



Trabajo Fin de Grado Grado en Medicina

Evaluación del daño por isquemia-reperfusión mesentérica en un modelo experimental murino

Autor:

Carlos Acebal Montero

Director:

Borja Herrero de la Parte

Leioa, 27 de Marzo de 2017

Incluir como primera página de la memoria del TFG

INFORME FINAL DEL DIRECTOR DEL TFG

Evaluación del daño por isquemia-reperfusión mesentérica en un modelo experimental murino

Autor:

Carlos Acebal Montero

Director:

Borja Herrero de la Parte

Calificación:

En número (0-10)	10
En letra	Diez

Consideraciones y valoraciones del Director:

El alumno ha participado en la medida de las posibilidades que marca la legislación vigente sobre el uso de animales en experimentación.

Los experimentos han sido realizados en el Departamento de Cirugía por personal cualificado para ello, pero los posteriores análisis de las muestras obtenidas y los resultados derivados de ellas los ha llevado a cabo el alumno tras una sesión formativa previa.

La Memoria elaborada por el alumno sobre los experimentos realizados se ha llevado a cabo con la profundidad requerida, siguiendo adecuadamente las indicaciones recibidas y proponiendo alternativas o soluciones ante las dificultades encontradas en algún momento.

Ha demostrado un alto grado de madurez a la hora de sistematizar el trabajo, demostrando un elevado grado de aprovechamiento.

El tiempo dedicado al mismo excede con mucho los 6 Cr requeridos.

Lugar y fecha: En Leioa, a trece de marzo de 2017



Fdo.: Borja Herrero de la Parte
Director del TFG

TRABAJO FIN DE GRADO
AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UPV/EHU
(ADDI)

Título del TFG:

1. ALUMNO

<u>Nombre y Apellidos:</u>	<u>DNI :</u>
<u>Grado:</u>	<u>Curso Académico:</u>

2. DIRECTOR DEL TFG

<u>Nombre Apellidos:</u>
<u>Departamento:</u>

Los abajo firmantes:

NO AUTORIZAN

BAUTORIZAN

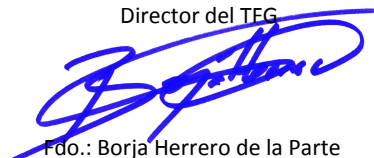
El depósito de este TFG en el Repositorio Institucional de la Universidad (ADDI) para ser consultado en **ACCESO ABIERTO**, en la modalidad siguiente:

Nota: Solo se publicarán los TFG que hayan superado la nota de corte establecida por el Centro.

(marca con una X la modalidad elegida)

1	Con todos los derechos reservados
2	Con la licencia Creative Commons
	Reconocimiento (cc by)
	Reconocimiento – Compartirlgual (cc by-sa)
	Reconocimiento-SinObraDerivada (cc by-nd)
	Reconocimiento-NoComercial (cc by-nc)
	Reconocimiento-NoComercial-Compartirlgual (cc by-nc-sa)
	Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada (cc by-nc-nd)
Mas información: http://es.creativecommons.org/blog/licencias/	

En Leioa, a 27 de Marzo de 2017

Estudiante  Fdo.: Carlos Acebal Montero	Director del TFG  Fdo.: Borja Herrero de la Parte
--	---

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANATOMIA	2
1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO LOCAL POR ISQUEMIA	3
1.3. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO LOCAL POR EL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	3
1.4. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO SISTÉMICO	6
1.5. TRATAMIENTO	6
1.6. ÁCIDO FÓLICO	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. ANIMALES UTILIZADOS	9
3.2. GRUPOS EXPERIMENTALES	9
3.3. INDUCCIÓN DE NEUTROPENIA	10
3.4. PROTOCOLO ANESTÉSICO	10
3.5. INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE LA ISQUEMIA	11
3.6. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	12
3.7. TOMA DE MUESTRAS Y EUTANASIA	13
3.8. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS	13
3.9. RECUENTO LEUCOCITARIO	14
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	15
4. RESULTADOS	17
4.1. RECUENTO LEUCOCITARIO	17
4.2. GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA	18
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23

1. INTRODUCCIÓN

La isquemia intestinal o mesentérica (IM) es un estado en el que el aporte sanguíneo del territorio mesentérico no es suficiente para cubrir las necesidades de éste. Su prevalencia ha ido aumentando con el envejecimiento de la población hasta representar actualmente 1 de cada 1000 ingresos hospitalarios, el 1-2% de los ingresos por dolor abdominal (1).

La IM se subdivide en 3 formas clínicas: isquemia mesentérica aguda (IMA), isquemia mesentérica crónica (IMC) y colitis isquémica (CI).

La IMA es consecuencia del déficit en el aporte sanguíneo procedente de la arteria mesentérica superior (AMS), afectando por ello al intestino delgado y al hemicolon derecho. Aproximadamente supone un 30% de los cuadros de IM, con elevadas tasas de mortalidad, en torno al 70% (2). La IMA puede ser de origen arterial o de origen venoso. Dentro de la IMA de origen arterial destaca la embolia de la arteria mesentérica superior (EAMS), la cual representa el 40-50% de los casos de IMA de origen arterial. En menor medida también la trombosis de la arteria mesentérica superior (TAMS) (3), la isquemia mesentérica no oclusiva (IMNO) (4) o la isquemia focal segmentaria (IFSA). En cuanto a la IMA de origen venosos destaca la trombosis venosa mesentérica (TVM) con sus 3 variantes (aguda, subaguda y crónica), si bien sólo la forma aguda de TVM presenta manifestaciones clínicas correspondientes con una IMA y representa el 10-15% de los casos (5) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Formas clínicas de IMA de origen arterial y venoso y su prevalencia.

Subtipo de IMA	Prevalencia
Embolia de la AMS	40-50%
Trombosis de la AMS	20-30%
Isquemia mesentérica no oclusiva	10-20%
Trombosis venosa mesentérica	10%
Isquemia focal segmentaria	5%

La IMC cursa con un déficit en el riego sanguíneo durante el proceso de digestión lo que provoca un desequilibrio entre la demanda y el aporte de O_2 . Supone menos del 5% de los ingresos por IM (2).

La tercera forma clínica de IM, la CI, supone la forma mas frecuente de las tres con un 70% de los casos de IM. En estas situaciones ocurren fenómenos de oclusión o hipoperfusión en el colon que, dependiendo del calibre e importancia del vaso ocluido puede, incluso, conducir a un estado de necrosis gangrenosa si se ven obstruidos vaso de mayor calibre, teniendo una afectación transmural (6).

