a través de la circulación y de los ganglios linfáticos mesentéricos aumentando la posibilidad de sepsis y finalmente, provocar SDOM (Lelubre & Vincent, 2018).

La teoría del origen intestinal de la sepsis propone el modelo de los tres pasos. En este modelo, un estímulo inicial resulta en la hipoperfusión esplácnica (primer paso) convirtiendo al intestino en el mayor sitio de producción de factores proinflamatorios. La resucitación resulta en reperfusión que conduce a una lesión por I/R en el tracto gastrointestinal (segundo paso) que da como resultado la pérdida de función de barrera de la mucosa intestinal y por consiguiente un incremento en la respuesta inflamatoria intestinal. Una vez que las bacterias o endotoxinas cruzan la mucosa intestinal pueden generar un aumento en la respuesta inmune tal que el intestino se convierte en un órgano proinflamatorio liberando quimiocinas, citocinas y otros intermediarios proinflamatorios que afectan el sistema inmune local, así como sistémico (tercer paso), finalmente provocando SRIS y SDOM (Gatt et al., 2007).

Citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β son reguladores tempranos de la respuesta inmune y ambas inducen la liberación de citocinas secundarias tales como IL-6 e IL-8. Estas citocinas proinflamatorias parecen contribuir al comienzo del SRIS y la sepsis. Hay evidencia de que la liberación de citocinas hacia la circulación sistémica contribuye a la patogénesis del SDOM. Múltiples estudios demuestran la relación entre elevadas concentraciones de citocinas proinflamatorias y mortalidad (Binkowska et al., 2015). Debido a la aparición de TNF α e IL-6 en la respuesta inmune temprana, estas citocinas se han propuesto como potenciales biomarcadores predictivos tempranos para respuesta inflamatoria sistémica (Guisasola et al., 2015).

La evaluación del estado clínico de los pacientes se realiza monitorizando la función cardiovascular, respiratoria, renal y hepática a partir de la estimación de variables fisiológicas como la producción de orina, la saturación de oxígeno, la concentración de gases en sangre, la proteína C reactiva y el lactato. El inconveniente que se presenta al monitorizar estas variables es que sólo se pueden detectar cuando los pacientes presentan una clara alteración de los órganos (Giannoudis et al., 2004). Debido a que la detección de estas variables se observa de manera tardía, es importante identificar marcadores de daño isquémico temprano que ayuden a proporcionar un tratamiento adecuado.

2.3 Daño celular generado por isquemia/reperfusión

La isquemia se refiere a la pérdida del suministro de sangre hacia algún órgano del cuerpo, resultando en deficiencias de oxígeno, glucosa y otras sustancias requeridas para el metabolismo. La obstrucción del flujo sanguíneo arterial causa hipoxia y conduce a la disfunción de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. La disminución en la producción de ATP en la mitocondria induce el metabolismo anaerobio, por lo que se produce un nivel bajo de ATP y agentes antioxidantes en las células. Además, la retención de ácido láctico puede conducir a la acidosis metabólica. Adicionalmente, puede haber fallas en las bombas de sodio/potasio (Na^+/K^+ -ATPasa) y calcio (Ca^{2+} -ATPasa) en la superficie celular. La falla en la bomba Na^+/K^+ -ATPasa causa retención de sodio en las células y potasio fuera de ellas. Un alto nivel de sodio en las células disminuye la actividad del intercambiador de sodio/hidrógeno (Na^+/H^+). Las bombas Ca^{2+} -ATPasa sobre el retículo endoplásmico también se vuelven disfuncionales lo que limita la recaptación de calcio. En las células, la acumulación de los iones H^+ , Na^+ y Ca^{2+} causa hiperosmolaridad lo cual conduce el flujo de agua hacia el citoplasma y edema celular. La retención del H^+ disminuye el pH celular conduciendo hacia el deterioro de la actividad enzimática y la condensación de la cromatina. El desprendimiento de los ribosomas disminuye la síntesis de proteínas (Fig.1) (McMichael & Moore, 2004; Wu et al., 2018).

Después de la etapa de reperfusión, la restauración del flujo sanguíneo al tejido isquémico proporciona oxígeno a través de los eritrocitos. En paralelo, la generación de ROS (10-30 segundos después de la reperfusión) incrementa debido a la baja concentración de agentes antioxidantes en las células isquémicas (McMichael & Moore, 2004; Wu et al., 2018). Durante la isquemia, la degradación de ATP produce hipoxantina. Una vez que el tejido isquémico es reperfundido, la afluencia de oxígeno cataliza la xantina-oxidasa para degradar la hipoxantina a ácido úrico, liberando el anión superóxido (O_2^-), el cual es altamente reactivo. El O_2^- es subsecuentemente convertido a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^*). La mayor consecuencia del OH^* es la peroxidación de estructuras lipídicas de las membranas celulares resultando en la producción y liberación de eicosanoides proinflamatorios, alteración de la permeabilidad celular, daño al DNA, degradación de proteínas estructurales y en última instancia, la muerte (Cowled & Fitridge, 2011; Tsukamoto et al., 2010).

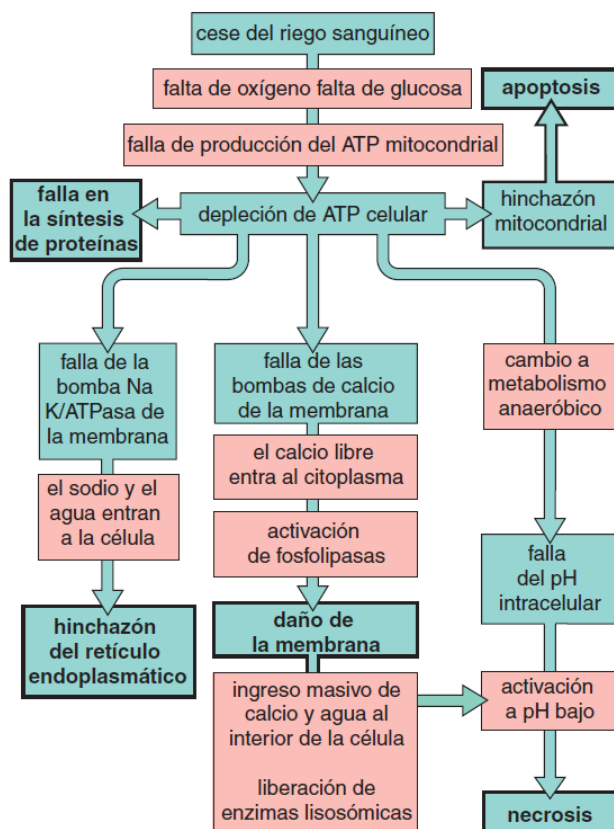


Figura 1. Respuesta celular a la isquemia (Tomada de Stevens, Lowe, & Scott, 2011)

La muerte celular puede ser definida como la pérdida irreversible de la integridad de la membrana plasmática. Históricamente, se han distinguido 3 tipos de muerte de acuerdo con algunos criterios morfológicos (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de muerte celular y características morfológicas

Apoptosis	Retracción celular, condensación y fragmentación de cromatina, retracción nuclear, formación de cuerpos apoptóticos.
Autofagia	Acumulación de vesículas autofágicas citoplasmáticas
Necrosis	Degradación inespecífica de DNA, cariólisis, dilatación de mitocondrias, ruptura temprana de membrana plasmática.

La muerte celular tipo I, mejor conocida como apoptosis, se considera un tipo de muerte controlada (dependiente de caspasas) e interviene en el proceso normal de eliminación y renovación celular; presenta cambios característicos en la morfología nuclear, incluida la condensación (picnosis) y fragmentación (cariorraxis) de la cromatina; se observan cambios menores en los organelos y contracción celular general, formación de ampollas en la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos que contienen material citoplasmático y nuclear. Todos estos cambios ocurren antes de que se pierda la integridad de la membrana plasmática. La muerte celular tipo II, la autofagia, se caracteriza por una

acumulación masiva de vesículas autofágicas en el citoplasma. La muerte celular tipo III, es conocida como necrosis, se describe como una muerte celular accidental y no controlada, sin embargo, hay evidencia de que este tipo de muerte puede llevarse a cabo mediante un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos de ejecución, morfológicamente se caracteriza por la ruptura temprana de la membrana plasmática y dilatación de los organelos, en particular de la mitocondria (Golstein & Kroemer, 2007; Vanden Berghe et al., 2015; Vanlangenakker et al., 2008).

2.4 Daño tisular generado por isquemia/reperfusión

La lesión por I/R se define como la exacerbación paradójica de la disfunción celular y la muerte, luego de la restauración del flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos. El restablecimiento del flujo sanguíneo es esencial para salvar tejidos isquémicos; sin embargo, la reperfusión en sí misma, paradójicamente, causa un daño mayor, amenaza la función y viabilidad del órgano. La lesión por I/R puede involucrar no sólo al órgano isquémico en sí, sino que también puede inducir daño sistémico a órganos distantes, lo que podría conducir a una falla multisistémica de los órganos. La lesión por reperfusión es un proceso multifactorial que produce una destrucción extensa del tejido (Cowled & Fritidge, 2011).

La lesión por I/R se compone por 2 estados específicos: el estado isquémico, donde hay una privación temporal de oxígeno y nutrientes por la pérdida del flujo sanguíneo hacia un tejido y el estado de reperfusión, en el cual se presenta un retorno del suministro de oxígeno hacia el tejido isquémico (Tsukamoto et al., 2010). La reintroducción de oxígeno hacia el tejido isquémico puede exacerbar la lesión y conduce a un incremento en la síntesis de radicales libres y citocinas proinflamatorias (Meng et al., 2020), así como a la migración de neutrófilos hacia la zona afectada (Kobata et al., 2007). Mediadores inflamatorios generados durante la I/R incluyen $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ (Kwiecien & Brzozowski T, 2002), factor de agregación plaquetaria, complemento y quimiocinas, todos estos son potentes quimioatrayentes y contribuyen a la migración de neutrófilos. Aunque los mismos neutrófilos activados pueden liberar $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, estas citocinas son principalmente liberadas por macrófagos residentes y mastocitos (Fukumura et al., 1995). El $\text{TNF}\alpha$ induce la adhesión de neutrófilos y degranulación, estimula la actividad de la enzima NADPH oxidasa para producir ROS e incrementa la expresión de receptores a IL-2 , así como la expresión de ICAM-1 endotelial (McMichael & Moore, 2004). El incremento en la actividad de la NADPH oxidasa está involucrada en la aparición del daño en la mucosa gástrica inducido por I/R y la actividad de esta enzima puede estar causalmente relacionada por la sobrerregulación de COX-2 durante I/R (Nakagiri & Murakami, 2009).

El endotelio es sensible a hipoxia, una de las primeras respuestas es el incremento en la endotelina-1 y la generación de radicales libres (Hassan et al., 1997). Posteriormente, se presenta daño secundario a un incremento en el volumen celular, pérdida en la organización del citoesqueleto y disminución en la fluidez de membrana. Durante la reperfusión las

células endoteliales exhiben daño morfológico incluyendo edema celular, pérdida en la adherencia sobre la membrana basal y adherencia de leucocitos activados (Rushing & Britt, 2008).

Los neutrófilos tienen un papel importante en la lesión por I/R. Las ROS producidas como el anión superóxido activan a los neutrófilos, los cuales liberan citocinas y subsecuentemente se da una migración mayor de neutrófilos hacia la región lesionada (Mittra & Abraham, 2006). Las moléculas de adhesión celular sobre la superficie de los neutrófilos se unen a ligandos en las células endoteliales, iniciando una secuencia de eventos que culminan en la extravasación de neutrófilos a través de la microvasculatura. La lesión de los tejidos se presenta en el momento de la reperfusión debido a la producción de radicales libres y enzimas proteolíticas generadas por los neutrófilos (Smith et al., 1987).

Las alteraciones descritas previamente corresponden a una reacción inflamatoria aguda, la cual es una respuesta rápida del anfitrión que sirve para hacer llegar leucocitos y proteínas plasmáticas al foco de lesión tisular. La inflamación aguda está constituida por 3 componentes esenciales: 1) alteración del calibre vascular que aumenta el flujo de sangre, 2) cambios estructurales de los capilares que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos, y 3) migración de los leucocitos de la microcirculación, acumulación de estos en el foco de lesión y activación para eliminar el agente lesivo. La reacción inflamatoria aguda puede estimularse por infecciones y toxinas microbianas, necrosis tisular de cualquier origen, incluida la isquemia, traumatismos, lesiones químicas y físicas, presencia de cuerpos extraños o reacciones inmunitarias (Kumar et al., 2010).

2.5 Daño en la mucosa gástrica inducido por isquemia/reperfusión

El daño en la mucosa gástrica provocado por I/R es un problema clínico importante asociado a diversas condiciones fisiopatológicas, tales como trauma, cirugía mayor, drogas antiinflamatorias o choque hipovolémico (Du et al., 2015). Varios estudios han demostrado que radicales libres, lipoperoxidación e infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica tienen un papel importante en la patogénesis de las lesiones gástricas agudas inducidas por I/R (Smith et al., 1987; Bülbül et al., 2008). Además, se ha demostrado que otros factores, tales como prostaglandinas y NO, también tienen un papel patogénico relevante en las lesiones gástricas (Nakamori et al., 2010).

Histológicamente, durante la fase de isquemia se han observado lesiones celulares letales caracterizadas por eosinofilia citoplasmática y condensación nuclear, también se observa la presencia de neutrófilos principalmente en la lámina propia y dilatación vascular. Este tipo de eventos son característicos durante la fase inicial de una respuesta inflamatoria (Beltran et al., 2013). Posterior a un periodo de 60 minutos de reperfusión se observa daño en la mucosa gástrica, principalmente en el epitelio superficial, extendiéndose hacia la región de las fositas y las glándulas gástricas (Yi et al., 2012).

2.6 Reparación del daño tisular

La reparación de las heridas se divide en 3 fases: inflamación, proliferación y maduración. Estas fases se solapan y su distinción es algo arbitrario, pero ayudan a comprender la secuencia de acontecimientos que suceden durante la cicatrización del tejido dañado. La agresión inicial determina la agregación plaquetaria y formación de un coágulo sobre la superficie de la herida, lo que provoca inflamación. En la fase proliferativa se forma tejido de granulación, proliferación y migración de células del tejido conjuntivo y reepitelización de la superficie dañada. La maduración implica el depósito de matriz extracelular (MEC), el remodelado tisular y la contracción de la herida (Kumar et al., 2010).

El daño en el tejido condiciona la activación rápida de las vías de la coagulación con formación de un coágulo de sangre en la superficie de la herida. Además de eritrocitos atrapados, el coágulo contiene fibrina, fibronectina y componentes del complemento. El coágulo permite detener la hemorragia y también sirve como andamiaje para las células que migran y que son atraídas por los factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas liberadas en la zona. La liberación de VEGF aumenta la permeabilidad de los vasos y causa edema. En 24 horas aparecen neutrófilos en los márgenes de la lesión liberando enzimas proteolíticas que limpian los restos y las bacterias invasoras (Kumar et al., 2010).

Los fibroblastos y las células endoteliales proliferan durante las primeras 24-72 horas del proceso de reparación para crear un tipo especializado de tejido, que se llama tejido de granulación que es una característica de la reparación tisular. El término se debe al aspecto blando, rosado y granular de la superficie de la herida. Su característica histológica típica es la presencia de neovasos pequeños y la proliferación de fibroblastos. Estos neovasos tienen fugas y permiten la salida de proteínas y líquido al espacio extravascular. Por tanto, el tejido de granulación nuevo suele ser edematoso y la cantidad formada depende del tamaño del defecto tisular creado por la lesión y de la intensidad de la inflamación (Kumar et al., 2010).

Los neutrófilos se sustituyen en gran parte por macrófagos en 48-96 horas los cuales son responsables de eliminar los restos extracelulares, fibrina y otros cuerpos extraños en el lugar de la reparación y de inducir la angiogenia y el depósito de MEC. A las 24-48 horas brotes de células epiteliales se desplazan desde el margen de la lesión depositando componentes de la membrana basal conforme avanzan. Al tiempo que se produce la reepitelización, aumenta la cantidad de fibrillas de colágeno. Al principio se produce una matriz provisional de fibrina, fibronectina plasmática y colágeno tipo III, pero después se sustituye por una matriz constituida por colágeno tipo I (Kumar et al., 2010).

La proliferación y restitución son los procesos responsables para mantener la continuidad epitelial y consecuentemente una barrera de células epiteliales en el estómago. La proliferación requiere mitosis y, por lo tanto, es un proceso bastante prolongado, mientras que la restitución es un proceso mucho más rápido que depende de la migración celular. En respuesta a la interrupción aguda del epitelio gástrico, la migración celular es la primera

respuesta para restaurar la continuidad epitelial y la función de barrera (Aihara & Montrose, 2014).

2.7 Melatonina

La melatonina (MT, N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona secretada por la glándula pineal en condiciones de oscuridad y regula diversos procesos biológicos (Pandi-Perumal et al., 2008). Se han demostrado diversas funciones fisiológicas de la MT, incluida la regulación del ciclo circadiano y endocrino, además de presentar propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antioxidantes (D'Angelo et al., 2020).

La síntesis de MT (Fig. 2) se realiza a partir de triptófano vía hidroxilación por 5-triptófano hidroxilasa a 5-hidroxitriptófano, descarboxilación por aminoácido aromática descarboxilasa a 5-hidroxitriptamina (serotonina), N-acetilación por N-acetil transferasa a N-acetilserotonina (NAT) y O-metilación por hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) a MT (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Paterniti et al., 2016). Una vez formada, la MT es liberada hacia los capilares y es entonces rápidamente distribuida a la mayoría de los órganos (Pandi-Perumal et al., 2008).

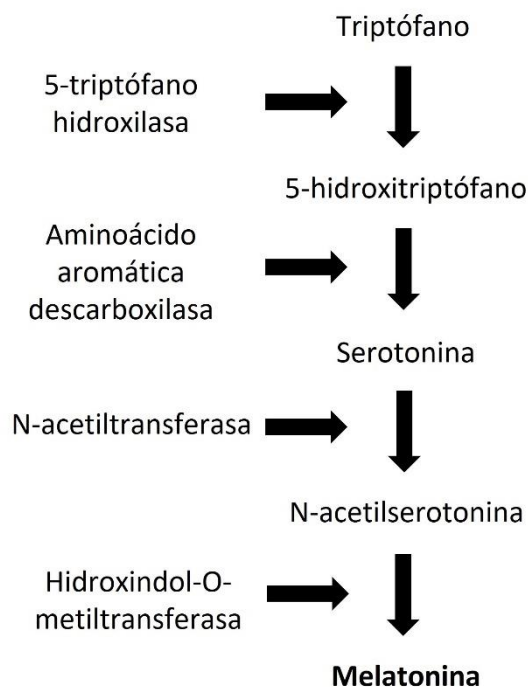


Figura 2. Síntesis de melatonina

La presencia de MT ha sido detectada en múltiples tejidos extrapineales incluyendo cerebro, retina, cristalino, cóclea, epitelio de la vía aérea, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, tiroides, páncreas, timo, bazo, células del sistema inmune, cuerpos carotideos, tracto reproductivo y células endoteliales. En muchos de estos tejidos, las enzimas que participan en la síntesis de MT han sido identificadas. La MT está presente esencialmente en todos los

fluidos biológicos incluyendo líquido cerebroespinal, saliva, bilis, líquido sinovial, líquido amniótico y leche materna. En varios de estos fluidos, la concentración de MT excede la de la sangre (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

La MT es un compuesto lipofílico que difunde rápidamente a través de las membranas y está involucrada en muchos procesos regulatorios, tales como ritmos biológicos, reflejo intestinal, protección contra inflamación, metabolismo y reproducción. En el tracto gastrointestinal, las células enterocromáfines (EC) son la principal fuente de MT extrapineal y sustancialmente contribuyen a las concentraciones en sangre periférica de MT. Los niveles de MT intestinal dependen de la digestión. En contraste con los niveles de MT pineal, los niveles de MT gastrointestinal son independientes de la luz o del ritmo circadiano (Chen et al., 2011; Ferlazzo et al., 2020). Los niveles de MT en el intestino son al menos 400 veces más altos que en la glándula pineal y 10 a 100 veces más altas que el suero (Ma et al., 2020). Las funciones de la MT extrapineal no solamente son endocrinas, también es una sustancia autocrina o paracrina y regula muchas funciones gastrointestinales como el transporte de iones y agua, proliferación epitelial, secreción de ácido y motilidad (Zhang et al., 2015).

La MT posee altas propiedades antioxidantes. Se une hasta a 10 radicales libres por molécula, mientras que los antioxidantes clásicos como la vitamina C y E se unen a uno. Además, tiene una alta biodisponibilidad, penetrando la barrera hematoencefálica y la placenta. Indirectamente, las propiedades antioxidantes están relacionadas con una mayor actividad de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, reductasa y catalasa (Shneider et al., 2020).

La MT ha resultado ser más efectiva que la vitamina E, reduciendo en mayor cantidad la concentración de H_2O_2 mitocondrial, además fue más eficaz para limitar la apoptosis mediada por mitocondrias en astrocitos. La forma en que la MT obtiene acceso a las células y los compartimentos subcelulares ha sido ampliamente debatida, se han considerado varias opciones. Al ser altamente soluble en lípidos, la MT podría simplemente difundirse pasivamente a través de las membranas celulares. Recientemente se sugirió que la MT se transfiere activamente a las células a través del transportador de glucosa, GLUT 1, también se ha propuesto que la absorción de MT por las células y las mitocondrias es un proceso facilitado que involucra a los transportadores de oligopéptidos PEPT1 y PEPT2. Estos transportadores existen tanto en la membrana como en las mitocondrias (Reiter et al., 2020).

Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias se han reportado en diferentes modelos. En un modelo de isquemia cerebral, el tratamiento con MT fue capaz de disminuir la expresión de IL-1 β y TNF- α en la corteza y en el hipocampo, así como de marcadores proapoptóticos como BAX y BAD (Paredes et al., 2015).

En estudios clínicos, la administración oral de MT en pacientes sometidos a trasplante renal (Panah et al., 2019) y con lesión cerebral inducida por I/R después de endarterectomía carotídea (Zhao et al., 2018) presentaron una mejor recuperación y función debido a la disminución del estrés oxidativo y el proceso inflamatorio.

La MT también está siendo ampliamente estudiada en el tratamiento del cáncer. Se ha reportado que la administración de MT inhibe la estabilización del HIF-1 α como resultado de sus propiedades antioxidantes, consecuentemente no se expresa el factor de crecimiento endotelial vascular (Dai et al., 2008; Park et al., 2009; Park et al., 2010). Esto provoca que se bloquee la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Kim et al., 2013).

2.8 Efecto de la melatonina sobre el daño en la mucosa gástrica generado por isquemia/reperfusión

El efecto de la administración de MT sobre el daño por I/R ha sido evaluado en diferentes órganos como son pulmón (Takhtfooladi et al., 2015), hígado (Deng et al., 2016), cerebro (Lin et al., 2018), intestino (Ozban et al., 2015) y corazón (Zhai et al., 2017). En el estómago, el efecto gastroprotector de la MT ha sido evaluado en diferentes modelos de ulceración. Mohamadin et al., (2009), realizaron un modelo de lesión gástrica inducida por peróxido de hidrógeno intragástrico en rata, encontraron que la MT protege la mucosa contra el daño gracias a sus propiedades antioxidantes, preservando los niveles de prostaglandinas-2 y óxido nítrico, además de inhibir la inducción de TNF α en el tejido gástrico. Por otra parte, Zhang et al., (2015), evaluaron el efecto de la MT en un modelo de lesión gástrica asociado a estrés por ruido, de acuerdo con sus resultados el posible mecanismo gastroprotector de la MT es atribuido a su capacidad para disminuir el estrés oxidativo y atenuar la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.

En estudios preclínicos, se ha demostrado que tanto el pretratamiento (preventivo) como el tratamiento (correctivo) con MT, tiene efectos gastroprotectores después de inducir lesiones agudas en la mucosa gástrica por I/R. El efecto protector de la MT ha sido atribuido a sus efectos antioxidantes limitando el daño por lipoperoxidación; además de aumentar la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. Por otra parte, estimula la producción de prostaglandinas, disminuye la infiltración y la función de neutrófilos y reduce la apoptosis en células de la mucosa gástrica (De La Lastra et al., 1997; Konturek et al., 1997; Cabeza et al., 2001; Cabeza et al., 2003; Shahrokhi et al., 2016; Mubarak et al., 2018).

2.9 Bioimpedancia eléctrica

La impedancia eléctrica es el uso de un voltaje aplicado a un circuito para medir su resistencia a la corriente. La medición de la impedancia proporciona la relación compleja de resistencia y reactancia para el circuito (Morse, 2014). La bioimpedancia eléctrica es definida como la medición de la impedancia eléctrica de una muestra biológica y representa la oposición de un medio biológico al paso de una corriente eléctrica alterna y tiene los

componentes de resistencia y reactancia. La resistencia está condicionada por la resistividad de los diferentes tejidos a la conducción de la corriente eléctrica. La reactancia es debida al efecto aislante de las membranas celulares que se comportan como condensadores que se cargan y descargan al paso de la corriente. Los valores de resistencia y reactancia dependen de la frecuencia de la corriente alterna. La resistencia es inversamente proporcional a la frecuencia, ya que la conductividad eléctrica de la mayoría de los tejidos aumenta si se incrementa la frecuencia (Sánchez-Iglesias et al., 2012).

La bioimpedancia eléctrica en los tejidos vivos puede ser medida continuamente con el fin de identificar alteraciones en condiciones patológicas como son isquemia, infarto o necrosis las cuales implican modificaciones celulares que afectan la impedancia. El monitoreo de la bioimpedancia ha sido utilizado para detectar infarto en diferentes órganos como son corazón, intestino, hígado, estómago, etc. En muchos de estos casos, el evento es detectado por las alteraciones que ocurren en el volumen intra y extracelular (Ivorra, 2005).

2.9.1 Espectroscopía de impedancia eléctrica

Se denomina espectroscopía a cualquier estudio en el cual la absorción de radiación electromagnética depende de la frecuencia, las cuales están en un rango de 100 Hz a 10 MHz, donde la absorción está determinada principalmente por la estructura celular del tejido. Por lo tanto, podemos definir la espectroscopía de impedancia eléctrica (EIE) como el estudio de la interacción de un campo eléctrico alterno con tejido biológico (Simini & Bertemes-Filho, 2018).

La técnica de EIE está relacionada con los fenómenos de absorción de las ondas electromagnéticas, la cual se mide variando la frecuencia del campo eléctrico aplicado y graficando la energía absorbida por la muestra en cada frecuencia. El trazado resultante se llama espectro que puede contener la intensidad de la absorción, es decir, la impedancia eléctrica. El enfoque general es aplicar un estímulo eléctrico (un voltaje o corriente conocido) al material y después observar el voltaje o corriente resultante. El estímulo se puede aplicar principalmente de 3 formas:

1. Función de paso: se aplica un voltaje de paso en un tiempo $t = 0$ al material y se mide una corriente variable en el tiempo. Luego se transforma en la frecuencia dominio para calcular la impedancia dependiente de la frecuencia.
2. Señal de ruido: un voltaje continuo compuesto de ruido aleatorio con energía sobre un rango de frecuencia conocido y la corriente resultante es medida y después es transformada hacia el dominio de frecuencia.
3. Señal sinusoidal: se aplica una tensión o corriente de frecuencia única al material y se mide la corriente o tensión dependiente de la frecuencia resultante. La respuesta se mide en el rango de frecuencias de interés en términos de desplazamiento de fase y amplitud o en partes reales e imaginarias. La parte real de la impedancia es llamada resistencia (R) mientras que la parte imaginaria es llamada reactancia (X).

La EIE consiste en medir la impedancia eléctrica (Z), la admitancia (Y), el módulo de impedancia $|Z|$ o la permitividad (en función de la frecuencia) para caracterizar el material biológico en estudio (Simini & Bertemes-Filho, 2018).

La EIE puede ser asistida mediante el uso de circuitos eléctricos equivalentes para representar el tejido biológico, los cuales se pueden usar para describir los parámetros que caracterizan un espectro de impedancia. El citoplasma celular y el espacio extracelular actúan como un medio conductivo aislado uno del otro por la membrana celular. La conductividad en el espacio intra (R_i) y extracelular (R_e) contribuyen a la resistencia total del tejido, mientras que la membrana celular contribuye al efecto capacitivo (C_m) (Fig. 3) (Kun & Peura, 1994; Casas et al., 1999; Simini & Bertemes-Filho, 2018).

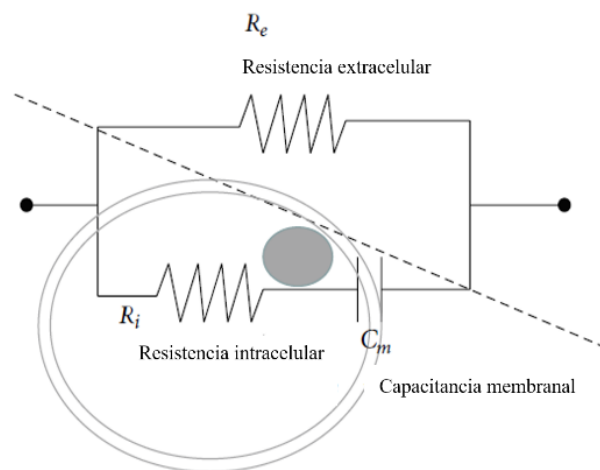


Figura 3. Modelo de un circuito eléctrico en el tejido. R_e (resistencia extracelular); R_i (resistencia intracelular); C_m (Capacitancia membranal) (figura tomada de Chao et al., 2013).

2.9.2 Propiedades eléctricas de los tejidos

Las propiedades eléctricas de los tejidos en varios rangos de frecuencia están determinadas por la disposición, dimensión, componentes y estructura interna de las células constituyentes (Bera, 2014). La conductividad y la permitividad eléctrica de los tejidos biológicos tienen una marcada dependencia con la frecuencia de la señal de excitación. Debido a la presencia del aumento en la conductividad al incrementar la frecuencia se pueden caracterizar 3 zonas de variación de conductividad denominadas dispersiones, cada una relacionada con membranas celulares, organelos celulares, efectos electrocinéticos, etc. Estas 3 regiones se conocen como α (hasta 10 kHz, aproximadamente), β (de 100 kHz hasta 10 MHz, aproximadamente) y γ (frecuencias superiores a 100 MHz). Por otra parte, Gabriel et al. 1996, reportó estas zonas de dispersión en frecuencias más bajas: 1 Hz, 1 kHz y 1 MHz. Más tarde, se agregó una cuarta zona de dispersión en el rango inferior de GHz (Fig. 4) (Grimnes & Martinsen, 2008).

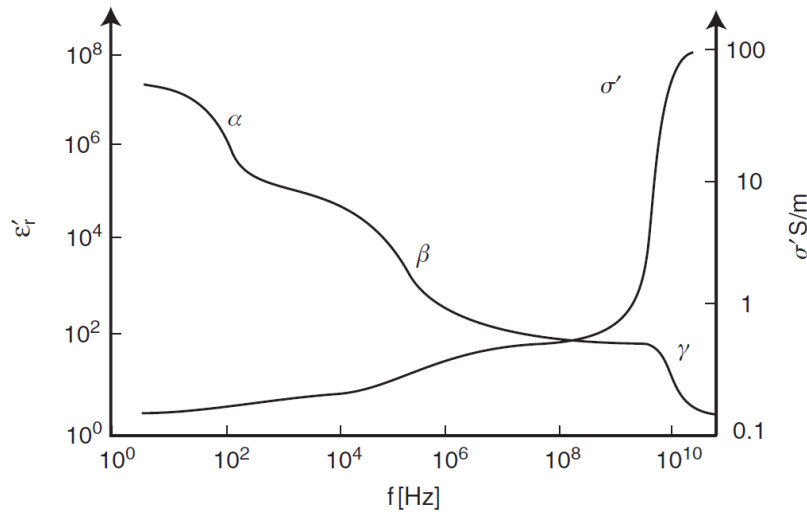


Figura 4. Regiones de dispersión (Tomada de Grimnes & Martinsen, 2008).

La primera región de dispersión se presenta a bajas frecuencias, en esta zona los cambios de impedancia se encuentran asociados con las interfases entre los tejidos, como la membrana celular. En la segunda región de dispersión los cambios se relacionan principalmente con la polarización de la membrana celular, la cual actúa como barrera al flujo de iones entre los medios intra y extracelulares; además, se produce una polarización de proteínas y macromoléculas orgánicas. La tercera región de dispersión se presenta a altas frecuencias, los cambios se asocian al contenido de agua, electrolitos y proteínas de los tejidos. Estas zonas de dispersión determinan el comportamiento del tejido, siendo la zona β la de mayor interés práctico para estudiar propiedades globales del tejido, tal como el estado histopatológico de los mismos (Grimnes & Martinsen, 2008).

2.9.3 La impedancia como una función de la frecuencia

A bajas frecuencias (aproximándose a 0 Hz), la membrana celular actúa como un capacitor de circuito abierto y bloquea el paso de la corriente eléctrica hacia el espacio intracelular y la corriente pasa sólo por el espacio extracelular, por lo que la impedancia es resistiva y representa la impedancia del volumen del espacio extracelular. A alta frecuencias, la membrana celular actúa como un condensador de cortocircuito que permite que la corriente eléctrica penetre tanto el espacio intra como el extracelular, la impedancia medida también es resistiva y representa la impedancia de los volúmenes de ambos compartimentos; entonces, los cambios en estas frecuencias están relacionados con el volumen del espacio intracelular (Parramon et al., 2007).

Las mediciones de impedancia en el rango de frecuencias de kHz hasta pocos MHz (región de dispersión β) se caracterizan por la presencia de membranas celulares que actúan como dieléctricos, por lo que no proporcionan conducción a baja frecuencia y son casi eléctricamente transparentes a altas frecuencias (Gersing, 1998).

