

11209

5A



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

*EFFECTO DE ANTIOXIDANTES EN ANASTOMOSIS
INTESTINALES EN UN MODELO DE ISQUEMIA-
REPERFUSION EN CONEJOS*

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO ESPECIALISTA EN CIRUGIA GENERAL

P R E S E N T A

DRA. IVONNE CEDILLO LEY

ASESOR DE TESIS:

DR. LUIS EDUARDO CARDENAS LAILSON



MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Efecto de Antioxidantes en Anastomosis
Intestinales en un modelo de
Isquemia-Reperfusión en Conejos**

A mis padres y hermanos
Por su ejemplo, cariño y apoyo incondicional.
Gracias, los quiero mucho.

Al Dr. Eduardo Cárdenas Lailson
Lalito, gracias por tu enseñanza, apoyo y amistad.

Al Dr. Hilario Gutiérrez Acar
Gracias por tu apoyo. Te quiero.

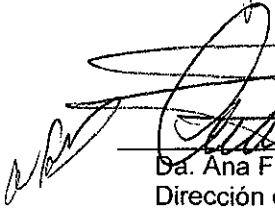
AUTORIZACIONES

HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"
DIRECCION DE ENSEÑANZA

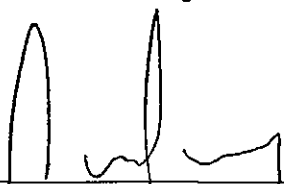


Dr. German Fajardo Dóici
Dirección de Enseñanza

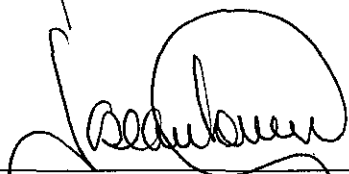
HOSPITAL GENERAL
DR. MANUEL GEA GONZALEZ
SUBDIRECCION
DE INVESTIGACION



Dr. Ana Flisser Steinbruch
Dirección de Investigación



Dr. Luis Eduardo Cárdenas Lalson
Asesor de tesis e investigador responsable



Dr. José Antonio Palacios Ruiz
Jefe de servicio y profesor titular del curso

COLABORADORES

Asesor de tesis e investigador responsable

Dr. Luis Eduardo Cárdenas Lailson
Jefe de la División de Cirugía Experimental
Hospital "Dr. Manuel Gea González"

Investigadores asociados

Dr. Juan Manuel Mijares García
Médico adscrito
Departamento de Cirugía General
Hospital "Dr. Manuel Gea González"

Dr. José Antonio Ruy-Díaz Reynoso
Jefe de la Clínica de Apoyo Nutricional
Departamento de Cirugía General
Hospital "Dr. Manuel Gea González"

Dra. Sara Parraguirre
Jefe de Servicio de Anatomía Patológica
Hospital "Dr. Manuel Gea González"

Dra. Blanca Eugenia Duffy Verdura
Residente de tercer año del servicio de Cirugía General
Hospital General " Dr. Manuel Gea González"

Dr. Jaime Caloca Valenzuela
Ex-residente del servicio de Cirugía General
Hospital "Dr. Manuel Gea González"

Efecto de antioxidantes en anastomosis intestinales en un modelo de isquemia-reperfusión en conejos

Resumen

El daño por isquemia-reperfusión a nivel intestinal secundario a la formación de radicales libres de oxígeno puede ser aminorado con los antioxidantes, que son un mecanismo de defensa para combatirlos y reducen las manifestaciones microvasculares de lesión por isquemia-reperfusión. El ácido ascórbico y el alfa-tocoferol pueden ser útiles para reducir dicho daño, permitiendo una mejor cicatrización de las anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia-reperfusión.

Objetivo. Evaluar el efecto del alfa-tocoferol y ácido ascórbico en las anastomosis intestinales, administrados previamente a un evento de isquemia-reperfusión en conejos.