1.1. ANATOMIA

En su mayoría, el aporte sanguíneo del intestino (**Figura 1**) procede de tres grandes vasos arteriales que nacen de la aorta abdominal (AO): el tronco celíaco (TC), la arteria mesentérica superior (AMS) y la arteria mesentérica inferior (AMI)

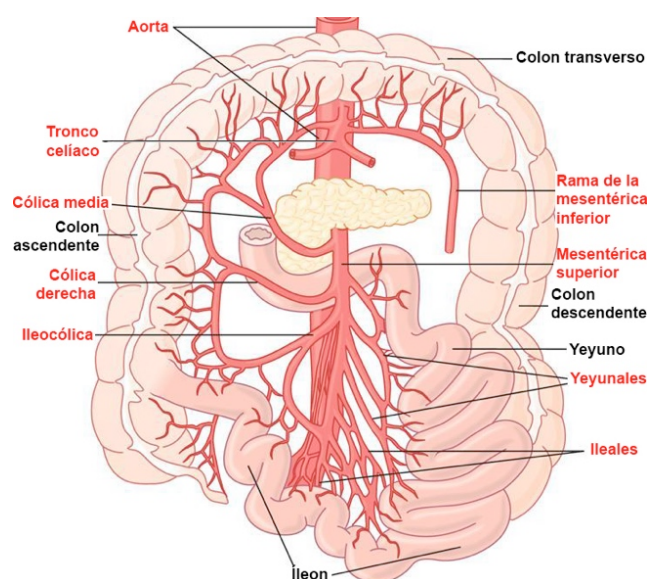


Figura 1. Representación esquemática de las principales arterias que irrigan el territorio intestinal (rojo).

El TC, incluyendo la arteria esplénica (AE), la arteria gástrica derecha (AGD) y la arteria hepática común (AHC), que suministra flujo sanguíneo hasta la segunda porción del duodeno; la AMS irriga desde la segunda porción del duodeno hasta la porción distal del colon transverso o hemicolon derecho; y, finalmente, la AMI que permite el aporte sanguíneo del colon descendente hasta el recto (7).

1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO LOCAL POR ISQUEMIA

El flujo sanguíneo, la concentración y saturación de la hemoglobina (Hb), la distribución de la sangre en la pared intestinal, la relación entre las necesidades y el aporte de O_2 y la capacidad de las células para utilizar el oxígeno van a influir en el suministro de oxígeno a estas células.

La privación del aporte sanguíneo a la célula, así como de los nutrientes y oxígeno que la sangre transporta, impide la fosforilación oxidativa normal en la mitocondria y la generación de energía por la vía aerobia. Por tanto, la célula se va a ver obligada a obtener energía mediante el metabolismo anaerobio por lo que hay una disminución de la producción de ATP. Al ser insuficiente la energía producida, el ADP obtenido de la hidrólisis de ATP va a ser hidrolizado a AMP, el cual va a jugar un papel importante en la génesis del síndrome de isquemia reperusión (SIR).

Conforme se prolonga el periodo de isquemia, se produce un acúmulo de lactato y protones (H^+) debidos al metabolismo anaerobio, lo que lleva a una progresiva acidificación del medio intracelular. Ello conlleva al descenso de las bombas Na^+/K^+ - ATPasa y Ca^{2+} - ATPasa, que finalmente conduce a un aumento del Ca^{2+} intracelular y a la muerte de la célula.

Al inhibirse la actividad de la bomba Na^+/K^+ - ATPasa la membrana plasmática se altera y se produce edema celular. Debido a la elevada concentración de Cl^- extracelular y elevada concentración intracelular de proteínas, el Cl^- penetra dentro de la célula con un catión arrastrando agua y el K^+ sale fuera para mantener el equilibrio iónico. Esto genera un edema que va a tener consecuencias en el posterior periodo de reperusión sanguínea del tejido isquémico.

1.3. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO LOCAL POR EL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Además del daño ya comentado, con el inicio de la reperusión el daño local se verá magnificado debido a la acción de citocinas, del sistema del complemento, de los neutrófilos, de los radicales libres de oxígeno y a la alteración de la permeabilidad capilar que, además, van a causar su expansión al resto del organismo (8).

1.1.1. Citocinas

Son moléculas que se encargan de la modulación de la respuesta inflamatoria, existiendo citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Son producidas principalmente por linfocitos y macrófagos activados aunque pueden ser producidas también por otras estirpes celulares. Estas citocinas se acumulan en los tejidos sometidos a isquemia y, tras la reperfusión, se extienden a la circulación sistémica y activan y atraen leucocitos a dichos tejidos.

1.1.2. Sistema del Complemento

Es uno de los mecanismos de defensa perteneciente a la respuesta inmune innata y, entre otros efectos, potencia la respuesta inflamatoria, facilita la fagocitosis y dirige la lisis de células.

Algunos autores proponen que las células sometidas a IM expresan “antígenos de isquemia” a los que se une la IgM circulante durante la reperfusión sanguínea de los tejidos. Éstos se unirían al componente C1 del sistema del complemento desencadenando la activación del mismo. Además, también se considera, al sistema del complemento, como un importante mediador de la inflamación durante la defensa inmune innata tras la isquemia-reperfusión y se ha demostrado que contribuye a la atracción de los neutrófilos al tejido isquémico dañado (9,10).

1.1.3. Radicales libres de oxígeno (RLO)

Son metabolitos tóxicos que presentan estados intermedios de reducción electroquímica del oxígeno al agua y tienen un papel importante en el curso del SIR. En condiciones no patológicas, el organismo elimina el 95% del oxígeno transformándolo en agua y el 5% restante lo va reduciendo originando, de forma controlada, RLO. Con la reoxigenación durante la reperfusión de los tejidos sometidos a isquemia, se produce un incremento patológico de dicha reducción, que ocurre en condiciones fisiológicas, debido al acúmulo de metabolitos durante la isquemia.

La reducción de los RLO en el tejido sometido a isquemia-reperfusión ocurre básicamente por la acción de los neutrófilos activados y del enzima xantina oxidasa

(XO), originado durante la isquemia por la conversión de la xantina deshidrogenasa (XD), que en condiciones normales se encuentra en el endotelio microvascular del tejido.