2.9.4 Propiedades eléctricas del tejido isquémico

La EIE es una técnica capaz de caracterizar tejidos *in vivo* y observar la progresión del daño en condiciones de isquemia. Durante el curso de la isquemia, el tejido exhibe cambios característicos en los espectros de impedancia, principalmente causados por edema celular, reducción del espacio extracelular y la acumulación de productos metabólicos. El efecto de la isquemia es el pronunciado aumento de la impedancia a bajas frecuencias, una característica común en órganos formados por células conectadas por uniones intercelulares. El cambio de estas uniones es un indicador del estado del órgano en el progreso de las alteraciones inducidas por la isquemia (Gersing, 1998).

Los cambios físicos en el tejido después del inicio de la isquemia conducen a cambios en los parámetros de impedancia (R y X), estos cambios dependerán del tiempo de isquemia y la frecuencia de excitación. Se han aceptado varios mecanismos relacionados a los cambios en los parámetros de impedancia con los cambios físicos en los tejidos relacionados con la isquemia. Un cambio temprano es la reducción del espacio intercelular, con el aumento en la resistencia de baja frecuencia, esto debido al cambio en la relación entre el agua extracelular e intracelular, ya que las células comienzan a hincharse debido a la ósmosis cuando se reduce la función de las bombas iónicas. La disminución en el agua extracelular da como resultado un aumento en la resistencia de baja frecuencia. Otro cambio es el aumento de la permeabilidad de la membrana celular debido a su función reducida, que resulta en una disminución gradual de la impedancia. Otro cambio que conduce a la reducción en la impedancia es la formación de edema intersticial, congestión vascular y cambios en la vascularidad (Strand-Amundsen et al., 2016).

En la figura 5 se muestra un esquema del efecto de la corriente eléctrica sobre un tejido biológico normóxico e isquémico a diferentes frecuencias. Durante condiciones de normoxia, una cantidad significativa de corriente de baja frecuencia es capaz de fluir a través del espacio extracelular sin demasiada oposición al paso de la corriente. Mientras que, en condiciones de isquemia, las células no son capaces de generar suficiente energía para alimentar las bombas iónicas y el agua extracelular penetra al interior de la célula. Como consecuencia, las células se hinchan e invaden el espacio extracelular y causan una mayor oposición al paso de la corriente en los fluidos extracelulares, causando un incremento en la impedancia a baja frecuencia. Entonces, las mediciones de bioimpedancia a bajas frecuencias son un indicador de tejido isquémico. A altas frecuencias, los cambios de impedancia están influenciados por las impedancias de los fluidos intra y extracelular, y la permeabilidad iónica de las membranas (Ivorra, 2005).

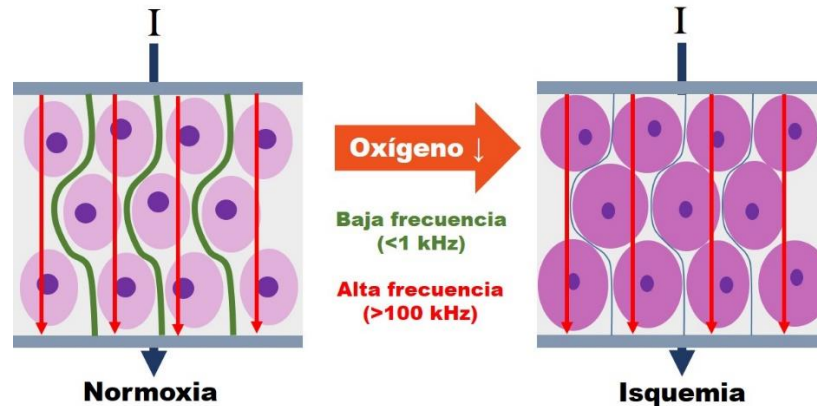


Figura 5. Paso de la corriente eléctrica a bajas y a altas frecuencias a través del tejido. El edema celular causado por la isquemia genera un aumento en la impedancia principalmente a bajas frecuencias (Adaptada de Ivorra, 2005).

La EIE ofrece diversas aplicaciones en el campo de la medicina. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estimar la composición del peso corporal en pacientes dializados (Baek et al., 2014; Zhu & Levin, 2015); para la detección de lesiones orales potencialmente malignas (Murdoch et al., 2014), así como para determinar la integridad de la mucosa en pacientes con reflujo gastroesofágico (van Hoeij et al., 2016; Weijenberg et al., 2016) y diagnosticar de manera temprana neoplasias esofágicas (Knabe et al., 2013). Además, se han caracterizado los cambios en impedancia en células del endotelio (Park et al., 2016), en tejido renal y células uroteliales, ambos en células normales y cancerosas (Yun et al., 2016; Park et al., 2016).

En el laboratorio de instrumentación biomédica del Departamento de Ingeniería Eléctrica de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa se diseñó y construyó un espectrómetro de impedancia que genera una corriente de excitación de 1 mA a 23 frecuencias diferentes en un ancho de banda de 215 Hz a 1 MHz (Beltran & Sacristan, 2015). A partir de las 46 mediciones obtenidas se pueden calcular 6 parámetros característicos que describen el comportamiento eléctrico del tejido gástrico en dos zonas de dispersión: R_L (resistencia central a bajas frecuencias), R_H (resistencia central a altas frecuencias), X_L (reactancia central a bajas frecuencias), X_H (reactancia central a altas frecuencias), f_L (frecuencia central a bajas frecuencias), f_H (frecuencia central a altas frecuencias) (Beltran & Sacristan, 2015).

Como lo muestra la figura 6, las mediciones se realizan por medio de una sonda intraluminal mínimamente invasiva de cuatro electrodos, la cual se inserta vía nasogástrica, de tal forma que la punta distal esté en contacto con la mucosa gástrica. El espectrómetro genera una corriente eléctrica senoidal en el tejido gástrico y mide la impedancia que ésta presenta sobre un intervalo de frecuencias específicas. Una computadora controla las operaciones del instrumento tales como el intervalo de frecuencias de operación, la captura de datos, su almacenamiento, así como su procesamiento. Los electrodos internos de la

sonda miden el potencial generado en el tejido mediante la corriente de excitación. La amplitud y fase de la impedancia son calculadas por el software para cada frecuencia de excitación y a partir de esas mediciones se obtienen los valores de las resistencias y las reactivancias a las 23 frecuencias de excitación (Beltran & Sacristan, 2015).

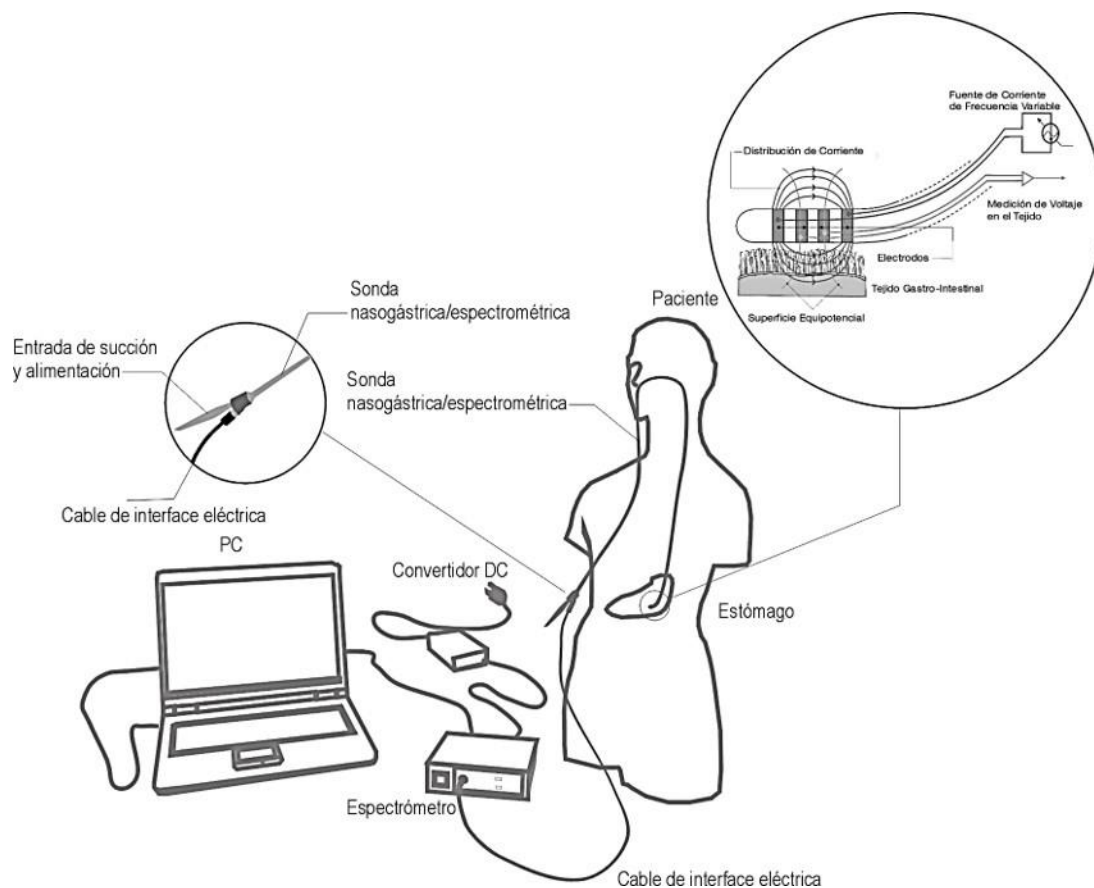


Figura 6. Espectrómetro de impedancia y sonda nasogástrica para medir la impedancia de la mucosa gástrica. La fuente de corriente produce una excitación constante sinusoidal a través de dos electrodos externos. Los dos electrodos internos miden el potencial generado por el tejido (Tomada de Beltran et al., 2015).

La EIE se ha propuesto como un método para monitorizar y detectar alteraciones en la mucosa gástrica asociadas a hipoxia tisular en pacientes en estado crítico. Se han realizado estudios para caracterizar los cambios en los espectros de impedancia de la mucosa gástrica en adultos sanos y en pacientes bajo diferentes grados de hipoperfusión esplácnica durante cirugía cardiovascular. En estos estudios, se ha observado el mayor incremento en la resistencia y la reactivancia a bajas frecuencias en los pacientes isquémicos con complicaciones con respecto a los voluntarios sanos (Fig. 7), pero la reactivancia es más consistente y es el parámetro eléctrico más sensible al daño tisular (Beltran et al., 2006; Beltran et al., 2010; Beltran et al., 2013). Los cambios a altas frecuencias ocurren de manera más tardía y se generan específicamente en la reactivancia.

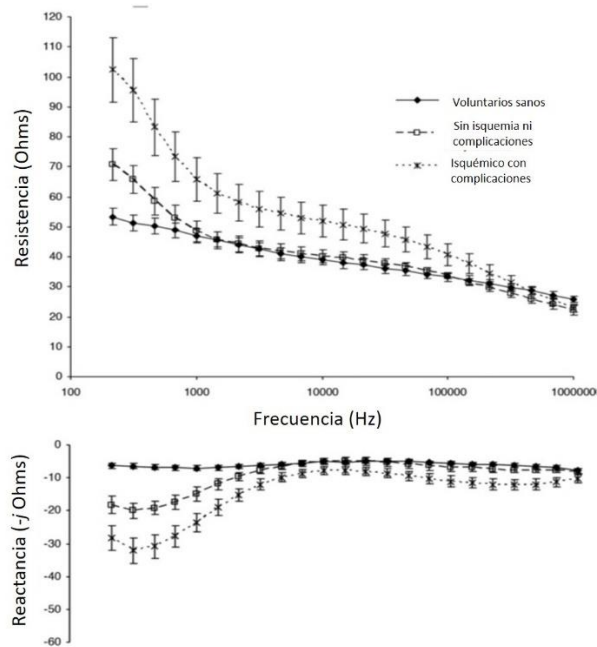


Figura 7. Resistencia - reactancia en voluntarios sanos comparada con pacientes sin isquemia ni complicaciones, con respecto a pacientes que presentaron isquemia prolongada y que desarrollaron complicaciones dentro de los primeros 3 días en la unidad de cuidados intensivos (Tomada de Beltran et al., 2015).

En modelos de isquemia gástrica se ha observado un incremento en la impedancia con daño tisular gástrico y se han encontrado alteraciones en la integridad tisular mediante microscopía de campo claro y endomicroscopía confocal (Beltran et al., 2013).

Con estos resultados se puede considerar que la espectroscopía de impedancia es capaz de identificar alteraciones en la mucosa gástrica generadas por isquemia de manera temprana, dando información adicional al clínico y que podría utilizarse como una opción para guiar la terapia si se identifican de manera adecuada los cambios a nivel celular y molecular involucrados en el aumento de impedancia, ayudando en el tratamiento y en la disminución de las complicaciones de los pacientes en estado crítico.

2.9.5 Parámetros de impedancia gástrica

Para obtener los parámetros característicos de la impedancia gástrica se utiliza un modelo teórico a partir de las ecuaciones de Cole-Cole, descrito previamente en (Beltrán et al., 2007).

La impedancia compleja (Z) es descrita por:

$$Z = R + jX$$

Cuando la impedancia tisular es trazada en un dominio complejo, la gráfica resultante se asemeja a un semicírculo, el cual puede ser caracterizado (Fig. 8). Cole-Cole propusieron una expresión que describe un semicírculo teniendo en cuenta la frecuencia:

$$Z = R_{\infty} + (R_0 - R_{\infty}) / (1 + (j\omega\tau)^{\alpha})$$

Donde R = resistencia tisular (real), X = reactancia tisular (imaginario), R_0 = resistencia a frecuencia 0, R_{∞} = resistencia a frecuencia infinita, τ = constante característica de tiempo, α = medida de la depresión del arco semicircular debajo del eje real, es una constante entre 0 y 1.

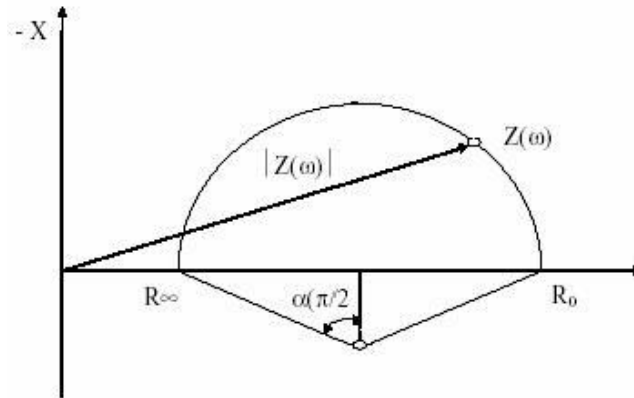


Figura 8. Gráfico de Cole-Cole (Tomada de Beltrán et al., 2007).

Debido a que el espectro de impedancia del tejido gástrico presenta 2 zonas de dispersión (bajas y altas frecuencias), los parámetros del modelo de Cole-Cole son calculados en estas 2 regiones como se muestra en la figura 9 a partir de las 46 mediciones obtenidas.

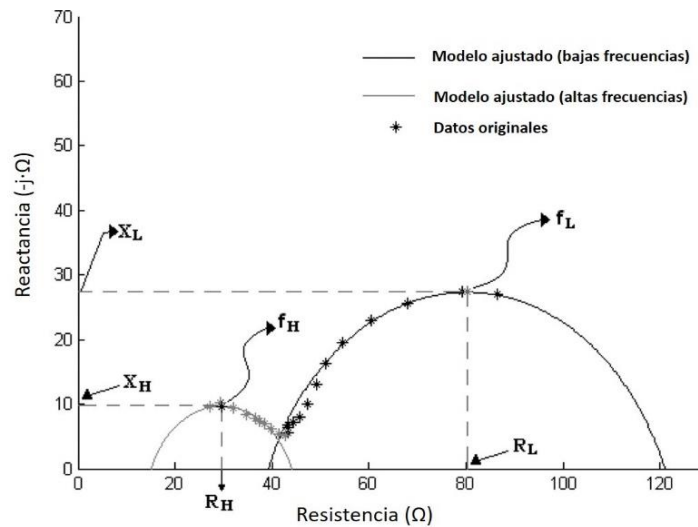


Figura 9. Zonas de dispersión en el gráfico de Cole – Cole y parámetros característicos. R_L (resistencia central a bajas frecuencias), R_H (resistencia central a altas frecuencias), X_L (reactancia central a bajas frecuencias), X_H (reactancia central a altas frecuencias), f_L (frecuencia central a bajas frecuencias), f_H (frecuencia central a altas frecuencias) (Tomada de Beltrán et al., 2007).

2.10 Métodos de cuantificación del daño en la mucosa gástrica inducido por I/R

El daño en la mucosa gástrica generado por I/R ha sido ampliamente reportado, en la literatura se han identificado 3 métodos para cuantificarlo. Magierowski et al., (2017) realizaron un análisis macroscópico realizado por planimetría computarizada, en el cual reportaron el área de lesión de la mucosa gástrica en mm². Otro tipo de análisis macroscópico fue el descrito por Hu et al., (2016) en donde reportó un índice de daño de la mucosa gástrica basado en la asignación de una puntuación dependiente de la longitud de la erosión y de puntos hemorrágicos. Finalmente, Gezginci-Oktayoglu et al., (2016) examinaron el daño microscópico de la mucosa gástrica utilizando un método de cuantificación el cual considera criterios histopatológicos tales como pérdida de células epiteliales, edema de la mucosa, sangrado y presencia de células inflamatorias, en cada una de estas variables asignaron una puntuación de 0-3.

Debido a las limitaciones encontradas en estos métodos de cuantificación para relacionarlos con las variaciones de impedancia gástrica se propuso un índice de lesión tisular el cual considera alteraciones patológicas inherentes del proceso inflamatorio y daño celular, los cuales pueden ser relacionados directamente con los cambios de impedancia bajo condiciones de isquemia e I/R.

Los métodos de cuantificación descritos anteriormente han sido utilizados para medir el efecto de diferentes moléculas antioxidantes como el β -caroteno (Mard et al., 2012) o la melatonina (Shahrokhi et al., 2016) entre otros, sobre el daño en la mucosa gástrica generado por diferentes modelos de lesión.

2.11 Biomarcadores de daño generado por isquemia/reperfusión

La isquemia induce un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido a una lesión adicional en la reperfusión. En el daño por I/R se encuentran involucrados diferentes mecanismos biológicos tales como la producción de citocinas, la migración de neutrófilos y la producción de radicales libres; por lo tanto, citocinas proinflamatorias como el TNF α , IL-1 β , IL-6, además de productos de la lipoperoxidación como el malondialdehído han sido utilizados como biomarcadores de daño por I/R (Brzozowski et al., 2004; Halladin, 2015). Específicamente en la mucosa gástrica, se propuso la estabilización del HIF-1 α y la expresión de iNOS como posibles biomarcadores de daño tisular de la mucosa gástrica generado por I/R (Peña-Mercado., 2018).

2.11.1 Óxido nítrico sintasa inducible

El óxido nítrico (NO) es generado por una reacción catalizada por una familia de enzimas llamadas Óxido Nítrico Sintetas (NOS). El NO es una molécula señalizadora involucrada en muchas condiciones fisiopatológicas. En los vasos sanguíneos, el endotelio es la principal fuente de NO a través de la actividad de NOS endotelial para mantener el tono vascular, regula la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos. En particular, NO es

conocido por tener un papel importante en la homeostasis cardiovascular vía interacción con la enzima guanilato ciclasa soluble, resultando en la generación de GMP cíclico como un segundo mensajero y vasodilatación (Ginnan et al., 2008).

Existen 3 tipos distintos de isoformas de la NOS con distintos patrones de expresión celulares y tisulares: NOS neuronal (nNOS; NOS1), NOS inducible (iNOS; NOS2) y NOS endotelial (eNOS; NOS3). En general, eNOS y nNOS son expresadas constitutivamente y la producción de NO es regulada predominantemente por el flujo de calcio intracelular que se une y activa a calmodulina, la cual a su vez activa a la enzima. La iNOS produce grandes cantidades de NO ($>1 \mu\text{M}$) y se regula principalmente a nivel transcripcional. La expresión génica y la posterior traducción de RNAm están reguladas por diversos estímulos, especialmente lipopolisacáridos, endotoxinas y mediadores proinflamatorios endógenos, como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e interferón- γ . También se ha demostrado que otros estímulos, como la hipoxia, están involucrados en la activación de la expresión del gen iNOS (Yu et al., 2018). El factor de transcripción que regula parcialmente su expresión es el HIF-1 α (Lee et al., 2019), sin embargo, a menudo requiere la coestimulación de citocinas (Scheschowitsch et al., 2015). Una vía de transducción de señales importante de los estímulos anteriores es la activación de la vía de señalización NF- κB . Además, los transductores de señales JAK, junto con las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) también están implicadas en la contribución de la expresión del gen iNOS. La regulación postraduccional de la expresión del gen iNOS ocurre predominantemente a través de mecanismos que influyen en la estabilidad del RNAm de la iNOS y la regulación de la actividad catalítica (Yu et al., 2018).

Varios estudios han demostrado que el estrés oxidativo y la producción excesiva de NO tiene un papel importante en la lesión por I/R. Bajo estas condiciones se produce un incremento en la expresión de iNOS resultando en la sobreproducción de NO, el cual rápidamente reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito (ONOO^-), una RNS altamente tóxica que causa lipoperoxidación, nitración de residuos de tirosina, activación de Caspasa-3, apoptosis y muerte celular (Serman et al., 2019; Wang et al., 2020).

2.11.2 Factor de Necrosis Tumoral – alpha

El factor de necrosis tumoral-alpha ($\text{TNF}\alpha$) es producido como una proteína trimérica transmembrana tipo 2 compuesta por 212 aminoácidos con peso molecular de 26 kD que incluye una secuencia señal residual que es usualmente cortada para dar lugar a la forma soluble por medio de una metaloproteasa convertidora de TNF (Giannoudis et al., 2004). El $\text{TNF}\alpha$ es una citocina producida principalmente por macrófagos. Esta citocina juega un papel clave en condiciones patológicas como infecciones, lesiones, inflamación y desarrollo de tumores. Una vez liberada por los macrófagos activa otras células inmunes y media la producción de otras citocinas proinflamatorias (Lima et al., 2019).

Existen diferentes estresores fisiológicos que pueden estimular la secreción de TNF α tales como endotoxinas, hipoxemia, I/R, hemorragia y sistema del complemento. Una vez secretado, el TNF α tiene múltiples efectos tales como el incremento en la síntesis de NO, activación de la vía del ácido araquidónico y la activación de la COX y lipooxigenasa. Estos procesos incrementan la producción de tromboxano A2 y prostaglandina E2 (Surbatovic et al., 2013). Además, se ha reportado que el incremento en la expresión de TNF α inducida por hipoxia aumenta la permeabilidad de células epiteliales intestinales (Taylor et al., 1998) y del tracto respiratorio *in vitro*, facilitando la difusión de antígenos bacterianos y toxinas que pueden causar inflamación (Bercier & Grenier, 2019).

Los efectos del TNF α son mediados por la unión a dos receptores membranales (TNF-RI, 55kD y TNF-RII, 75kD), que se encuentran en casi todos los tipos celulares. En pacientes politraumatizados incrementa la concentración de receptores encontrándose una correlación con la presencia de SDOM (Giannoudis et al., 2004).

2.11.3 Ciclooxygenasa -2

La ciclooxigenasa (COX) existe en 2 isoformas, denominadas COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducible). Tanto la COX-1 como la COX-2 funcionan como un dímero ubicado en la superficie luminal del retículo endoplásmico y asociado con la membrana interna de la envoltura nuclear; sin embargo, la COX-2 también se encuentra en el aparato de Golgi. A pesar de las estrechas similitudes en estructura, función catalítica y localización subcelular, COX-1 y COX-2 difieren notablemente en sus perfiles de expresión. Hay varios elementos reguladores de la transcripción en la región promotora de COX-2, pero no en la COX-1. La COX-2 se expresa predominantemente durante la inflamación, por lo que es regulada por agentes proinflamatorios, incluidas citocinas y endotoxinas en diversos tipos celulares, incluidos los relacionados con la respuesta inflamatoria. Se ha evidenciado el incremento en la expresión de COX-2 en lesiones gástricas inducidas por estrés, etanol, aspirina (Brzozowski et al., 1997) y durante condiciones de I/R gastrointestinal (Kamel et al., 2020; Mazaleuskaya & Ricciotti, 2020; Omayone et al., 2020) .

3 Justificación

La isquemia esplácica es una condición frecuente en pacientes en estado crítico que puede generar una falla orgánica múltiple. La evaluación del estado clínico en este tipo de pacientes se realiza monitoreando la función cardiovascular, respiratoria, renal y hepática a partir de la estimación de parámetros como la producción de orina, la saturación de oxígeno, gases en sangre, proteína C reactiva y lactato. El inconveniente que se presenta al monitorizar estos parámetros sistémicos es que sólo se pueden detectar cuando los pacientes presentan una clara alteración de los órganos. La administración de vasodilatadores y administración de fluidos es la terapia de elección en este tipo de condiciones. El principal problema al que se enfrenta el personal médico es que al administrar este tipo de tratamiento genera reperfusión en los órganos isquémicos generando un daño mayor en el tejido, esto provocado por la generación de radicales libres, además de provocar daño en órganos distantes.

Se ha desarrollado una amplia investigación sobre varias moléculas con diferentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias con la finalidad de evitar el daño generado en la mucosa gástrica por I/R. Sin embargo, la efectividad de estas moléculas dependerá de la progresión del daño en el momento de la intervención. Es importante conocer si el daño es aún reversible para proporcionar el tratamiento adecuado. Las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes hacen a la melatonina un buen candidato para evaluar su efecto sobre los marcadores en diferentes tiempos de isquemia, lo cual podría ser importante para guiar una terapia que no esté dirigida a la prevención sino a bloquear el daño en la mucosa gástrica.

La melatonina ha sido identificada como una molécula con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias la cual ha demostrado tener efectos protectores en la mucosa gástrica, por lo que en este trabajo se busca evaluar su efecto sobre los posibles biomarcadores de estrés isquémico y en las mediciones de impedancia gástrica.

4 Pregunta de investigación

¿Qué efecto tendrá la melatonina exógena en el grado de lesión sobre la mucosa gástrica en un modelo de I/R en relación con la impedancia y a la expresión de marcadores inflamatorios y apoptóticos?

5 Hipótesis

El tratamiento con melatonina reducirá el grado de lesión sobre la mucosa gástrica en un modelo de I/R, disminuyendo la impedancia y la expresión de marcadores inflamatorios y apoptóticos.

6 Objetivo general

Evaluar el efecto de la melatonina exógena sobre los cambios en la impedancia gástrica, marcadores de proceso inflamatorio, proliferación y apoptosis después de la inducción de lesiones en la mucosa gástrica generadas por isquemia/reperfusión.

7 Objetivos particulares

- Proponer una escala para cuantificar el daño en la mucosa gástrica generado por I/R a partir de los resultados de un estudio preliminar (Índice de Lesión Tisular (ILT)).
- Evaluar el valor predictivo de los parámetros de impedancia para identificar el daño tisular irreversible.
- Relacionar los valores predictivos del ILT y de los parámetros de impedancia para identificar el tiempo de isquemia en el cual el daño en la mucosa gástrica es reversible.
- Determinar el efecto de la MT sobre la lesión gástrica inducida por isquemia después de 24 horas de reperfusión.
- Analizar el efecto de la MT sobre posibles biomarcadores de lesión gástrica (iNOS, TNF α , COX-2), proliferación (PCNA) y apoptosis (Caspasa-3 activa) después de 24 horas de reperfusión.

8 Materiales y métodos experimentales

8.1 Protocolo de experimentación

8.1.1 Definición de la población objetivo

Criterios de inclusión

Ratas macho de la cepa Wistar criadas en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, con un peso de 250-350 g.

Criterios de exclusión

Ratas que presenten alteraciones cardiorrespiratorias después de la administración de la anestesia.

Ratas que durante la apertura de la cavidad abdominal presenten datos de daño tisular gastrointestinal como sangrado, hematomas o edema.

Ratas que mueran durante el procedimiento quirúrgico.

Criterios de eliminación

Ratas que mueran durante las 24 horas de reperusión.

Procedimientos en donde se generen errores experimentales, tanto en el procedimiento quirúrgico (ruptura del vaso sanguíneo), como en los equipos utilizados (fallas en las mediciones de la impedancia gástrica), o se dañen o degraden las muestras.

Ubicación

El protocolo se aprobó por el comité de ética del Centro Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica (CI³M), siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los experimentos y la obtención de las fotomicrografías se realizaron en el quirófano experimental del CI³M de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

El procesamiento histológico se realizó en el laboratorio de biología celular de la Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa.

El procesamiento inmunohistoquímico y western blot se realizó en la unidad de investigación en enfermedades oncológicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

8.1.2 Diseño estadístico del muestreo

El trabajo se realizó en 3 etapas:

- Propuesta y validación de un ILT por medio de un modelo de I/R gástrica

- Modelo de isquemia prolongada (Isquemia de 60, 90 y 120 min) para identificar el tiempo de isquemia a partir del cual el daño en la mucosa gástrica es reversible.
- Modelo de I/R para evaluar el efecto de la MT sobre el daño en la mucosa gástrica.

Las ratas se alojaron en cajas de policarbonato bajo periodos de luz – oscuridad (12-12); se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* hasta el momento de la cirugía.

Modelo de I/R para validar el ILT propuesto.

Se realizaron 4 grupos experimentales: Control, Sham, Isquemia 30 min, Isquemia 30 min/Reperusión 60 min (Isq/Rep 60) (Fig. 10).

Grupo Control (5 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular, sin oclusión de la arteria celiaca.

Grupo Sham (5 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 90 min de exposición de la cavidad abdominal sin oclusión de la arteria celiaca.

Grupo Isq 30 (5 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 30 min de isquemia producida por oclusión de la arteria celiaca.

Grupo Isq/Rep 60 (5 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 60 min de isquemia producida por oclusión de la arteria celiaca.

Modelo de isquemia prolongada para identificar datos histopatológicos relacionados con daño epitelial reversible en mucosa gástrica.

Se realizaron 4 grupos experimentales: Control, Isquemia 60 min (Isq 60), Isquemia 90 min (Isq 90) e Isquemia 120 min (Isq 120) (Fig. 10).

Grupo Control (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular, sin oclusión de la arteria celiaca.

Grupo Isq 60 (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 60 min de isquemia producida por oclusión de la arteria celiaca.

Grupo Isq 90 (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 90 min de isquemia producida por oclusión de la arteria celiaca.

Grupo Isq 120 (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 120 min de isquemia producida por oclusión de la arteria celiaca.

Modelo de I/R (60 min/24 h) para evaluar el efecto de la MT sobre el daño en la mucosa gástrica

Se realizaron 3 grupos experimentales: Sham, I/R sin tratamiento (I/R) e I/R con melatonina (I/R+MT) (Fig. 10).

Grupo Sham (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular, sin oclusión de la arteria celiaca, después de mantener abierta la cavidad abdominal por 60 min.

Grupo I/R (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 60 min de oclusión de la arteria celiaca y 24 horas de reperfusión. Se administraron 300 μ L de solución salina (0.9%) por vía intraperitoneal (i.p.) 5 min antes de retirar la oclusión.

Grupo I/R+MT (8 ratas): se tomaron mediciones de impedancia y biopsias de la porción glandular después de 60 min de oclusión de la arteria celiaca y 24 horas de reperfusión. Se administraron 300 μ L de MT (10 mg/kg) por vía i.p. 5 min antes de retirar la oclusión.

8.2 Diseño experimental

Procedimiento quirúrgico

Se utilizaron ratas macho Wistar de entre 250 y 350 g de peso procedentes del bioterio de la UAM – Iztapalapa. Las ratas se anestesiaron con xilacina (10 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg) por vía i.p. antes de salir del bioterio para disminuir el estrés generado por el traslado de los animales hacia el quirófano experimental del CI³M. Una vez en el laboratorio, se les colocó una manta térmica y se mantuvieron anestesiadas con isoflurano al 2% hasta finalizar el experimento.

Grupo control (Espectros de impedancia)

Se realizó la apertura de la cavidad abdominal, se expuso el estómago y se hizo una incisión por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%). Posteriormente, se tomaron los espectros de impedancia de la porción glandular de la mucosa gástrica.

Grupo control (Biopsias)

Se realizó la apertura de la cavidad abdominal, se expuso el estómago y se hizo una incisión por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%). Posteriormente, se tomaron las biopsias de la porción glandular (3 \times 3 mm) para el análisis histológico y molecular.

Grupos Sham (Espectros de impedancia y biopsias)

Se realizó la apertura abdominal, se expuso el estómago y se identificó la arteria celiaca, después se tocó con la pinza sin ocluir y se dejó la cavidad abdominal abierta por 60 min. Pasado este tiempo, se realizó una incisión por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%). Finalmente, se obtuvieron los espectros de impedancia y las biopsias de la porción glandular (3 \times 3 mm) para el análisis histológico y molecular.

Grupos isquemia 30, 60, 90 y 120 min (Espectros de impedancia y biopsias)

Se realizó la apertura de la cavidad abdominal, se expuso el estómago, se identificó la arteria celiaca y se ocluyó por 30, 60, 90 o 120 min dependiendo del grupo. Pasado este tiempo, se realizó una incisión por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%). Se tomaron los espectros de impedancia de la mucosa gástrica. Posteriormente, se tomaron las biopsias de la porción glandular (3 × 3 mm) para el análisis histológico y molecular.

Grupo Isq/Rep (30/60 min) (Espectros de impedancia y biopsias)

Se realizó la apertura de la cavidad abdominal, se identificó la arteria celiaca y se ocluyó por 30 min. Pasado este tiempo, se retiró la oclusión para permitir la reperfusión por 60 min. Después se expuso el estómago y se abrió por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%) para tomar los espectros de impedancia y las biopsias de la porción glandular (3 × 3 mm) para el análisis histológico.

