

# Valoración del malon-dialdehído mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico, en pared intestinal de ratas controles y sometidas a isquemia-reperfusión mesentérica. Efecto de la superóxido dismutasa endovenosa

J. Carnés Sánchez<sup>1</sup>, P. Moratinos Palomero<sup>2</sup>, C. Gutierrez Ortega<sup>3</sup>, A. Aguilera Martínez<sup>4</sup>, J.F. Guijarro Escribano<sup>5</sup>

*Med Mil (Esp) 1999; 55 (2): 72-75*

## RESUMEN

**Antecedentes y objetivos.** Valorar el malon-dialdehído (MDA), catabolito de la peroxidación lipídica de las membranas celulares, mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA), para comprobar el posible aumento de la actividad oxidante de radicales libres de oxígeno, a nivel del intestino delgado de rata, sometida a isquemia-reperfusión mesentérica y el efecto protector de la superóxido dismutasa (SOD). **Material y método.** Se distribuyeron 30 ratas machos, de 240 a 300 g de peso, en tres series: serie I, control no isquémica, sirvió para toma de muestras tisulares basales; serie II, isquemia mesentérica aguda (IMA) de 90 minutos y 30 minutos de perfusión, más solución salina endovenosa; serie III, todo igual que la serie II, salvo que al suero fisiológico se añadió SOD. Tras la anestesia se practicó laparotomía accediendo a la cavidad abdominal, fijando la arteria mesentérica craneal (AMC) mediante cinta de *vessloop*, que se clampó el tiempo señalado. En las series II y III se procedió a la inyección endovenosa con microinyector, de suero fisiológico a razón de 0,002 ml por gramo de peso corporal y en la serie III, se añadieron 2 U.I. de SOD por gramo de peso corporal. La velocidad de inyección fue de 1ml/10 min. Se realizaron dos tandas de tratamiento, una 10 minutos antes y otra 10 minutos después de la perfusión. Transcurridos los 30 min de perfusión en las series II y III, se procedió a tomar muestras de pared intestinal de la porción yeyunal media, (50 mg de tejido) a los animales de las tres series. Dichas muestras fueron sometidas al test del TBA, según método de Ohkawa *et al.* Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS® v. 6.0 para Windows, así como la hoja de cálculo Excel 5.0 para Windows. Se realizó test de Sahapiro-Wilks, y se calculó la mediana, la media aritmética, y la distancia intercuartil como medida de dispersión. La representación de resultados se hizo mediante diagrama de *boxplot*. **Resultados y conclusiones.** 1.º Las concentraciones de MDA libre en yeyuno en condiciones fisiológicas basales, son indetectables cuando se determinan mediante el test del TBA. 2.º La isquemia de la AMC durante 90 min seguida de 30 min de perfusión, produce un aumento significativo del MDA en la pared yeyunal. 3.º El tratamiento endovenoso con SOD redujo a límites de normalidad la concentración de MDA, que se hizo indetectable. 4.º La valoración del MDA, catabolito final de la peroxidación lipídica, puede ser útil como índice de la actividad oxidante de los radicales libres de oxígeno, y antioxidante, mediante el test del TBA en casos de isquemia-reperfusión aguda intestinal y tratamiento con SOD, si bien el método no detectó concentraciones de MDA cuya lectura espectroscópica en absorbancias fuera menor o igual al cociente  $a=0,1558$  de la ecuación de la recta de regresión patrón.

**PALABRAS CLAVE:** Isquemia-reperfusión mesentérica - Malon-dialdehído - Ácido tiobarbitúrico - Superóxido dismutasa.

## INTRODUCCIÓN

Los procesos de isquemia-reperfusión provocan un incremento en la formación de radicales libres (RL), especialmente de radicales libres de oxígeno (RLO), (1-4) agentes muy reactivos directamente relacionados con la iniciación de los procesos de peroxidación lipídica de las membranas celulares, cuyo catabolismo rinde al medio malón dialdehído (MDA) (5, 6).

El MDA es el producto final y se acumula en los tejidos, tras el catabolismo de los ácidos grasos constitutivos de las membra-

nas celulares. La concentración de MDA tisular puede ser cuantificada por técnicas *in vitro*, mediante la reacción colorimétrica con el ácido tiobarbitúrico (TBA), medible por espectrofotometría (7).