Material y métodos. Se estudiaron a 45 conejos machos Nueva Zelanda, con un peso entre 3 y 4 Kg. Estos fueron divididos en 3 grupos: Grupo I.- Grupo con suplemento de antioxidantes más isquemia intestinal (n=15). Grupo II.- Grupo sin suplemento de antioxidantes más isquemia intestinal (n=15). Grupo III.- Grupo control (sin suplemento y sin isquemia intestinal (n=15). La isquemia intestinal se produjo con el pinzamiento de la arteria mesentérica superior por 30 minutos. Posteriormente se resecó 1 cm de intestino delgado, el cual fue enviado a estudio histopatológico y se realizó anastomosis intestinal en un plano con polipropileno 5-0 cardiovascular. Al grupo control no se le realizó isquemia intestinal. Todos los animales fueron reintervenidos a las 24 horas para evaluar la presencia de complicaciones (dehiscencia, estenosis), además se resecó el segmento anastomosado para su estudio histopatológico (realizado en forma ciega por un solo patólogo). El análisis estadístico se realizó con prueba exacta de Fisher de dos colas, considerando una $p < 0.05$ como significativa.

Resultados. Se eliminaron a 5 conejos por muerte por complicaciones anestésicas. Las complicaciones observadas en el grupo 1 fue una eventración, una obstrucción intestinal por adherencias; en el grupo 2 se observó una obstrucción intestinal a nivel de la anastomosis intestinal y el grupo 3 no presentó complicaciones. El estudio histopatológico no mostró diferencias significativas en los tres grupos de estudio.

Conclusiones. El suplemento con ácido ascórbico y alfa-tocoferol no mostró tener efectos protectores sobre las anastomosis intestinales en nuestro modelo de isquemia-reperfusión en conejos. En la literatura se ha sugerido la combinación de diferentes modalidades terapéuticas para tratar de aminorar los efectos deletéreos producidos por la isquemia-reperfusión.

INDICE

Antecedentes	1
Marco de referencia	4
Objetivo General	9
Hipótesis	9
Diseño del estudio	9
Material y métodos	10
Resultados	18
Discusión	24
Conclusión	26
Referencias bibliográficas.....	27

Efecto de antioxidantes en anastomosis intestinales en un modelo de isquemia-reperfusión en conejos

ANTECEDENTES

Introducción

La lesión isquémica del intestino es resultado de la privación de oxígeno y de los nutrientes necesarios para la integridad celular. Notablemente el intestino es capaz de tolerar una reducción del 75% del flujo sanguíneo mesentérico durante 12 horas sin que con el microscopio óptico se detecte cambio alguno, (15) porque en condiciones normales, el oxígeno es aportado sólo por una quinta parte de los capilares mesentéricos. A pesar de una máxima extracción de oxígeno, por debajo de un nivel crítico del flujo sanguíneo las células van muriendo, en un proceso que avanza desde la luz hacia fuera.⁽¹⁶⁾

El daño isquémico es resultado de la hipoxia y de la lesión por reperfusión. La mayor parte de la lesión por una isquemia breve aparece durante la reperfusión. A medida que el período isquémico se prolonga, la hipoxia se torna más deletérea que la reperfusión. Durante este estadio el intestino está macroscópicamente cianótico, pero la lesión aguda todavía puede revertirse. La lesión por reperfusión ha sido atribuida a muchos factores, entre los que se incluyen los radicales de oxígeno reactivos. Cuando el oxígeno molecular es reducido en pasos univalentes, se forma superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Estas especies químicas dañan a los ácidos nucleicos, lípidos de membrana, enzimas y receptores. Con la reperfusión de los tejidos isquémicos este daño difuso puede dar como resultado lisis celular, alteración de la función celular y necrosis.⁽¹⁶⁾