Grupo I/R (60 min/24 horas) (Espectros de impedancia y biopsias)

Se realizó la apertura de la cavidad abdominal, se expuso el estómago, se identificó la arteria celiaca y se ocluyó por 60 min. Se administraron 300 µL de solución salina (0.9%) por vía i.p. 5 min antes de retirar la pinza. Después de que pasaron 60 min de isquemia, se retiró la pinza y se suturó la cavidad abdominal. Las ratas se alojaron en jaulas individuales con libre acceso a agua. Después de 24 horas, las ratas se anestesiaron nuevamente, posteriormente se expuso el estómago y se abrió por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%) para tomar los espectros de impedancia y las biopsias de la porción glandular (3 × 3 mm) para el análisis histológico y molecular.

Grupo I/R+MT (60 min/24 horas) (Espectros de impedancia y biopsias)

Se realizó la apertura de la cavidad abdominal, se expuso el estómago y se bloqueó el flujo sanguíneo de la arteria celiaca por 60 min. Se administraron 10 mg/kg de MT vía i.p. 5 min antes de retirar la oclusión (Shahrokhi et al., 2016). Después de que pasaron 60 min de isquemia, se retiró la pinza y se suturó la apertura. Las ratas se alojaron en jaulas individuales con libre acceso a agua. Después de 24 horas, las ratas se anestesiaron nuevamente, se expuso el estómago y se abrió por la curvatura mayor, se extrajo el contenido gástrico y se lavó con solución salina (0.9%) para tomar los espectros de impedancia y las biopsias de la porción glandular (3 × 3 mm) para el análisis histológico y molecular.

Al finalizar el procedimiento, las ratas se sacrificaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995).

Las biopsias obtenidas para el análisis histológico se fijaron en formalina neutra estabilizada (10%) y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Las biopsias para el análisis molecular se pesaron y se congelaron en hielo seco, después se trasladaron a la UAM-Cuajimalpa donde se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

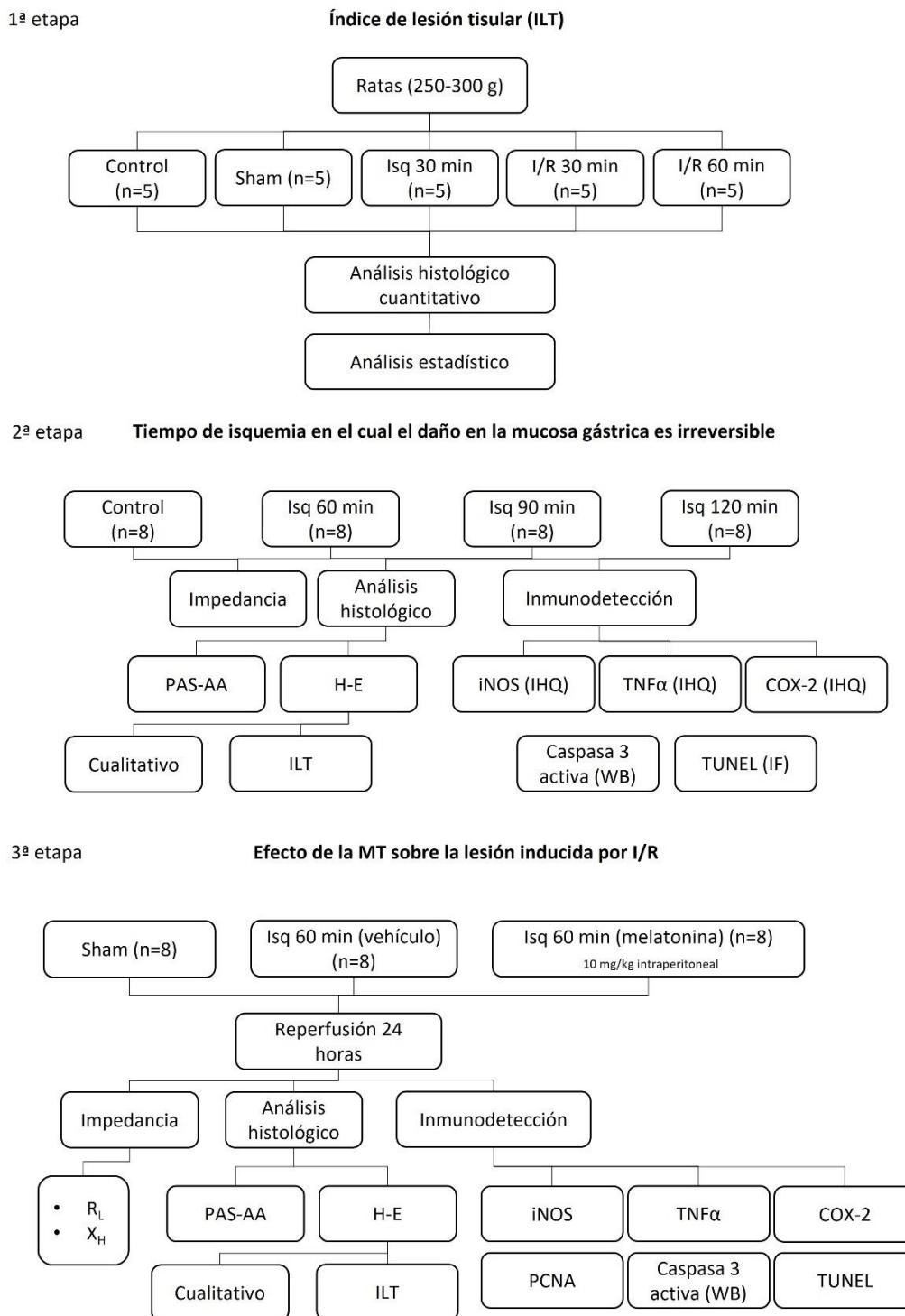


Figura 10. Diseño experimental.

8.3 Proceso de captación de información

8.3.1 Espectroscopía de impedancia gástrica

Para las mediciones de impedancia gástrica se introdujo la sonda nasogástrica espectrométrica por la curvatura mayor, cuidando que los electrodos se mantuvieran siempre en contacto con la mucosa gástrica y se obtuvieron las mediciones de resistencia y reactancia para las 23 frecuencias que forman el espectro cada 30 segundos durante 5 min aproximadamente; después se calcularon fuera de línea a través de un modelo matemático propuesto previamente para la resistencia y reactancia a bajas y altas frecuencias (R_L , X_L , R_H y X_H).

8.3.2 Técnica histológica

Se obtuvieron biopsias de la mucosa gástrica de los grupos experimentales, las cuales se sumergieron en formalina neutra estabilizada (10%). Las biopsias se dividieron para obtener cortes transversales y longitudinales, posteriormente se lavaron con PBS. El procesamiento histológico se realizó con el procesador de tejidos Leica TP1020. Las biopsias se deshidrataron con alcohol etílico (70%, 80%, 96% y 100%), se aclararon con 2 pasos de xileno y posteriormente se embebieron en parafina (Paraplast Plus; Oxford Labware, St. Louis, Mo, USA) en un microarreglo de tejidos (MAT). Los bloques se almacenaron a 4°C.

8.3.3 Tinción Hematoxilina – Eosina

La tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: los cortes se desparafinaron con xileno, se hidrataron en diferentes pasos de alcohol etílico (100%, 96%, 80%, 70%) hasta llegar a agua destilada. Las laminillas se sumergieron en Hematoxilina de Harris, después se lavaron con agua de grifo, se sumergieron en alcohol absoluto-ácido clorhídrico (1:1) y se realizó un lavado, posteriormente se sumergieron en solución de Scott y a continuación se sumergieron en Eosina, finalmente se deshidrataron en varios pasos de alcohol etílico (96%, 100%) y xileno para realizar el montaje con resina (Entellan; Sigma – Aldrich).

8.3.4 Tinción Ácido Peryódico de Schiff-Azul Alcían

La tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS)-Azul Alcían (AA) se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: se realizaron cortes longitudinales de 3 μm de espesor, después se desparafinaron con xileno, se hidrataron en diferentes pasos de alcohol etílico (100%, 96%, 80%, 70%) hasta llegar a agua destilada. Las laminillas se sumergieron en solución azul alcían (pH-2.5) y se hizo un lavado con agua destilada, posteriormente se óxido en ácido peryódico y se lavó nuevamente con agua destilada, posteriormente se sumergieron en solución de reactivo de Schiff, a continuación, se realizaron 3 pasos en solución de metabisulfito de sodio y se lavaron con agua destilada, finalmente, se deshidrataron en alcohol etílico (96%, 100%) y xileno para realizar el montaje con resina.

8.3.5 Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes longitudinales de 3 μm de espesor, los cuales se premontaron en portaobjetos electrocargados (Superfrost Plus Glass Slides, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), se desparafinaron con xileno, se hidrataron en diferentes pasos de alcohol etílico (100%, 96% y 70%) hasta llegar a agua destilada. Las muestras se sometieron a recuperación antigénica en un *buffer* de citrato de sodio (pH-6) (20x Immuno/DNA Retriever with Citrate, Santa Barbara, California, USA), durante 40 min en un recuperador de antígenos (Retriever 2100, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). El bloqueo de peroxidasa endógena se hizo con peróxido de hidrógeno al 3% por 30 min. El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con albumina 4% por 60 min. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-iNOS (*rabbit policlonal*, SC-649, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; dilución 1:100), anti-TNF α (1:200, *Goat polyclonal*, SC-1351), anti-COX-2 (1:1000, *Rabbit polyclonal*, Novus, NB-100-689) y anti-PCNA (1:1000, *Rabbit polyclonal*, ABCAM, AB-2426) en una cámara húmeda toda la noche a 4°C. Se realizó un control de isotipo como control negativo (Calbiochem millipore, NI01-100 (*rabbit*); NI02-100 (*goat*)). El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (*antirabbit*: MP-7401, *antigoat*: MP-7405; Vector Laboratories) se incubó por 30 min. El complejo antígeno-anticuerpo se reveló con un kit de inmunodetección (Vector Laboratories) y se hizo la contratinción con hematoxilina.

8.3.6 Western blot

La extracción de proteína total se realizó con el *buffer* de lisis T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, #7850, Rockford, USA) adicionado con inhibidor de proteasas (cOmplete. EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 11873580001, Sigma-Aldrich, Mannheim, Germany). Las biopsias se homogenizaron con el *buffer* de lisis (100 μL) y se centrifugaron a 14000 rpm, se separó la fase acuosa y se almacenó a -80°C. La concentración de proteínas se cuantificó usando un kit (Pierce BCA Protein Assay Kit, #23227, Thermo Scientific Rockford, USA). Las proteínas (60 μg) se separaron en un gel de acrilamida 10% (SDS-PAGE) y se transfirieron hacia una membrana de nitrocelulosa (AmershamTM ProtranTM 0.2 m NC, 10600001, GE Healthcare Life Sciences, Germany). El bloqueo se hizo con leche baja en grasa (5%) con TBS-Tween 20 por 60 min. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario anti-caspasa-3 (mouse monoclonal, SC-56053, 1:1000) y anti-GAPDH (goat polyclonal, SC-48167, 1:10000) por toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, se enjuagaron con TBS-Tween 20 y se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a HRP (m-IgG κ BP-HRP, SC-516102, 1:1000); por 2 horas. La inmunodetección se hizo por quimioluminiscencia (Super Signal[®] West Femto, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El análisis por densitometría se realizó con el software Image J, versión 1.45 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

8.3.7 Ensayo de apoptosis (TUNEL)

La detección de la fragmentación de DNA se realizó con la técnica de TUNEL (*Terminal dUTP nick-end labeling*) con el kit *In situ cell death detection fluorescein* (Roche

Diagnostics, Indianapolis, USA). Se realizaron cortes longitudinales de 5 μm de espesor, los cuales se premontaron en portaobjetos electrocargados, se desparafinaron con xileno, se hidrataron en diferentes pasos de alcohol etílico (100%, 96% y 70%) hasta llegar a agua destilada y se sometieron a recuperación antigénica en *buffer* de citrato de sodio (pH-6) (20 \times Immuno/DNA Retriever with Citrate, Santa Barbara, California, USA) por 40 min en un recuperador de antígenos; se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL conjugada a fluoresceína por 60 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda en completa oscuridad. Finalmente, el montaje se realizó con FluoroshieldTM with DAPI.

8.4 Procedimientos

8.4.1 Espectros de impedancia gástrica

Se introdujo la sonda nasogástrica espectrométrica en la mucosa gástrica por la apertura en la curvatura mayor del estómago. Los 2 electrodos externos inyectaron la corriente eléctrica alterna a 23 frecuencias diferentes y los 2 electrodos que se encuentran en medio midieron el voltaje en un intervalo de frecuencias entre 215 Hz y 1 MHz.

8.4.2 Análisis histológico cualitativo

De cada uno de los ejemplares, se realizaron 9 cortes transversales y 9 longitudinales de 5 μm de espesor con un microtomo de rotación (RM2245, LEICA). Los cortes se premontaron en portaobjetos esmerilados (MADESA) y teñidos con la técnica de H-E de acuerdo con el protocolo utilizado en el Laboratorio de Neurobiología Tisular de la UAM-Iztapalapa. Las laminillas se analizaron con el microscopio fotónico de campo claro (Axioscope II, Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) y las imágenes se digitalizaron con la cámara AxioCam Mrc5 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

8.4.3 Análisis cuantitativo a partir del ILT

Para cuantificar el daño en la mucosa gástrica generado por I/R se retomó la propuesta de un “Índice de lesión tisular” (ILT), el cual considera alteraciones histopatológicas propias del daño tisular como son: área vascular, área glandular, daño celular (edema, núcleos picnóticos, carioplásticos, cariorréticos) y profundidad de la erosión epitelial (Pena-Mercado et al., 2016).

El procedimiento a partir del cual se obtuvieron los datos para el ILT se describirá a continuación. Para cuantificar el grado de lesión, se generó un modelo de I/R gástrica por oclusión de la arteria celiaca (Wada et al., 1996), se utilizaron 20 ratas Wistar macho de 250-350 g, las cuales se asignaron aleatoriamente a 4 grupos: Control, Isquemia 30 min, Isquemia 30 min con perfusión de 30 min (I/R 30 min) e Isquemia de 30 min con 60 min de perfusión (I/R 60 min). El procedimiento quirúrgico se realizó como se describió en el diseño experimental. Las biopsias se fijaron en formaldehído 10%, se procesaron de acuerdo con la técnica histológica estándar. Se realizaron cortes transversales y longitudinales de 5 μm de espesor los cuales se tiñeron con H-E.

Las variables consideradas para este ILT se nombraron: área vascular (μm^2), área del lumen glandular (μm^2), daño celular (número de células dañadas) y erosión epitelial. Para cuantificar estas variables se tomaron 9 fotomicrografías de cortes transversales ($\times 400$) y longitudinales ($\times 100$) de 5 μm de espesor. Las laminillas correspondientes al plano transversal se observaron a un aumento general $\times 100$ para identificar 3 zonas del campo de visión, para esto, la imagen se dividió en 9 cuadrantes y se digitalizaron las fotomicrografías de los campos 2, 4, 9 de la primera laminilla; en la segunda los campos 1, 6, 7; finalmente, en la tercera los campos 3, 5, 8, con un aumento general $\times 400$, para obtener 27 imágenes transversales de cada ejemplar. Para identificar la profundidad de la erosión epitelial en la mucosa, se digitalizaron 9 fotomicrografías del corte longitudinal con un aumento general $\times 100$. Las imágenes se guardaron en formato TIF con un tamaño de 2584×1936 píxeles. La cuantificación de las variables se realizó con el software AxioVision SE64 (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) con los siguientes parámetros: escala X & Y con un valor de $0.1418 \mu\text{m}/\text{píxel}$.

Para medir el área vascular, se delimitaron los vasos sanguíneos tomando como referencia la continuidad del endotelio vascular y la presencia de eritrocitos. Para el área del lumen glandular, este se delimitó de acuerdo con la extensión del lumen incluyendo las glándulas que hayan perdido la continuidad por alteraciones en la arquitectura glandular. Para el daño celular, se contaron el número de células que presentaron edema celular, cambios hidrópicos y datos de muerte celular por apoptosis o necrosis. Para la profundidad de la erosión epitelial se consideró descamación epitelial, erosión hasta porción oxíntica y fúndica.

Para determinar la extensión del daño se propuso una puntuación de 0-2. Para las variables área vascular, área del lumen glandular y daño celular, fue necesario asignar una escala para cada una de las puntuaciones. Para esto, se tomó la totalidad de los datos de cada una de las variables y se realizó la estadística descriptiva para identificar los percentiles 25, 50 y 75 y el rango intercuartil (RIC). Posteriormente, se hizo una gráfica de caja y bigote para conocer la distribución de los datos y asignar la escala.

A partir de estos resultados, se propuso una categorización “sin daño tisular” y “daño tisular”, ya que se ha identificado que, en condiciones de estrés isquémico de corto tiempo, puede existir daño celular agudo sin evidencias de erosiones en la mucosa gástrica. Para esto, se tomó la totalidad de los datos de la variable daño celular *vs* los resultados del ILT y se realizó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para identificar el punto de corte y asignar la puntuación del ILT a partir del cual se categorizaría el daño.

8.4.4 Análisis cuantitativo de la tinción de mucinas con técnica de PAS-AA

El análisis cuantitativo se realizó por medio de patología digital, los cortes se escanearon y digitalizaron (Aperio CS2, Leica Biosystems) para cuantificar el área AA-positiva y PAS-positiva. La cuantificación se realizó con el software ImageJ con el algoritmo de deconvolución de color.

8.4.5 Análisis inmunohistoquímico cuantitativo

El análisis cuantitativo se realizó por medio de patología digital, los cortes se escanearon y digitalizaron (Aperio CS2, Leica Biosystems) para cuantificar la intensidad de la tinción (Intensidad/área) en los cortes inmunoteñidos para iNOS, TNF α y COX-2, así como el número de núcleos PCNA-positivos en la mucosa gástrica.

8.4.6 Análisis inmunofluorescencia ensayo de apoptosis TUNEL

Para el análisis cuantitativo del número de núcleos TUNEL-positivos, se obtuvieron 3 campos de la porción superior de la mucosa gástrica ($\times 400$) por corte. La observación y la cuantificación se realizó con el microscopio invertido Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss), las imágenes se digitalizaron y se analizaron con el software ZEN (Carl Zeiss).

8.4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS 21 (IBM Corporation, NY, USA) y GraphPad Prism 6 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de impedancia y las variables (área del lumen, vascular y daño celular) de los grupos experimentales se hizo una prueba ANOVA (*post hoc* de Tuckey) y una de Kruskal – Wallis (*post hoc* T3 de Dunnett) para el ILT. Para identificar cuáles de los parámetros de impedancia podrían relacionarse con el daño en la mucosa gástrica cuantificado con el ILT se realizó una regresión lineal segmentada. Para identificar los valores predictivos de la puntuación del ILT y de los parámetros de impedancia a partir de los cuales se puede considerar que existe daño tisular en la mucosa gástrica, se realizó una curva ROC. El valor de significancia se fijó en $p < 0.05$. Los valores son presentados como la media \pm ESM.

9 Resultados

9.1 Obtención de la escala para asignar la puntuación del ILT

Se obtuvieron las mediciones de las variables propuestas (área vascular, área del lumen glandular, número de células dañadas y profundidad de la erosión) de cada uno de los grupos (Control, Isq 30, Isq/Rep 30 min e I/R 60 min) (Fig. 11) y se realizó la estadística descriptiva de todos los datos.

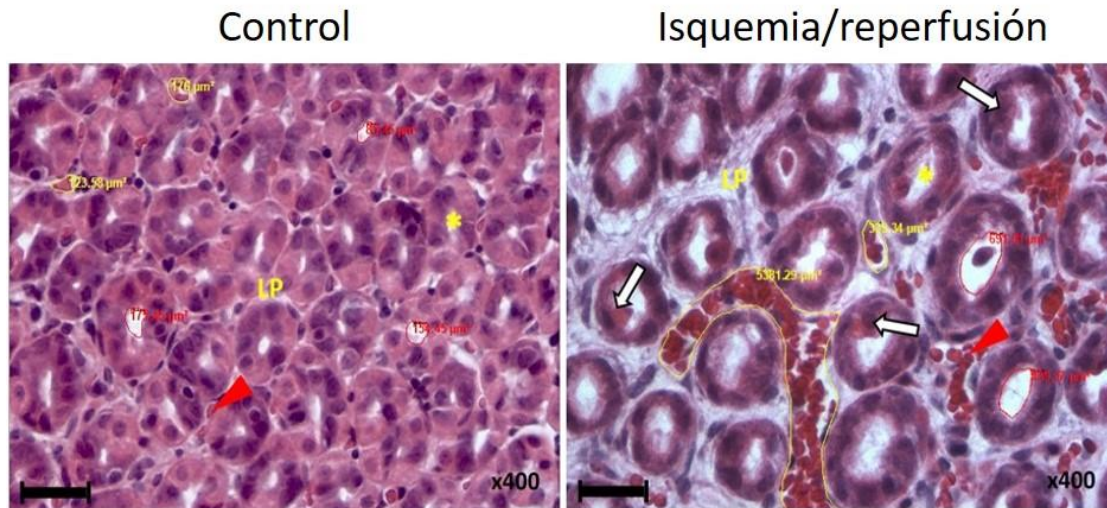


Figura 11. Fotomicrografías de cortes transversales de mucosa gástrica de rata. Mediciones de las variables consideradas para el ILT. Mediciones del área vascular (trazo amarillo), mediciones del área del lumen glandular (trazo rojo), vasos sanguíneos (punta de flecha), lumen glandular (asterisco), células dañadas (flecha hueca), lámina propia (LP). H & E. Barra de escala: 50 μm .

Posteriormente se obtuvieron los percentiles 25, 50 y 75 (Tabla 3), se delimitaron los intervalos y se realizó una gráfica de caja y bigote (*Box plot*) para identificar la distribución de los datos y asignar la puntuación siguiente:

Área vascular (μm^2): puntuación = 0 ($\leq P75$), se estableció para mediciones de los vasos sanguíneos los cuales no presentan datos aparentes de lesión; la puntuación = 1 ($> P75$ a $\text{RIC} \times 1.5$) y la puntuación = 2 (outliers) corresponden a vasos sanguíneos dilatados (Fig. 12A). Área del lumen glandular (μm^2): puntuación = 0 ($\leq P75$), se asignó para mediciones del lumen glandular en las cuales el epitelio presenta características normales; la puntuación = 1 ($> P75$ a $\text{RIC} \times 1.5$) y la puntuación = 2 (outliers) se corresponde al incremento en el área del lumen glandular debido a atrofia de células epiteliales y a zonas con pérdida de la arquitectura glandular, los cuales generan zonas de exfoliación o erosión epitelial (Fig. 12B). Daño celular: puntuación = 0 se asignó para el intervalo entre el valor mínimo a P25, la puntuación = 1 para el intervalo entre P25 – P50, la puntuación = 2 para el intervalo entre P50 y el valor máximo (Fig. 12C). Erosión epitelial: puntuación = 0, epitelio superficial conservado; puntuación = 1, exfoliación o erosión del epitelio superficial; puntuación = 2, profundidad de la erosión hasta la porción oxíntica.

Tabla 3. Percentiles 25, 50, 75 y el rango intercuartil (RIC) de las variables cuantificadas

VARIABLES	P25	P50	P75	RIC
Área vascular (μm^2)	67.46	127.7	268	200.54
Área del lumen glandular (μm^2)	91.60	204.2	307.2	215.6
Daño celular (Células dañadas)	24	83	187	163

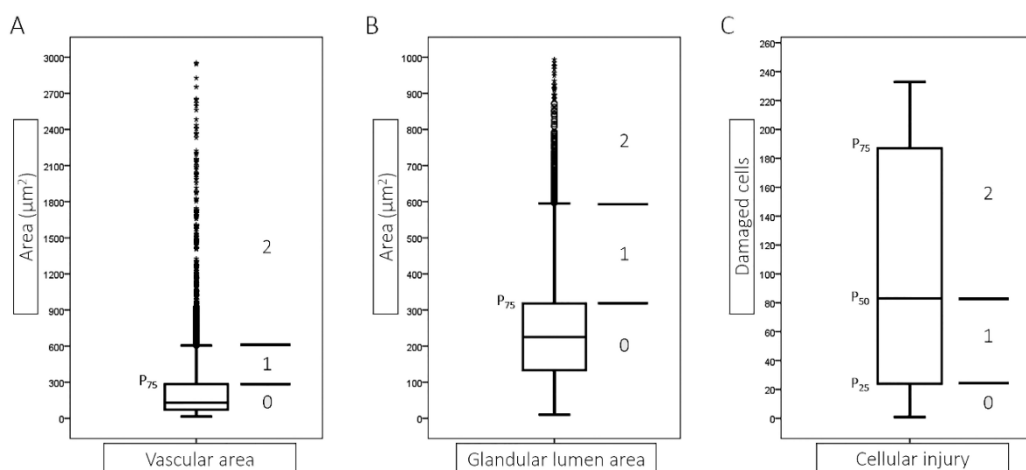


Figura 12. Gráfica de caja-bigote para asignar la puntuación del índice de lesión tisular (ILT) (0-2). A) Área Vascular (μm^2); B) Área del lumen glandular (μm^2); C) Daño celular (Tomada de Peña-Mercado et al., 2018).

La escala para asignar la puntuación de cada una de las variables se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Escala para indicar la puntuación para cada una de las variables.

Puntuación	0	1	2
Área vascular	100 - 300 μm^2	301-600 μm^2	$\geq 601 \mu\text{m}^2$
Área del lumen glandular	50 - 300 μm^2	301-600 μm^2	$\geq 601 \mu\text{m}^2$
Daño celular (número de células edematizadas, núcleos carioplícticos o picnóticos)	≤ 25	26-85	≥ 86
Erosión epitelial	Sin erosión	Erosión de epitelio superficial	Erosión hasta la porción oxíntica

Se realizó una curva ROC (Fig. 13) y se obtuvo un área bajo la curva de 0.993, además se identificó el punto de mayor sensibilidad (0.96) y especificidad (0.96), con este resultado se propuso que una puntuación > 3 sugiere que ya existe daño tisular en la mucosa gástrica.

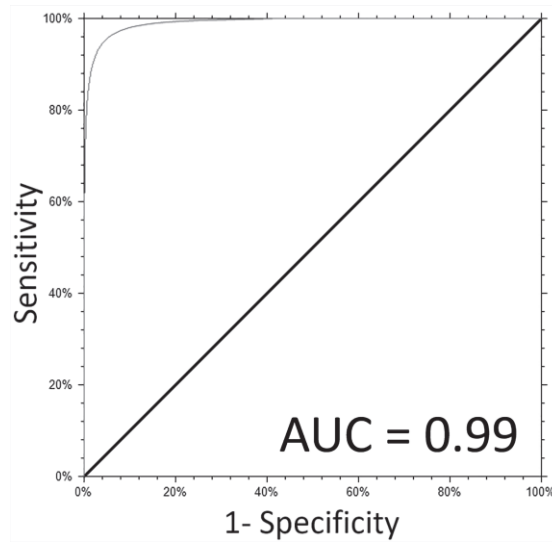


Figura 13. Curva ROC para categorizar el daño en la mucosa gástrica comparando el grupo control y los grupos experimentales (Tomada de Peña-Mercado et al., 2018).

9.2 Validación del ILT

Los resultados de la cuantificación realizada con el ILT (Fig. 14) fueron consistentes con los datos histopatológicos reportados, siendo el grupo I/R 60 min el que obtuvo una puntuación > 3 (5.4 puntos) y consecuentemente, fue el grupo que presentó daño tisular generado por erosión de la mucosa gástrica hasta la porción oxíntica (Peña-Mercado et al., 2018).

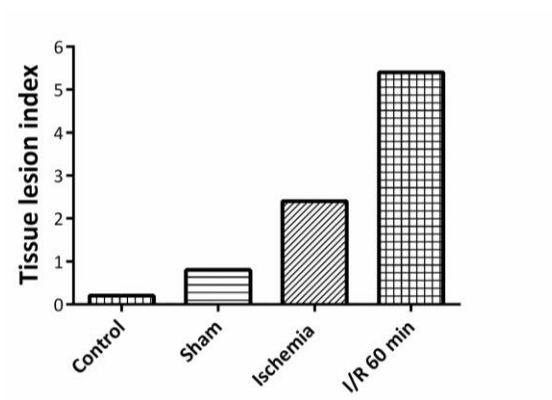


Figura 14. Puntuación del ILT para el grupo Control y los experimentales: Control (0.2 puntos); Sham (0.8 puntos); Isquemia (2.4 puntos); I/R 60 min (5.4 puntos) (Tomada de Peña-Mercado et al., 2018).

9.3 Análisis de impedancia gástrica de los grupos Control, Isq 60, 90 y 120 min.

Para identificar el efecto de diferentes tiempos de isquemia en la mucosa gástrica se obtuvieron los espectros de impedancia (Fig. 15-A) y una gráfica de Cole-Cole (Fig. 15-B) de los grupos Control Isq 60, 90 y 120 min, en los cuales se identificó un aumento, tanto en la R_L y la X_L (frecuencias < 10000 Hz) en los grupos isquémicos siendo el grupo de 90 min el que presentó el mayor cambio. Mientras que a altas frecuencias (>10000 Hz) no se observaron cambios importantes en la R_H de los grupos isquémicos; sin embargo, la X_H en los grupos Isq 90 y 120 min presentó un incremento con respecto al grupo Isq 60 min.

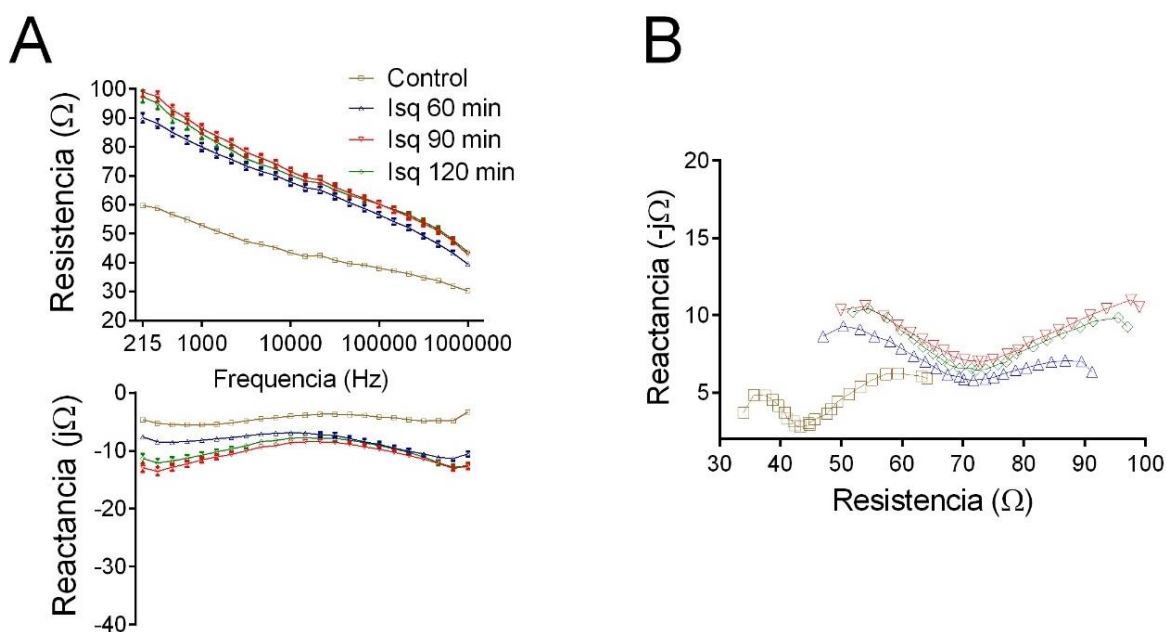


Figura 15. A) Espectros de impedancia gástrica (resistencia y reactancia) de los grupos Control, Isq 60, 90 y 120min. Los datos son expresados como la media \pm ESM. B) Gráfica de Cole-Cole (resistencia vs reactancia).

Se calcularon los parámetros de impedancia gástrica a bajas (R_L y X_L) y altas (R_H y X_H) frecuencias de las condiciones experimentales (Fig. 16). Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de estos se realizó una prueba ANOVA.

En el análisis de la R_L de los grupos Isq 60 min, Isq 90 min e Isq 120 min, se identificó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) con respecto al grupo Control, este incremento se da de manera tiempo-dependiente, siendo los grupos Isq 90 y 120 min los que presentaron el mayor aumento (Fig. 16A). La R_H de los grupos Isq 60 min, Isq 90 min e Isq 120 min incrementó significativamente ($p < 0.001$) con respecto al grupo Control; sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre ellos (Fig. 16B).