Se conocen gran cantidad de sustancias antioxidantes, que impiden o atenúan la acción de los RLO que puedan generarse, contribuyendo a frenar el deterioro oxidativo que producen en las membranas celulares llegando hasta su delección. Entre los antioxidantes, la superóxido dismutasa (SOD), ocupa un papel relevante por su intenso efecto protector en condiciones fisiológicas (8-10) y estar presente en la mayor parte de los tejidos humanos, en las células y líquidos extracelulares (8).

Este trabajo tiene por objeto cuantificar los niveles de MDA libre en tejido intestinal sano, y en el sometido a isquemia-reperfusión, así como en animales tratados con SOD endovenoso, para valorar la influencia de la isquemia-reperfusión sobre la peroxidación lipídica de las membranas celulares y si la SOD es capaz de atenuar estos efectos, en nuestras condiciones experimentales.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 30 ratas machos variedad Wistar, con pesos comprendidos entre 240 y 300 gramos, procedentes del estabula-

<sup>1</sup> Ldo. en Ciencias Biológicas. Servicio de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital Militar Gómez Ulla.

<sup>2</sup> Doctor en Medicina. Tcol. San. Med. Anatómo-patólogo. Servicio de Anatomía Patológica.

<sup>3</sup> Ldo. en Ciencias Biológicas. Servicio de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital Militar Gómez Ulla.

<sup>4</sup> Ldo. en Veterinaria. Tcol. San. Vet. Veterinario. Servicio de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital Militar Gómez Ulla.

<sup>5</sup> Doctor en Medicina. Tcol. San. Med. Cirujano vascular. Servicio de Cirugía Vascular. Hospital Militar Gómez Ulla.

**Dirección para la correspondencia:** Dr. Patrocinio Moratinos Palomero. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Militar Gómez Ulla. Glorieta del Ejército, s/n. 28047 Madrid.

Recibido: 11 de noviembre de 1998

Aceptado: 8 de mayo de 1999

## Isquemia mesentérica experimental

rio del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar Gómez Ulla. Los animales se mantuvieron en jaulas de macrolón, con base de sepiolita, a razón de cinco por jaula, en condiciones estándar de laboratorio a 22° C y fotoperiodo de 12 horas, con alimentación y bebida *ad libitum*. Cumpliendo la normativa vigente de la Unión Europea, sobre alojamiento y cuidados de los animales destinados a experimentación (86/609/CEE).

Fueron distribuidos en tres series experimentales de 10 animales:

Serie I: control no fue sometida a isquemia sirvió para realizar las tomas tisulares basales. Serie II: isquemia mesentérica de 90 minutos, reperfusión de 30 minutos y tratamiento con solución salina más SOD. Serie III: igual que serie II, sin SOD.

Los animales de las series II y III fueron sometidos a procedimiento quirúrgico, tras inducción anestésica mediante inyección intramuscular de cóctel anestésico (50% de clorhidrato de ketamina (50 mg/ml), 40% de diazepam (5 mg/ml), y 10% de sulfato de atropina (1mg/ml) en proporción de 0,03 ml/g de peso corporal. Por laparotomía media, se controló la arteria mesentérica craneal (AMC) con cinta de vesselloop ocluyéndola con microclamp atraumático modelo Heifezt, durante 90 minutos. Después fueron sometidos a reperfusión durante 30 minutos. (11-12)

En la series II y III se procedió a la inyección endovenosa por vía yugular con microinyector Meditronika® modelo A-99 y sistema Butterfly-23 de 0,4 mm de diámetro externo, modelo Venisystemn®, de suero fisiológico a razón de 0,002 ml por gramo de peso (entre 0,48 y 0,6 ml), agregando en la serie III 2 U.I. de SOD por gramo de peso del animal (entre 480 y 600 U.I.). La velocidad de inyección fue de 1 ml/10 min. Se realizaron dos tandas de tratamiento, una 10 minutos antes y otra 10 minutos después de la reperfusión.

La SOD empleada, fue de eritrocitos bovinos de la marca SIGMA® S-2515. SIGMA CHEMICAL CO. P.O. Box 14508- St. Louis. MO63178 USA.

Transcurridos los 30 min de reperfusión de las series II y III, se procedió a tomar muestras de pared intestinal de la porción yeyunal media, (50 mg de tejido) en los animales de las tres series, que fueron sometidas al test del TBA, según método de Ohkawa *et al* (13).