Una fuente eficaz de radicales de oxígeno en la lesión isquémica y por reperfusión es la enzima xantina oxidasa, así como neutrofilos activados, oxidación de catecolaminas, células endoteliales y prostaglandinas. El efecto más dañino de los radicales libre es la peroxidación lipídica. Las membranas celulares están compuestas de ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos. Los radicales libres de oxígeno causan daño celular por peroxidación de lípidos, lo cual resulta en daño estructural y funcional de la célula.^(6,13)

Historia

El concepto de lesión por reperfusión fue formulado por primera vez en 1935, cuando Tennant y Wiggers observaron anomalías eléctricas asociadas a la reperfusión del miocardio isquémico, ahora conocido como arritmias inducidas por la reperfusión. Cristian Barnard en su libro " Una vida" también describió la incidencia de fibrilación ventricular inducida por reperfusión durante la recuperación en el primer trasplante de corazón. Arritmias similares ocurren también durante la terapia intravenosa trombolítica. El primer reporte bien documentado de lesión por reperfusión se originó en el laboratorio de Jennings y sus colaboradores, quienes describieron el desarrollo de necrosis de tejidos durante la reperfusión del miocardio isquémico. El mismo año, Darforth y colaboradores describieron la modulación de reacciones glucolíticas y síntesis de ATP asociadas con la reperfusión.

Tomó otros diez años hasta que el concepto de lesión por reperfusión fue desarrollado. Arritmias por reperfusión se describieron claramente en 1971 en un trabajo por Taylor; en 1972 Katz y Tada describieron la incidencia de " corazón de piedra " asociado a isquemia por reperfusión; en 1973 Hearse y colaboradores demostraron la liberación de enzimas intracelulares en el corazón isquémico reperfundido. Hearse y sus colaboradores fueron probablemente los primeros en llamar lesión por reperfusión a éste daño; y es probablemente su trabajo que convenció a los científicos de los efectos deletéreos de la reperfusión. Las investigaciones de lesión por reperfusión dieron un nuevo giro y nuevos artículos siguieron publicándose. Los cirujanos de corazón fueron los primeros en convencerse de la lesión por reperfusión, debido a que la isquemia – reperfusión es un procedimiento de rutina para ellos. Después de esto, el concepto de lesión por reperfusión se difundió y los científicos comenzaron a reconocer que el tejido o célula que sufre isquemia puede ser sujeto a lesión por reperfusión. Fue probablemente Granger proporcionaron evidencia de lesión por reperfusión en otros tejidos. Otros investigadores comenzaron a explorar los mecanismos de lesión por reperfusión y desde a principios de los años ochentas, cientos de artículos de lesión por reperfusión fueron publicados.

Las investigaciones en lesión por reperfusión tomaron un nuevo giro en 1981, cuando Reimer y sus asociados publicaron su trabajo revolucionario describiendo un fenómeno en el que corazones sujetos a periodos cortos repetitivos de isquemia reversible se tornarían más tolerantes a lesión por reperfusión y/o el inicio de lesión por reperfusión sería retrasada. Las observaciones de éstos autores fueron basadas en la evaluación patológica del corazón. ⁽²⁾

Los estudios de isquemia-reperfusión y sus efectos gastrointestinales se han basado en modelos experimentales para determinar alteraciones en la motilidad. ⁽¹⁾ Hasta la fecha, no se han descrito modelos experimentales de isquemia-reperfusión para determinar los efectos en las anastomosis intestinales.

MARCO DE REFERENCIA

Lesión por Reperfusión

El re-establecimiento del flujo sanguíneo tiene dos consecuencias benéficas para el tejido isquémico: El aporte energético se restaura y se retiran los metabolitos tóxicos. Así la reperfusión es un prerrequisito para la recuperación de la lesión por isquemia. Sin embargo, el paso de los metabolitos tóxicos a la circulación sistémica puede tener consecuencias metabólicas severas y la reperfusión resulta así en acidosis metabólica, hiperkalemia, mioglobinuria y falla renal.⁽¹⁶⁾