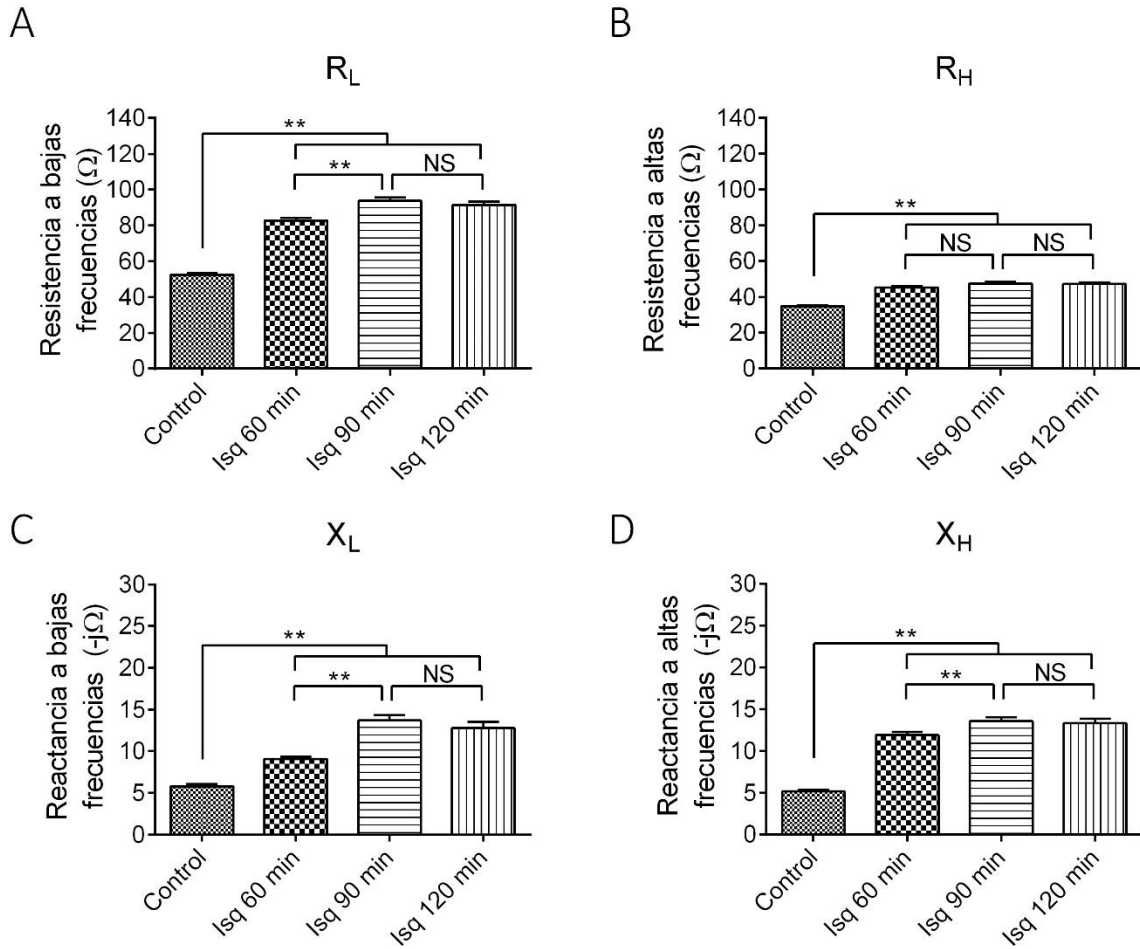


Figura 16. Representación gráfica de los parámetros de impedancia de los grupos experimentales. A) Resistencia a bajas frecuencias (Ω): Control (52.5 ± 0.7), Isq 60 min (82.7 ± 1.3), Isq 90 min (93.7 ± 1.8), Isq 120 min (91.4 ± 2.0). B) Resistencia a altas frecuencias (Ω): Control (34.8 ± 0.3), Isq 60 min (45.2 ± 0.6), Isq 90 min (47.4 ± 0.7), Isq 120 min (47.1 ± 0.9). C) Reactancia a bajas frecuencias ($-j\Omega$): Control (5.7 ± 0.2), Isq 60 min (9.0 ± 0.2), Isq 90 min (13.6 ± 0.6), Isq 120 min (12.8 ± 0.7). D) Reactancia a altas frecuencias ($-j\Omega$): Control (5.1 ± 0.1), Isq 60 min (11.8 ± 0.4), Isq 90 min (13.5 ± 0.4), Isq 120 min (13.3 ± 0.5). ** $p < 0.001$. Los datos son expresados como la media \pm ESM. (NS) no significativo.

El análisis de la X_L de los grupos Isq 60 min, Isq 90 min e Isq 120 min mostró un incremento significativo ($p < 0.001$) con respecto al Control, siendo los 2 últimos los que presentaron el mayor incremento (Fig. 16C). La X_H de los grupos Isq 60 min, Isq 90 min e Isq 120 min presentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) con respecto al Control, siendo los 2 últimos los que presentaron el mayor incremento; sin embargo, no se presentaron diferencias entre ellos (Fig. 16D).

La R_L en los grupos isquémicos presentó incremento gradual, indicando que existe un proceso de edematización glandular que se agrava de manera tiempo-dependiente. Por otra parte, la R_H fue el parámetro de impedancia que presentó los menores cambios entre los grupos de Isq 60, 90 y 120 min con respecto al grupo Control. Mientras que la X_L y la X_H

en los grupos isquémicos presentaron un comportamiento similar a la R_L, estos cambios sugieren que hay daño en la membrana celular generado por la pérdida de oxígeno.

9.4 Análisis histológico para identificar el tiempo de isquemia en el cual el daño puede ser revertido

Para identificar el tiempo de isquemia en el cual el daño en la mucosa gástrica es reversible se obtuvieron cortes transversales y longitudinales de 5 µm de espesor de los grupos: Control (Fig. 17A, B), Isq 60 min (Fig. 17C, D), Isq 90 min (Fig. 17E, F) e Isq 120 min (Fig. 17G, H). En el análisis histopatológico del grupo Control (Fig. 17A, B), se observó la estructura glandular conservada (Fig. 17A). En el corte transversal se identificaron las glándulas de la mucosa, espacio de la lámina propia y vasos sanguíneos sin datos aparentes de lesión (Fig. 17B). En el grupo Isq 60 min (Fig. 17C, D), se observaron áreas de dilatación vascular con presencia de eritrocitos desde la región superior y hasta la región fúndica de la mucosa gástrica. En el corte transversal, se identificaron algunas células con vacuolización citoplasmática lo que indica degeneración hidrópica. A nivel de la lámina propia, se identificaron vasos sanguíneos con dilatación importante y abundante presencia de eritrocitos lo que indica congestión vascular (Fig. 17D).

En el grupo Isq 90 min (Fig. 17E, F), se observaron vasos sanguíneos dilatados; además se identificaron zonas con descamación de células del epitelio superficial (Fig. 17E). En el corte transversal, se observaron algunas células del epitelio glandular con aumento en la eosinofilia y condensación nuclear, las cuales pierden las uniones intercelulares y se desprenden hacia el lumen glandular; a nivel de la lámina propia, se identificaron vasos sanguíneos dilatados y zonas hemorrágicas (Fig. 17F).

En el grupo Isq 120 min (Fig. 17G, H), se observaron áreas de ulceración (Fig. 17G). En el corte transversal, se observaron células del epitelio glandular desprendidas de la membrana basal, las cuales presentaron aumento en la eosinofilia y condensación nuclear. A nivel de la lámina propia, se identificaron zonas de hemorragia (Fig. 17H).

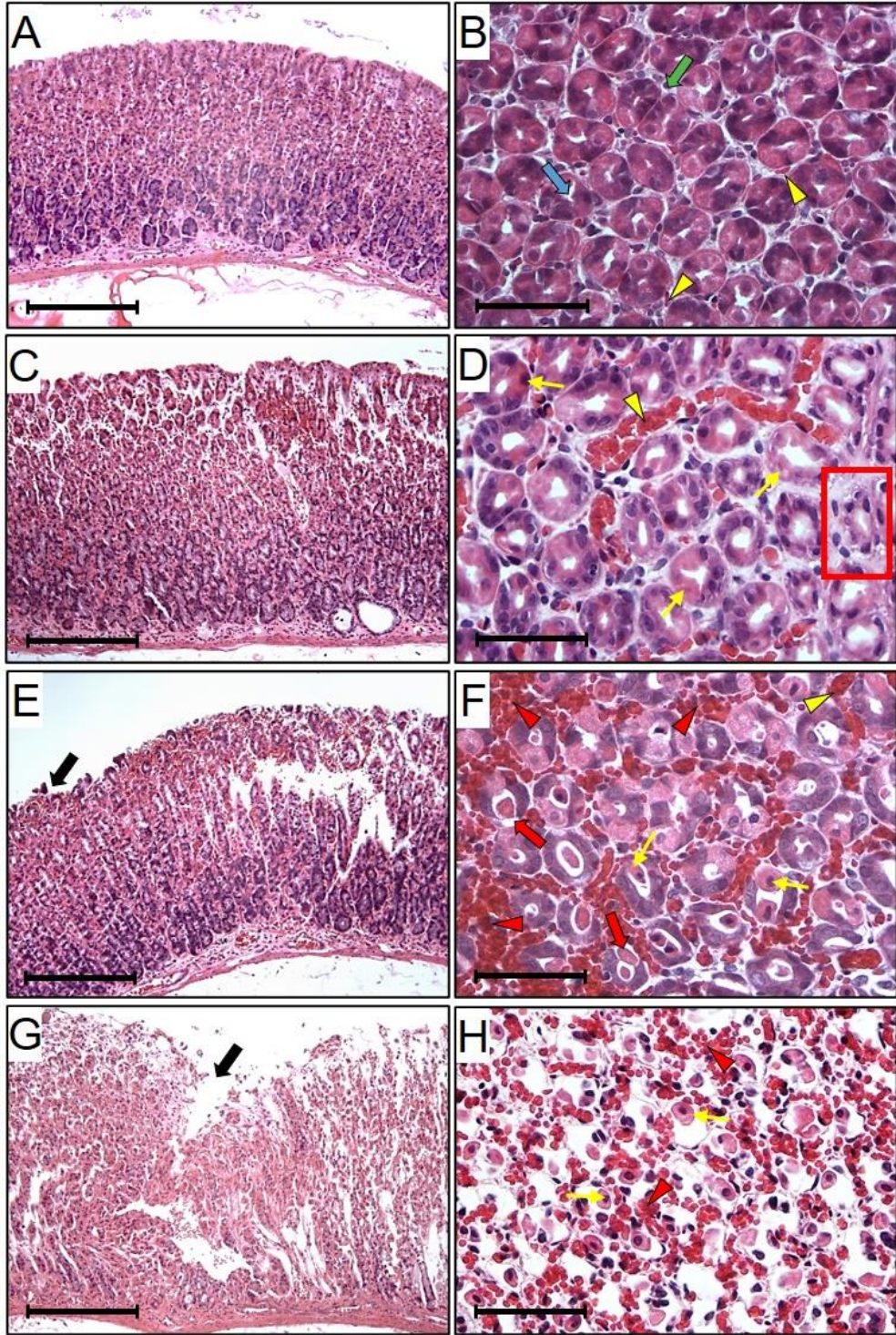


Figura 17. Fotomicrografías de cortes longitudinales (A, C, E, G) y transversales (B, D, F, H) de mucosa gástrica de los grupos experimentales: Control (A, B), Isq 60 min (C, D), Isq 90 min (E, F) e Isq 120 min (G, H). Identificadores: Lámina propia (Flecha verde); Lumen glandular (Flecha azul); Vasos sanguíneos (Cabeza de flecha); Células dañadas (Flecha amarilla delgada); Glándula con cambios hidrópicos (rectángulo rojo). H&E. Barra de escala: 100 μ m, \times 100 (A, C, E y G) y 50 μ m, \times 400 (B, D, F, H).

9.5 Análisis histológico cuantitativo (ILT)

En el análisis cuantitativo (ILT) se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en la puntuación entre los grupos isquémicos con respecto al grupo Control. Los grupos Isq 60, 90 y 120 min presentaron una puntuación > 3 y de acuerdo la categorización del ILT existe lesión tisular; sin embargo, la severidad incrementa de manera tiempo-dependiente (Tabla 5), siendo en el grupo Isq 120 min en donde existe un mayor daño; sin embargo, a partir de los 90 min de isquemia puede comprometerse la integridad funcional de la mucosa gástrica debido a la pérdida de las uniones intercelulares (Fig. 18).

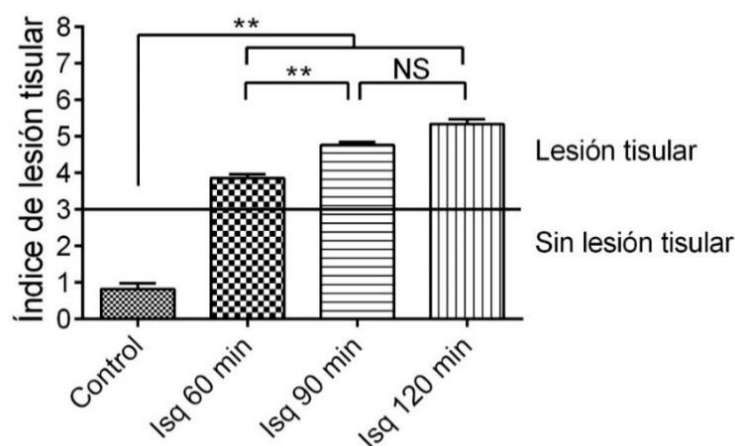


Figura 18. Representación gráfica de la puntuación del ILT de los grupos experimentales: Control (0.8 ± 0.1), Isq 60 min (3.8 ± 0.1), Isq 90 min (4.7 ± 0.1), Isq 120 min (5.3 ± 0.1). Los datos son expresados como la media \pm ESM. (NS) no significativo. ** ($p < 0.001$).

9.6 Efecto de la producción de mucinas en diferentes tiempos de isquemia

La tinción con Ácido Peryódico de Schiff-Azul Alciano (PAS-AA) (Fig. 19A-H), mostró células mucinógenas de la región superficial de la mucosa gástrica con intensa alcianofilia (color azul); además, se identificaron células PAS-positivas (color magenta brillante) en el cuello y la porción basal de las fositas glandulares en el grupo Control (Fig. 19A-B), la cual tiende a incrementar en el grupo Isq 60 min (Fig. 19C-D), mientras que en los grupos Isq 90 (Fig. 19E-F) e Isq 120 min (Fig. 19G-H), se redujo significativamente ($p < 0.001$) la afinidad tintorial (Fig. 20A, B) a lo largo del epitelio superficial y glandular de la mucosa gástrica indicando que se pierde la producción de glucosaminoglicanos ácidos y neutros, respectivamente.

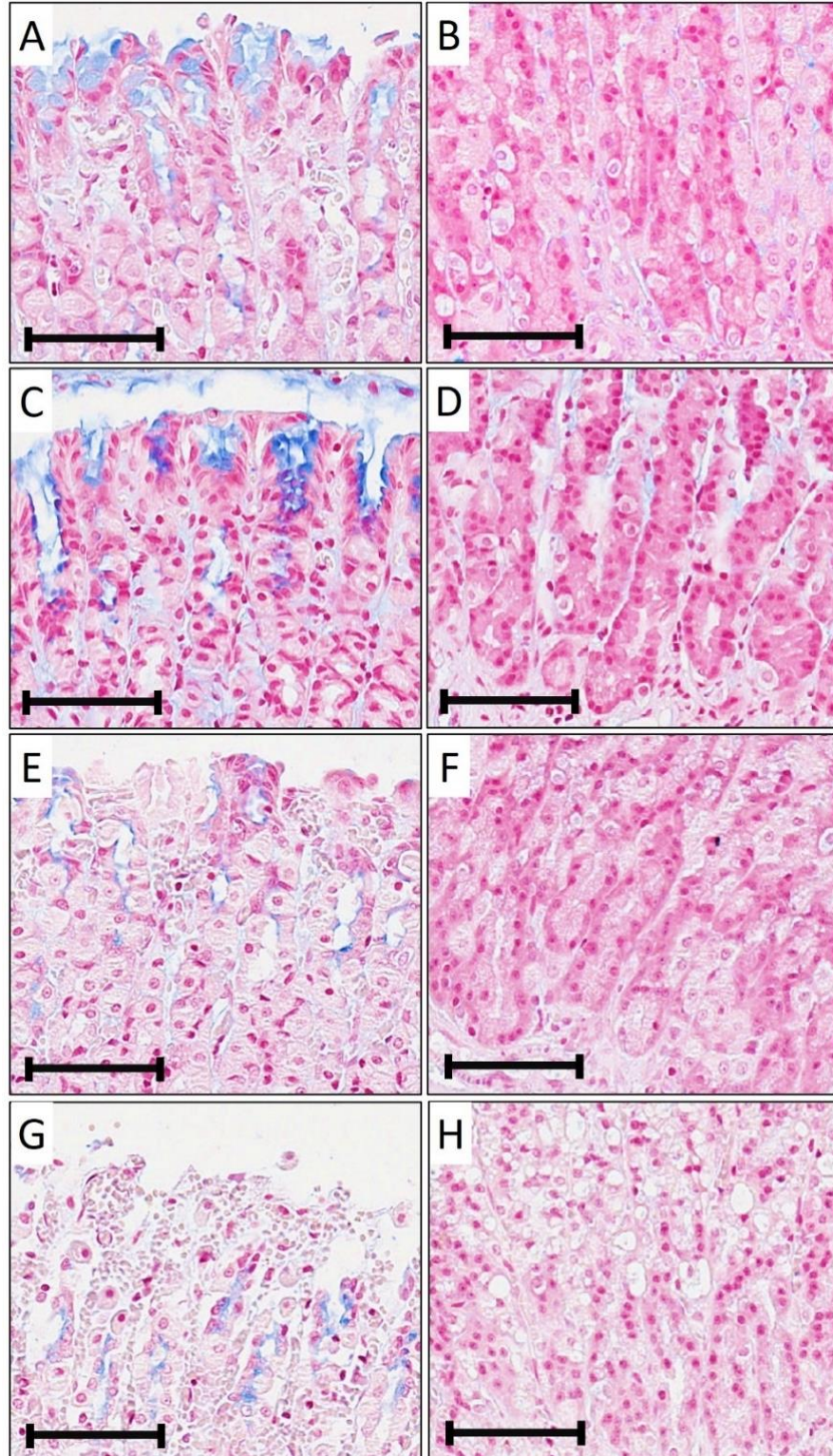


Figura 19. Fotomicrografías de cortes longitudinales de mucosa gástrica teñidos con PAS-AA de los grupos experimentales: Control (A, B), Isq 60 min (C, D), Isq 90 min (E, F) e Isq 120 min (G, H). Barra de escala: 100 μ m, \times 400.

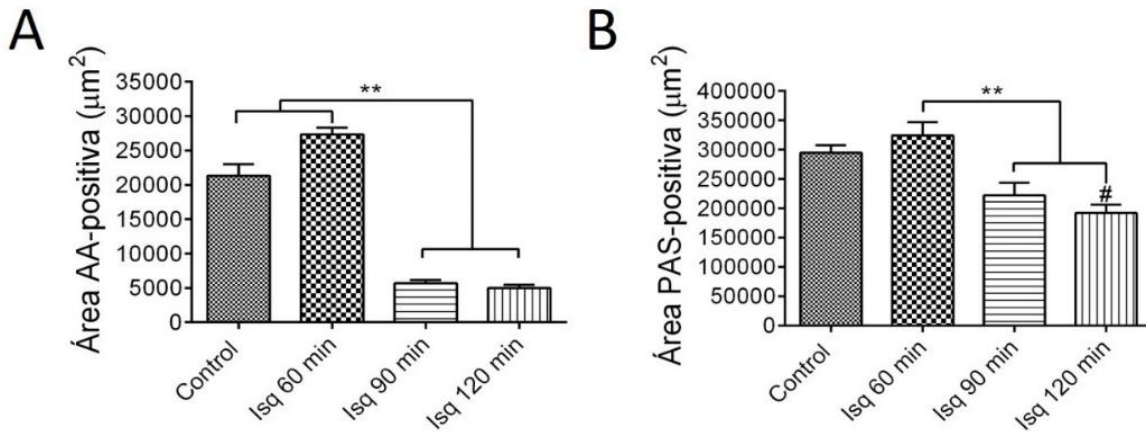


Figura 20. Representación gráfica de la cuantificación del área AA-positiva y PAS-positiva de los grupos experimentales. **A**) Área AA-positiva (μm^2): Control (21342 ± 1664), Isq 60 min (27355 ± 987), Isq 90 min (5676 ± 453) e Isq 120 min (4986 ± 448). **B**) Área PAS-positiva (μm^2): Control (294859 ± 12500), Isq 60 min (324601 ± 22670), Isq 90 min (222152 ± 21199) e Isq 120 min (192078 ± 14499). Los resultados son presentados como la media \pm ESM. ** $p < 0.001$. # $p < 0.001$ con respecto al grupo Control.

9.7 Relación entre los parámetros de impedancia gástrica con la puntuación del ILT

Las mediciones de los parámetros de impedancia a bajas frecuencias (R_L y X_L) mostraron un incremento gradual de manera tiempo-dependiente que es consistente con los resultados en el análisis histológico cualitativo y cuantitativo (ILT). La puntuación obtenida después de 60 min de isquemia nos sugiere que a partir de este tiempo ya hay daño en la mucosa gástrica (Tabla 5). Por otra parte, el incremento en la R_H se presentó en condiciones isquémicas, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos; mientras que la X_H fue el parámetro de impedancia que presentó el mayor incremento después de 120 min de isquemia. Es importante mencionar que tanto en las mediciones de los parámetros de impedancia como en la puntuación del ILT no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Isq 90 y 120 min.

Tabla 5. Relación entre los parámetros de impedancia gástrica y la puntuación del índice de lesión tisular (ILT) en los grupos Control, Isq 60, 90 y 120 min. Resistencia a bajas frecuencias (R_L); Resistencia a altas frecuencias (R_H); Reactancia a bajas frecuencias (X_L); Reactancia a altas frecuencias (X_H). Los datos son expresados como la media \pm ESM.

	Control	Isq 60 min	Isq 90 min	Isq 120 min
R_L (Ω)	$52.57 \pm 0.70^{\circ\&\#}$	$82.75 \pm 1.37^{\circ\&\#}$	$93.74 \pm 1.82^{\circ}$	$91.41 \pm 2.07^{\circ}$
X_L ($-j\Omega$)	$5.77 \pm 0.27^{\circ\&\#}$	$9.09 \pm 0.26^{\circ\&\#}$	$13.69 \pm 0.62^{\circ}$	$12.80 \pm 0.71^{\circ}$
R_H (Ω)	$34.80 \pm 0.36^{\circ\&\#}$	$45.25 \pm 0.61^*$	$47.46 \pm 0.73^*$	$47.14 \pm 0.93^*$
X_H ($-j\Omega$)	$5.17 \pm 0.18^{\circ\&\#}$	$11.88 \pm 0.40^{\circ\&\#}$	$13.57 \pm 0.47^{\circ}$	$13.32 \pm 0.55^{\circ}$
ILT	$0.82 \pm 0.15^{\circ\&\#}$	$3.86 \pm 0.10^{\circ\&\#}$	$4.76 \pm 0.07^{\circ}$	$5.34 \pm 0.12^{\circ}$

* $p < 0.001$ vs Control; $^{\circ}$ $p < 0.001$ vs Isq 60 min; $^{\&}$ $p < 0.001$ vs Isq 90; $^{\#}$ $p < 0.001$ vs Isq 120

9.8 Obtención del umbral predictivo para identificar el daño irreversible a partir de los parámetros de impedancia y la puntuación del ILT

Para identificar los valores predictivos a partir de los cuales se puede identificar el grupo isquémico a partir del cual se puede reducir el daño en la mucosa gástrica en condiciones de isquemia prolongada, se realizó una curva ROC con los parámetros de impedancia (R_L , X_L , R_H y X_H) (Fig. 21) y se obtuvo el AUC, el punto de mayor sensibilidad – especificidad para identificar el punto de corte, finalmente se ubicaron los valores predictivos positivo y negativo para identificar a los verdaderos positivos (VP-con lesión) y a los verdaderos negativos (VN-sin lesión), respectivamente (Tabla 6). El resultado nos permitió identificar que la R_L y X_H fueron los parámetros de impedancia que obtuvieron la mayor AUC (Tabla 6), lo cual nos permite sugerir que ambos parámetros son los que mejor se relacionan con el daño en la mucosa gástrica en condiciones de isquemia prolongada.

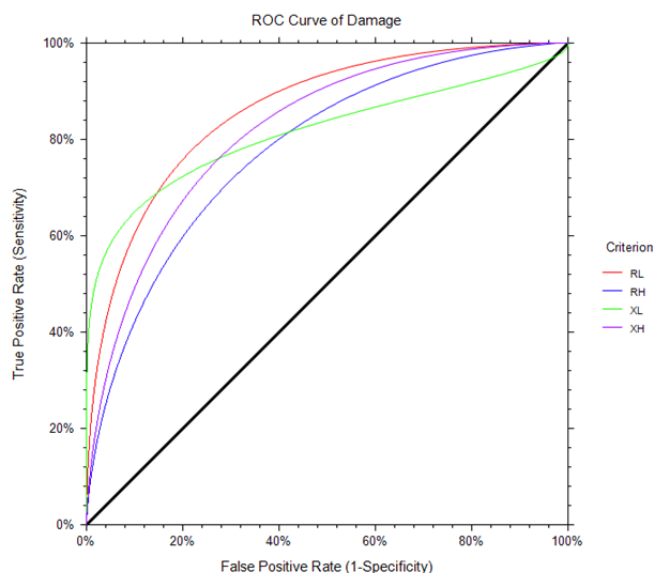


Figura 21. Curva ROC para predecir el grado de lesión en la mucosa gástrica a partir de la puntuación del ILT y los parámetros de impedancia a bajas y altas frecuencias. Área bajo la curva (AUC).

Tabla 6. Análisis de la curva ROC de los parámetros de impedancia gástrica a bajas (R_L , X_L) y altas (R_H , X_H) frecuencias. Área bajo la curva (AUC), verdaderos negativos (VN), verdaderos positivos (VP), valor predictivo (V-P), sensibilidad (S), especificidad (E).

	AUC	VN	S-E	V-P	S-E	VP	E-S
R_L (Ω)	$0.86 \pm 0.022^{+0\&}$	70	0.90-0.60	79	0.78-0.78	87	0.90-0.60
R_H (Ω)	$0.78 \pm 0.028^{*\&}$	38	0.90-0.43	43	0.71-0.71	48.7	0.90-0.40
X_L ($-j\Omega$)	$0.81 \pm 0.023^*$	5.4	0.90-0.27	9	0.75-0.75	10.5	0.90-0.65
X_H ($-j\Omega$)	$0.82 \pm 0.025^{*+}$	7.7	0.90-0.52	10.5	0.74-0.74	13.5	0.90-0.50

* $p < 0.001$; R_L vs R_H , X_L , X_H ; + $p < 0.001$; R_H vs R_L , X_L , X_H ; $^0 p < 0.001$; X_L vs R_L , R_H , X_H ; & $p < 0.001$; X_H vs R_L , R_H , X_L .

Para identificar los parámetros de impedancia que mejor se relacionan con el daño en la mucosa gástrica en condiciones de isquemia prolongada se realizó una regresión lineal segmentada, tomando como “punto de quiebre” el valor predictivo con mayor sensibilidad y especificidad de los parámetros de impedancia (R_L : 79 Ω ; R_H : 43 Ω ; X_L : 9 $-j\Omega$ y X_H : 10.5 $-j\Omega$). Este resultado nos permitió confirmar que la R_L (Fig. 22A) y la X_H (Fig. 22D) son los parámetros de impedancia que mejor se relacionan ($r^2 = 0.72$ y $r^2 = 0.66$, respectivamente) con este tipo de lesión de la mucosa gástrica.

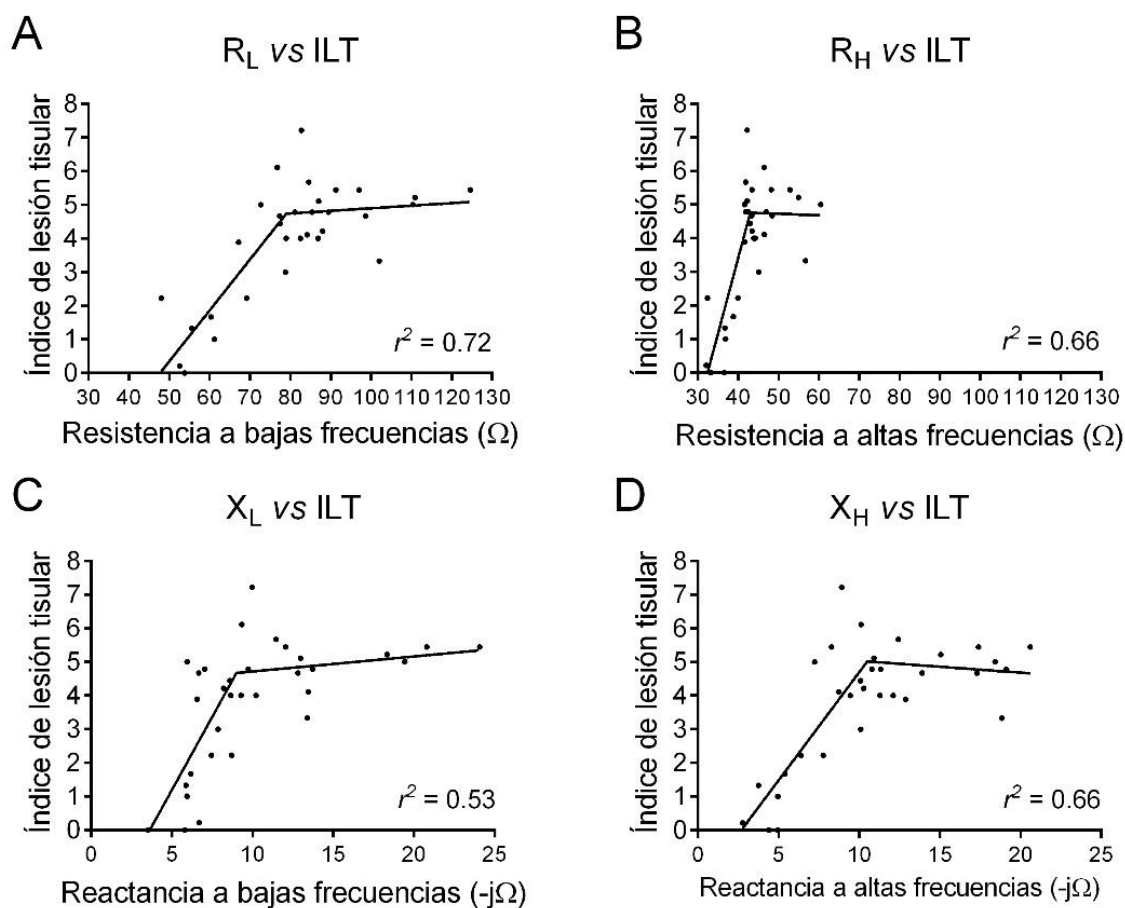


Figura 22. Representación gráfica de la regresión lineal segmentada: Resistencia (R_L y R_H) y Reactancia (X_L y X_H) vs Índice de lesión tisular (ILT).

Con estos resultados, se realizó una gráfica de dispersión y se delimitaron los valores predictivos de los parámetros de impedancia y el de la puntuación del ILT (Fig. 23A-D). Para identificar el tiempo de isquemia a partir del cual se puede revertir el daño, se ubicó el grupo isquémico que tuviera el mayor número de ejemplares más próximo a la puntuación 3 del ILT y que se ubicara por detrás del valor de los verdaderos positivos (Tabla 6). Se observó, que los ejemplares del grupo Isq 60 min, obtuvieron la menor puntuación en el ILT de los grupos isquémicos y además que el 75% y 85% (R_L y X_H , respectivamente) de estos se encontraron por debajo del valor de los VP-con lesión. De acuerdo con los

resultados obtenidos se pudo inferir que el daño en la mucosa gástrica generado por 60 min de isquemia todavía puede ser revertido, mientras que a mayores tiempos de isquemia el daño es irreversible.

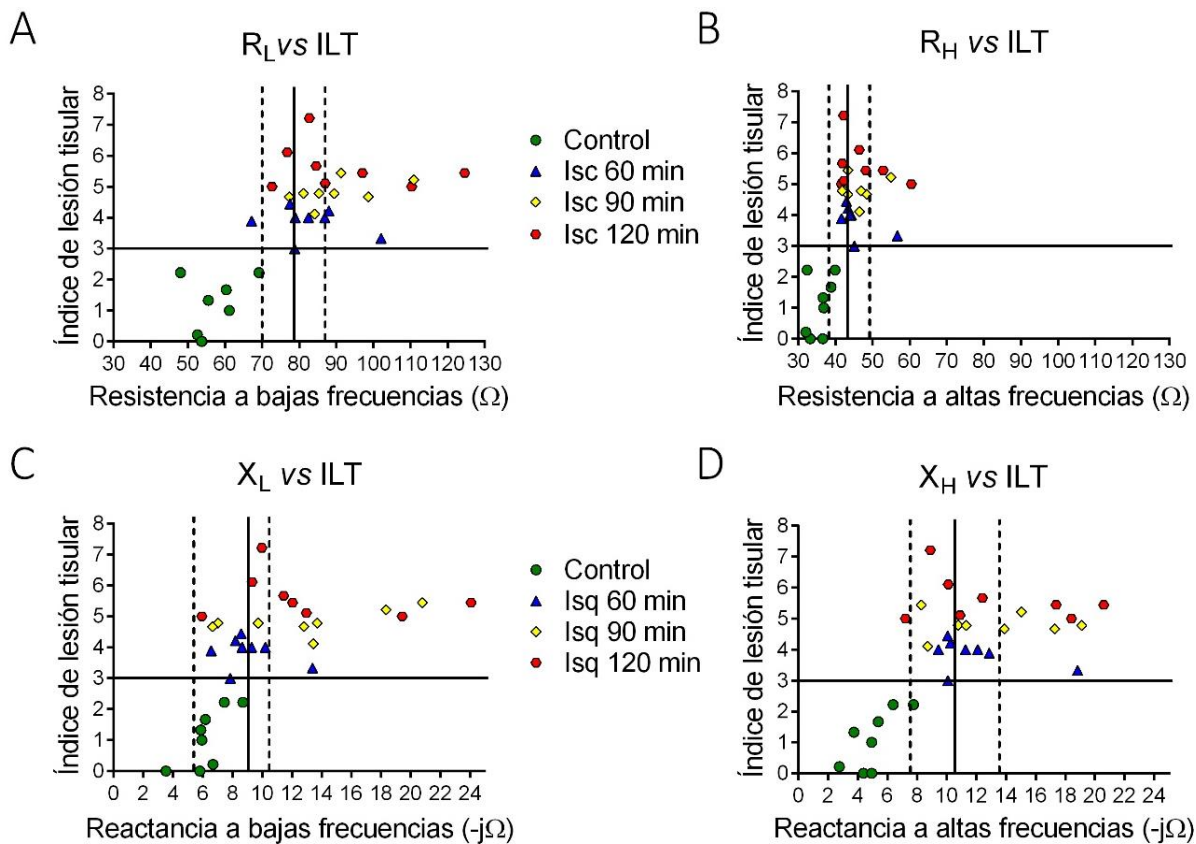


Figura 23. Comparación de la puntuación del índice de lesión tisular vs los parámetros de impedancia gástrica a bajas y altas frecuencias (R_L , R_H , X_L y X_H) en un modelo de isquemia prolongada.