Por cada 50 mg de tejido de pared intestinal correspondiente a porción yeyunal media, pesados mediante balanza automática electrónica modelo Mini-sc Mobba, se agrega 1 ml de tampón-fosfato pH 7 macerando en Teen-Broke (teniendo el homogeneizador de vidrio a -20° C), hasta homogeneizar la mezcla que se centrifuga a 5.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos a temperaturas entre 0 y 5° C. Se toman 140 microlitros del sobrenadante en un tubo de ensayo y se agrega 1 ml de ácido fosfórico al 1%, con el fin de detener la producción de RL, 33 microlitros de butil-hidroxi-tolueno (BHT) (diluido al 0,01% en alcohol etílico), para impedir la neoformación de RL, y 0,6 ml de TBA al 0,6% (diluido en agua destilada), como reactivo de color frente al MDA, sometiendo la mezcla a ebullición con agitación suave, durante 45 min., apareciendo una tonalidad rosada. Se enfría en baño con hielo y se agrega 1,4 ml de n-butanol para disolver la fase orgánica, agitando el tubo y centrifugando a 4.000 rpm durante 15 min. a una temperatura entre 0 y 5° C. Del sobrenadante o fase orgánica, se toma muestra para su lectura espectroscópica en la banda de 535 nanómetros de longitud de onda.

Obtención de los valores estándar: se preparó una solución madre de MDA a concentración de 706 nM/ml. Esta solución se diluyó 1/10 en tampón fosfato pH 7, quedando la nueva solución a concentración de 70,6 nM MDA/ml, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:1 según el esquema:

Tubo 1 (0,14 de muestra + 0,86ml de tampón fosfato):  
9,88 nM MDA/ tubo

Tubo 2 (1ml de tubo 1 + 1ml de tampón fosfato):  
4,94 nM MDA/tubo

Tubo 3 (1ml de tubo 2 + 1ml de tampón fosfato):  
2,47 nM MDA/tubo

Tubo 4 (1ml de tubo 3 + 1ml de tampón fosfato):  
1,24 nM MDA/tubo

Tubo 5 (1ml de tubo 4 + 1ml de tampón fosfato):  
0,62 nM MDA/tubo

Tubo 6 (1ml de tubo 5 + 1ml de tampón fosfato):  
0,31 nM MDA/tubo

Tubo 7 (1ml de tubo 6 + 1ml de tampón fosfato):  
0,15 nM MDA/tubo

Tubo 8 (1ml de tubo 7 + 1ml de tampón fosfato):  
0,077 nM MDA/tubo

Tras haber realizado las diluciones se procedió con cada tubo, de modo similar que las muestras de yeyuno, siguiendo todo el procedimiento desde la agregación del ácido fosfórico, hasta el final, manteniendo las condiciones señaladas.

Para el cálculo de la recta patrón se realizó la recta de regresión, tomando como resultado válido un coeficiente de correlación R igual o mayor a 0,95 (lo que indica que el 95% de los puntos se encuentran dentro de la correlación lineal), calculando tanto la ordenada en el origen como la pendiente de la recta, así como el grado de correlación entre los puntos.

Para el análisis estadístico de resultados se utilizó el programa SPSS v. 6.0. para Windows, así como la hoja de cálculo Excel 5.0 para Windows. Se valoró el supuesto de normalidad con el test de Shapiro-Wilks. Se calculó la mediana y la media aritmética. Como medida de dispersión se tomó la distancia intercuartil (IQR). La cuantificación de los resultados se representó mediante diagrama de *boxplot*.

## RESULTADOS

### a) Curva patrón

Se obtuvo una recta de regresión lineal, en la cual, en el eje de las Y, se representaron las absorbancias y en el eje de las X la concentración de MDA en nanomoles. Cada punto representado en la figura 1 corresponde a la densidad óptica (Absorbancia a

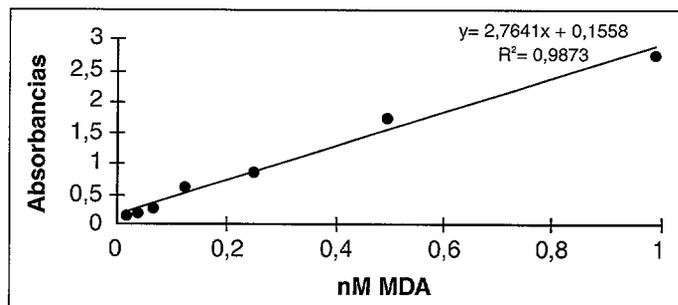


Figura 1. Recta patrón.