Algunos tejidos tales como la mucosa intestinal, puede ser especialmente susceptible debido a la anatomía microvascular específica. Los cambios estructurales incluyen no solo inflamación de los organelos, si no también la célula entera debido a la entrada de agua y electrolitos. Las rupturas de los lisosomas preceden la muerte celular. Otras sustancias claves que participen o sean parte de la formación de los radicales libres de oxígeno en la lesión tisular son iones de calcio, leucocitos y bacterias. La adhesión leucocitaria ha sido implicada como un paso crítico en la lesión del endotelio vascular que lleva a permeabilidad microvascular aumentada y trombosis. La inducción de neutropenia o la administración de anticuerpos monoclonales antiadhesión de leucocitos, que previenen las típicas lesiones, implican un papel central de los leucocitos en la lesión por reperfusión.^(5,6,8) Específicamente, la formación de radicales libres de oxígeno en el intestino puede desencadenar o causar lesión en otros órganos a distancia, por ejemplo el corazón y pulmones y afectar la función vascular en general. La traslocación bacteriana del intestino a los vasos linfáticos y al torrente sanguíneo es un fenómeno descubierto recientemente cuyo papel es en gran parte desconocido. Precondicionamiento isquémico es aún otro concepto más, probado principalmente en el corazón canino, que tiene implicaciones clínicas potenciales. La reperfusión de tejido isquémico ocurre en transplantes de órganos sólidos, con frecuencia después de un tiempo considerable de isquemia.

Mecanismos protectores incluyen cazadores de radicales libres de oxígeno, por ejemplo alopurinol y superóxido de dismutasa.⁽⁶⁾ Otras medidas probadas efectivas durante la implantación son la expansión de volumen sanguíneo con soluciones coloides y/o soluciones electrolíticas y la administración de un calcio antagonista. Los mecanismos de estas medidas son probablemente relacionadas a una microcirculación renal mejorada y remisión del vasoespasmo.⁽³⁾

Efectos de Isquemia-Reperfusión en Antioxidantes

Existe un acuerdo general que las cantidades de varios antioxidantes se reducen significativamente durante la isquemia-reperfusión. Por ejemplo la catalasa se reduce después de la isquemia-reperfusión. La depleción de antioxidantes se ha reportado después de pinzamiento aórtico asociado a cirugía de corazón abierto, con un aumento concomitante de alfa tocoferol plasmático y ácido ascórbico. Concentraciones de alfa tocoferol cerebral y ácido ascórbico también se reducen después de oclusión carotídea unilateral y reperfusión.

Efectividad de Antioxidantes en Lesión por Isquemia-Reperfusión

Los hallazgos de que la isquemia y la reperfusión de un tejido se asocian a la generación de radicales libres con una simultánea reducción de varios antioxidantes propició que los científicos utilizaran antioxidantes exógenos en un intento para atenuar la lesión por reperfusión.⁽¹³⁾

Los antioxidantes son agentes que interrumpen la peroxidación, previenen el daño celular y la producción de peróxidos y otros radicales libres. Muchos antioxidantes se han usado en forma experimental y han demostrado tener efectos citoprotectores variables, estos incluyen la vitamina E, propranolol, bloqueadores de los canales de calcio, vitamina C.^(6,9)

Estudios in vitro con vitamina E, han demostrado que atenúa la adhesión leucocitaria, incrementa la liberación de prostaciclina, un vasodilatador e inhibidor de la adhesión leucocitaria y de su activación. También se ha reportado que la vitamina E afecta el metabolismo del ácido araquidónico, reduce la síntesis de leucotrienos (potentes mediadores de la adhesión leucocitaria postisquémica), y puede reducir la agregación plaquetaria.^(5,9)

El ácido ascórbico es incapaz de rescatar el radical peroxilo en la fase lípida, pero puede regenerar alfa-tocoferol del radical tocoferoxilo y por lo tanto ayudar en el reciclaje de alfa tocoferol. El Beta-caroteno es otro antioxidante soluble en grasa, rescata el oxígeno y reacciona directamente con el peroxilo y radicales alcoxilo, interfiriendo así con la reacción en cadena de peroxidación lípida.