La acumulación de XO y de hipoxantina son los principales causantes de la producción de RLO durante la reperfusión. La XO cataliza la conversión de hipoxantina a xantina, lo que produce un anión superóxido (O_2^-) que iniciará la cadena de oxidación-reducción, con producción de nuevos RLO. Otra de las fuentes de RLO proviene de la activación de los neutrófilos, originando un daño directo como indirecto en las propias células. Dentro del daño directo, se describen:

- modificaciones de los ácidos nucleicos y rupturas del ADN.
- despolimerización de mucopolisacáridos y del ácido hialúrico, así como degradación del colágeno.
- inactivaciones enzimáticas que pueden alterar la integridad de las membranas.

El daño indirecto es el derivado de la reacción de los RLO. El proceso principal en este sentido es la peroxidación de lípidos, que consiste en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares. Esto produce una reacción en cadena con formación de RLO intermedios que son altamente reactivos y extremadamente tóxicos, conduciendo todo ello a la pérdida de función de barrera de la membrana celular, lo que provoca apoptosis celular.

1.1.4. Neutrófilos

Estas células del sistema inmune, atraídas por factores quimiotácticos, van a migrar al tejido isquémico y activarse, liberando así los gránulos contenidos en su citoplasma produciendo daño en el tejido.

Los leucocitos activados que llegan al foco de quimiotaxis, se adhieren al endotelio y crean un “microambiente” que aumenta la porosidad endotelial, e incluso su disrupción. Esta pérdida de competencia vascular continúa aun cuando los polimorfonucleares (PMNs) han migrado al espacio intersticial y liberado sus enzimas citotóxicas y RLO.

1.4. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO SISTÉMICO

El daño sistémico se debe fundamentalmente al desequilibrio iónico y a la producción de metabolitos a nivel local que resultan tóxicos a nivel sistémico, y a la acción de RLO a distancia del foco inicial.

El desequilibrio iónico entre medio intracelular y extracelular da lugar al secuestro de líquidos a nivel intracelular y en el tercer espacio, y a un descenso del volumen circulante eficaz.

Como se ha mencionado, otra parte del daño sistémico procede de los RLO. Se cree que la liberación de citocinas y RLO en el lugar de la isquemia llevan a una activación leucocitaria y del endotelio en múltiples focos además del original.

1.5. TRATAMIENTO

Las opciones terapéuticas actuales para el manejo de pacientes que cursan IM dependen de la etiología de la misma, las condiciones hemodinámicas del paciente y la experiencia del equipo médico. En rasgos generales, en la IM no oclusiva se opta un manejo médico, más conservador, mediante la administración endovenosa de papaverina (11,12), mientras que en la IM oclusiva el tratamiento de elección pasa por un abordaje quirúrgico (13).

Independientemente de la etiología de la IM, en aquellos pacientes que presenten signos clínicos compatibles con peritonitis o infarto intestinal, se elige un tratamiento quirúrgico inmediato para la resección de la porción intestinal infartada o necrótica (14). La inestabilidad hemodinámica del paciente también es otro criterio para la indicación quirúrgica del paciente con IM. Por el contrario, el abordaje quirúrgico está contraindicado en aquellos pacientes con riesgo de padecer comorbilidades asociadas a la anestesia general, así como si se sospecha que la IM es debida a vasoespasmo, indicándose en ambos casos el manejo médico mediante anticoagulantes y vasodilatadores intrarteriales.

1.6. ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble esencial para múltiples funciones corporales. No puede ser sintetizada *de novo* por el organismo por lo que se adquiere

de forma exógena procedente de múltiples alimentos como legumbres o frutas de hoja verde en forma aniónica. El ácido fólico hace referencia a la forma oxidada y más estable de la familia de los folatos. La forma activa la constituye el ácido folínico, disponible para administración parenteral.

Los folatos actúan como substratos en diferentes vías biológicas como la síntesis de ADN y ARN, replicación celular, la señalización intracelular o la metilación genética.

No hay muchos trabajos que utilicen el ácido fólico como fármaco antioxidante en el tratamiento del daño por isquemia y reperusión. En el Laboratorio de Cirugía Experimental dependiente del Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física, de la Universidad del País Vasco UPV-EHU, el ácido fólico ha sido ensayado en modelos de isquemia-reperusión en territorio mesentérico, en su preparación parenteral de ácido folínico. En su experiencia, la administración IV de ácido folínico a dosis relativamente elevadas de 2,5 mg/kg en los minutos previos al restablecimiento del flujo mesentérico tras el bloqueo completo de la arteria mesentérica superior en la rata, disminuye tanto la gravedad de las lesiones mucosas como la mortalidad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las lesiones producidas durante la reperfusión de órganos isquémicos siguen siendo un importante problema médico sin solución satisfactoria. Este problema afecta a todos los órganos, pero tiene especial relevancia clínica en el caso del intestino dado que en los pacientes hipovolémicos se instaura desde el inicio un estado de bajo flujo en este órgano con el fin de aportar volemia en otros órganos más vitales. Durante la resucitación de estos pacientes el síndrome de reperfusión del intestino puede dar lugar a una situación catastrófica conocida como fracaso multiorgánico.

Está aceptado que los principales agentes de daño sistémico durante la reperfusión son los polimorfonucleares neutrófilos, que reaccionan contra las células endoteliales afectando así a riñón, hígado y pulmón (principalmente).

Sería interesante conocer si la depleción leucocitaria podría constituir una opción terapéutica en este síndrome. Para ello se propone un modelo de isquemia-reperfusión sobre animales neutropénicos.

Se estudiará la modificación en el daño demostrable como consecuencia de la neutropenia, así como si el efecto terapéutico del ácido fólico se mantiene en esta situación clínica.

Los objetivos de este proyecto son, por tanto:

- Estudiar la modificación en el daño como consecuencia de la neutropenia en el Síndrome de Isquemia-Reperfusión Mesentérico (SIRM).
- Analizar si el efecto terapéutico del ácido fólico se mantiene en esta situación clínica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES UTILIZADOS

Los animales empleados para este trabajo fueron ratas macho singénicas de la cepa WAG/RijHsd de 3-4 meses de edad y un peso medio de 264 gramos (rango de 235 – 296 gramos).

La cepa empleada fue adquirida en origen a Harlan (Países Bajos), y criadas en el Estabulario del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Enfermería de la UPV/EHU. Los animales se mantuvieron en condiciones circadianas de luz/oscuridad con comida y agua “ad libitum”. La cepa empleada muestra un ritmo de crecimiento moderado, llegando a estabilizarse en la decimocuarta semana, en la que alcanzan un peso de 300g los machos y de 200g las hembras y una supervivencia que no suele superar los 22 meses en los machos y los 31 en las hembras.