535 nm) obtenida para cada concentración de MDA. A partir de estos puntos se construyó la recta de regresión definiendo, mediante el coeficiente de correlación, el grado que dicha recta representa a la mencionada nube de puntos (grado de asociación lineal). En la misma figura se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación lineal, cuyo valor  $R^2$  igual a 0,987, significa que el 98,7% de la variación total de las absorbancias es explicado por la recta de regresión, aceptándose como válida.

**b) Determinación de MDA en intestino**

Las concentraciones de MDA en las tres series, se valoraron mediante la técnica *in vitro* del test del TBA. Tras conocer la densidad óptica de cada muestra sometida al test del TBA, se calcularon las concentraciones de MDA a través de la ecuación de la recta patrón, efectuando las correcciones debidas a las diluciones en la técnica.

**c) Cálculos**

La relación existente entre los valores de las absorbancias y la concentración de MDA en nM viene definida por la fórmula:  $nM\ MDA/g\ de\ tejido = (DO_{535nm} - a)/b \times ml\ tampón\ fosfato/mg\ de\ tejido \times 1/0,14 \times 1000$ , siendo los resultados de valores:

- $DO_{535nm}$ , el valor de cada una de las absorbancias, obtenidas de la lectura del espectrofotómetro.
- $a$ , el valor del punto de la ordenada en el origen. En la recta,  $a = 0,1558$ .
- $b$ , el valor de la pendiente de la recta. En la recta,  $b = 2,764$ .

**d) Matriz de datos**

Los resultados obtenidos de cada una de las muestras y tras aplicar la fórmula expresada, aparecen representados en la tabla 1.

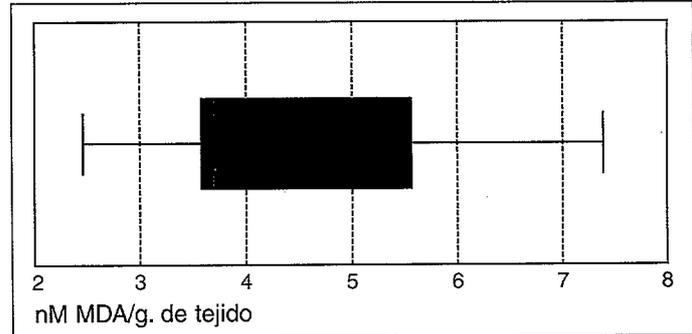
Mediante esta técnica no se pueden determinar las concentraciones de MDA cuya lectura en absorbancias sea menor o igual al coeficiente  $a$  de la ecuación de la recta de regresión ( $a=0,1558$ ), de manera que las concentraciones de MDA en los animales de la serie I—control— y en la II (tratados con SOD) fueron indetectables.

Los resultados obtenidos no vulneran el supuesto de normalidad (test de Shapiro-Wilks  $p = 0,43$ ). Sin embargo se aprecia en el diagrama de boxplot una cierta asimetría, con una mediana de 4,15 nM MDA/g de tejido, cuando a la media aritmética de los datos corresponde a 4,513 nM MDA/g de tejido (figura 2).

**Tabla 1.** Valores de las absorbancias y concentración de MDA por gramo de tejido, para cada uno de los grupos de la muestra.

CONTROL		I/R + SOD		I/R	
Absorbancia	nM MDA	Absorbancia	nM MDA	Absorbancia	nM MDA
0,011	Indetectable	0,043	Indetectable	0,207	2,646
0,066	Indetectable	0,027	Indetectable	0,290	6,936
0,026	Indetectable	0,085	Indetectable	0,234	4,042
0,097	Indetectable	0,065	Indetectable	0,263	5,541
0,037	Indetectable	0,048	Indetectable	0,237	4,197
0,071	Indetectable	0,080	Indetectable	0,203	2,439
0,082	Indetectable	0,036	Indetectable	0,298	7,350
0,049	Indetectable	0,121	Indetectable	0,225	3,577
0,015	Indetectable	0,089	Indetectable	0,232	3,938
0,044	Indetectable	0,047	Indetectable	0,243	4,507

Dado el número de casos empleados, y la asimetría que presenta la distribución de datos, es más adecuado el empleo de la distancia intercuartil (IQR) como medida de dispersión, que corresponde en el presente experimento, al intervalo comprendido entre los 3,571 y los 5,535 nM MDA/g de tejido. En este rango se encuentra representado el 50% de los datos, mientras que el resto oscila fuera de este intervalo, con un mínimo de 2,44 nM MDA /g. de tejido y un máximo de 7,35 nM MDA/ g de tejido (fig. 2).