En resumen, hay mucha evidencia que apoya la formación de metabolitos tóxicos de oxígeno en tejidos isquémicos reperfundidos. Los tejidos están equipados con un sistema de defensa tanto intracelular como extracelular. El sistema de defensa puede también ser dividido en defensas enzimáticas y no enzimáticas. Los componentes importantes de un antioxidante no enzimático incluye alfa tocoferol, ácido ascórbico y beta caroteno, así como otros compuestos que pueden reaccionar con radicales para formar productos menos reactivos tales como aminoácidos que contienen sulfuro. El líquido extracelular representa una segunda línea de defensa en contra de lesión por oxidantes. La lesión oxidante puede potencialmente ocurrir durante isquemia y reperfusión debido a una excesiva producción de radicales libres, una disminución en defensas antioxidantes, o ambas. Debido a que los antioxidantes funcionan extrayendo los metabolitos tóxicos de oxígeno, pueden ser por lo general altamente efectivos en reducir la lesión por isquemia reperfusión. ^(4,5,9,10)

Mecanismos de Lesión Isquémica en los Organos Mesentéricos

Lesión por Hipoxia

En un tiempo se consideraba el principal mecanismo de lesión intestinal durante periodos de isquemia; a la hipoxia aún se le reconoce como un muy importante (pero solo uno de varios) factor que contribuye al daño tisular. De hecho, el mecanismo por el cual la hipoxia causa daño aún no se comprende por completo, pero el mecanismo de reserva para incrementar la extracción de oxígeno es formidable en el intestino. En estudios animales, el consumo de oxígeno puede caer a la mitad de su nivel normal durante periodos sostenidos sin lesión apreciable. Sin embargo, debajo de éste nivel crítico de consumo de oxígeno se presenta daño isquémico. Otros estudios han confirmado que el oxígeno, en lugar de otros nutrientes, es el factor crítico que determina si se sostiene lesión isquémica.

Conforme aumenta el grado de isquemia, se produce un espectro de lesión con un gradiente desde el interior de la pared intestinal hacia fuera. Esto genera una profundidad graduada de lesión desde la punta de la vellosidad hacia fuera a través de la muscularis propia. Grados muy leves de isquemia causan un desperfecto en la permeabilidad selectiva a moléculas grandes, manifestado inicialmente por capilares y posteriormente por la capa mucosa epitelial, pero sin cambio morfológico evidente. Conforme progresa la isquemia en duración o grado, se elevan y posteriormente se separan células epiteliales de las puntas vellosas. La sensibilidad aumentada de la punta vellosa se debe probablemente a una combinación de la arborización distal de la cama vascular vellosa y de la difusión contracorriente de oxígeno de arteriola a vénula en la base de la vellosidad, que reduce el aporte de oxígeno en una forma graduada, de la base a la punta de la vellosidad. Aunque éste efecto probablemente no es significativo bajo circunstancias fisiológicas normales, puede ser incrementado a un punto de significancia por flujo bajo, que permite más tiempo para que ocurra la difusión contracorriente. Después de niveles más severos de isquemia se presenta una pérdida epitelial extensa y posteriormente daño submucoso. Aunque la capa mucosa puede regenerarse después de un daño isquémico a partir de las células epiteliales contenidos en las glándulas sudoríparas y folículos pilosos después de una quemadura profunda de segundo grado; una vez que el daño penetra a través de la muscularis propia, se torna irreversible y por último resulta en una pérdida de la integridad intestinal y perforación. Una lesión profunda a la mucosa que en forma extensa involucra la submucosa pero que deja intacta la muscularis propia resulta en reemplazo por tejido cicatrizal y consecuente formación de estenosis.