Todos procedimientos que se describen a continuación se llevaron a cabo conforme a la legislación vigente y fueron aprobadas por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEa) de la UPV/EHU con el Código M20/2016/225 Herrero de la Parte.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

Para el desarrollo experimental de éste Trabajo de Fin de Grado se emplearon 30 animales a los que se indujo Síndrome de Isquemia-Reperfusión, distribuidos aleatoriamente en 5 grupos tal y como se describe a continuación en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Descripción de los grupos experimentales empleados en éste trabajo.

Grupo	Descripción de la lesión
1	Animales no tratados.
2	Animales tratados con suero salino (vehículo).
3	Animales tratados suero salino (vehículo), con inducción previa de neutropenia.
4	Animales con inducción previa de neutropenia y tratados con ácido folínico.
5	Animales tratados con ácido folínico.

En la **Figura 2** podemos ver una representación del cronograma de los procedimientos realizados.

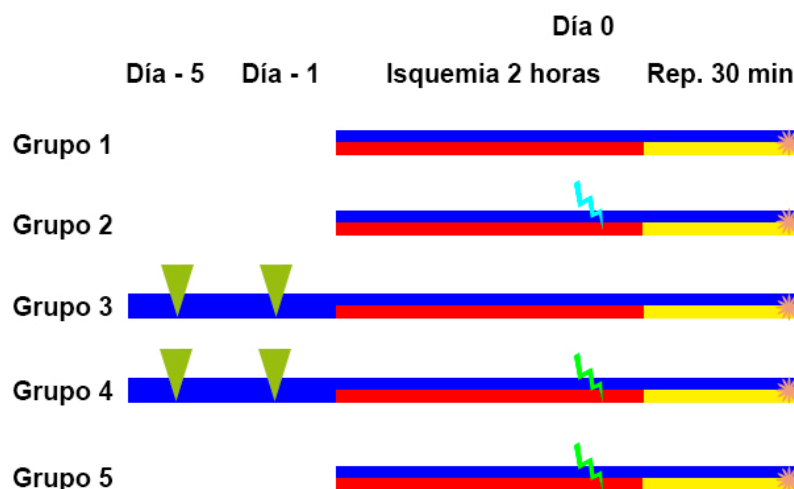


Figura 2. Línea temporal de los procedimientos de cada grupo experimental. Se representa el momento de la inyección de Ciclofosfamida (triángulo verde), la administración de suero salino (rayo azul), la administración de ácido fólico (rayo verde) y el momento de la toma de muestra y eutanasia (asterisco). La línea azul indica la duración total del experimento en cada grupo; la roja, el tiempo total de ischemia; y la amarilla, el tiempo de reperusión

3.3. INDUCCIÓN DE NEUTROPENIA

Para lograr que los animales de los grupos 3 y 4 presentasen un recuento leucocitario reducido, se les administró ciclofosfamida (50 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) 1 y 5 días antes de la realización de la ischemia. Para ello, los animales se introdujeron en un cepo inmovilizador para la administración de sustancias y mediante una aguja hipodérmica de 27 G recibieron las dosis del fármaco.

3.4. PROTOCOLO ANESTÉSICO

Para llevar a cabo la inducción quirúrgica de ischemia mesentérica, los animales fueron previamente pre-anestesiados empleado diazepam (15 mg/kg, i.p.). Transcurridos 10 minutos, se les administró un cóctel de ketamina (80 mg/kg) y medetomidina (0,5 mg/kg), ambos por vía i.p., y se esperaron otros 5 minutos antes de la realización de los procedimientos.

3.5. INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE LA ISQUEMIA

Una vez comprobado que los animales estaban completamente anestesiados, se colocaron en posición decúbito supino sobre una manta calefactora a 37° C y se practicó una laparotomía para extraer el paquete intestinal (sobre una gasa humedecida en suero salino a 37° C). Con el paquete intestinal fuera del animal, se procedió a localizar la arteria mesentérica superior (AMS) (**Figura 3**).

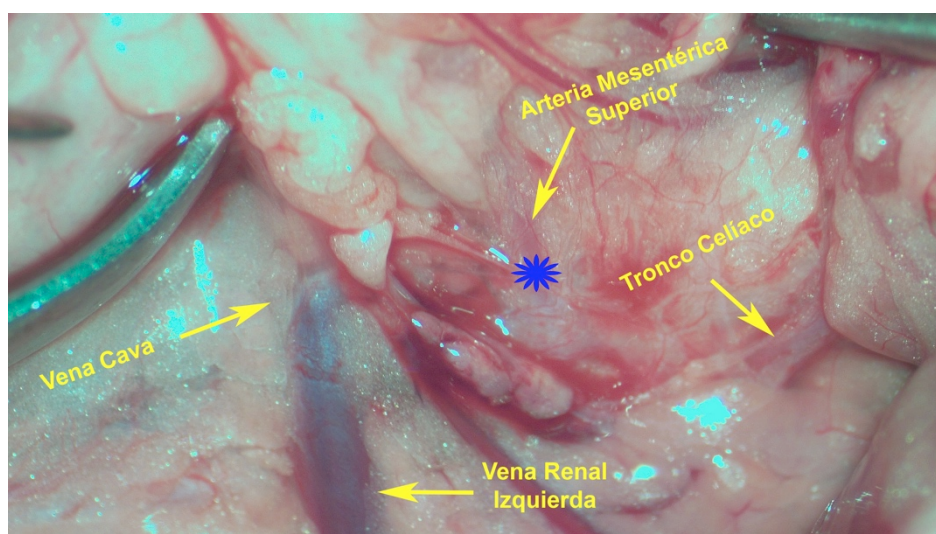


Figura 3. Fotografía del campo quirúrgico donde se observan los principales vasos de la región abdominal: TC, AMS, vena cava (VC) vena renal izquierda (VRI). Se observa también la zona de colocación del clip de Yasargil (asterisco azul)

Una vez localizada, se disecó la AMS y se colocó un clip de Yasargil para aneurismas con el fin de interrumpir el flujo arterial a la totalidad sin dañar la estructura vascular (**Figura 4**). Se reintrodujo el paquete abdominal, se suturó la laparotomía realizada y se administró una dosis de meloxicam (2 mg/kg sc). Tras dos horas de isquemia, se reabrió la laparotomía y se retiró el clip de Yasargil, permitiéndose la reperfusión intestinal durante media hora más. La cavidad abdominal fue cerrada de nuevo con puntos simples.