**Figura 2.** Representación mediante diagrama boxplot del valor de la mediana para la concentración de MDA, en la serie experimental de isquemia-reperfusion.

**DISCUSIÓN**

La mucosa intestinal, y particularmente la del intestino delgado, es especialmente sensible a las lesiones producidas por la privación de oxígeno (14-15), pero es durante la revascularización cuando parece que se producen los mayores daños sobre las células del epitelio (16). Con la llegada de sangre oxigenada a los tejidos anóxicos se produce una explosión en la formación de RL, que atacan directamente los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de las membranas celulares, formándose endoperóxidos lipídicos, capaces de volver a reaccionar con una nueva molécula de ácido graso de la membrana y repetir el ciclo, o bien metabolizarse para dar lugar a la formación del (MDA) (17). Este proceso de peroxidación lipídica de las membranas celulares, provoca serias alteraciones en la estructura y en la funcionalidad de las células afectadas (18).

En el modelo experimental presentado se somete a los animales de la serie III a un período de isquemia constante de 90 minutos y después a 30 minutos de reperfusion, a fin de producir un microambiente similar al que ocurre en cuadros clínicos de isquemia tisular, encontrando un valor medio de 4,5 nM de MDA por gramo de tejido, contenido entre los valores del IQR, comprendidos entre 2,44 y 7,35 nM de MDA por g de tejido. Es de señalar que los resultados obtenidos cumplieron el supuesto de normalidad, realizado mediante el test de Shapiro-Wilks, indicando una distribución homogénea de los valores obtenidos, lo que se traduce en una respuesta muy similar de todos los animales ante un episodio de isquemia-reperfusion. En los animales de la serie I o control, a los que únicamente se tomaron muestras, a fin de establecer los valores normales, la cantidad de MDA libre en yeyuno fue indetectable, o lo que es lo mismo, existía un valor inapreciable de MDA en tejidos sanos. Esto apoya la hipótesis de un incremento significativo de la peroxidación lipídica y de la

destrucción celular tras isquemia-reperusión. Estos resultados coinciden con los de otros autores, así Horton *et al.* encontraron aumento de la concentración de MDA en el plasma de tejido isquémico intestinal, determinado mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con respecto a un grupo sham (19). Van Ye *et al.*, demostraron un incremento significativo del MDA libre en intestino con tan solo 10 minutos de isquemia y 60 minutos de reperusión (20).

Numerosos estudios han evaluado favorablemente el papel de las enzimas antioxidantes, entre las que cabe destacar la SOD, como protectoras de la mucosa intestinal durante los cuadros de isquemia reperusión (21-23). La SOD produce la reducción del radical superóxido, eliminándolo del medio e inhibiendo los procesos lesivos a las células por el mecanismo:  $2 O_2$  (superóxidos)  $+ 2H^+ H_2O_2 + O_2$  (1, 3, 5, 6, 9, 22).

Otamiri comparando dos series de ratas sometidas a isquemia-reperusión intestinal, encontró una reducción significativa de los niveles de MDA en la serie tratada con SOD con respecto a la serie isquémica (24). Estos resultados son coincidentes con los del presente trabajo. Hemos observado reducción de los niveles de MDA tras el tratamiento de los animales con SOD, alcanzando valores inapreciables, como los obtenidos en animales control sin tratamiento experimental, indicativos de una disminución de la destrucción de membranas.

Si bien el MDA libre en tejidos es un metabolito secundario de los RL, su cuantificación mediante la reacción colorimétrica del test del TBA, podría ser considerado como indicador fiable del nivel de actividad de los RL sobre las membranas celulares, ofreciendo una aproximación veraz al proceso de peroxidación lipídica en situaciones de isquemia-reperusión. La SOD pudiera ser considerada como un agente terapéutico interesante en la reducción de las lesiones microscópicas y funcionales que produce la peroxidación lipídica.

Consideramos que, aunque muy probablemente, la elevada mortalidad que en la actualidad sigue acompañando a muchos procesos isquémicos agudos, y en especial al infarto intestinal, tiene su origen en una suma de reacciones adversas que el proceso provoca y que pueden conducir a muerte por shock sistémico, es importante tener en cuenta los efectos degradativos de la destrucción de las membranas. Además, el MDA actúa como un agente agravante de las lesiones, puesto que su presencia en estado libre en el tejido y en concentraciones importantes, provocaría una disminución de la deformabilidad de los eritrocitos e incrementa la viscosidad de la sangre, con el posible riesgo de generación de microtrombos a nivel capilar, que obstaculizan la correcta reentrada de sangre (1-8).