Un componente importante del daño intestinal irreversible es la lesión endotelial microvascular, que activa trombosis microvascular y pérdida irreversible de viabilidad microvascular. La extensión de esta trombosis es la determinante principal de la habilidad que tiene el segmento isquémico para recuperarse después de la lesión isquémica. El tratamiento preliminar con anticoagulantes extiende (dobla) el periodo de insulto isquémico que puede tolerarse sin necrosis irreversible.

Lesión por Reperfusión

Aunque la hipoxia juega un papel en la lesión del órgano isquémico durante el periodo de hipoperfusión, una parte del daño se sostiene durante la reperfusión. El catabolismo de trifosfato de adenosina durante el periodo isquémico lleva a la acumulación de bases de purina, hipoxantina y xantina. La isquemia por sí misma media la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. A diferencia de la xantina deshidrogenasa, la xantina oxidasa requiere de oxígeno como un electrón receptor para la oxidación de purinas a ácido úrico. El resultado es la generación de radicales libres superóxido (O_2) cuando se dispone de oxígeno, en exceso, durante la reperfusión. Esta generación de superóxido desencadena una cascada clásica de radicales libres, que produce lesión microvascular y por último en lesión de células parenquimatosas. Los oxidantes reactivos amplifican más aún esta lesión reclutando y activando neutrófilos circulantes, que en turno participan en el daño endotelial y epitelial a través de la liberación de factores citotóxicos, proteasas, citocinas y radicales libres. Además de los enterocitos en el intestino y los hepatocitos en el hígado, las células endoteliales son una fuente abundante de xantina oxidasa. Además, por este mecanismo desencadenante puede servir como un indicador de lesión por reperfusión mediada por radicales libres en otros órganos y el intestino.

Una vez que se describió la patogénesis de lesión por reperfusión, el bloqueo de metabolitos tóxicos de oxígeno se convirtió en un blanco obvio para la intervención terapéutica. Granger y colaboradores encontraron que la dismutasa superóxido, un acarreador de radicales libres tóxicos de superóxido, administrados justo antes de lesión por reperfusión atenuaba la lesión al intestino delgado de la rata. Similarmente, la inhibición de la oxidasa xantina por alopurinol no únicamente prevenía el daño microvascular (como la dismutasa superóxido) sino también aminoraba el daño celular del epitelio intestinal. Sin embargo, otros estudios no han demostrado un efecto benéfico en la ablación de radicales libres. La explicación probable para estas discrepancias es que existe una ventana terapéutica dentro del espectro del grado, y duración de la isquemia, durante la cual los efectos de lesión por reperfusión sobrepasan los efectos de isquemia y en la cual la interrupción de la cascada de radicales libres resulta en una disminución significativa de la lesión total sostenida. Periodos más largos o severos de hipoperfusión pueden producir lesión en la cual el componente isquémico sobrepasa por mucho el componente de reperfusión y en los cuales la eliminación de radicales libres tiene poco efecto. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos de isquemia intestinal reconocida clínicamente, el componente isquémico es el que predomina. ⁽⁶⁾

OBJETIVO GENERAL

- 1.- Determinar el efecto de los antioxidantes (alfa-tocofero y ácido ascórbico) en anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia-reperusión.

HIPÓTESIS

Si se ha demostrado que existen efectos deletéreos en isquemia-reperusión a nivel intestinal asociado a la formación de radicales libres de oxígeno y al daño a nivel microvascular y se conoce que los antioxidantes son un mecanismo de defensa para combatir los radicales libres y reducir las manifestaciones microvasculares de lesión por isquemia reperusión; entonces el ácido ascórbico y el alfatocoferol deben ser útiles para reducir el daño por reperusión a nivel intestinal, mejorando así la calidad de cicatrización de las anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia reperusión y prevenir la dehiscencia de anastomosis intestinal.

HIPÓTESIS DE NULIDAD

- 1.- El efecto de isquemia reperusión intestinal no aumenta la frecuencia de dehiscencia de anastomosis
- 2.- Los antioxidantes no previenen el daño por isquemia-reperusión, por lo que no previenen la dehiscencia de anastomosis intestinales en segmentos isquémicos reperfundidos.