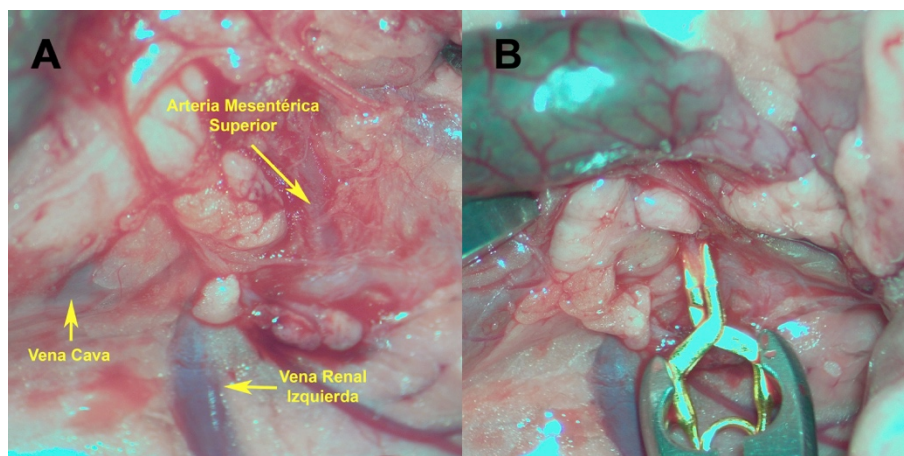


Figura 4. Fotografías del procedimiento de disección (A) y colocación del clip de Yasargil (B) sobre la AMS.

3.6. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL

Según el grupo correspondiente, los animales recibieron ácido folínico (30 mg/kg) o el mismo volumen de suero salino (empleado como vehículo) 10 minutos antes de finalizar la isquemia. Para ello, con el animal aun anestesiado, se realizó una incisión en la zona inguinal izquierda del animal para exponer la vena femoral (**Figura 5A**), que se cateterizó empleando un catéter de linfografía de 27 G a través del cual se administraron las sustancias a ensayar. Una vez emplazado el catéter en la luz de la vena femoral común, éste se sujetó a la misma empleando un clip de Yasargil para impedir su salida durante la infusión del tratamiento (**Figura 5B**).

Concluida la infusión se retiró el catéter y se realizó hemostasia directa en la zona de punción durante 2 minutos. Tras verificar la ausencia de sangrado, se suturó la incisión con puntos simples.

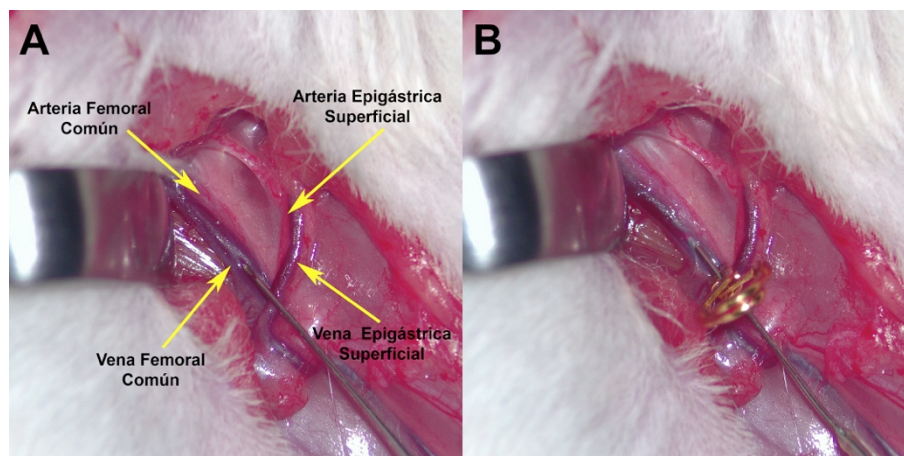


Figura 5. Fotografía de la región inguinal izquierda de la rata en la que se observa la vena femoral y demás vasos sanguíneos (A). Una vez introducido el catéter en el interior de la vena femoral común, éste se sujetó con un clip de Yasargil (B).

3.7. TOMA DE MUESTRAS Y EUTANASIA

Transcurridos los 30 minutos de perfusión mesentérica, el animal se mantuvo anestesiado mediante isoflurano al 1,5%, se reabrió de nuevo la incisión abdominal y, utilizando dos pinzas hemostáticas, se clampó una porción de intestino delgado, que fue extirpado y conservado para la realización de los análisis patológicos. Además, se localizó la vena cava y se procedió a la extracción del volumen total de sangre circulante para el posterior recuento leucocitario. Éste hecho produjo la muerte del animal por exanguinación, la cual se confirmó por dislocación cervical.

3.8. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

La porción del intestino delgado extraído se dividió en 3-4 fragmentos de intestino de aproximadamente 1 cm de longitud cada uno, independientemente de su estado macroscópico. Estas piezas se conservaron en formaldehído al 4% para posteriormente incluirse en parafina según el procedimiento habitual.

Los fragmentos de intestino de cada animal se incluyeron dentro de un mismo bloque de parafina, colocándose perpendicularmente al plano de corte. De cada bloque se obtuvieron 3 secciones histológicas que se montaron sobre un mismo portaobjetos

para, posteriormente, teñirse con hematoxilina-eosina. De tal forma que, en cada portaobjetos, se obtuvieron entre 9 y 12 muestras de tejido intestinal en las que se valoró el grado de lesión histológica.

Tabla 3. Descripción del grado de lesión histológica (GLH) e índice de lesión dado a cada GLH.

Grado	Descripción de la lesión	Índice de Lesión
0	La estructura de la vellosidad intestinal es normal y no se observan lesiones a nivel microscópico.	0
1	El epitelio de las vellosidades se encuentra conservado casi en su totalidad, con presencia de pequeños despegamientos a nivel apical (espacios de Gruenhagen).	1
2	Conservación parcial del epitelio, con denudación apical.	2
3	Conservación de la estructura de la vellosidad con pérdida casi total del epitelio.	3
4	Desestructuración de la vellosidad	4
5	Ausencia de vellosidad intestinal.	5

De cada portaobjetos se seleccionaron aleatoriamente 8 secciones histológicas, cada una de los cuales se dividió en 4 cuadrantes, valorándose el GLH en cada uno de ellos según la escala reflejada en la **Tabla 3**. Así, de cada sección histológica, se obtuvo un índice de lesión que osciló entre 0 y 20.