9.9 Análisis inmunohistoquímico de la expresión de iNOS

El análisis inmunohistoquímico de iNOS en el grupo Isq 60 min (Fig. 24B) mostró leve inmunorreactividad citoplasmática en células epiteliales de la mucosa gástrica, la cual incrementó significativamente ($p < 0.001$) en los grupos Isq 90 e Isq 120 min (Fig. 24C, D), siendo el grupo Isq 90 min el que presentó el pico máximo de expresión (Fig. 24E).

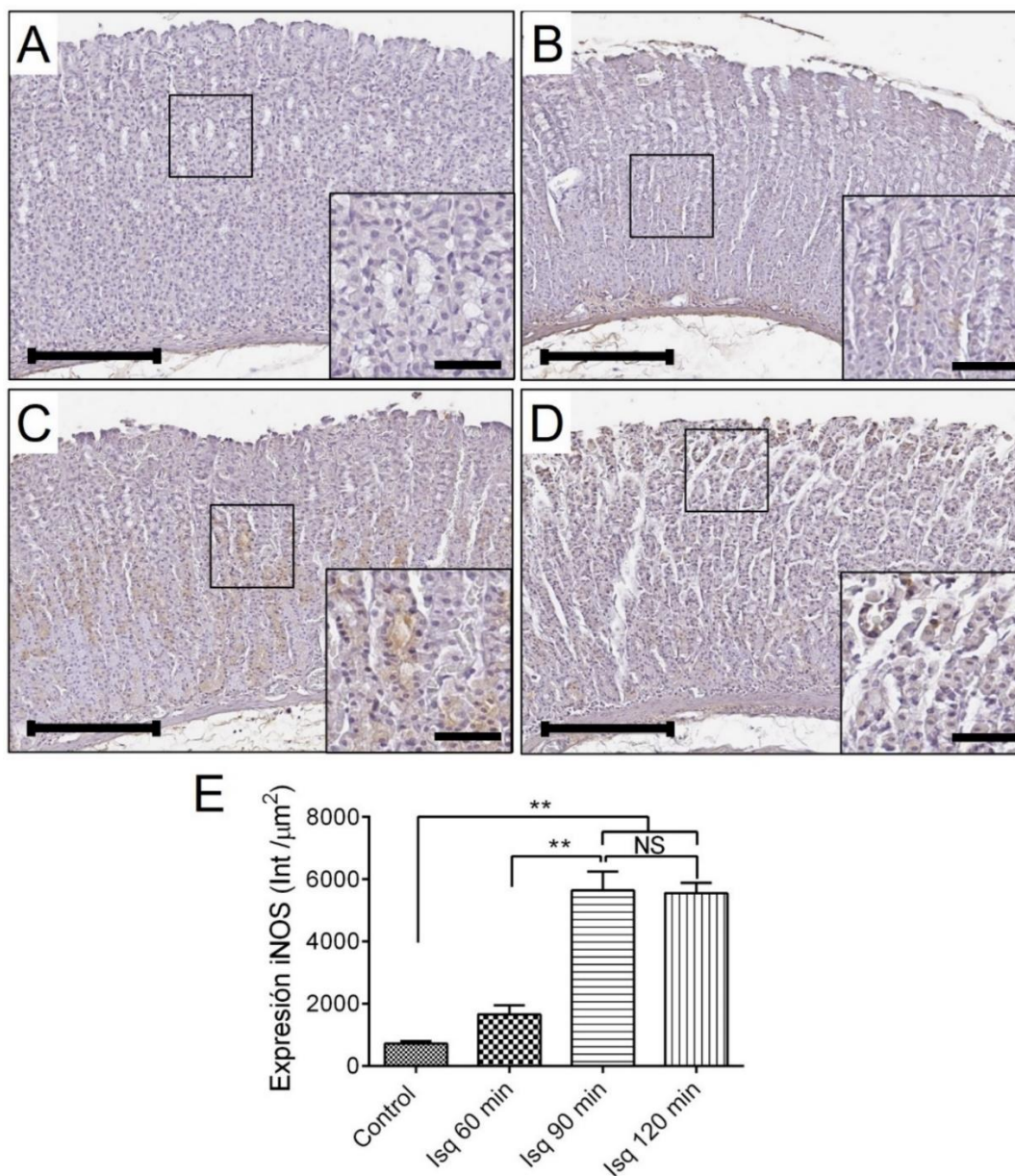


Figura 24. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de iNOS (A-D) en los grupos experimentales: Control (A), Isq 60 min (B), Isq 90 min (C) e Isq 120 min (D). Barra de escala: 200 μm , $\times 100$. Magnificación: barra de escala: 80 μm . E) Representación gráfica de la expresión (Int/ μm^2) de iNOS en los grupos experimentales: Control (722.3 \pm 83.2), Isq 60 min (1664 \pm 283.4), Isq 90 min (5642 \pm 608.7) e Isq 120 min (5557 \pm 330.5). Los datos son expresados como la media \pm ESM. ** $p < 0.001$. (NS) no significativo.

9.10 Análisis inmunohistoquímico de la expresión de TNF α

La inmunodetección de TNF α no mostró cambios en la expresión entre los grupos Control e Isq 60 min (Fig. 25A, B), mientras que en los grupos Isq 90 e Isq 120 min (Fig. 25C, D) incrementó el nivel de expresión significativamente ($p < 0.001$), siendo el grupo de Isq 90 min el que presentó el mayor aumento (Fig. 25E).

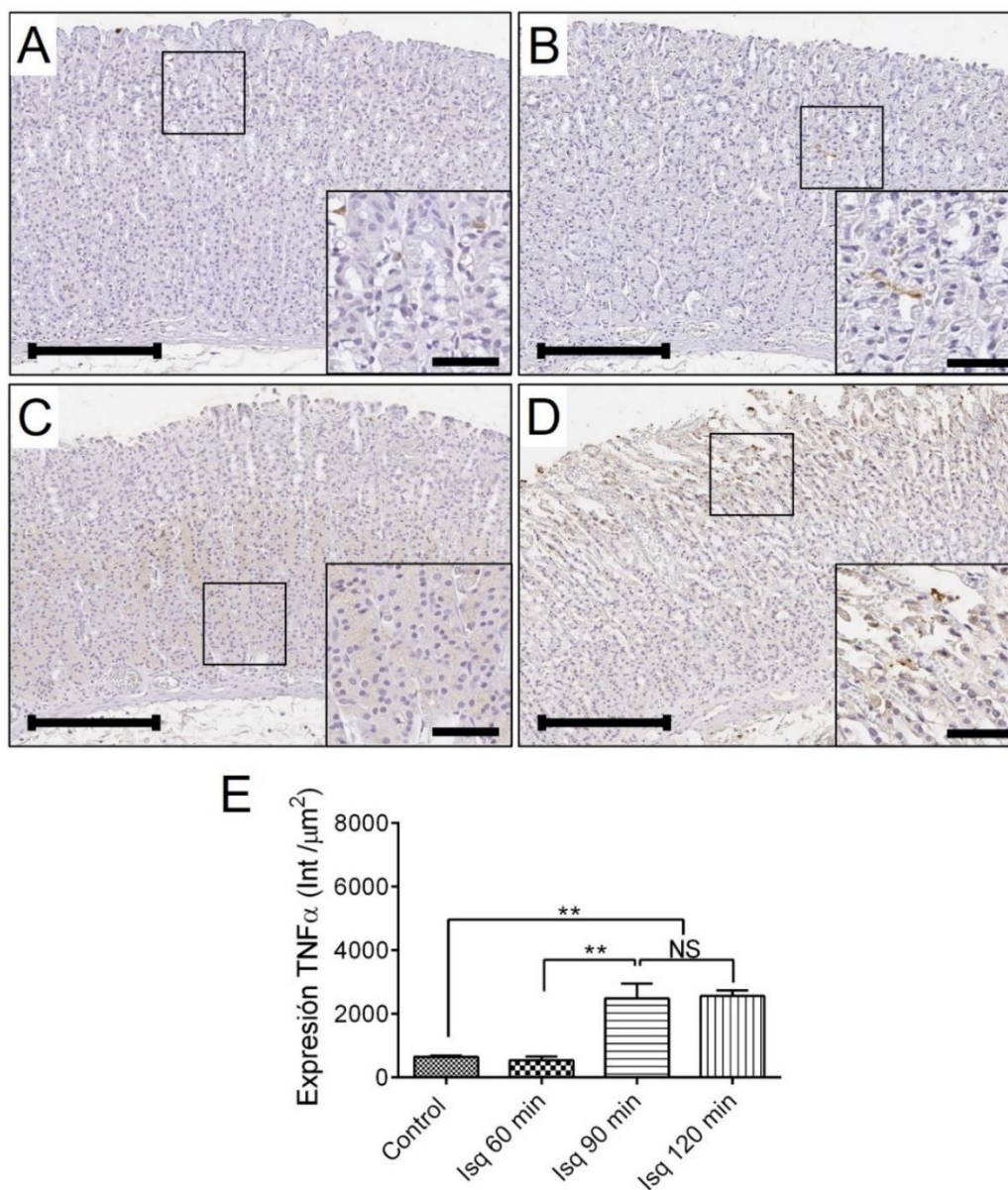


Figura 25. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de TNF α (A-D) en los grupos experimentales: Control (A), Isq 60 min (B), Isq 90 min (C) e Isq 120 min (D). Barra de escala: 200 μm , $\times 100$. Magnificación: barra de escala: 80 μm . E) Representación gráfica de la expresión (Int/ μm^2) de TNF α en los grupos experimentales: Control (653.3 \pm 38.1), Isq 60 min (545.9 \pm 112), Isq 90 min (2492 \pm 463.5) e Isq 120 min (2565 \pm 180.4). Los datos son expresados como la media \pm ESM. ** $p < 0.001$. (NS) no significativo.

9.11 Análisis inmunohistoquímico de la expresión de COX-2

El análisis inmunohistoquímico para la detección de COX-2, mostró inmunorreactividad positiva en algunos tipos celulares de la muscular de la mucosa en el grupo Control (Fig. 26A). En condiciones isquémicas se observó un incremento gradual ($p < 0.001$) en la expresión de COX-2 en células endoteliales y del epitelio superficial en los grupos Isq 60 (Fig. 26B) e Isq 90 min (Fig. 26C). En el grupo Isq 120 (Fig. 26D) se identificó una disminución en la expresión de COX-2 con respecto al grupo Isq 90 min (Fig. 26E) probablemente asociada a la degradación del tejido en la porción superior de la mucosa gástrica.

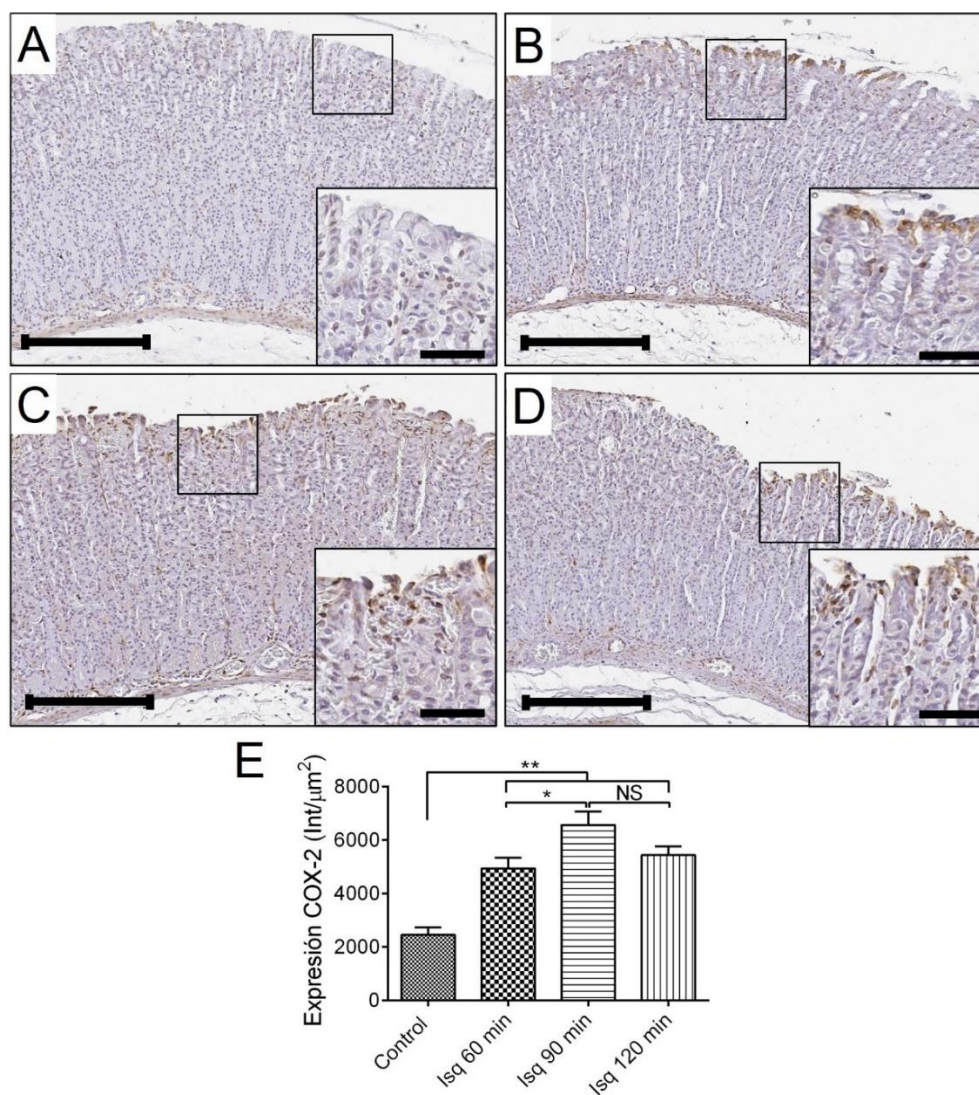


Figura 26. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de COX-2 (A-D) en los grupos experimentales: Control (A), Isq 60 min (B), Isq 90 min (C) e Isq 120 min (D). Barra de escala: 200 μm , $\times 100$. Magnificación: barra de escala: 80 μm . E) Representación gráfica de la expresión (Int/ μm^2) de COX-2 en los grupos experimentales: Control (653.3 \pm 38.1), Isq 60 min (545.9 \pm 112), Isq 90 min (2492 \pm 463.5) e Isq 120 min (2565 \pm 180.4). Los datos son expresados como la media \pm ESM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$. (NS) no significativo.

9.12 Detección de apoptosis por medio del ensayo de TUNEL

La fragmentación de DNA de las células epiteliales dañadas se analizó por medio del ensayo de apoptosis TUNEL el cual nos permitió identificar algunas células TUNEL-positivas en el epitelio superficial de la mucosa en el grupo Control, mientras que en los grupos isquémicos se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en el número de células positivas con respecto al Control, siendo los grupos de Isquemia por 90 y 120 min los que presentaron el mayor aumento; consecuentemente, se generó una zona apoptótica con una mayor profundidad que alcanza la porción oxíntica de la mucosa, después de 120 min de isquemia (Fig. 27A-E)

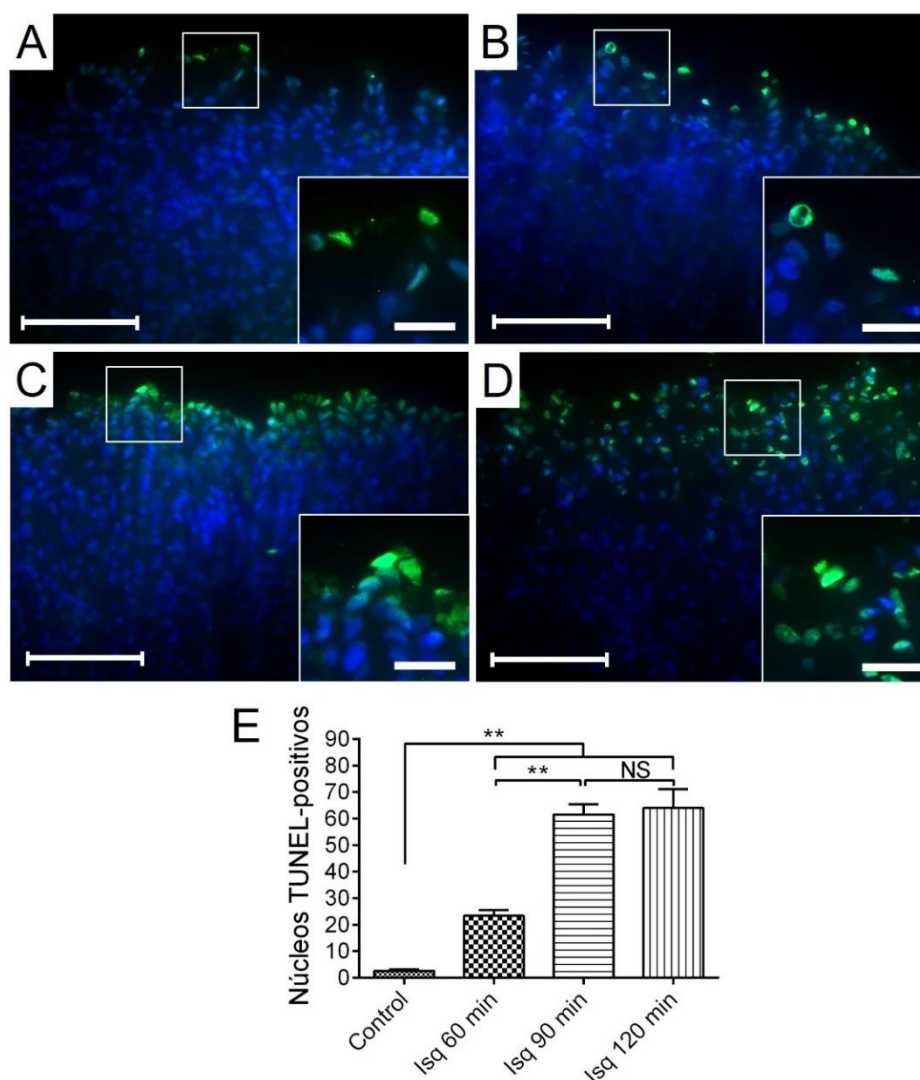


Figura 27. Detección de fragmentación de DNA por técnica de TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) en los grupos experimentales: Control (A), Isq 60 min (B), Isq 90 min (C) e Isq 120 min (D). Barra de escala: 100 μ m, $\times 400$. Magnificación: barra de escala: 50 μ m. E) Representación gráfica de la cuantificación del número de células TUNEL-positivas: Control (2.5 ± 0.5), Isq 60 min (23.3 ± 2.1), Isq 90 min (61.5 ± 3.8) e Isq 120 min (64.0 ± 7.08). ** ($p < 0.001$). Los datos son expresados como la media \pm ESM. (NS) no significativo.

9.13 Detección de Caspasa-3-activa por medio de Western blot

El análisis de inmunodetección de Caspasa-3-activa por Western blot (Fig. 28), mostró un incremento en la expresión de Caspasa-3 activa a partir del grupo Isq 90 min, siendo el grupo Isq 120 min el que presentó el mayor nivel de expresión ($p < 0.01$), mientras que en los grupos Control e Isq 60 min no se detectó.

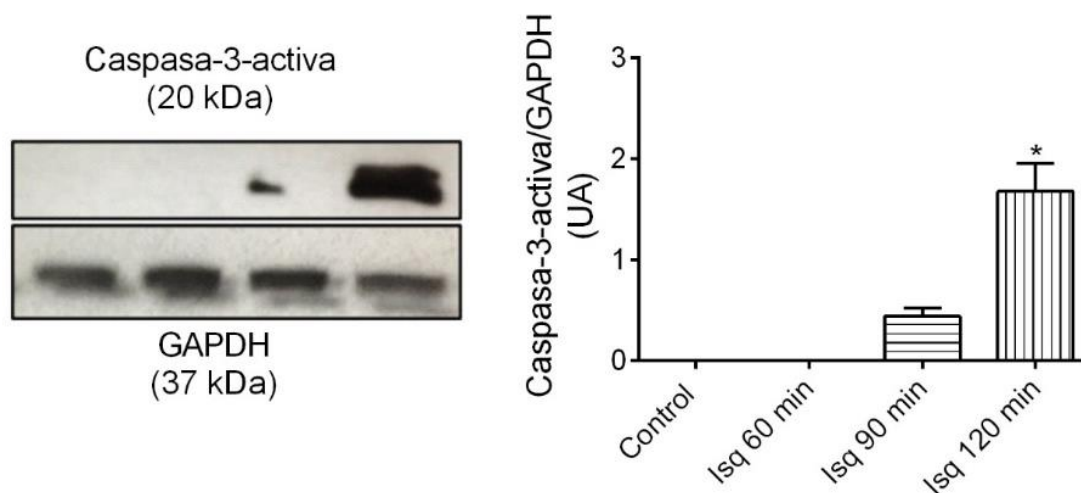


Figura 28. Inmunodetección por Western Blot y análisis cuantitativo de Caspasa-3-activa de los grupos experimentales: Control (0), Isq 60 min (0), Isq 90 min (0.44 ± 0.07) e Isq 120 min (1.67 ± 0.28). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos son expresados como la media \pm ESM. * $p < 0.01$. (UA) Unidades arbitrarias.

En conjunto, estos resultados permiten evidenciar que, a partir de 90 min de isquemia, las células del epitelio de la mucosa gástrica expresan de manera significativa iNOS, TNF α y COX-2, además de presentar muerte celular apoptótica en el epitelio superficial lo que puede comprometer la integridad de la barrera epitelial.

9.14 Efecto de la MT sobre las mediciones de los parámetros de impedancia gástrica de los grupos Sham, I/R e I/R+MT

Para evaluar el efecto de la MT sobre los cambios en las propiedades eléctricas de la mucosa gástrica sometida a I/R (60 min/24 horas), se registraron los espectros de impedancia (Fig. 29A); además, se graficó la resistencia vs la reactancia (gráfica de Cole-Cole) (Fig. 29B). En la Fig. 29A se observó una disminución en la resistencia y reactancia a bajas (< 10000 Hz) y altas (> 10000 Hz) frecuencias en el grupo I/R+MT con respecto al grupo I/R. Por otra parte, en la gráfica de Cole-Cole se observó un desplazamiento importante hacia el lado derecho en el grupo I/R+MT con respecto al no tratado (Fig. 29B), sugiriendo que existe una posible reversión del daño después de la administración de MT.

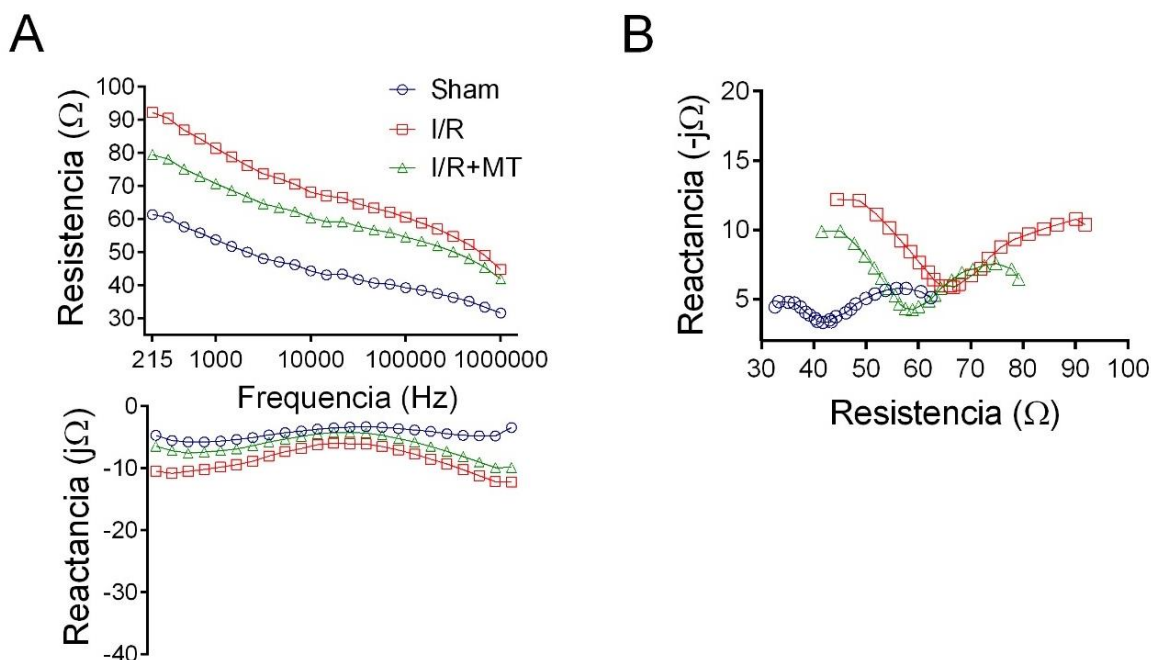


Figura 29. A) Espectro de impedancia gástrica (resistencia y reactancia) de los grupos Sham, I/R e I/R+MT. Los datos son expresados como la media \pm ESM. B) Gráfica de Cole-Cole (resistencia vs reactancia).

Después, se calcularon los parámetros de impedancia gástrica que mejor se relacionan con el daño inducido por isquemia prolongada (R_L y X_H) en los grupos Sham, I/R e I/R+MT (Fig. 30A, B). En el análisis de la R_L (Fig. 30A), se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) en el grupo I/R con respecto al grupo Sham, el cual disminuyó significativamente en el grupo I/R+MT. De manera similar, la X_H (Fig. 30B) presentó un incremento significativo en el grupo I/R con respecto al grupo Sham que disminuyó ($p < 0.001$) después del tratamiento con melatonina.

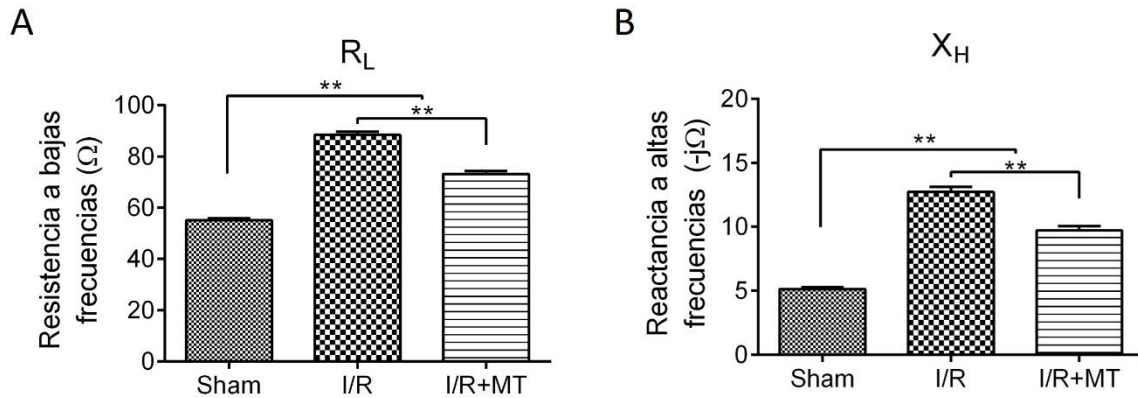


Figura 30. Representación gráfica de los parámetros de impedancia gástrica (R_L y X_H) de los grupos: Sham, I/R e I/R+MT. A) R_L : Resistencia a bajas frecuencias (Ω): Sham (55.1 ± 0.7), I/R (88.4 ± 1.2), I/R+MT (73.2 ± 1.05). B) X_H : Reactancia a altas frecuencias ($-j\Omega$): Sham (5.1 ± 0.1), I/R (12.7 ± 0.4), I/R+MT (9.7 ± 0.3). ** $p < 0.001$. Los datos son expresados como la media \pm ESM. (NS) no significativo.

9.15 Efecto de la MT sobre el daño en la mucosa gástrica inducido por I/R

En el grupo Sham, se observaron algunos vasos sanguíneos dilatados, la arquitectura glandular se encuentra conservada (Fig. 31A, B). En el grupo I/R (Fig. 31C, D), se observaron vasos sanguíneos congestionados y zonas hemorrágicas; además se identificaron zonas de erosión del epitelio superficial (Fig. 31C). En el corte transversal, se identificaron células del epitelio glandular con desprendimiento de la membrana basal, células con aumento en la eosinofilia y cambios morfológicos asociados a muerte celular por apoptosis y necrosis. A nivel de la lámina propia, se identificaron vasos sanguíneos dilatados con abundantes eritrocitos (congestión vascular), además de un incremento en algunas zonas de la lámina propia, lo que sugiere edema intersticial (Fig. 31D).

En el grupo I/R+MT (Fig. 31E, F), se observaron células del epitelio glandular con cambios citoplasmáticos con tendencia a la basofilia. Además, se identificaron pequeñas zonas con edema y vasos sanguíneos dilatados principalmente en la porción superior de la mucosa. Por otra parte, no se identificaron zonas de erosión epitelial importante (Fig. 31E). En el corte transversal, se observaron células del epitelio glandular en su mayoría con datos morfológicos de edema celular, además de algunas células con datos de franco proceso apoptótico; sin embargo, la arquitectura glandular se encontró conservada. A nivel de la lámina propia, se identificaron áreas de dilatación vascular importante sin presencia de eritrocitos (Fig. 31F).

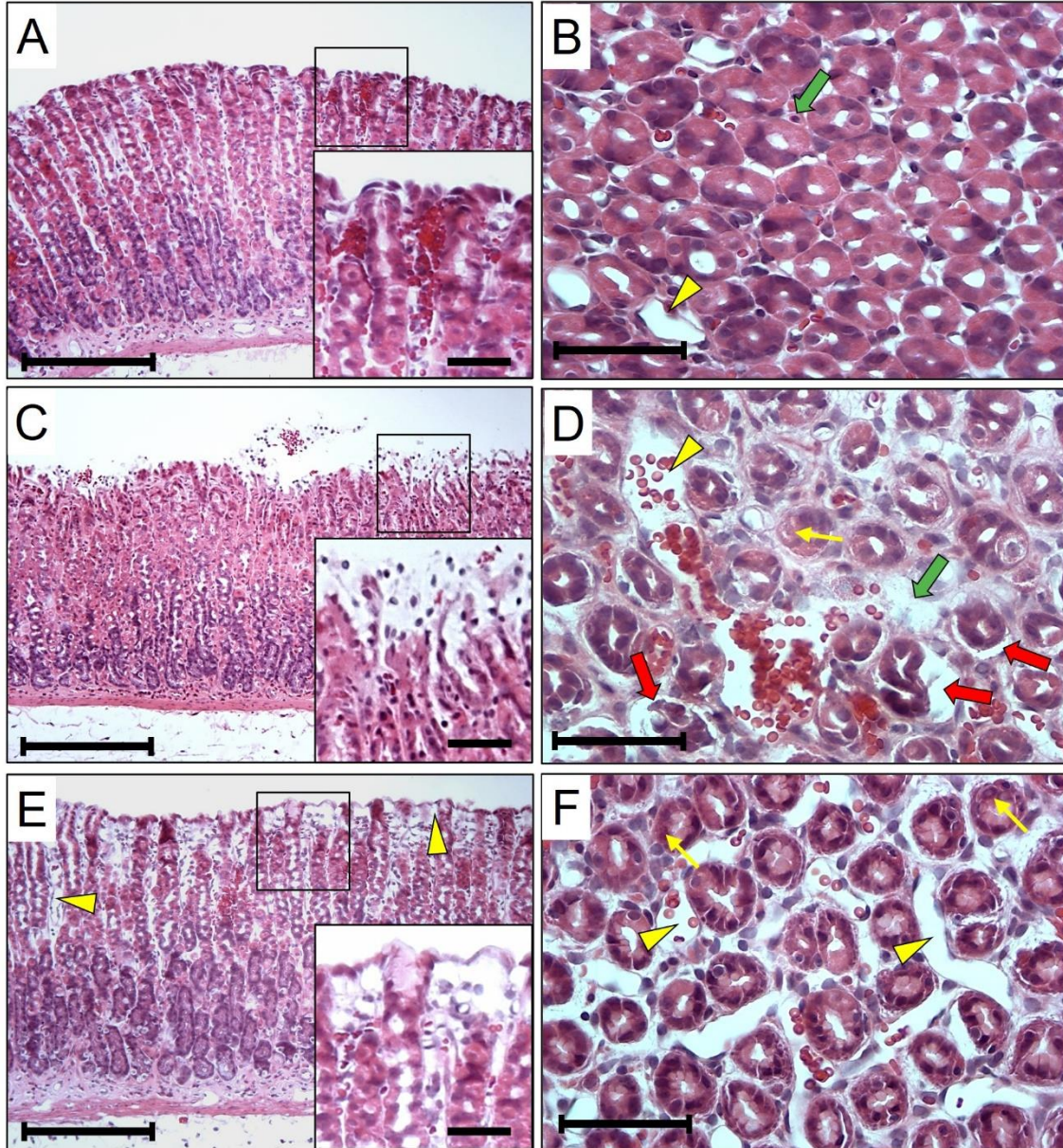


Figura 31. Fotomicrografías de corte longitudinal (A, C, E) y transversal (B, D, F) de mucosa gástrica de los grupos Sham (A, B), I/R (C, D) e I/R+MT (E, F). Identificadores: Erosión epitelial (Flecha negra gruesa); Vasos sanguíneos (Cabeza de flecha); Lámina propia (Flecha verde); Lumen glandular (Flecha azul); Células dañadas (Flecha amarilla delgada); Desprendimiento glandular (flecha roja). H&E. Barra de escala: 500 μm , $\times 100$ (A, C, E); 100 μm , $\times 400$ (B, D, F); magnificación: 50 μm .