DISEÑO

Estudio experimental, prospectivo, comparativo, ciego, transversal.

OBJETIVO GENERAL

- 1.- Determinar el efecto de los antioxidantes (alfa-tocofero y ácido ascórbico) en anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia-reperusión.

HIPÓTESIS

Si se ha demostrado que existen efectos deletéreos en isquemia-reperusión a nivel intestinal asociado a la formación de radicales libres de oxígeno y al daño a nivel microvascular y se conoce que los antioxidantes son un mecanismo de defensa para combatir los radicales libres y reducir las manifestaciones microvasculares de lesión por isquemia reperusión; entonces el ácido ascórbico y el alfatocoferol deben ser útiles para reducir el daño por reperusión a nivel intestinal, mejorando así la calidad de cicatrización de las anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia reperusión y prevenir la dehiscencia de anastomosis intestinal.

HIPÓTESIS DE NULIDAD

- 1.- El efecto de isquemia reperusión intestinal no aumenta la frecuencia de dehiscencia de anastomosis
- 2.- Los antioxidantes no previenen el daño por isquemia-reperusión, por lo que no previenen la dehiscencia de anastomosis intestinales en segmentos isquémicos reperfundidos.

DISEÑO

Estudio experimental, prospectivo, comparativo, ciego, transversal.

OBJETIVO GENERAL

- 1.- Determinar el efecto de los antioxidantes (alfa-tocofero y ácido ascórbico) en anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia-reperusión.

HIPÓTESIS

Si se ha demostrado que existen efectos deletéreos en isquemia-reperusión a nivel intestinal asociado a la formación de radicales libres de oxígeno y al daño a nivel microvascular y se conoce que los antioxidantes son un mecanismo de defensa para combatir los radicales libres y reducir las manifestaciones microvasculares de lesión por isquemia reperusión; entonces el ácido ascórbico y el alfatocoferol deben ser útiles para reducir el daño por reperusión a nivel intestinal, mejorando así la calidad de cicatrización de las anastomosis intestinales posterior a un evento de isquemia reperusión y prevenir la dehiscencia de anastomosis intestinal.

HIPÓTESIS DE NULIDAD

- 1.- El efecto de isquemia reperusión intestinal no aumenta la frecuencia de dehiscencia de anastomosis
- 2.- Los antioxidantes no previenen el daño por isquemia-reperusión, por lo que no previenen la dehiscencia de anastomosis intestinales en segmentos isquémicos reperfundidos.

DISEÑO

Estudio experimental, prospectivo, comparativo, ciego, transversal.

MATERIAL Y METODOS

Universo

Conejos machos Nueva Zelanda, sanos, con un peso entre 3 y 4 kilogramos.

Tamaño de la Muestra

Se utilizaron 45 conejos machos de laboratorio, divididos en tres grupos:

- Grupo I: Conejos con suplemento de ácido ascórbico y alfatocoferol, sometidos a isquemia reperfusión.
- Grupo II: Conejos sin suplemento de ácido ascórbico y alfatocoferol, sometidos a isquemia-reperfusión.
- Grupo III: Conejos sin suplemento de antioxidantes y sin isquemia-reperfusión (Control).

Forma de asignación de los casos a cada grupo de estudio

Aleatoria.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión

Conejos machos sanos Nueva Zelanda con peso entre 3 y 4 kilogramos, con buen estado nutricional, sin cirugía previa y sin evidencia de enfermedad infecciosa.

Criterios de Exclusión

Conejos de laboratorio con patología previa al estudio, conejos incluidos en otros protocolos de investigación y conejos con cirugía previa.

Criterios de Eliminación

Muerte por complicaciones anestésicas.

Variables Independientes

- 1.- Edad
- 2.- Peso

Variables Dependientes de la Patología

- 1.- Efectos intestinales de lesión por isquemia-reperfusión
- 2.- Presentación de dehiscencia de anastomosis intestinales.