3.9. RECuento LEUCOCITARIO

Para corroborar que los animales de los grupos experimentales 3 y 4 se encontraban en una situación de neutropenia o déficit leucocitario, se realizó un recuento de las células de la serie blanca.

Para la dilución de la sangre y posibilitar así una correcta determinación celular, se usó líquido de Türk. En su preparación se emplearon 2 ml de ácido acético glaciar (produce lisis de los eritrocitos sin alterar a los leucocitos) y 1 ml de solución acuosa de violeta de genciana al 1% (tiñe el núcleo de los leucocitos) y hasta 100 ml de H₂O destilada.

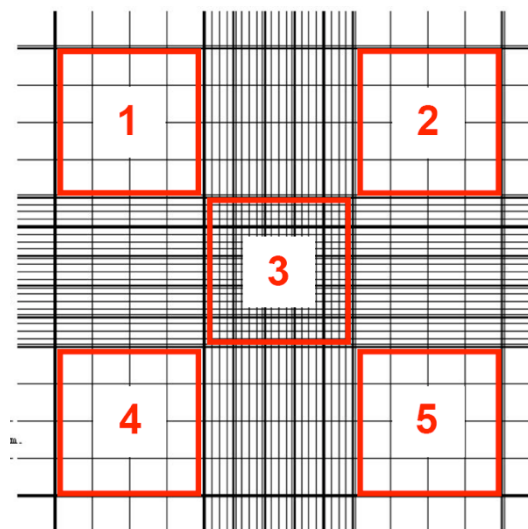


Figura 6. Cámara de Neubauer o hemocitómetro.

En el recuento de células de la serie blanca se utilizó un hemocitómetro o cámara de Neubauer con un área de 1 mm^2 para cada uno de los recuadros numerados (**Figura 6**) y una altura de $0,1 \text{ mm}$ respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos el volumen comprendido entre cada uno de los recuadros numerados y el cubreobjetos es de $0,1 \text{ mm}^3$, es decir $0,1 \mu\text{L}$.

Para realizar la determinación celular se realizó una dilución 1:10 de la sangre extraída en líquido de Türk y se dispuso en la cámara de Neubauer para su conteo bajo microscopio óptico a 10 aumentos. Se obtuvo el número de leucocitos en cada uno de los recuadros marcados en rojo en la **Figura 6** y obtuvo la media de células .

Con los datos de la dilución realizada, la media de leucocitos obtenidos de cada muestra de sangre y el volumen de carga que admite cada recuadro de la cámara de Neubauer, se obtuvo el número de leucocitos por mL.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos tanto del recuento de leucocitario así como del GLH se introdujeron en un primer momento en una hoja de cálculo Excel, siguiendo la misma nomenclatura de series e individuos. Una vez el conjunto de datos fue

obtenido, estos fueron exportados al paquete informático GraphPad Prism v.6.01 para realizar los test estadísticos.

Previo a la obtención de la media y desviación estándar de cada serie experimental, se comprobó la distribución normal de los datos introducidos mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Tras la comprobar que los datos tenían una distribución normal y calcular la media y desviación estándar de cada grupo experimental, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de las variables independientes entre sí y, posteriormente, análisis de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, una vez que se comprobó y rechazó, mediante ANOVA, la hipótesis nula de igualdad de medias.

Finalmente, para la representación gráfica de los resultados se emplearon gráficos de barras con la media y desviación estándar de cada grupo.

4. RESULTADOS

4.1. RECuento LEUCOCITARIO

El recuento medio leucocitario de ratas sanas no sometidas a ningún tratamiento ni condición experimental es de $8,1 \times 10^6$ células/ml. En el Grupo 3, animales que fueron sometidos a neutropenia y que, posteriormente les fue administrado suero salino como vehículo, el recuento medio de células de la serie blanca fue de $7,3 \times 10^5$ células/ml. Por último, el grupo al que se indujo neutropenia y mas tarde tratado con ácido folínico (grupo 4) obtuvo un recuento leucocitario de $8,87 \times 10^5$ células/ml.

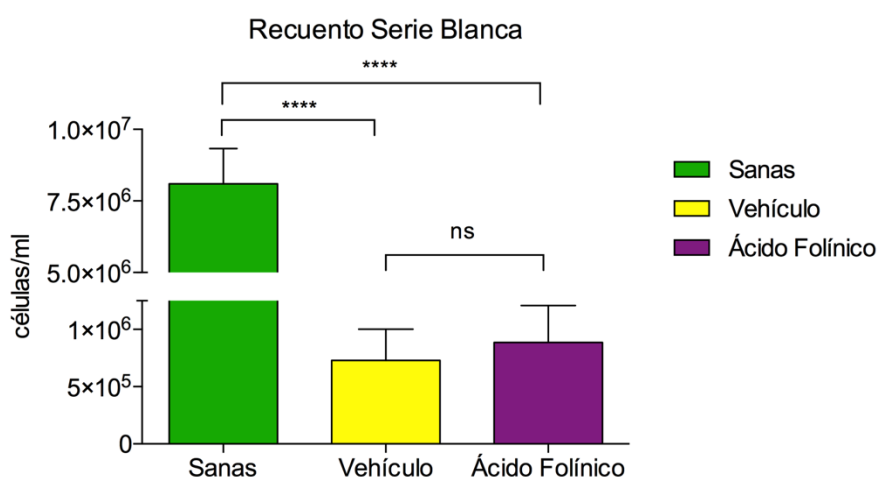


Figura 7. Gráfico de barras correspondiente al recuento leucocitario de ratas sanas no sometidas a ningún tratamiento ni condición experimental (verde), ratas tratadas con ciclofosfamida 50 mg/kg y posteriormente con suero salino (amarillo) y animales tratados con ciclofosfamida 50 mg/kg y posteriormente con ácido folínico 30 mg/kg).

Se puede observar en la **Figura 7** que la administración de dos dosis de ciclofosfamida en los grupos 3 y 4 redujo, aproximadamente, en un 90% el recuento de células de la serie blanca, sin que la administración de i.p. de ácido folínico o el vehículo empleado en este trabajo influyera en el mismo ($p > 0,05$).

4.2. GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA

La valoración del GLH se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado correspondiente de material y métodos.