9.16 Análisis histológico cuantitativo (ILT) de los grupos Sham, I/R e I/R+MT

El análisis cuantitativo mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la puntuación del ILT en el grupo I/R+MT con respecto al grupo I/R. En ambos grupos se obtuvo una puntuación > 3 indicando que existen alteraciones tisulares, sin embargo, en el grupo I/R el daño en la mucosa gástrica es más severo (Fig. 32).

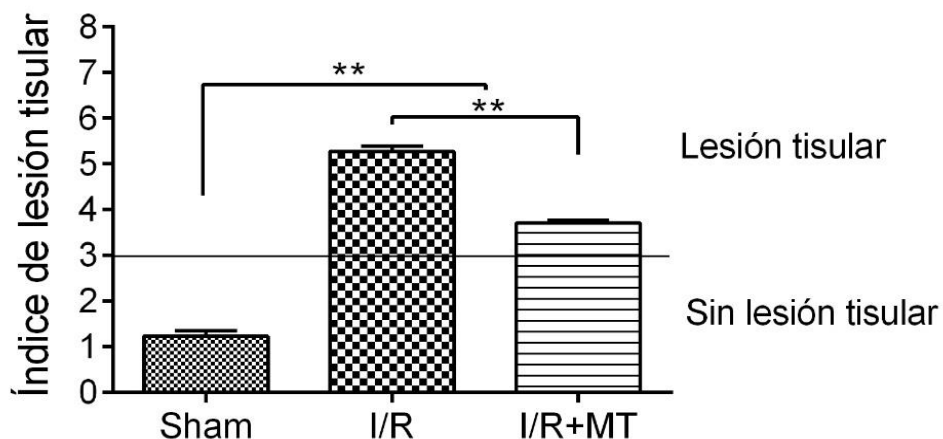


Figura 32. Representación gráfica de la puntuación del ILT de los grupos Sham (1.2 ± 0.1), I/R (5.2 ± 0.1) e I/R+MT (3.7 ± 0.06). Los datos son expresados como la media \pm ESM. ** $p < 0.001$.

9.17 Efecto de la MT sobre la producción de mucinas en condiciones de I/R

La tinción de PAS-AA permitió identificar la localización y densidad de células mucinógenas AA-positivas (color azul) y PAS-positivas (color magenta brillante), las cuales producen glucosaminoglicanos ácidos y neutros, respectivamente. En el grupo I/R (Fig. 33C) se observó una disminución en la afinidad tintorial AA-positiva en el epitelio superficial, la cual incrementó de manera significativa ($p < 0.01$) después del tratamiento con MT (Fig. 33E). Además, el área PAS-positiva también incrementó significativamente ($p < 0.001$) con la administración del tratamiento (Fig. 33F, H) con respecto al grupo I/R.

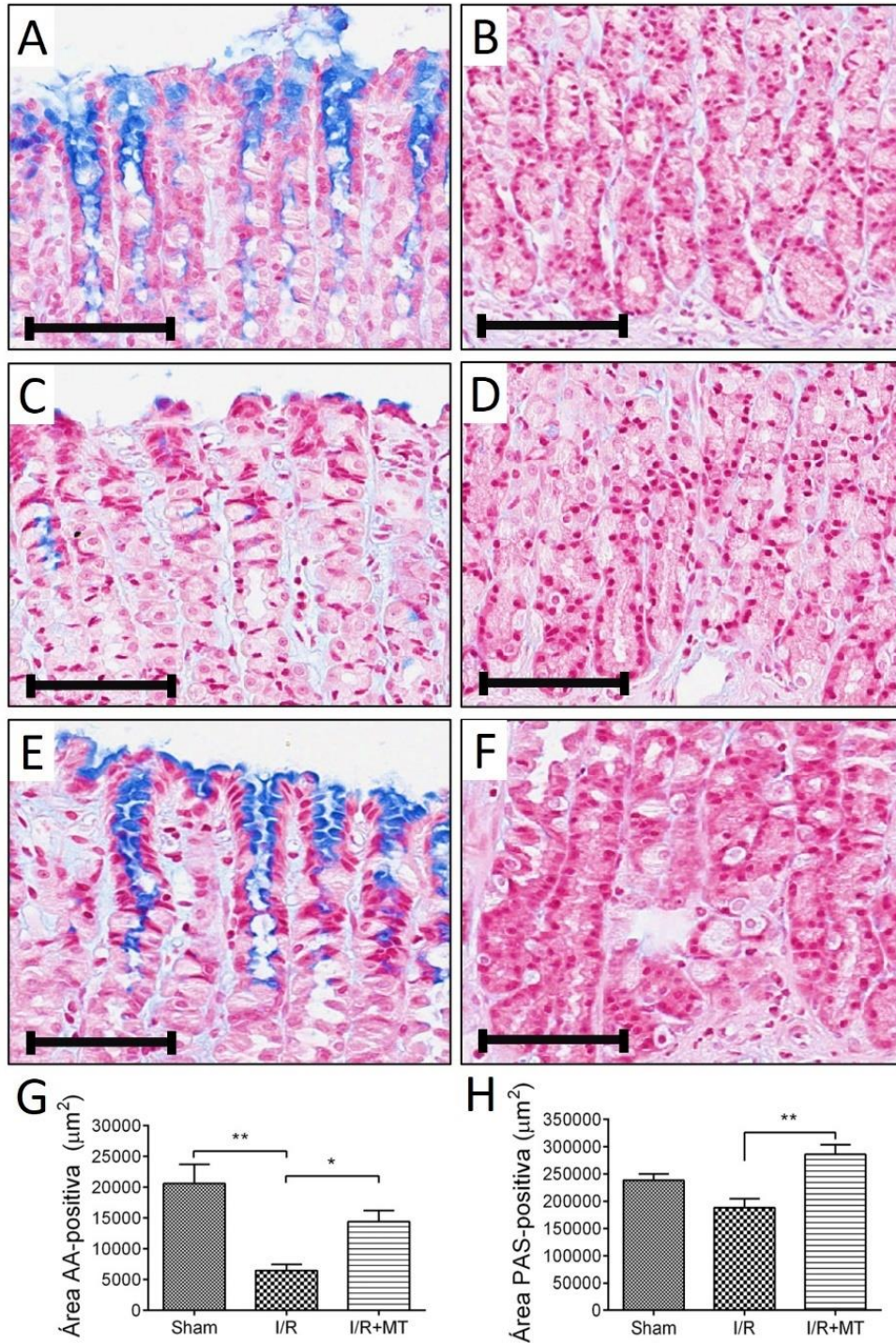


Figura 33. Fotomicrografías de cortes longitudinales (A-F) de mucosa gástrica teñidos con PAS-AA de los grupos Sham (A, B), I/R (C, D) e I/R+MT (E, F). Barra de escala: 100 µm, ×400. Representación gráfica de la cuantificación del área AA-positiva (G) y PAS-positiva (H) de los grupos experimentales. G) Área AA-positiva (µm²): Sham (20616 ± 3126), I/R (6489 ± 981.5) e I/R+MT (14411 ± 1790). H) Área PAS-positiva (µm²): Sham (238314 ± 11496), I/R (188137 ± 16547) e I/R+MT (252135 ± 20315). Los resultados son presentados como la media ± ESM. * p < 0.01, ** p < 0.001.

9.18 Relación de los parámetros de impedancia gástrica y el ILT de los grupos Sham, I/R e I/R+MT

Los cambios identificados en la R_L y X_H son consistentes con los reportados en el análisis histopatológico cualitativo y cuantitativo (ILT) (Tabla 7), en donde se observó que en condiciones de I/R, se presentó el mayor daño en el tejido acompañado de edema tisular en la porción superior de la mucosa; mientras que en el grupo I/R+MT, los parámetros de impedancia y la puntuación del ILT disminuyen significativamente con respecto al grupo no tratado.

Tabla 7. Relación de los parámetros de impedancia gástrica y el índice de lesión tisular (ILT) de los grupos Sham, I/R e I/R+MT. Resistencia a bajas frecuencias (R_L); Reactancia a altas frecuencias (X_H). Los datos son expresados como la media \pm ESM.

	Sham	I/R	I/R+MT
R_L (Ω)	52.57 ± 0.70 ^{o&}	88.49 ± 1.23 ^{*&}	73.24 ± 1.05 ^{*o}
X_H ($-j\Omega$)	5.17 ± 0.18 ^{o&}	12.72 ± 0.40 ^{*&}	9.73 ± 0.31 ^{*o}
ILT	0.82 ± 0.15 ^{o&}	5.27 ± 0.11 ^{*&}	3.70 ± 0.06 ^{*o}

* $p < 0.001$ vs Sham; ^o $p < 0.001$ vs I/R; & $p < 0.001$ vs I/R+MT

Para evaluar el efecto de la MT sobre el grado de lesión inducido por I/R a partir de los valores predictivos de los parámetros de impedancia (R_L y X_H) y el ILT, realizó una gráfica de dispersión (Fig. 34), en la cual se pudo identificar que los ejemplares del grupo I/R+MT se encuentran por debajo del VP-con lesión, mientras que en el grupo I/R algunos ejemplares se encuentran en la zona de lesión. Estos resultados nos sugieren que el daño en la mucosa gástrica del grupo tratado con MT tiene una mejor recuperación que el grupo no tratado.

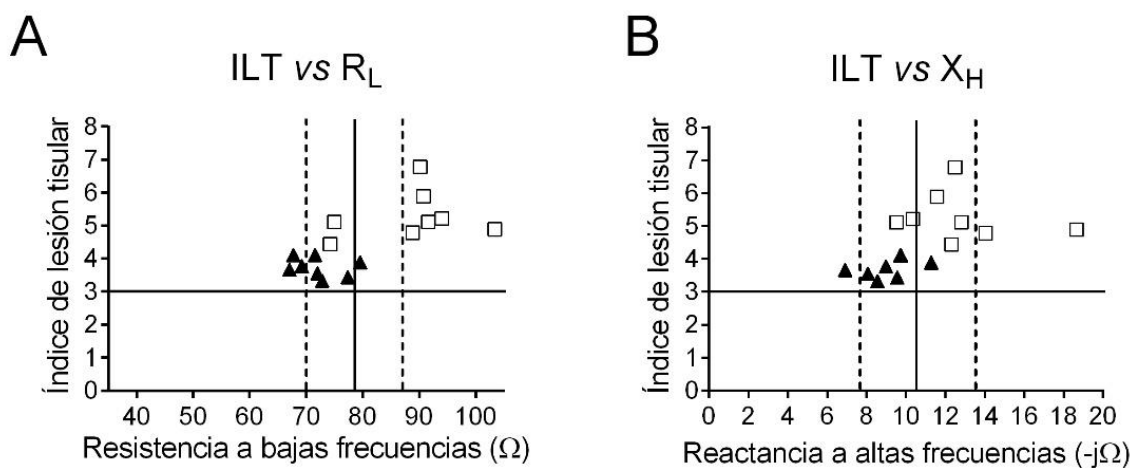


Figura 34. Comparación de la puntuación del Índice de lesión tisular (ILT) vs los parámetros de impedancia gástrica (R_L y X_H) en un modelo de I/R por 24 horas.

9.19 Efecto de la MT sobre la expresión de iNOS en condiciones de I/R

El análisis inmunohistoquímico de iNOS (Fig. 35A-C) mostró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en la inmunorreactividad positiva citoplasmática en células del epitelio de la mucosa gástrica en el grupo I/R (Fig. 35B) con respecto al grupo Sham (Fig. 35A). La administración de MT indujo una disminución en su expresión; sin embargo, los cambios no fueron significativos (Fig. 35C, D).

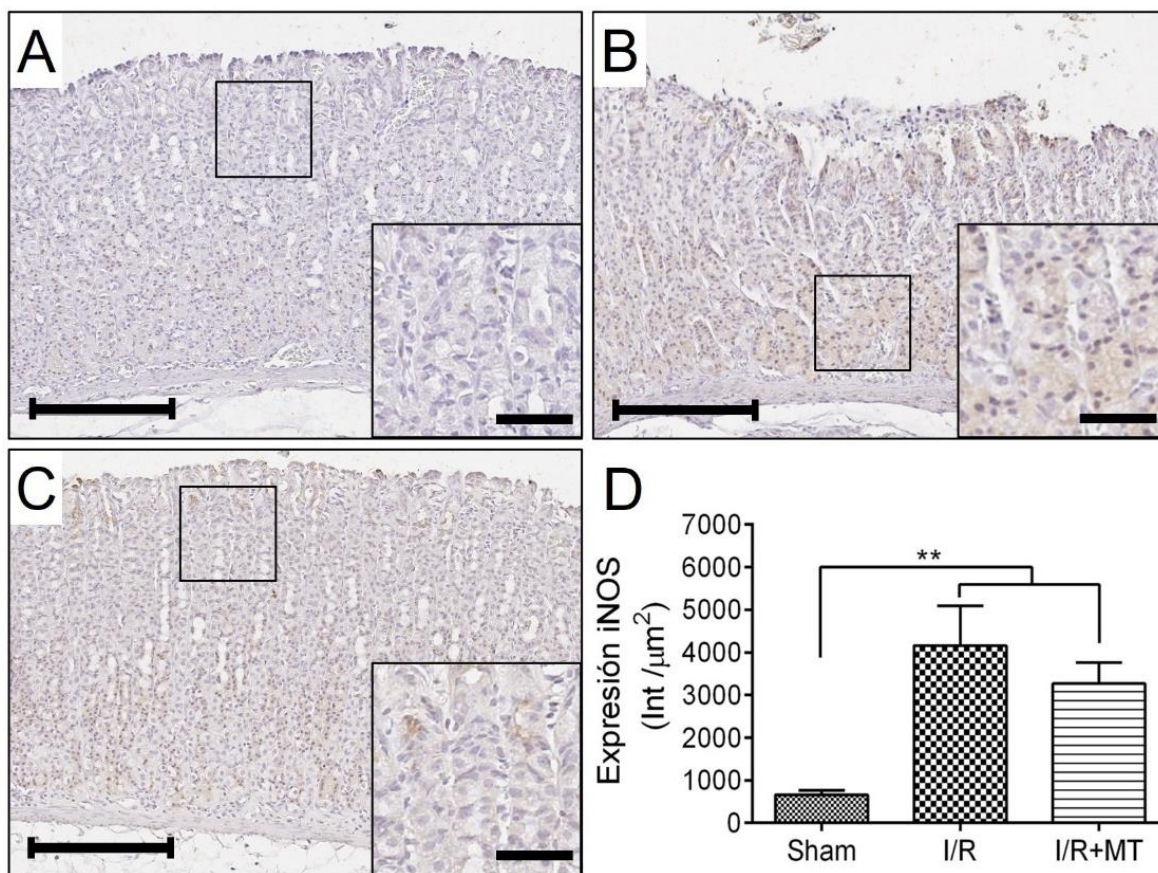


Figura 35. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de iNOS en los grupos Sham (A), I/R (B) e I/R+MT (C). Barra de escala: 200 μm, ×100. Magnificación: barra de escala: 80 μm. D) Representación gráfica de la expresión (Int/μm²) de iNOS en los grupos Sham (660.7 ± 105.9), I/R (4160 ± 929) e I/R+MT (3271 ± 486). Los datos son expresados como la media ± ESM. ** $p < 0.001$.

9.20 Efecto de la MT sobre la expresión de TNFα en condiciones de I/R

El análisis inmunohistoquímico de TNFα (Fig. 36A-C) mostró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en la inmunorreactividad positiva citoplasmática en células del epitelio de la mucosa gástrica en el grupo I/R (Fig. 36B) con respecto al grupo Sham (Fig. 36A). La administración de MT indujo una disminución estadísticamente significativa en la expresión de TNFα con respecto al grupo I/R ($p < 0.01$) (Fig. 36C, D).

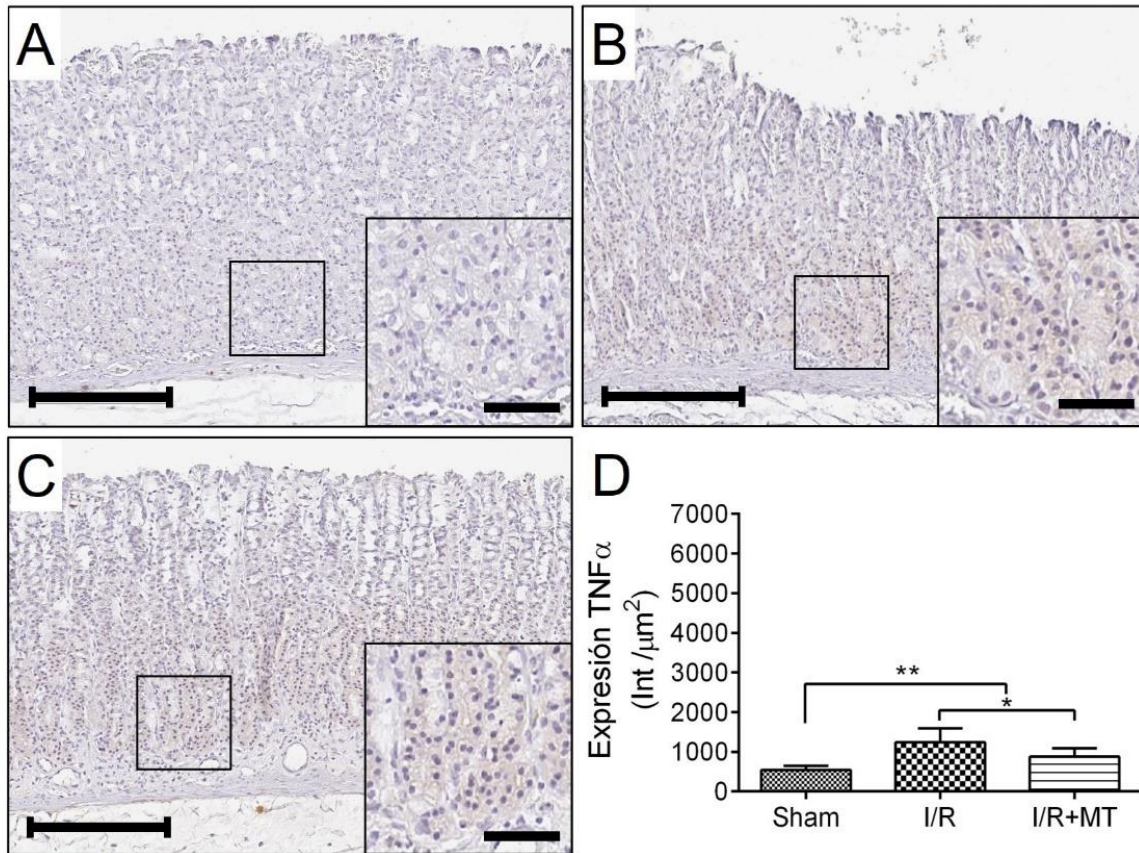


Figura 36. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de TNF α en los grupos Sham (A), I/R (B) e I/R+MT (C). Barra de escala: 200 μ m, \times 100. Magnificación: barra de escala: 80 μ m. D) Representación gráfica de la expresión (Int/ μ m²) de TNF α en los grupos Sham (537.9 \pm 104.8), I/R (1240 \pm 356.6) e I/R+MT (879.7 \pm 212.7). Los datos son expresados como la media \pm ESM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

9.21 Efecto de la MT sobre la expresión de COX-2 en condiciones de I/R

La inmunodetección de COX-2 (Fig. 37A-C) mostró inmunorreactividad positiva en algunos tipos celulares de la muscular de la mucosa en el grupo Sham (Fig. 37A). En el grupo I/R (Fig. 37B), se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en la expresión de COX-2 en células endoteliales, células del sistema inmune, además se identificó un nivel importante de expresión en zonas de exfoliación y erosión de la mucosa gástrica. Después del tratamiento con MT (Fig. 37C), se encontró la expresión principalmente en células del sistema inmune y algunas zonas de exfoliación epitelial. El análisis cuantitativo mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en la expresión de COX-2 en el grupo tratado con MT con respecto al grupo I/R (Fig. 37D).

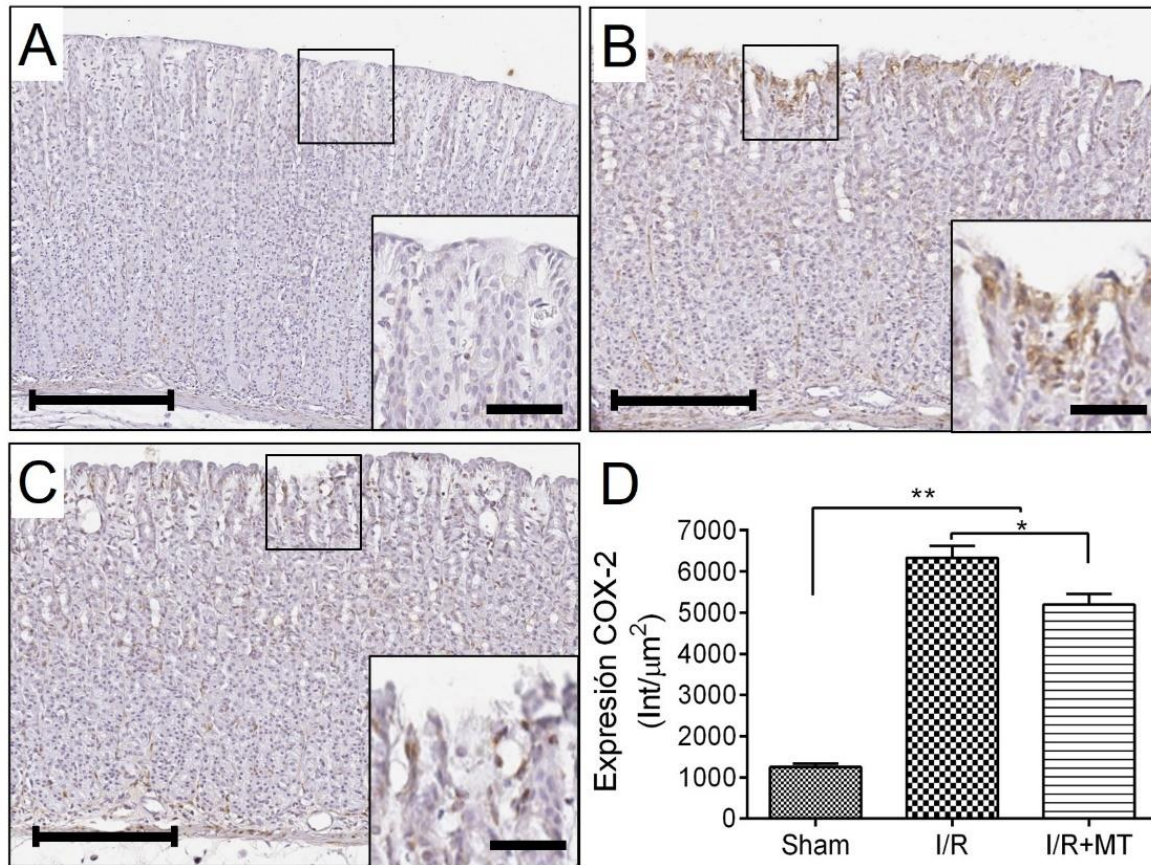


Figura 37. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de COX-2 en los grupos Sham (A), I/R (B) e I/R+MT (C). Barra de escala: 200 μ m, $\times 100$. Magnificación: barra de escala: 80 μ m. D) Representación gráfica de la expresión (Int/ μ m²) de COX-2 en los grupos Sham (1249 \pm 91.8), I/R (6331 \pm 288.4) e I/R+MT (5197 \pm 252.8). Los datos son expresados como la media \pm ESM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

9.22 Efecto de la MT sobre la proliferación en condiciones de I/R

Para evaluar el efecto de la MT sobre la proliferación celular en la mucosa gástrica en condiciones de I/R, se realizó el marcaje inmunohistoquímico de PCNA (Fig. 38A-C). En el grupo Sham (Fig. 38A), se encontraron algunos núcleos PCNA-positivos en células localizadas en la lámina propia y el epitelio foveolar, así como en la porción del cuello. Mientras que en el grupo I/R (Fig. 38B), se observaron núcleos PCNA-positivos en células epiteliales en la porción del istmo y el cuello de las glándulas, principalmente en las zonas de erosión. Por otra parte, en el grupo I/R+MT (Fig. 38C), se identificó inmunorreactividad positiva en núcleos de células localizadas en la lámina propia, células epiteliales del istmo y la porción del cuello y algunas en las foveolas. El análisis cuantitativo mostró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en el número de núcleos positivos en el grupo tratado, con respecto al grupo I/R (Fig. 38D).

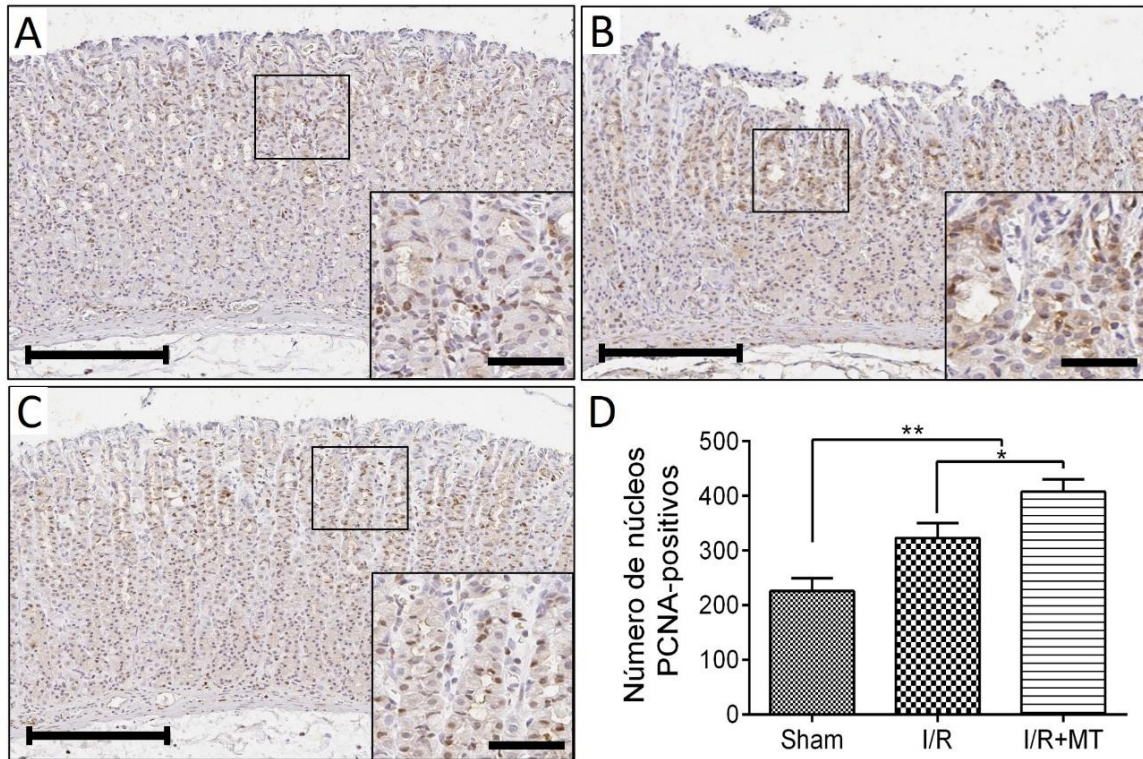


Figura 38. Fotomicrografías representativas de la inmunodetección de PCNA en los grupos Sham (A), I/R (B) e I/R+MT (C). Barra de escala: 200 μ m, \times 100. Magnificación: barra de escala: 80 μ m. D) Representación gráfica del número de células PCNA-positivas en los grupos Sham (226.2 ± 23.1), I/R (323 ± 27.1) e I/R+MT (407.6 ± 22.8). Los datos son expresados como la media \pm ESM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

9.23 Efecto de la MT sobre la apoptosis inducida por I/R

Para examinar el efecto de la MT sobre la apoptosis inducida por I/R se realizó el ensayo de apoptosis TUNEL. El grupo Sham (Fig. 39A) mostró algunas células apoptóticas en el epitelio superficial de la mucosa gástrica. En el grupo I/R (Fig. 39B), se identificaron células TUNEL-positivas en el epitelio superficial y porción oxíntica, mientras que en el grupo tratado con MT (Fig. 39C), se identificaron células TUNEL-positivas confinadas a la porción superior de la mucosa gástrica. En el análisis estadístico se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en el número de células apoptóticas en el grupo I/R con respecto al grupo Sham, mientras que el grupo tratado con MT presentó una menor cantidad de células apoptóticas (Fig. 39D).

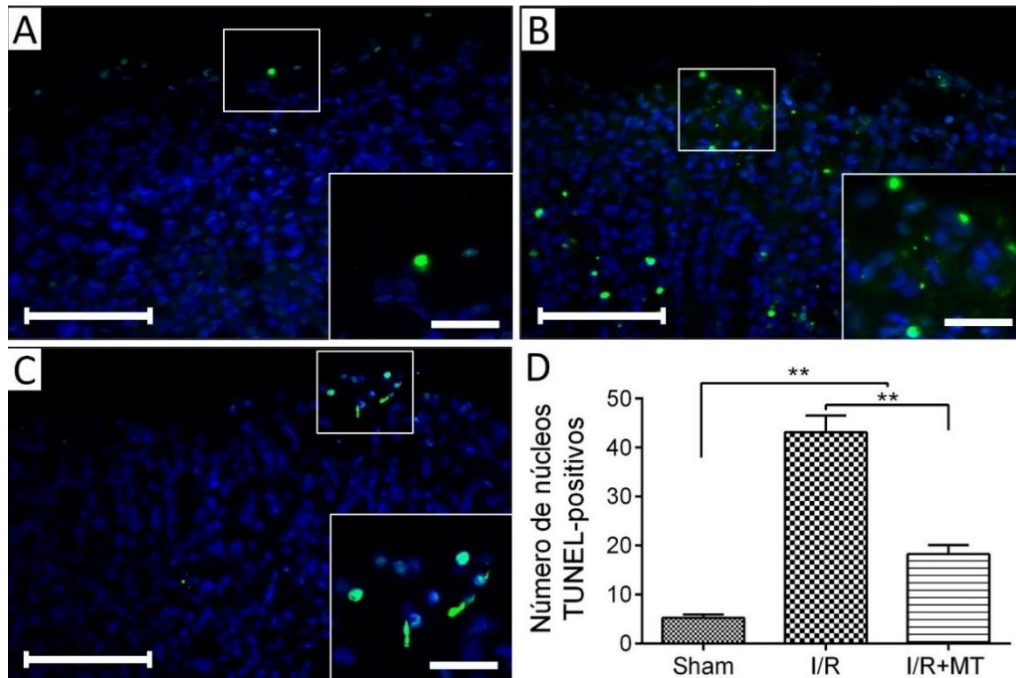


Figura 39. Detección de fragmentación de DNA por técnica de TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) en los grupos Sham (A), I/R (B) e I/R+MT (C). Barra de escala: 100 μ m, \times 400. Magnificación: barra de escala: 50 μ m. D) Representación gráfica de la cuantificación del número de células TUNEL-positivas en los grupos Sham (5.28 ± 0.7), I/R (43.1 ± 3.4) e I/R+MT (18.2 ± 1.85). ** ($p < 0.001$). Los datos son expresados como la media \pm ESM.

9.24 Efecto de la MT sobre la activación de Caspasa-3 inducida por I/R

El análisis de inmunodetección de Caspasa-3-activa por Western blot confirmó estos resultados, el análisis cuantitativo mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la expresión de Caspasa-3 activa en el grupo I/R+MT con respecto al no tratado I/R (Fig. 40). Con este resultado, se observó que el tratamiento con MT atenúa la apoptosis en la mucosa gástrica inducida por I/R.

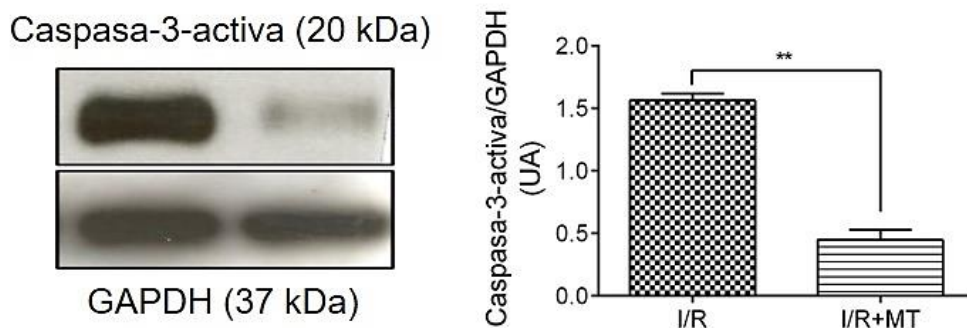


Figura 40. Inmunodetección por Western Blot y análisis cuantitativo de Caspasa-3-activa de los grupos I/R (1.56 ± 0.03) e I/R+MT (0.45 ± 0.04). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos son expresados como la media \pm ESM. * $p < 0.01$. (UA) Unidades arbitrarias.

10 Discusión

El daño en la mucosa gastrointestinal causado por I/R es un problema clínico importante asociado con diversas condiciones fisiopatológicas, tales como trauma, hemorragia, cirugía mayor, fármacos antiinflamatorios, choque hipovolémico, enfermedad isquémica o sangrado por úlcera isquémica (Du et al., 2015). Eventos isquémicos transitorios en la mucosa gástrica ocurren en pacientes en estado crítico con SDOM, los cuales presentan una tasa de mortalidad del 44 al 76% (Osterbur et al., 2014). La disfunción gastrointestinal se observa frecuentemente en este tipo de pacientes, se refiere, en general al deterioro funcional del tracto gastrointestinal, el cual puede llevar a una falla orgánica múltiple. Recientemente, se ha propuesto que el grado de severidad de lesión gastrointestinal aguda es un buen predictor de la mortalidad (Ding et al., 2020), por lo que el diagnóstico temprano es fundamental para orientar las posibles intervenciones terapéuticas con la finalidad de evitar complicaciones.