### CONCLUSIONES

- 1.º Las concentraciones de MDA libre en yeyuno en condiciones fisiológicas normales, son insignificantes cuando se determinan mediante el test del TBA.
- 2.º La isquemia de la AMC durante 90 min seguida de 30 min de reperusión, produce un aumento significativo del MDA en la pared yeyunal.
- 3.º El tratamiento endovenoso con SOD redujo a límites de normalidad la concentración de MDA, que se hizo indetectable.

- 4.º La valoración del MDA como catabolito final de la peroxidación lipídica, puede ser útil como índice de la actividad oxidante de los radicales libres de oxígeno, y antioxidante, mediante el test del TBA en casos de isquemia-reperusión aguda intestinal y tratamiento con SOD.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Moratino P, Guijarro FJ. Los nuevos conceptos sobre los radicales libres y su interés en la medicina actual (1.ª parte). *Med Mil (Esp)* 1994; 50 (2): 145-158.
2. Grace P. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 737-647.
3. Rodríguez J, Granero J, Martínez E. Reperusión intestinal: Fundamentos fisiopatológicos de sus perspectivas terapéuticas. *Rev Esp Enf Digest* 1997; 89 (1): 39-45.
4. Zimmerman B, Granger N. Reperfusion injury. *Surg Clin N Am* 1992; 72 (1): 65-83.
5. Slaters T. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222: 1-15.
6. Moratino P, Guijarro FJ. Los nuevos conceptos sobre los radicales libres y su interés en la medicina actual (2.ª parte). *Med Mil (Esp)* 1994; 50 (2): 274-291.
7. Halliwell B, Gutteridge C. Free radicals in Biology and Medicine 1995. 2.ª Ed. Oxford: Clarendon Press.
8. Marklund S. Superoxide dismutase in human Tissues, cells and extracellular fluids: Clinical implications. *Free Rad Aging Clin Dis* 1986: 509-526.
9. Greenwald R. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. *Free Rad Biol Med* 1990; 8:201-209.
10. Pardo J, Martín de Miguel JM, Fuentes M, Moratino P, Menéndez del Campo JA. Compuestos radioprotectores: estado actual del problema. *Oncología* 1990; 13 (8): 376-384.
11. Guijarro JF, Moratino P, Aguilera A. Perfil de la supervivencia durante diferentes tiempos de isquemia aguda mesentérica: estudio experimental. *Cir Esp* 1995; 6: 493-496.
12. Carnés J, Moratino P, Gutiérrez C, Aguilera M, Guijarro F. Curva de supervivencia en el síndrome de isquemia-reperusión de la arteria mesentérica craneal: estudio experimental en ratas. *Med Mil (Esp)* 1997; 53 (3): 211-215.
13. Ohkawa H, Oshishi N, Yago K. Assay for lipids peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
14. Robinson J, Mirkovitch V, Winistörfer B, Saegesser F. Response of the intestinal mucosa to ischaemia. *Gut* 1981; 22: 512-527.
15. Guijarro F, Moratino P, Montero J, Gomis M, Portellano P, Alguacil R. Radicales libres en la isquemia intestinal. *Rev ACAD* 1996; XII (1): 11-18.
16. Nilsson U, Schoenberg M, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger H, Lundgren O. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106: 629-636.
17. Rodríguez J, Granero J, Martínez E. Reperusión intestinal: Fundamentos fisiopatológicos de sus perspectivas terapéuticas. *Rev Esp Enf Digest* 1997; 89 (1): 39-45.
18. Grace P. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-647.
19. Horton H, Walker P. Oxygen radicals, lipid peroxidation and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74 (4): 1515-1520.
20. Van Ye T, Roza A, Pieper G, Henderson J, Johnson C, Adams M. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res* 1993; 55: 555-558.
21. Dalsing M, Grosfeld J, Shiffler M, Vane D, Hull M, Baehner R, Webbe T. Superoxide dismutase: A cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res* 1983; 34: 589.
22. Rousseau P, Armstrong M. Superoxides dismutases- Production and therapeutic potential. *Pharm Tech Eur* 1996; 8 (9): 24-28.
23. Vohra K, Rosenfeld W, Singh I, Anderson V. Ischemic injury to newborn rabbit ileum: protective role of human superoxide dismutase. *J Pediatr Surg* 1989; 24 (9): 893-898.
24. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surg* 1989; 105: 593-597.