Los animales del grupo 1 que, sometidos a isquemia, no recibieron medicación han presentado el segundo menor grado lesional, con un $GLH = 14,8 \pm 1,8$. En el grupo que incluía animales a los que se administró el vehículo del tratamiento a ensayar, suero salino, se obtuvo una lesión histológica de grado $14,7 \pm 1,46$, si bien al comparar ambos grupos, para comprobar el efecto de la administración del vehículo, se observó que estas diferencias no son estadísticamente significativas con un p valor $> 0,05$ ($p = 0,662$) (**Figura 8**).

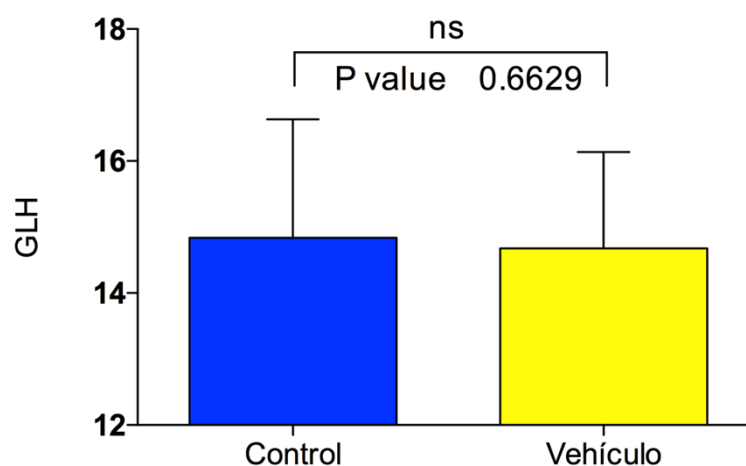


Figura 8. Gráfico comparativo entre el GLH de animales controles (azul) y tratados con el vehículo (amarillo)

En la **Figura 9** se puede observar el efecto de los tratamientos ensayados sobre animales con IM. En el grupo 3 de animales tratados con suero salino, a los que se les indujo previamente neutropenia, obtuvieron un mayor grado lesional ($GLH = 15,6 \pm 0,72$), con unas diferencias significativas comparándolo con el grupo 1 ($p < 0,01$). Sin embargo son los animales con inducción previa de neutropenia y tratados con ácido folínico (grupo 4) los que mayor grado de lesión histológica obtuvieron de todos los grupos ($GLH = 15,9$) y los que presentan una mayor diferencia estadística al enfrentarse con los animales del grupo control (grupo 1), $p < 0,0001$. Por su parte, en el grupo de animales sometidos a isquemia y tratados con ácido folínico se

produjo un aumento del grado de lesión con respecto a los 2 primeros grupos mencionados, pero que fue ligeramente menos marcado que en el grupo “neutropenia + vehículo” y “neutropenia + ácido folínico”.

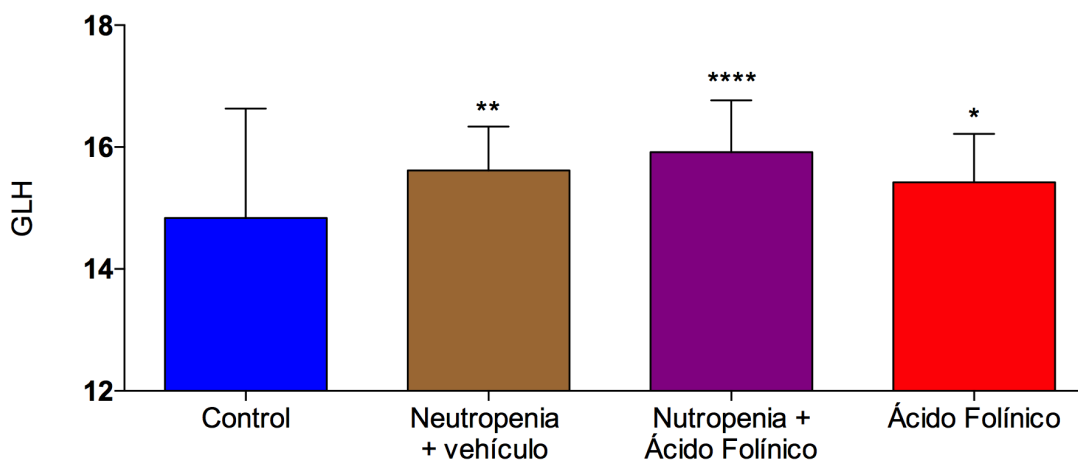


Figura 9. Representación gráfica del GLH de los diferentes tratamientos y condiciones experimentales ensayadas. Sobre cada grupo experimental se observa el nivel de significación de las diferencias respecto al control o grupo 1 (azul): **, $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ y *, $p < 0,05$.

5. DISCUSIÓN

Los objetivos de este estudio eran, como ya hemos mencionado, por un lado, estudiar la modificación en el daño como consecuencia de la neutropenia en el SIRM; y por otro, analizar si el efecto terapéutico del ácido folínico se mantiene en esta situación clínica.

Para ello, en un primer paso, desarrollamos un modelo experimental en ratas albinas con déficit leucocitario mediante la administración ip de ciclofosfamida, consiguiendo, tal y como se recoge en los resultados, una disminución del 90% en el recuento de leucocitos, reducción similar a los que recoge la literatura con otros modelos experimentales. Algunos modelos de neutropenia descritos emplean anticuerpos administrados intraperitonealmente para conseguir la reducción del recuento leucocitario. Por ejemplo, en 2006, Liu et al. emplearon anticuerpos monoclonales anti-Gr-1 en ratones inmunocompetentes C57BL/6 y B6 ICAM-1 deficientes (ICAM-1KO), resultando en una reducción del 95% en el recuento leucocitario (15). Otros autores, sin embargo, emplearon suero de conejo anti-neutrófilos de ratón y suero de conejo preinmunizado, consiguiendo una disminución del 85% en el recuento leucocitario (16). Otros modelos descritos emplean, al igual que nuestro estudio, la administración intraperitoneal como forma de desarrollar neutropenia en animales de experimentación, tanto en ratones como en ratas, consiguiendo una disminución del recuento del PMNs superior al 95% (17).

Teniendo en cuenta que durante el SIRM se produce una grave alteración hemodinámica que desemboca en shock, cabría esperar un efecto beneficioso al tratar a los animales únicamente con suero (18). Sin embargo, al comparar el grupo control con el grupo de animales tratados únicamente con suero observamos una tendencia a la disminución del daño intestinal pero sin alcanzar significación estadística.