La espectroscopía de impedancia es una técnica que nos permite monitorear la progresión del daño en tejidos isquémicos. Los cambios tempranos en los parámetros de impedancia (R_L , X_L , R_H y X_H) asociados a isquemia gástrica han sido reportados por Beltran et al., (2006, 2013, 2015) en pacientes en estado crítico y en modelos animales; pero era importante poder cuantificar el daño en la mucosa generado por isquemia e I/R, para lo cual en este trabajo se propuso un índice (ILT) que puede relacionarse con los cambios en la impedancia gástrica. Este índice consideró alteraciones patológicas asociadas con el proceso inflamatorio y daño celular los cuales están relacionados con los parámetros de impedancia a bajas y altas frecuencias (R_L , X_L , R_H y X_H). Además, estas variables pueden verse afectadas por algún tratamiento el cual puede inhibir o disminuir el daño en la mucosa gástrica en condiciones de isquemia o I/R.

Las mediciones de los métodos de cuantificación del daño en la mucosa gástrica descritos previamente, pueden verse afectados por la subjetividad del observador y las técnicas de medición; además, las puntuaciones han sido modificadas en algunos trabajos de acuerdo con el criterio del investigador, lo cual hace difícil comparar los resultados con los de otros investigadores (Zhang et al., 2008; Peskar et al., 2009; Hu et al., 2016). El estudio del daño en la mucosa gástrica se enfoca principalmente en la búsqueda de tratamientos los cuales puedan minimizar el área de erosión generada por I/R (Mard et al., 2015; Hu et al., 2016; Magierowski et al., 2017), por lo cual estos métodos de cuantificación pueden servir como referencia para identificar la extensión y profundidad del daño con el tratamiento en modelos de I/R gástrica; sin embargo, al no ser objetivos, no pueden relacionarse con los cambios en las mediciones de impedancia gástrica generados por I/R. En un estudio preliminar (Pena-Mercado et al., 2016), se propuso un ILT que considera 4 variables: área vascular, área del lumen glandular, número de células dañadas y profundidad de la erosión; sin embargo, la escala se asignó de manera arbitraria, por lo que para este trabajo se

definieron por medio de un análisis estadístico (Fig. 10) y finalmente se categorizó el daño en la mucosa gástrica.

Para la validación del ILT, se realizó el análisis histopatológico y cuantitativo del daño en la mucosa gástrica generado por I/R. Los resultados fueron consistentes con los reportados por Beltran et al., (2013), en donde se identificaron cambios asociados a edema celular y dilatación vascular después de 30 min de isquemia; por otra parte, después de 60 min de reperfusión se identificó daño celular importante que generó erosión en la mucosa gástrica, estos resultados son consistentes con los presentados por Liu et al., (2013) en un modelo de isquemia similar. Con las variables consideradas en el ILT se logró identificar bajo condiciones de isquemia por 30 min, el daño celular y la congestión vascular sin datos aparentes de erosión que comprometan la función de barrera, mientras que en condiciones de reperfusión se observó erosión epitelial hasta la porción oxíntica, lo cual incrementa la puntuación del ILT de manera significativa. Basándonos en estos resultados, la escala sugerida es consistente con los resultados reportados por Nakamori et al., (2010) y Gou et al., (2011), quienes en condiciones de isquemia por 30 min no encontraron daño macroscópico visible; sin embargo, después de 60 min de reperfusión, múltiples lesiones hemorrágicas fueron observadas. En este trabajo, los resultados del ILT nos permitieron conducir un análisis cuantitativo objetivo usando escalas definidas estadísticamente, las cuales nos permitieron obtener resultados cuantitativos reproducibles y comparables que puedan ser relacionados con los cambios de la impedancia gástrica (Peña-Mercado et al., 2018).

La EIE permite monitorear y detectar en tiempo real los cambios morfológicos tempranos que se presentan en condiciones de privación de oxígeno (Swisher et al., 2015). En este trabajo, se detectaron cambios tisulares tempranos asociados a daño por isquemia, con incremento en los parámetros de impedancia a bajas frecuencias (R_L y X_L); además, se encontró un mayor aumento (R_L , X_L y X_H) en los grupos Isq 90 y 120 min. El incremento en la R_L está relacionado con edema y disminución del espacio intercelular como resultado del metabolismo anaerobio durante la isquemia. Cuando el estímulo es muy prolongado, la deficiencia aguda de ATP puede conducir a daño celular irreversible que finalmente conduce a destrucción membranaral y muerte (Lueck et al., 2019), cambios que se relacionan con los aumentos de la reactancia (X_L y X_H).

Algunos trabajos han buscado identificar las alteraciones tisulares que sugieren daño isquémico reversible e irreversible y relacionarlas con las variaciones en mediciones de impedancia en tejido cardiaco (Lueck et al., 2019) y hepático (Cui et al., 2010). Se ha evaluado la integridad de la mucosa intestinal (Warners et al., 2017) y la viabilidad intestinal en isquemia a partir de mediciones de impedancia eléctrica (Pan et al., 2019). Cui et al., (2010), reportaron un incremento gradual a bajas frecuencias a 60 min de isquemia con tendencia a formar una meseta después de 120 min de isquemia. Por su parte, Strand-Amundsen et al., (2017), reportaron un rápido incremento en R_L y en X_H que se mantiene

durante las primeras 3 h de isquemia antes de disminuir, identificando los mayores cambios en X_H . Por otra parte, la R_L ha sido utilizada por Al-Surkhi & Naser (2018) para caracterizar tejido hepático isquémico en conejos. En mucosa gástrica, Beltran et al., (2010), reportaron que X_L es el parámetro que mejor se relaciona con el daño temprano en la mucosa gástrica en pacientes en estado crítico; además de proponer el umbral de $X_L > 26 -j\Omega$ para los pacientes con mayores complicaciones y mortalidad y $X_L < 13 -j\Omega$, para los pacientes sin complicaciones.

En los resultados de este trabajo, los parámetros de impedancia que mejor se relacionan con el daño en la mucosa gástrica generado en condiciones de isquemia prolongada son la R_L y la X_H como lo reporta Strand-Amundsen et al., (2017). Sin embargo, la X_L es un indicador confiable que permite identificar alteraciones tisulares de manera temprana en condiciones de hipoperfusión (Beltran et al., 2010). Además, los umbrales obtenidos para identificar la reversibilidad del daño y la integridad de la mucosa gástrica en el modelo murino son diferentes a los propuestos por Beltran et al., (2010), en humanos. Las diferencias podrían deberse a las especies utilizadas en los modelos experimentales. Por otra parte, los valores de impedancia son específicos para cada órgano, reportándose variaciones considerables entre muestras de diferentes tejidos y entre el mismo órgano en especies diferentes. Estas variaciones pueden ser causadas por la citología (tamaño, forma y disposición de la organización tisular del órgano), diferentes sustancias fundamentales y matriz extracelular (cantidades de agua, grasa o tipos de tejido conectivo) que influyen esencialmente en la impedancia a bajas frecuencias (Bera, 2014).

Los resultados histológicos de este trabajo muestran un incremento en el daño de la mucosa de manera tiempo-dependiente. La privación de oxígeno por 60 min provocó lesiones celulares asociadas a daño celular reversible, mientras que a partir del grupo de Isq 90 min se identificó desprendimiento de las células epiteliales, culminando con la formación de zonas de ulceración a los 120 min de isquemia, generando que la mucosa gástrica pierda su función de barrera. Magalhães et al., (2015), realizaron un análisis de viabilidad en estómago de conejo encontrando necrosis y ulceración hemorrágica hasta la capa muscular después de 3 h de isquemia. Consistente con los datos histopatológicos obtenidos con H-E, la tinción con PAS-AA evidenció pérdida de la secreción de mucinas en los grupos Isq 90 e Isq 120 min. Esta secreción de moco recubre el epitelio de la mucosa gástrica protegiéndola de la autodigestión por pepsina y ácido. Se ha descrito que 75% de los pacientes en estado crítico presentan evidencias de alteraciones en la producción de moco dentro de las 24 h posteriores al ingreso a la unidad de cuidados intensivos (Fennerty, 2002). La disminución en la síntesis de mucinas hace que la mucosa gástrica sea más susceptible a la lesión inducida por diversos factores agresores, incluidas lesiones por I/R (Bülbül et al., 2008). Grootjans et al., (2013), reportaron que la pérdida de la barrera de moco inducida por isquemia colónica por 60 min permite que las bacterias penetren y se adhieran a las células epiteliales tanto en la porción superficial como en la base de las criptas; por lo que la

identificación temprana de isquemia en el tracto gastrointestinal es crítica para minimizar la morbilidad y mortalidad en pacientes en estado crítico.

La iNOS es una enzima relacionada al proceso inflamatorio, la cual se expresa en condiciones de isquemia, además está vinculada con la pérdida de la integridad epitelial en modelos de I/R gástrica (Peña-Mercado et al., 2018). La cinética de expresión de iNOS en condiciones de isquemia prolongada no ha sido reportada en mucosa gástrica, por lo que se vuelve importante detectar la modulación de su expresión en etapas tempranas de isquemia para intervenir terapéuticamente con la finalidad de minimizar significativamente el daño resultado de la reperfusión. En este trabajo, se identificó un incremento gradual en la expresión de la iNOS en células epiteliales gástricas de manera tiempo-dependiente. En modelos *in vitro*, Xu et al., (2000) evidenciaron un incremento en la expresión de iNOS a partir de las 2 h de privación de oxígeno con un máximo de expresión a las 6 h, además identificaron apoptosis que incrementó de acuerdo con la duración de la privación. Por su parte, Serman et al., (2019), indujeron la expresión de iNOS en diferentes tiempos de hipoxia identificándose un incremento después de 4 h y alcanzando una meseta a las 8 h de hipoxia. Varios estudios han demostrado que la hipoxia induce la expresión de la iNOS, lo que conduce a la producción rápida de NO. A su vez, el NO se combina con el anión superóxido para generar peroxinitrito, el cual causa lipoperoxidación, activación de Caspasa-3 y apoptosis (Guo et al., 2019).

El TNF α es una citocina proinflamatoria que es inducida por hipoxia y está relacionada con el incremento en la permeabilidad epitelial (Bercier & Grenier, 2019). En este trabajo, se identificó la expresión de TNF α en células epiteliales de la mucosa gástrica a los 90 min de isquemia y desciende ligeramente a los 120 min, debido probablemente al grado de lesión existente en la mucosa. Yu et al., (2012) han identificado en células cardíacas, un incremento en los niveles de TNF α de manera tiempo-dependiente durante la privación de oxígeno. La apoptosis inducida por TNF α altera la función de barrera, debido al desprendimiento de células epiteliales. Se ha demostrado que los epitelios pueden desencadenar la extrusión después de estímulos apoptóticos intrínsecos o extrínsecos (Watson & Hughes, 2012).

La COX-2 es una enzima inducible involucrada en la inflamación y es responsable de la producción de prostaglandinas involucradas en la recuperación de las úlceras gástricas (Mahmoud & Abd El-Ghffar, 2019). La expresión de COX-2 puede ser inducida en respuesta a factores proinflamatorios (IL-1 α , β , TNF α , INF γ), con la consecuente expresión de COX-2 en las zonas de lesión, incrementando la intensidad de la señal inmunohistoquímica con la severidad del daño tisular (Omayone et al., 2020). Los resultados obtenidos en el análisis inmunohistoquímico son consistentes con los reportados, en donde se ha identificado la expresión de COX-2 en células del epitelio glandular, células mucinógenas, mononucleares, fibroblastos y en el endotelio en las zonas de lesión (Mahmoud & Abd El-Ghffar, 2019).

La inmunodetección de Caspasa-3 activa y el ensayo de apoptosis TUNEL permitió identificar la activación de la Caspasa-3 y el mayor incremento en el número de células apoptóticas en los grupos isquémicos por 90 y 120 min, indicando la existencia de procesos bioquímicos irreversibles que comprometen la integridad del epitelio en la región superficial de las glándulas de la mucosa gástrica. Datos histológicos y el patrón de daño tisular similares a los que se encontraron en este trabajo han sido reportados en un modelo de isquemia intestinal, con desprendimiento de células del epitelio glandular después de 90 min de isquemia asociada a muerte celular por apoptosis (Ikeda et al., 1998). En consecuencia, después de 90 min de isquemia, las células epiteliales apoptóticas y necróticas podrían generar zonas de ulceración que podrían comprometer la función de barrera de la mucosa gástrica.

Después de identificar que, en condiciones de isquemia por 60 min, la mucosa gástrica todavía no pierde la integridad, la siguiente etapa correspondió a los experimentos de los grupos I/R e I/R+MT en los cuales la oclusión de la arteria celiaca fue de 60 min y 24 h de reperfusión.

Los resultados del análisis histológico cualitativo y cuantitativo en nuestro modelo de I/R mostraron lesiones en la mucosa gástrica (edema, hemorragia y algunas zonas de erosión en la porción foveolar de la mucosa) que podrían comprometer la función de barrera de la mucosa gástrica. En relación con estos resultados, Cabeza et al., (2001), reportaron lesiones hemorrágicas, edematosas, así como áreas de exfoliación y alteraciones estructurales en 2/3 partes de las fositas glandulares. Recientemente, Mubarak et al., (2018) reportaron edema y disrupción de la arquitectura de la mucosa gástrica con marcada necrosis y apoptosis de las glándulas fúndicas, así como infiltración de células inflamatorias en todo el espesor de la mucosa. Las lesiones descritas por ambos autores aparentemente son más severas que las observadas en este trabajo, esto podría deberse a que su análisis se hizo sobre lesiones agudas inducidas por 60 min de reperfusión, mientras que, en nuestro modelo, el tiempo de reperfusión es de 24 h y ya existe un proceso de recuperación de la mucosa gástrica (Majumdar et al., 1997). Por otra parte, en el grupo de I/R+MT, se observaron rasgos morfológicos de regeneración de la mucosa gástrica como son reepitelización y tejido de granulación vascular en la porción luminal de la mucosa gástrica después del tratamiento con MT. El tejido de granulación se desarrolla en zonas de lesión y consiste en células de tejido conectivo en proliferación (macrófagos y fibroblastos) y células endoteliales con lo cual se forman capilares por medio del proceso de neovascularización, el cual es estimulado por péptidos angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (Ahluwalia et al., 2017). Los hallazgos presentados en este trabajo refuerzan los estudios previos que reportan que el tratamiento de MT desempeña un papel restaurador después de la lesión inducida por I/R (Mubarak et al., 2018).

Estos resultados permitieron identificar las alteraciones histopatológicas que inducen los cambios en los parámetros de impedancia. El incremento en la R_L se encuentra relacionado

con edema celular y alteraciones en el volumen extracelular (Swisher et al., 2015). En condiciones de reperfusión, se pueden encontrar células epiteliales en proceso de edema, a nivel de la lámina propia se genera congestión vascular y zonas de hemorragia (abundante presencia de eritrocitos), así como presencia de células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos), características tisulares que reducen el espacio extracelular provocando el incremento de la R_L , mientras que el incremento en X_H está relacionado con la pérdida de la integridad membranal y muerte celular (Lueck et al., 2019). Después del tratamiento con MT, la disminución en el proceso inflamatorio y la muerte celular, además de la presencia de tejido de granulación se ven reflejadas en las mediciones de la R_L y X_H , las cuales disminuyen después del proceso de regeneración.

Las alteraciones morfológicas inducidas por I/R identificadas con H-E fueron acompañadas con la pérdida de células productoras de glucosaminoglicanos ácidos en el epitelio foveolar (AA-positivas) y la reducción de la producción de glucosaminoglicanos neutros (PAS-positivas) en el epitelio glandular. Las mucinas gástricas y las capas de moco son secretadas a partir de células mucinógenas superficiales y glandulares. Después de su síntesis, la mucina se acumula en forma de gránulos y después es secretada por exocitosis (An et al., 2020). La pérdida de células mucinógenas en el epitelio superficial después de daño gástrico inducido por estrés (An et al., 2020) e I/R gástrica ha sido previamente reportada (Magierowska et al., 2019). Posterior al tratamiento con MT, se observó la regeneración de células AA-positivas en la porción foveolar, así como un incremento en la producción de glucosaminoglicanos neutros, sugiriendo que el tratamiento revirtió el daño permitiendo que estos tipos celulares mantuvieran la función de barrera.

Los mecanismos de lesión en la mucosa gástrica inducidos por reperfusión se encuentran asociados a la generación de ROS y nitrógeno, las cuales conducen a la elevación de la infiltración de neutrófilos produciendo más radicales libres y mediadores inflamatorios, lo que puede llevar a la lipoperoxidación. Además, existe un incremento en la expresión de moléculas proinflamatorias (iNOS, $TNF\alpha$ y COX-2) las cuales son producidas por la activación del NF- κ B el cual inicia la expresión de genes involucrados en respuestas inflamatorias (Mabrok & Mohamed, 2019; Birsén et al., 2020).

Estudios previos han reportado que el pretratamiento con MT produce un efecto inhibitorio sobre la expresión de iNOS, en parte, por inhibición de las vías de señalización de la MAPK p38 y el NF- κ B, las cuales regulan su expresión (Vilar et al., 2014), esta desregulación disminuye la producción de NO y por consecuencia la creación de peroxinitrito lo que limitaría el daño inducido por reperfusión. Mientras que la reducción en la expresión de $TNF\alpha$ inducida por el pretratamiento con MT se debe a la desregulación de las vías de señalización PI3K/AKT, ERK, NF- κ B (Huang et al., 2019). Los resultados en este trabajo mostraron, que el daño por I/R induce la expresión de iNOS y $TNF\alpha$, mientras que el tratamiento de MT provocó una aparente regulación negativa en su expresión. Sin embargo, después de 24 horas de reperfusión los niveles de expresión tanto de iNOS como

de TNF α podrían estar disminuyendo, ya que se ha reportado que iNOS se sobreexpresa en etapas tempranas de reperfusión (1 hora) y después disminuye gradualmente (Wei et al., 2015). Por otra parte, la inmunodetección de COX-2 mostró un incremento en la expresión principalmente en las zonas de erosión después de la reperfusión, mientras que disminuyó con el tratamiento debido a que hubo un proceso de recuperación. En mucosa gástrica, el incremento en la expresión de COX-2 y PGE2, se ha detectado principalmente en células mucinógenas superficiales y foveolares adyacentes a la zona ulcerada (Villegas et al., 2004). Se ha reportado que el pretratamiento con MT reduce la fosforilación de I κ B- α , lo que genera la reducción en la activación de NF- κ B, disminuyendo la expresión de COX-2 en modelos de respuesta inflamatoria *in vitro* e *in vivo* (Mannino et al., 2019; Ramamoorthy et al., 2017).

La mucosa gástrica posee la capacidad inherente de repararse rápidamente (24 horas aproximadamente) después de una lesión leve o moderada por 2 mecanismos de reparación diferentes que participan en la restauración completa de la mucosa gástrica dañada; el proceso de restitución, el cual comienza con la migración de células epiteliales viables de las fositas y glándulas gástricas, y el proceso de proliferación, que es más lento y reemplaza las células perdidas en el tejido dañado (Majumdar et al., 1997). El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), es una proteína asociada a la DNA polimerasa δ , es utilizada como un marcador de proliferación celular (Ji et al., 2019). En modelos *in vitro*, la aplicación de MT ha demostrado tener un efecto protector por inhibición de la generación de ROS y lipoperoxidación, aumento de la tasa de proliferación y migración celular, así como reducción de la apoptosis en células HUVEC (Aykutoglu et al., 2020). En nuestros resultados, el número de núcleos PCNA-positivos incrementó en el grupo tratado con MT con respecto al grupo I/R. Previamente, se ha reportado que la MT incrementa la proliferación y migración lo que sugiere que puede acelerar el proceso de renovación en la mucosa intestinal (Li et al., 2017). Esto podría indicar que, debido al tiempo de reperfusión, en ambos grupos experimentales existe un proceso de regeneración de la mucosa, sin embargo, el tratamiento con MT podría acelerarlo, lo que se confirmó con el análisis histológico. Se ha reportado que la actividad proliferativa es dependiente del tiempo de la reperfusión, indicando que la severidad del daño en la mucosa tiene una correlación negativa con la actividad proliferativa (Ji et al., 2019).

El ensayo de apoptosis TUNEL mostró un incremento estadísticamente significativo del número de células en proceso apoptótico, el cual se revierte tras el tratamiento con MT. El pretratamiento con MT ha demostrado tener un efecto gastroprotector del daño por I/R por medio de la reducción de apoptosis (Mubarak et al., 2018). El efecto antiapoptótico inducido por la administración de MT se debe a que inhibe pasos importantes de la activación de la vía mitocondrial, previene la traslocación mitocondrial de Bax, reduce la activación de Caspasa 3 y 9 por bloqueo de la liberación del citocromo C, por lo que se reduce la muerte celular por vía apoptótica (Maity et al., 2009).

La detección temprana de eventos isquémicos gastrointestinales es particularmente relevante en pacientes en estado crítico donde los síntomas clásicos del dolor abdominal se ocultan debido a la sedación y la ventilación mecánica. Un diagnóstico más temprano puede dar como resultado una intervención terapéutica temprana que posiblemente prevenga la necesidad de cirugía o si la cirugía estuviera indicada, ocurriría antes, reduciendo la mortalidad. Incluso un retraso de 24 h en el diagnóstico ha mostrado que disminuye la tasa de supervivencia en un 20% (Salim et al., 2017). Además de la identificación temprana de eventos isquémicos gastrointestinales en pacientes en estado crítico, es importante la intervención terapéutica temprana con la finalidad de minimizar/regenerar la lesión inducida después de la reperfusión, reduciendo las diferentes complicaciones que pueden llevar a la muerte del paciente.

11 Conclusiones

- El Índice de lesión tisular (ILT) propuesto permite cuantificar y categorizar el grado de lesión en la mucosa gástrica inducido por I/R de manera objetiva.
- La relación existente entre la puntuación del ILT y las mediciones de los parámetros de impedancia a bajas y altas frecuencias, permitió identificar que la R_L y la X_H son los parámetros que mejor se relacionan con el daño en la mucosa gástrica en condiciones de isquemia prolongada. Además, se propusieron los valores para predecir lesiones reversibles e irreversibles a partir de las mediciones de estos parámetros.
- Los marcadores de proceso inflamatorio y apoptosis presentaron el mayor aumento en el nivel de expresión después de 90 min de isquemia.
- En conjunto, los cambios en la impedancia gástrica, las alteraciones morfológicas y la expresión de marcadores de proceso inflamatorio y muerte celular permitieron evidenciar que la mucosa gástrica pierde su función de barrera a partir de 90 min de isquemia.
- El tratamiento con MT aceleró el proceso de regeneración sobre lesiones inducidas en la mucosa gástrica por I/R, redujo la expresión de los marcadores de proceso inflamatorio y muerte celular apoptótica, además de incrementar la proliferación celular.
- El proceso regenerativo inducido por MT generó una disminución en las mediciones de los parámetros de impedancia gástrica relacionados con el proceso inflamatorio (R_L) y el daño celular (X_H); lo cual corrobora que el uso de la espectroscopia de impedancia eléctrica permite evaluar el grado de lesión y el proceso de recuperación en la mucosa gástrica en nuestro modelo de I/R.

12 Perspectivas

En este trabajo, se ha reforzado que el uso de la EIE permite evidenciar el grado de daño y el proceso de regeneración en la mucosa gástrica sometida a condiciones de isquemia e I/R y, por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con MT de lesiones gástricas agudas inducidas por I/R acelera el proceso de regeneración de la mucosa.

En pacientes en estado crítico, específicamente con choque séptico temprano, se ha evaluado el efecto de la administración de MT (50 mg durante 5 días) por vía oral, se ha reportado que reduce el estrés oxidativo y la inflamación (Aisa-Alvarez et al., 2020); además de disminuir la disfunción orgánica; sin embargo, las diferencias con los pacientes no tratados no son significativas (Taher et al., 2021). Estos resultados podrían deberse a que la MT es administrada ya que el paciente se encuentra en estado de choque; además de que la biodisponibilidad de la MT administrada oralmente es baja (3 al 33%) debido al metabolismo de primer paso en el hígado (DeMuro et al., 2000).

Por lo que el siguiente paso en nuestro trabajo sería, evaluar el efecto de la administración de MT (600 mg por vía intravenosa) en pacientes en estado de choque, los cuales serán monitoreados por medio de una sonda nasogástrica espectrométrica. El momento en el que se administre el tratamiento con MT sería detectado por medio de EIE cuando se identifique un incremento en la reactancia entre $7.7 -j\Omega$ y $13.5 -j\Omega$, cuando las lesiones gástricas son reversibles, es la ventana en la cual la administración de MT podría ayudar a mantener la integridad de la mucosa gastrointestinal. Para identificar si el tratamiento mejoró las alteraciones gastrointestinales asociadas al estado de choque, se podrían medir los niveles de Citrulina y D-Lactato en suero los cuales están asociados con la severidad de la disfunción gastrointestinal (Teng et al., 2021).

Por lo tanto, esperaríamos que la detección temprana de alteraciones en la mucosa gástrica que sugieren lesiones isquémicas y la rápida intervención terapéutica con altas dosis de MT intravenosa podrían disminuir las complicaciones asociadas presentadas durante el estado de choque y, por ende, la tasa de mortalidad en pacientes en estado crítico.

13 Referencias

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., ... Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *71*(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Ahluwalia, A., Brzozowski, T., Jones, M. K., Ichikawa, Y., & Tarnawski, A. S. (2017). Formation of new blood vessels during gastric ulcer healing. Role of bone marrow derived endothelial progenitor cells. *J Physiol Pharmacol*, *68*(4), 585–589.
- Aihara, E., & Montrose, M. H. (2014). Importance of Ca(2+) in gastric epithelial restitution-new views revealed by real-time in vivo measurements. *Current Opinion in Pharmacology*, *19*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.07.012>
- Aisa-Alvarez, A., Soto, M. E., Guarner-Lans, V., Camarena-Alejo, G., Franco-Granillo, J., Martínez-Rodríguez, E. A., ... Pérez-Torres, I. (2020). Usefulness of Antioxidants as Adjuvant Therapy for Septic Shock: A Randomized Clinical Trial. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *56*(11). <https://doi.org/10.3390/medicina56110619>
- Al-Surkhi, O. I., & Naser, R. Y. (2018). Detection of Cell Morphological Changes of Ischemic Rabbit Liver Tissue Using Bioimpedance Spectroscopy. *IEEE Trans Nanobioscience*, *17*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1109/TNB.2018.2853269>
- An, J. M., Kim, E., Lee, H. J., Park, M. H., Son, D. J., & Hahm, K. B. (2020). Dolichos lablab L. extracts as pharmanutrient for stress-related mucosal disease in rat stomach. *J Clin Biochem Nutr*, *67*(1), 89–101. <https://doi.org/10.3164/jcbn.20-11>
- Asrani, V. M., Brown, A., Bissett, I., & Windsor, J. A. (2020). Impact of Intravenous Fluids and Enteral Nutrition on the Severity of Gastrointestinal Dysfunction: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Crit Care Med (Targu Mures)*, *6*(1), 5–24. <https://doi.org/10.2478/jccm-2020-0009>
- Aykutoglu, G., Tartik, M., Darendelioglu, E., Ayna, A., & Baydas, G. (2020). Melatonin and vitamin E alleviate homocysteine-induced oxidative injury and apoptosis in endothelial cells. *Mol Biol Rep*, *47*(7), 5285–5293. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05607-z>
- Baek, S. H., Oh, K.-H., Kim, S., Kim, D. K., Joo, K.-W., Oh, Y. K., ... Na, K. Y. (2014). Control of fluid balance guided by body composition monitoring in patients on peritoneal dialysis (COMPASS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *15*, 432. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-15-432>
- Baez, A. A. (2019). Development of multiple organ dysfunction syndrome in older and young adult trauma patients. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, *9*(1), 21–24. https://doi.org/10.4103/IJCIIS.IJCIIS_56_18
- Beltrán, N. E., de Folter, J. J. M., Godínez, M. M., Díaz, U., & Sacristán, E. (2007). Algorithm for characteristic parameter estimation of gastric impedance spectra in humans. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference, 2007*, 4131–4134. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2007.4353245>
- Beltran, N E, Sanchez-Miranda, G., Godinez, M., Diaz, U., & Sacristan, E. (2006). Gastric impedance spectroscopy in elective cardiovascular surgery patients. *Physiological*

Measurement, 27(3), 265–277. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/27/3/005>

- Beltran, N E, Sanchez-Miranda, G., Godinez, M. M., Diaz, U., & Sacristan, E. (2010a). The predictive value of gastric reactance for postoperative morbidity and mortality in cardiac surgery patients. *Physiological Measurement*, 31(11), 1423–1436. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/31/11/002>
- Beltran, N E, Sanchez-Miranda, G., Godinez, M. M., Diaz, U., & Sacristan, E. (2010b). The predictive value of gastric reactance for postoperative morbidity and mortality in cardiac surgery patients. *Physiol Meas*, 31(11), 1423–1436. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/31/11/002>
- Beltran, Nohra E., Garcia, L. E., & Garcia-Lorenzana, M. (2013). Gastric tissue damage analysis generated by ischemia: Bioimpedance, confocal endomicroscopy, and light microscopy. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/824682>
- Beltran, Nohra E., & Sacristan, E. (2015). Gastrointestinal ischemia monitoring through impedance spectroscopy as a tool for the management of the critically ill. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 240(7), 835–845. <https://doi.org/10.1177/1535370215571876>
- Beltran, Nohra E, Garcia, L. E., & Garcia-Lorenzana, M. (2013a). Gastric tissue damage analysis generated by ischemia: bioimpedance, confocal endomicroscopy, and light microscopy. *BioMed Research International*, 2013(824682), 8 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/824682>
- Beltran, Nohra E, Garcia, L. E., & Garcia-Lorenzana, M. (2013b). Gastric Tissue Damage Analysis Generated by Ischemia: Bioimpedance, Confocal Endomicroscopy, and Light Microscopy. *BioMed Research International*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/824682>
- Beltran, Nohra E, Sánchez-Miranda, G., & Sacristan, E. (2015). Effect of Feeding and Suction on Gastric Impedance Spectroscopy Measurements. *Gastroenterology Nursing : The Official Journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates*, 38(4), 259–266. <https://doi.org/10.1097/SGA.0000000000000123>
- Bera, T. K. (2014). Bioelectrical Impedance Methods for Noninvasive Health Monitoring: A Review. *J Med Eng*, 2014, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2014/381251>
- Bercier, P., & Grenier, D. (2019). TNF-alpha disrupts the integrity of the porcine respiratory epithelial barrier. *Res Vet Sci*, 124, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.029>
- Binkowska, A. M., Michalak, G., & Słotwiński, R. (2015). Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Central-European Journal of Immunology*, 40(2), 206–216. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.52835>
- Birsen, İ., İzgüt-Uysal, V. N., Soylu, H., & Üstünel, İ. (2020). The effect of apelin-13 on gastric ischemia/reperfusion injury: the roles of sensory nerves and vagus nerve. *Can J Physiol Pharmacol*, 98(5), 282–295. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0502>
- Brzozowski, T, Konturek, P. C., Konturek, S. J., Pajdo, R., Bielanski, W., Brzozowska, I., ... Hahn, E. G. (1997). The role of melatonin and L-tryptophan in prevention of acute gastric lesions induced by stress, ethanol, ischemia, and aspirin. *Journal of Pineal Research*, 23(2), 79–89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1997.tb00339.x>
- Brzozowski, Tomasz, Konturek, P. C., Konturek, S. J., Pajdo, R., Kwiecien, S., Pawlik, M., ... Pawlik, W. W. (2004). Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *European Journal of Pharmacology*, 499(1–2), 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.072>

- Bülbül, M., Tan, R., Gemici, B., Öngüt, G., & Izgüt-Uysal, V. N. (2008). Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. *Journal of Gastroenterology*, *43*(3), 202–207. <https://doi.org/10.1007/s00535-007-2148-3>
- Cabeza, J., Alarcon-de-la-Lastra, C., Jimenez, D., Martin, M. J., & Motilva, V. (2003). Melatonin modulates the effects of gastric injury in rats: Role of prostaglandins and nitric oxide. *Neurosignals*, *12*(2), 71–77. <https://doi.org/10.1159/000071816>
- Cabeza, J., Motilva, V., Martín, M. J., Alarcon De La Lastra, C., & De La Lastra, C. A. (2001). Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences*, *68*(12), 1405–1415. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)00935-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)00935-3)
- Cabeza, J., Motilva, V., Martín, M. J., & De La Lastra, C. A. (2001). Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences*, *68*(12), 1405–1415. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)00935-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)00935-3)
- Caraballo, C., & Jaimes, F. (2019). Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *92*(4), 629–640.
- Casas, O., Bragós, R., Riu, P., Rosell, J., Tresànceh, M., Warren, M., ... Cinca, J. (1999). In vivo and in situ ischemic tissue characterization using electrical impedance spectroscopy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09448.x>
- Chao, P.-J., Huang, E.-Y., Cheng, K.-S., & Huang, Y.-J. (2013). Electrical impedance spectroscopy as electrical biopsy for monitoring radiation sequelae of intestine in rats. *BioMed Research International*, *2013*, 974614. <https://doi.org/10.1155/2013/974614>
- Chen, C.-Q., Fichna, J., Bashashati, M., Li, Y.-Y., & Storr, M. (2011). Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World Journal of Gastroenterology*, *17*(34), 3888–3898. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i34.3888>
- Cowled, P., & Fitridge, R. (2011). Pathophysiology of Reperfusion Injury. In R. Fitridge & M. Thompson (Eds.). Adelaide (AU).
- Cui, M. L., Ahn, H. S., Kim, J. Y., Shin, H. J., Lee, D. S., Kim, H. J., & Yun, S. S. (2010). Bioelectrical impedance may predict cell viability during ischemia and reperfusion in rat liver. *J Korean Med Sci*, *25*(4), 577–582. <https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.4.577>
- D'Angelo, G., Chimenz, R., Reiter, R. J., & Gitto, E. (2020). Use of Melatonin in Oxidative Stress Related Neonatal Diseases. *Antioxidants (Basel)*, *9*(6), 477. <https://doi.org/10.3390/antiox9060477>
- Dai, M., Cui, P., Yu, M., Han, J., Li, H., & Xiu, R. (2008). Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. *Journal of Pineal Research*, *44*(2), 121–126. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00498.x>
- De La Lastra, C. A., Cabeza, J., Motilva, V., & Martin, M. J. (1997). Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pineal Research*, *23*(2), 47–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9392441>
- DeMuro, R. L., Nafziger, A. N., Blask, D. E., Menhinick, A. M., & Bertino, J. S. J. (2000). The absolute bioavailability of oral melatonin. *Journal of Clinical Pharmacology*, *40*(7), 781–784. <https://doi.org/10.1177/00912700022009422>
- Deng, W.-S., Xu, Q., Liu, Y. E., Jiang, C.-H., Zhou, H., & Gu, L. (2016). Effects of melatonin on