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio observamos que, en animales neutropénicos tratados, tanto con ácido folínico como con suero salino, se produce un empeoramiento del grado de lesión intestinal. Éstos hallazgos se contraponen a los datos de otros estudios (19) donde se observa que tras 45 minutos de isquemia hepática, en una primera fase post-isquemia (tras 1 hora de reperfusión), no se

aprecia influencia de los neutrófilos sobre el daño isquémico local a nivel hepático. Sin embargo, en fases más avanzadas se observa que la depleción continua de PMNs en sangre periférica tiene efectos protectores. Esta disparidad, entre éstos resultados y los presentados en nuestro trabajo, podría deberse tanto al tiempo de duración de la isquemia como a que sobrepasado un periodo de tiempo de isquemia, la depleción de neutrófilos ya no tenga un efecto beneficioso, sino el contrario.

En cuanto al tratamiento experimental del SIRM con ácido folínico, tanto en animales neutropénicos como en animales que no presentan esta condición previa, se ha observado que, tras la administración de este antioxidante, hubo un empeoramiento del grado de lesión local a nivel intestinal. Al contrario de lo manifestado en nuestro estudio, existen otras investigaciones en las que se objetiva una disminución de la lesión intestinal, tanto microscópica como macroscópica, al administrar ácido folínico justo antes de restablecer el flujo sanguíneo (20). Tales diferencias, en un estudio que metodológicamente se ha planteado de manera similar, podrían deberse a la diferencia de cepas de las ratas empleadas en ambos trabajos, ya que, como sugieren otros estudios (21), existen variables que pueden modificar los resultados a la hora de realizar estudios experimentales sobre el SIRM como son la cepa, edad, peso y periodo de IMA.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

- La administración intraperitoneal de ciclofosfamida constituye un método eficaz, fácil y reproducible para la depleción leucocitaria. Siendo su resultado independiente del tratamiento posterior que recibieron los animales.
- La administración endovenosa de suero salino no ha producido cambios en el grado de lesión intestinal, tras isquemia mesentérica aguda.
- La depleción leucocitaria ha empeorado la lesión local del Síndrome de Isquemia Reperusión Mesentérica, lo que es compatible con el papel reconocido a linfocitos y macrófagos en la regeneración y reparación tisular.
- El tratamiento con ácido folínico en animales sometidos a isquemia mesentérica aguda, tanto en animales con una disminución drástica en el recuento de leucocitos como en animales sanos, ha empeorado el grado de lesión intestinal, sin que se haya encontrado explicación a este hecho.
- En los animales sometidos a isquemia intestinal y tratados con ácido fólico, la depleción leucocitaria no modifica el patrón lesional

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sreenarasimhaiah J, Brandt L, Boley S, Gandhi S, Hanson M, Vernava A, et al. Diagnosis and management of intestinal ischaemic disorders. *BMJ*. 2003;326:1372-6.
2. Montoro Huguet MA, Sans Cuffi M. Isquemia intestinal. Problemas comunes en la práctica clínica. 2003.
3. Florian A, Jurcut R, Lupescu I, Grasu M, Croitoru M, Ginghină C. Mesenteric ischemia: a complex disease requiring an interdisciplinary approach. A review of the current literature. *Rom J Intern Med = Rev Roum médecine interne*. 2010;48(3):207-22.
4. Howard TJ, Plaskon LA, Wiebke EA, Wilcox MG, Madura JA. Nonocclusive mesenteric ischemia remains a diagnostic dilemma. *Am J Surg*. abril de 1996;171(4):405-8.
5. Acosta S. Epidemiology of Mesenteric Vascular Disease: Clinical Implications. *Semin Vasc Surg*. marzo de 2010;23(1):4-8.
6. Montoro Huguet MA, Sánchez Puértolas AB, Santolaria Piedrafita S. Colitis isquémica. Problemas comunes en la práctica clínica. 2003.
7. Martinez JP, Hogan GJ. Mesenteric ischemia. *Emerg Med Clin North Am*. 2004;22(4 SPEC. ISS.):909-28.
8. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004;70:71-86.
9. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette K a, Tilney NL. The Cytokine-adhesion Molecule Cascade in Ischemia/Reperfusion Injury of the Rat Kidney. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2682-90.
10. Wada K, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology*. enero de 2001;120(1):126-33.
11. Klotz S, Vestring T, Rötger J, Schmidt C, Scheld HH, Schmid C. Diagnosis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia after open heart surgery.

- Ann Thorac Surg. noviembre de 2001;72(5):1583-6.
12. Brunaud L, Antunes L, Collinet-Adler S, Marchal F, Ayav A, Bresler L, et al. Acute mesenteric venous thrombosis: Case for nonoperative management. J Vasc Surg. octubre de 2001;34(4):673-9.
 13. Karwowski J, Arko F. Surgical management of mesenteric ischemia. Tech Vasc Interv Radiol. 2004;7(3):151-4.
 14. Acosta S, Ögren M, Sternby N-H, Bergqvist D, Björck M. Mesenteric venous thrombosis with transmural intestinal infarction: A population-based study. J Vasc Surg. enero de 2005;41(1):59-63.
 15. Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. Hepatology. 2006;43(6):1220-30.
 16. Dovi J V, He L, Dipietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. J Leukoc Biol. 2003;73.
 17. Harris FE, Turner DR, Oliveira DBG. Early vasculitis in the mercuric chloride induced Brown Norway rat model is neutrophil independent. Int J Exp Pathol. 1999;80:133-42.
 18. Ulibarrena MÁ, García-Alonso Montoya I, Portugal Porras V, García Redondo B, Méndez Martín JJ. Hemodynamic monitoring in a model of shock induced by intestinal reperfusion in the rat. Rev Española Enfermedades Dig. 1998;90(2):100-4.
 19. Jaeschke H, Farhood A, Smith C. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. Faseb J. 1990;4(15):3355-9.
 20. Bilbao Axpe JE. Valoración de la perfusión intestinal en ratas sometidas a tratamientos con antioxidantes. UPV/EHU; 1990.
 21. Ortiz Lacorzana J, García-Alonso Montoya I, Portugal Porras V, Méndez Martín JJ. Influencia del peso corporal y del período de isquemia mesentérica aguda en la mortalidad de ratas sometidas a revascularización intestinal. Rev Española Enfermedades Dig. 1990;77(4):263-7.