- liver function and lipid peroxidation in a rat model of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(5), 1955–1960.
<https://doi.org/10.3892/etm.2016.3160>
- Ding, L., Chen, H. Y., Wang, J. Y., Xiong, H. F., He, W. H., Xia, L., ... Zhu, Y. (2020). Severity of acute gastrointestinal injury grade is a good predictor of mortality in critically ill patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 26(5), 514–523.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i5.514>
- Du, Z., Jia, H., Liu, J., Zhao, X., & Xu, W. (2015). Effects of three hydrogen-rich liquids on hemorrhagic shock in rats. *Journal of Surgical Research*, 193(1), 377–382.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.06.051>
- Egan, E. D., & Johnson, K. B. (2020). The Influence of Hemorrhagic Shock on the Disposition and Effects of Intravenous Anesthetics: A Narrative Review. *Anesthesia and Analgesia*, 130(5), 1320–1330. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004654>
- Fennerty, M. B. (2002). Pathophysiology of the upper gastrointestinal tract in the critically ill patient: rationale for the therapeutic benefits of acid suppression. *Crit Care Med*, 30(6 Suppl), S351–5. <https://doi.org/10.1097/00003246-200206001-00002>
- Ferlazzo, N., Andolina, G., Cannata, A., Costanzo, M. G., Rizzo, V., Currò, M., ... Caccamo, D. (2020). Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century? *Antioxidants (Basel)*, 9(11), 1088.
<https://doi.org/10.3390/antiox9111088>
- Fukumura, D., Kurose, I., Miura, S., Tsuchiya, M., & Ishii, H. (1995). Oxidative stress in gastric mucosal injury: role of platelet-activating factor-activated granulocytes. *Journal of Gastroenterology*, 30(5), 565–571. <https://doi.org/10.1007/BF02367780>
- Gatt, M., Reddy, B. S., & MacFie, J. (2007). Review article: bacterial translocation in the critically ill—evidence and methods of prevention. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25(7), 741–757. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03174.x>
- Gersing, E. (1998). Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45(2), 145–149.
[https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00079-8)
- Gezginci-Oktayoglu, S., Orhan, N., & Bolkent, S. (2016). Prostaglandin-E 1 has a protective effect on renal ischemia/ reperfusion-induced oxidative stress and inflammation mediated gastric damage in rats. *Int Immunopharmacol*, 36, 142–150.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.021>
- Giannoudis, P. V., Hildebrand, F., & Pape, H. C. (2004). Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 86(3), 313–323.
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.86B3.15035>
- Ginnan, R., Guikema, B. J., Halligan, K. E., Singer, H. A., & Jourdeuil, D. (2008). Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(7), 1232–1245.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.025>
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
- Gou, L., Zhang, L., Yin, C., Jia, G., Yin, X., Zhuang, X., ... Liu, Y. (2011). Protective effect of L-citrulline against acute gastric mucosal lesions induced by ischemia–reperfusion in rats.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 89(5), 317–327.
<https://doi.org/10.1139/y11-027>

- Grimnes, S & Martinsen, Ø. (2008). Passive tissue electrical properties. In *Bioimpedance and bioelectricity basics* (p. 123). Great Britain: Elsevier.
- Grootjans, J., Hundscheid, I. H., Lenaerts, K., Boonen, B., Renes, I. B., Verheyen, F. K., ...
Buurman, W. A. (2013). Ischaemia-induced mucus barrier loss and bacterial penetration are rapidly counteracted by increased goblet cell secretory activity in human and rat colon. *Gut*, 62(2), 250–258. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301956>
- Guisasola, M. C., Ortiz, A., Chana, F., Alonso, B., & Vaquero, J. (2015). Early inflammatory response in polytraumatized patients: Cytokines and heat shock proteins. A pilot study. *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research*, 101(5), 607–611.
<https://doi.org/10.1016/j.otsr.2015.03.014>
- Guo, M., Ma, X., Feng, Y., Han, S., Dong, Q., Cui, M., & Zhao, Y. (2019). In chronic hypoxia, glucose availability and hypoxic severity dictate the balance between HIF-1 and HIF-2 in astrocytes. *FASEB J*, 33(10), 11123–11136. <https://doi.org/10.1096/fj.201900402RR>
- Halladin, N. L. (2015). Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. *Danish Medical Journal*, 62(4), B5054.
- Hassan, M., Kashimura, H., & Matsumaru, K. (1997). Gastric Mucosal Injury Induced by Local Ischemia - Reperfusion in Rats Role of Endogenous Endothelin-1 and Free Radical. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(7), 1375–1380.
- Hooper N, A. T. (2020). Hemorrhagic Shock. In *StatPearls [Internet]*. Retrieved from
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470382/>
- Hu, Y., Tao, X., Han, X., Xu, L., Yin, L., Qi, Y., ... Peng, J. (2016). Dioscin attenuates gastric ischemia/reperfusion injury through the down-regulation of PKC/ERK1/2 signaling via PKC α and PKC β 2 inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, 258, 234–244.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.09.014>
- Huang, C. C., Chiou, C. H., Liu, S. C., Hu, S. L., Su, C. M., Tsai, C. H., & Tang, C. H. (2019). Melatonin attenuates TNF- α and IL-1 β expression in synovial fibroblasts and diminishes cartilage degradation: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Pineal Res*, 66(3), e12560. <https://doi.org/10.1111/jpi.12560>
- Ikeda, H., Suzuki, Y., Suzuki, M., Koike, M., Tamura, J., Tong, J., ... Itoh, G. (1998). Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut*, 42(4), 530–537. <https://doi.org/10.1136/gut.42.4.530>
- Ivorra, A. (2005). *Contributions to the measurement of electrical impedance for living tissue ischemia injury monitoring*. Universidad Polit cnica de Catalu na.
- Ji, A. L., Li, T., Zu, G., Feng, D. C., Li, Y., Wang, G. Z., ... Tian, X. F. (2019). Ubiquitin-specific protease 22 enhances intestinal cell proliferation and tissue regeneration after intestinal ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol*, 25(7), 824–836.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i7.824>
- Kamel, M., Ahmed, S. M., & Abdelzaher, W. (2020). The potential protective effect of modafinil in intestinal ischemic reperfusion-induced in rats. *Int Immunopharmacol*, 88, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106983>

- Khadaroo, R. G., Churchill, T. A., Tso, V., Madsen, K. L., Lukowski, C., & Salim, S. Y. (2017). Metabolomic profiling to characterize acute intestinal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*, *12*(6), e0179326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179326>
- Kim, K. J., Choi, J. S., Kang, I., Kim, K. W., Jeong, C. H., & Jeong, J. W. (2013). Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. *Journal of Pineal Research*, *54*(3), 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01030.x>
- Kislitsina, O. N., Rich, J. D., Wilcox, J. E., Pham, D. T., Churyla, A., Vorovich, E. B., ... Yancy, C. W. (2019). Shock - Classification and Pathophysiological Principles of Therapeutics. *Curr Cardiol Rev*, *15*(2), 102–113. <https://doi.org/10.2174/1573403x15666181212125024>
- Knabe, M., Kurz, C., Knoll, T., Velten, T., Vieth, M., Manner, H., ... Pech, O. (2013). Diagnosing early Barrett's neoplasia and oesophageal squamous cell neoplasia by bioimpedance spectroscopy in human tissue. *United European Gastroenterology Journal*, *1*(4), 236–241. <https://doi.org/10.1177/2050640613495198>
- Kobata, A., Kotani, T., Komatsu, Y., Amagase, K., Kato, S., & Takeuchi, K. (2007). Dual action of nitric oxide in the pathogenesis of ischemia/reperfusion-induced mucosal injury in mouse stomach. *Digestion*, *75*(4), 188–197. <https://doi.org/10.1159/000108590>
- Konturek, P. C., Konturek, S. J., Brzozowski, T., Dembinski, A., Zembala, M., Mytar, B., & Hahn, E. G. (1997). Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenging of oxygen radicals. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *32*(5), 433–438. <https://doi.org/10.3109/00365529709025077>
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Aster, J. (2010). Inflamación aguda y crónica. In *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional* (p. 45). Barcelona: Elsevier.
- Kun, S., & Peura, R. (1994). Tissue ischemia detection using impedance spectroscopy. *Proceedings of 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, *2*, 868–869 vol.2.
- Kwiecien S., Brzozowski T., K. S. (2002). Effects of Reactive Oxygen Species Action on Gastric Mucosa in Various Models of Mucosal Injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *53*(1), 39–50. Retrieved from http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/03_02/pdf/39_03_02_article.pdf
- Lee, M., Wang, C., Jin, S. W., Labrecque, M. P., Beischlag, T. V., Brockman, M. A., & Choy, J. C. (2019). Expression of human inducible nitric oxide synthase in response to cytokines is regulated by hypoxia-inducible factor-1. *Free Radic Biol Med*, *130*, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.441>
- Lelubre, C., & Vincent, J. L. (2018). Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*, *14*(7), 417–427. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0005-7>
- Li, J., Li, R. X., Liu, G., Lv, C. F., Mi, Y. L., & Zhang, C. Q. (2017). Effect of melatonin on renewal of chicken small intestinal mucosa. *Poult Sci*, *96*(8), 2942–2949. <https://doi.org/10.3382/ps/pex085>
- Lier, H., Bernhard, M., & Hossfeld, B. (2018). [Hypovolemic and hemorrhagic shock]. *Anaesthesist*, *67*(3), 225–244. <https://doi.org/10.1007/s00101-018-0411-z>
- Lima, M. S. R., Lima, V. C. O., Piuvezam, G., Azevedo, K. P. M., Maciel, B. L. L., & Morais, A.

- H. A. (2019). Mechanisms of action of molecules with anti-TNF-alpha activity on intestinal barrier inflammation: A systematic review protocol. *Medicine (Baltimore)*, 98(39), 1–5. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017285>
- Lin, Y. W., Chen, T. Y., Hung, C. Y., Tai, S. H., Huang, S. Y., Chang, C. C., ... Lee, E. J. (2018). Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(1), 182–192. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3607>
- Liu, Y., Gou, L., Fu, X., Li, S., Lan, N., & Yin, X. (2013). Protective effect of rutin against acute gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion. *Pharmaceutical Biology*, 51(7), 914–919. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.771375>
- Lueck, S., Preusse, C. J., Delis, A., & Schaefer, M. (2019). Development of cell oedema in piglet hearts during ischaemia monitored by dielectric spectroscopy. *Bioelectrochemistry*, 129, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.023>
- Ma, N., Zhang, J., Reiter, R. J., & Ma, X. (2020). Melatonin mediates mucosal immune cells, microbial metabolism, and rhythm crosstalk: A therapeutic target to reduce intestinal inflammation. *Medicinal Research Reviews*, 40(2), 606–632. <https://doi.org/10.1002/med.21628>
- Mabrok, H. B., & Mohamed, M. S. (2019). Induction of COX-1, suppression of COX-2 and pro-inflammatory cytokines gene expression by moringa leaves and its aqueous extract in aspirin-induced gastric ulcer rats. *Mol Biol Rep*, 46(4), 4213–4224. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04874-9>
- Magalhães, M. A., Barbosa, A. J., Figueiredo, J. A., Alberti, L. R., & Petroianu, A. (2015). Effects of different periods of gastric ischaemia in the viability of the tissue of body, fundus and antrum region of rabbit stomach. *Arq Bras Cir Dig*, 28(3), 167–170. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202015nahead00001>
- Magierowska, K., Korbut, E., Hubalewska-Mazgaj, M., Surmiak, M., Chmura, A., Bakalarz, D., ... Magierowski, M. (2019). Oxidative gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion and the mechanisms of its prevention by carbon monoxide-releasing tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer. *Free Radic Biol Med*, 145, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.032>
- Magierowski, M., Magierowska, K., & Hubalewska-mazgaj, M. (2017). Exogenous and Endogenous Hydrogen Sulfide Protects Gastric Mucosa against the Formation and Time-Dependent Development of Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lesions Progressing into Deeper Ulcerations. *Molecules*, 22(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules22020295>
- Mahmoud, Y. I., & Abd El-Ghffar, E. A. (2019). Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation. *Biomed Pharmacother*, 109, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.118>
- Maity, P., Bindu, S., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Pal, C., ... Bandyopadhyay, U. (2009). Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 314–323. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00663.x>
- Majumdar, A. P., Fligiel, S. E., & Jaszewski, R. (1997). Gastric mucosal injury and repair: effect of aging. *Histol Histopathol*, 12(2), 491–501.

- Mannino, G., Caradonna, F., Cruciata, I., Lauria, A., Perrone, A., & Gentile, C. (2019). Melatonin reduces inflammatory response in human intestinal epithelial cells stimulated by interleukin-1 β . *J Pineal Res*, 67(3), e12598. <https://doi.org/10.1111/jpi.12598>
- Mard, S. A., Mojadami, S., Farbood, Y., Kazem, M., & Naseri, G. (2015). The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of gallic acid against mucosal inflammation- and erosions-induced by gastric ischemia-reperfusion in rats. *Vet Res Forum*, 6(4), 305–311.
- Mard, S. A., Neisi, N., Darbor, M., Hassanpour, M., Makvandi, M., Solgi, G., & Mard, S. A. (2012). B-Carotene Protects the Gastric Mucosa Against Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *European Cytokine Network*, 23(4), 173–178. <https://doi.org/10.1684/ecn.2012.0317>
- Mazaleuskaya, L. L., & Ricciotti, E. (2020). Druggable Prostanoid Pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1274, 29–54. https://doi.org/10.1007/978-3-030-50621-6_3
- McIntyre, W. F., Um, K. J., Alhazzani, W., Lengyel, A. P., Hajjar, L., Gordon, A. C., ... Belley-Côté, E. P. (2018). Association of Vasopressin Plus Catecholamine Vasopressors vs Catecholamines Alone With Atrial Fibrillation in Patients With Distributive Shock: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, 319(18), 1889–1900. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.4528>
- McMichael, M.; Moore, R. (2004). Ischemia – Reperfusion Injury Pathophysiology, Part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14(4), 231–241.
- Meng, X., Wei, M., Wang, D., Qu, X., Zhang, K., Zhang, N., & Li, X. (2020). The protective effect of hesperidin against renal ischemia-reperfusion injury involves the TLR-4/NF-kB/iNOS pathway in rats. *Physiology International*, 107(1), 82–91. <https://doi.org/10.1556/2060.2020.00003>
- Mistraletti, G., Paroni, R., Umbrello, M., Moro Salihovic, B., Coppola, S., Froio, S., ... Iapichino, G. (2019). Different routes and formulations of melatonin in critically ill patients. A pharmacokinetic randomized study. *Clinical Endocrinology*, 91(1), 209–218. <https://doi.org/10.1111/cen.13993>
- Mitra, S., & Abraham, E. (2006). Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(8), 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.06.011>
- Mohamadin, A. M., Ashour, O. M., El-Sherbeny, N. A., Alahdal, A. M., Morsy, G. M., & Abdel-Naim, A. B. (2009). Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced gastric injury in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 36(4), 367–372. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05072.x>
- Morse, J. (2014). *Electrical bioimpedance as a detection tool for internal hemorrhaging and blood aggregation*. University of Ottawa.
- Mubarak, H. A., Mahmoud, M. M., Shoukry, H. S., Merzeban, D. H., Sayed, S. S., & Rashed, L. A. (2018). Protective effects of melatonin and glucagon-like peptide-1 receptor agonist (liraglutide) on gastric ischaemia-reperfusion injury in high-fat/sucrose-fed rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(9), 934–942. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12956>
- Murdoch, C., Brown, B. H., Hearnden, V., Speight, P. M., D'Apice, K., Hegarty, A. M., ... Thornhill, M. H. (2014). Use of electrical impedance spectroscopy to detect malignant and

- potentially malignant oral lesions. *Int J Nanomedicine*, 9, 4521–4532.
<https://doi.org/10.2147/ijn.S64087>
- Nakagiri, A., & Murakami, M. (2009). Roles of NADPH oxidase in occurrence of gastric damage and expression of cyclooxygenase-2 during ischemia/reperfusion in rat stomachs. *J Pharmacol Sci*, 111(4), 352–360. <https://doi.org/10.1254/jphs.09169FP>
- Nakamori, Y., Komatsu, Y., Kotani, T., Kojima, S., & Takeuchi, K. (2010). Pathogenic Importance of Cysteinyl Leukotrienes in Development of Gastric Lesions Induced by Ischemia/Reperfusion in Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 333(1), 91–98.
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.162578>
- Omayone, T. P., Salami, A. T., Olopade, J. O., & Olaleye, S. B. (2020). Attenuation of ischemia-reperfusion-induced gastric ulcer by low-dose vanadium in male Wistar rats. *Life Sci*, 259, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118272>
- Osterbur, K., Mann, F. A., Kuroki, K., & Declue, A. (2014). Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(4), 1141–1151.
<https://doi.org/10.1111/jvim.12364>
- Ozban, M., Aydin, C., Cevahir, N., Yenisey, C., Birsen, O., Gumrukcu, G., ... Berber, I. (2015). The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *BMC Surgery*, 15, 18.
<https://doi.org/10.1186/s12893-015-0003-7>
- Pan, P., Song, Y., Du, X., Bai, L., Hua, X., Xiao, Y., & Yu, X. (2019). Intestinal barrier dysfunction following traumatic brain injury. *Neurol Sci*, 40(6), 1105–1110.
<https://doi.org/10.1007/s10072-019-03739-0>
- Panah, F., Ghorbanihaghjo, A., Argani, H., Haiaty, S., Rashtchizadeh, N., Hosseini, L., ... Sanajou, D. (2019). The effect of oral melatonin on renal ischemia–reperfusion injury in transplant patients: A double-blind, randomized controlled trial. *Transplant Immunology*, 57(July), 101241. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2019.101241>
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J. M., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, 85(3), 335–353.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.001>
- Paredes, S. D., Rancan, L., Kireev, R., González, A., Louzao, P., González, P., ... Tresguerres, J. A. F. (2015). Melatonin Counteracts at a Transcriptional Level the Inflammatory and Apoptotic Response Secondary to Ischemic Brain Injury Induced by Middle Cerebral Artery Blockade in Aging Rats. *BioResearch Open Access*, 4(1), 407–416.
<https://doi.org/10.1089/biores.2015.0032>
- Park, J.-W., Hwang, M.-S., Suh, S.-I., & Baek, W.-K. (2009). Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 46(4), 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00678.x>
- Park, S. Y., Jang, W. J., Yi, E. Y., Jang, J. Y., Jung, Y., Jeong, J. W., & Kim, Y. J. (2010). Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *Journal of Pineal Research*, 48(2), 178–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00742.x>
- Park, Y., Kim, H. W., Yun, J., Seo, S., Park, C.-J., Lee, J. Z., & Lee, J.-H. (2016). Microelectrical

- Impedance Spectroscopy for the Differentiation between Normal and Cancerous Human Urothelial Cell Lines: Real-Time Electrical Impedance Measurement at an Optimal Frequency. *BioMed Research International*, 2016, 8748023. <https://doi.org/10.1155/2016/8748023>
- Parramon, D., Erill, I., Guimerà, A., Ivorra, A., Muñoz, A., Sola, A., ... Villa, R. (2007). In vivo detection of liver steatosis in rats based on impedance spectroscopy. *Physiological Measurement*, 28(8), 813–828. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/8/005>
- Paterniti, I., Cordaro, M., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2016). The antioxidative property of melatonin against brain ischemia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(7), 841–848. <https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1182020>
- Peña-Mercado, E., Garcia-Lorenzana, M., Arechaga-Ocampo, E., González-De la Rosa, C. H., & Beltran, N. E. (2018). Evaluation of HIF-1 α and iNOS in ischemia/reperfusion gastric model: bioimpedance, histological and immunohistochemical analyses. *Histol Histopathol*, 33(8), 815–823. <https://doi.org/10.14670/hh-11-975>
- Pena-Mercado, E., Garcia-Lorenzana, M., Arechaga, E., La Rosa, C. H. G. De, & Beltran, N. E. (2016). Gastric mucosa injury quantification in an ischemia - Reperfusion experimental model. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS, 2016-October*, 2303–2306. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2016.7591190>
- Peña-Mercado, E., Garcia-Lorenzana, M., & Beltran, N. E. (2018). Histomorphometric analysis with a proposed tissue lesion index in ischemia-reperfusion induced gastric mucosa damage. *Histol Histopathol*, 33(10), 1047–1058. <https://doi.org/10.14670/hh-11-999>
- Peskar, B. M., Ehrlich, K., Schuligoi, R., & Peskar, B. A. (2009). Role of lipoxigenases and the lipoxin A4/annexin 1 receptor in ischemia-reperfusion-induced gastric mucosal damage in rats. *Pharmacology*, 84(5), 294–299. <https://doi.org/10.1159/000244017>
- Porth, C. (2010). Adaptación, lesión y muerte celulares; Insuficiencia cardiaca y shock circulatorio. In *Fisiopatología. Salud – enfermedad: un enfoque conceptual* (pp. 113, 617–625). Médica Panamericana.
- Ramamoorthy, H., Abraham, P., Isaac, B., & Selvakumar, D. (2017). Role for NF- κ B inflammatory signalling pathway in tenofovir disoproxil fumarate (TDF) induced renal damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 99, 103–118. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.029>
- Reiter, R. J., Sharma, R., Rosales-Corral, S. A., Coto-Montes, A., Boga, J. A., & Vriend, J. (2020). Advances in Characterizing Recently-Identified Molecular Actions of Melatonin: Clinical Implications. *Approaching Complex Diseases: Network-Based Pharmacology and Systems Approach in Bio-Medicine*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32857-3_14
- Rushing, G. D., & Britt, L. D. (2008). Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. *Annals of Surgery*, 247(6), 929–937. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31816757f7>
- Sakr, Y., Lobo, S. M., Moreno, R. P., Gerlach, H., Ranieri, V. M., Michalopoulos, A., & Vincent, J.-L. (2012). Patterns and early evolution of organ failure in the intensive care unit and their relation to outcome. *Critical Care (London, England)*, 16(6), R222. <https://doi.org/10.1186/cc11868>
- Salim, S. Y., Young, P. Y., Churchill, T. A., & Khadaroo, R. G. (2017). Urine intestinal fatty acid-binding protein predicts acute mesenteric ischemia in patients. *J Surg Res*, 209, 258–265.

<https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.07.017>

- Sánchez-Iglesias, A., Fernández-Lucas, M., Teruel, J. (2012). Fundamentos eléctricos de la bioimpedancia. *Nefrología*, 32(2), 133–135.
- Scheschowitsch, K., de Moraes, J. A., Sordi, R., Barja-Fidalgo, C., & Assreuy, J. (2015). Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Research*, 100, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.001>
- Serman, Y., Fuentealba, R. A., Pasten, C., Rocco, J., Ko, B. C. B., Carrión, F., & Irrarrázabal, C. E. (2019). Emerging new role of NFAT5 in inducible nitric oxide synthase in response to hypoxia in mouse embryonic fibroblast cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 317(1), C31–C38. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00054.2019>
- Shahrokhi, N., Khaksari, M., Nourizad, S., Shahrokhi, N., Soltani, Z., & Gholamhosseinian, A. (2016). Protective effects of an interaction between vagus nerve and melatonin on gastric ischemia/reperfusion: the role of oxidative stress. *Iran J Basic Med Sci*, 19(1), 72–79.
- Shahrokhi, Nader, Khaksari, M., Nourizad, S., Shahrokhi, N., Soltani, Z., & Gholamhosseinian, A. (2016). Protective effects of an interaction between vagus nerve and melatonin on gastric ischemia/reperfusion: the role of oxidative stress. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1), 72–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096067>
- Shneider, A., Kudriavtsev, A., & Vakhrusheva, A. (2020). Can melatonin reduce the severity of COVID-19 pandemic? *International Reviews of Immunology*, 39(4), 153–162. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1756284>
- Simini, F & Bertemes-Filho, P. (2018). Electrical Impedance Spectroscopy. In *Bioimpedance in biomedical applications and research* (pp. 5–7). Switzerland: Springer.
- Simko, L. C., & Culleiton, A. L. (2020). Cardiogenic shock with resultant multiple organ dysfunction syndrome. *Nursing*, 50(7), 54–60. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000580664.82974.cf>
- Smith, S. M., Holm-Rutili, L., Perry, M. A., Grisham, M. B., Arfors, K. E., Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (1987). Role of neutrophils in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in the rat. *Gastroenterology*, 93(3), 466–471. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90907-3](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90907-3)
- Stevens, A., Lowe, J., & Scott, I. (2011). Lesión celular y muerte. In *Patología Clínica* (Manual Mod, p. 19).
- Strand-Amundsen, R. J., Reims, H. M., Tronstad, C., Kalvøy, H., Martinsen, Ø. G., Høgetveit, J. O., ... Tønnessen, T. I. (2017). Ischemic small intestine-in vivo versus ex vivo bioimpedance measurements. *Physiol Meas*, 38(5), 715–728. <https://doi.org/10.1088/1361-6579/aa67b7>
- Strand-Amundsen, R. J., Tronstad, C., Kalvøy, H., Gundersen, Y., Krohn, C. D., Aasen, A. O., ... Tønnessen, T. I. (2016). In vivo characterization of ischemic small intestine using bioimpedance measurements. *Physiol Meas*, 37(2), 257–275. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/37/2/257>
- Surbatovic, M., Veljovic, M., Jevdjic, J., Popovic, N., Djordjevic, D., & Radakovic, S. (2013). Immunoinflammatory Response in Critically Ill Patients : Severe Sepsis and / or Trauma, 2013.

- Swisher, S. L., Lin, M. C., Liao, A., Leeflang, E. J., Khan, Y., Pavinatto, F. J., ... Maharbiz, M. M. (2015). Impedance sensing device enables early detection of pressure ulcers in vivo. *Nature Communications*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7575>
- Taghavi, S., & Askari, R. (2021). Hypovolemic Shock. Treasure Island (FL).
- Taher, A., Shokoohmand, F., Abdoli, E., Mohammadi, Y., & Mehrpooya, M. (2021). A pilot study on the melatonin treatment in patients with early septic shock: results of a single-center randomized controlled trial. *Irish Journal of Medical Science*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02758-1>
- Takhtfooladi, H., Takhtfooladi, M., Moayer, F., & Mobarakeh, S. (2015). Melatonin attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 21(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2014.01.010>
- Taylor, C. T., Dzus, A. L., & Colgan, S. P. (1998). Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology*, 114(4), 657–668. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70579-7](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70579-7)
- Teng, J., Xiang, L., Long, H., Gao, C., Lei, L., & Zhang, Y. (2021). The Serum Citrulline and D-Lactate are Associated with Gastrointestinal Dysfunction and Failure in Critically Ill Patients. *International Journal of General Medicine*, 14, 4125–4134. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S305209>
- Tsukamoto, T., Chanthaphavong, R. S., & Pape, H.-C. (2010). Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury*, 41(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2009.07.010>
- van Hoeij, F. B., Weijenberg, P. W., van den Bergh Weerman, M. A., van den Wijngaard, R. M. J. G. J., Verheij, J., Smout, A. J. P. M., & Bredenoord, A. J. (2016). Mucosal integrity and sensitivity to acid in the proximal esophagus in patients with gastroesophageal reflux disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(1), G117-22. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00134.2016>
- Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J., & Vandenabeele, P. (2015). Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(4), e975093. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.975093>
- Vanlangenakker, N., Berghe, T., Krysko, D., Festjens, N., & Vandenabeele, P. (2008). Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Current Molecular Medicine*, 8(3), 207–220. <https://doi.org/10.2174/156652408784221306>
- Vilar, A., de Lemos, L., Patraca, I., Martínez, N., Folch, J., Junyent, F., ... Camins, A. (2014). Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition. *Free Radic Res*, 48(2), 119–128. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.845295>
- Villegas, I., Martin, A. R., Toma, W., & de la Lastra, C. A. (2004). Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *European Journal of Pharmacology*, 505(1–3), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.10.020>
- Wacker, D. A., & Winters, M. E. (2014). Shock. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(4), 747–758. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.07.003>
- Wadal, K., Kamisakil, Y., Kitano~, M., Kishimoto, Y., Nakamotol, K., Itoh, T., & Wada K.,

- Kamisaki Y., Kitano M., Kishimoto Y., Nakamoto K., Itoh T., Itoh A. (1996). A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: Role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sciences*, 59(19), 295–301. Retrieved from http://www.bidi.uam.mx:4855/0024320596005000/1-s2.0-0024320596005000-main.pdf?_tid=1fcaa852-5785-11e7-8969-00000aab0f26&acdnat=1498161673_043cbd70996a8ee9be3457444f1f7e0b
- Wang, M., Deng, J., Lai, H., Lai, Y., Meng, G., Wang, Z., ... Jiang, H. (2020). Vagus Nerve Stimulation Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury through Inhibiting NF- κ B Activation and iNOS Protein Expression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 7106525. <https://doi.org/10.1155/2020/7106525>
- Warners, M. J., Vlieg-Boerstra, B. J., Verheij, J., van Hamersveld, P. H. P., van Rhijn, B. D., Van Ampting, M. T. J., ... Bredenoord, A. J. (2017). Esophageal and Small Intestinal Mucosal Integrity in Eosinophilic Esophagitis and Response to an Elemental Diet. *Am J Gastroenterol*, 112(7), 1061–1071. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.107>
- Watson, A. J., & Hughes, K. R. (2012). TNF-alpha-induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*, 1258, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06523.x>
- Wei, D., Xiong, X., & Zhao, H. (2015). Tim-3 cell signaling and iNOS are involved in the protective effects of ischemic postconditioning against focal ischemia in rats. *Metab Brain Dis*, 30(2), 483–490. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9543-2>
- Weijenborg, P. W., Smout, A. J. P. M., & Bredenoord, A. J. (2016). Esophageal acid sensitivity and mucosal integrity in patients with functional heartburn. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 28(11), 1649–1654. <https://doi.org/10.1111/nmo.12864>
- Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., ... Li, C. J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*, 46(4), 1650–1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Xu, J., He, L., Ahmed, S. H., Chen, S. W., Goldberg, M. P., Beckman, J. S., & Hsu, C. Y. (2000). Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke*, 31(7), 1744–1751. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.7.1744>
- Yi, L., Lingshan, G., Cui, Y., Xiaoxing, Y., & Junnian, Z. (2012). A preliminary study on protective effect of L-citrulline against ischemia-reperfusion induced gastric mucosal lesions in rat. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(1), 31–35. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.91863>
- Yu, X., Deng, L., Wang, D., Li, N., Chen, X., Cheng, X., ... Liao, Y. (2012). Mechanism of TNF-alpha autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1alpha, presented by exosomes. *J Mol Cell Cardiol*, 53(6), 848–857. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.10.002>
- Yu, X., Ge, L., Niu, L., Lian, X., Ma, H., & Pang, L. (2018). The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/8364848>
- Yun, J., Kim, H. W., Park, Y., Cha, J.-J., Lee, J. Z., Shin, D. G., & Lee, J.-H. (2016). Micro electrical impedance spectroscopy on a needle for ex vivo discrimination between human normal and cancer renal tissues. *Biomicrofluidics*, 10(3), 34109.

<https://doi.org/10.1063/1.4951702>

- Zhai, M., Li, B., Duan, W., Jing, L., Zhang, B., Zhang, M., ... Yu, S. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 63(2). <https://doi.org/10.1111/jpi.12419>
- Zhang, L., Gong, J. T., Zhang, H. Q., Song, Q. H., Xu, G. H., Cai, L., ... Zhang, H. W. (2015). Melatonin attenuates noise stress-induced gastrointestinal motility disorder and gastric stress ulcer: Role of gastrointestinal hormones and oxidative stress in rats. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 21(2), 189–199. <https://doi.org/10.5056/jnm14119>
- Zhang Y., Wei E., Hu X., Qiao W., Shi Y., Xu M., Z. J. (2008). The role of nuclear factor-kB in the effect of angiotensin II in the paraventricular nucleus in protecting the gastric mucosa from ischemia - reperfusion injury in rats. *Journal of Gastroenterology*, 43(9), 687–698. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00535-008-2217-2.pdf>
- Zhao, Z., Lu, C., Li, T., Wang, W., Ye, W., Zeng, R., ... Liu, C. (2018). The protective effect of melatonin on brain ischemia and reperfusion in rats and humans: In vivo assessment and a randomized controlled trial. *Journal of Pineal Research*, 65(4), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jpi.12521>
- Zhu, F., & Levin, N. W. (2015). Estimation of body composition and normal fluid status using a calf bioimpedance technique. *Blood Purification*, 39(1–3), 25–31. <https://doi.org/10.1159/000368937>