Variables Dependientes del investigador

- 1.- Dosis de Antioxidantes
- 2.- Tiempo de pinzamiento de la arteria mesentérica superior de la rata.
- 3.- Tiempo entre el proceso de isquemia-reperfusión y sacrificio del animal.
- 4.- Técnica y calidad de anastomosis intestinales. Experiencia del cirujano investigador en realizar anastomosis intestinales.

Parámetros de Medición

- 1.- Estadios de daño tisular por histopatología
- 2.- Porcentaje de dehiscencia de anastomosis por grupo de estudio.

PROCEDIMIENTO DE CAPTACIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Todos los estudios se realizaron en conejos machos Nueva Zelanda con un peso entre 3 y 4 kilogramos que se asignaron en forma aleatoria, a uno de tres grupos experimentales. Todos los animales fueron manejados de acuerdo a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Los animales se alojaron en jaulas individuales y fueron alimentados de la siguiente forma:

Grupo I: Se alimentaron a base de comida para conejos (Lab Rabbit diet) y agua a libre demanda, adicionando 3mg/100g de peso de vitamina E y 10 mg de vitamina C al alimento ingerido diariamente.

Grupo II: Los animales fueron alimentados exclusivamente a base de comida para conejos y agua a libre demanda

Grupo III: exclusivamente a base de comida para conejo y agua a libre demanda.

Los animales de los tres grupos fueron alimentados con las dietas mencionadas desde un periodo de una semana previa al inicio del estudio y continuaron con las dietas hasta ser sacrificadas.

Los animales se mantuvieron en ayuno 18 horas previas a cada procedimiento. No se administraron antibióticos durante el estudio. Los conejos fueron anestesiados con pentobarbital a dosis de 30 mg / Kg de peso y se monitorizó la temperatura rectal a 37°C. Los 15 conejos de cada grupo se sometieron a laparotomía, resección intestinal de 1 segmento de yeyuno a una distancia de 1 cm del ligamento de Treitz a las 24 horas posterior a la operación para el evento de isquemia-reperfusión. El periodo de isquemia intestinal causado por el cirujano fue de 30 minutos en los grupos 1 y 2, excepto en el grupo control.

Isquemia

Se les produjo isquemia intestestinal a los grupos I y II.

La isquemia intestinal se realizó en este modelo animal por una sutura de nylon colocada alrededor de la arteria mesentérica superior. Una laparotomía con incisión media se realizó bajo anestesia con pentobarbital a dosis de 30 mg /Kg de peso. Con el intestino retraído hacia la izquierda, se identificó la arteria mesentérica superior. Se utilizó un nylon de 3-0 para crear un aro alrededor de ella y después ambos extremos se pasaron a través de un tubo de doble lumen. Al traccionar la sutura, se eliminó las pulsaciones de las ramas arteriales mesentéricas y su liberación restauró las pulsaciones. El periodo de isquemia fue de 30 minutos, posterior al cual se liberó la arteria. La valoración se logró también al final del estudio por evaluación histológica.

Anastomosis intestinal

Posterior al periodo de isquemia, se realizó resección intestinal de 1 cm de intestino delgado a una distancia de 1 cm de l ligamento de Treitz y entero-entero anastomosis término-terminal en un plano, utilizando monofilamento (polipropileno de 5-0). Se realizó estudio histopatológico del segmento intestinal resecado.

Efecto de isquemia-reperfusión en la anastomosis intestinal

En cada uno de los grupos se sacrificaron a los conejos a las 24 horas. Previo al sacrificio se realizó por segunda ocasión, laparotomía y resección intestinal de 1 cm de intestino delgado, incluyendo el sitio anastomosado de la primer cirugía, identificado por la línea de sutura. Se realizó estudio histopatológico del segmento intestinal resecado. Una vez obtenido el segmento intestinal se procedió a abrirlo en forma longitudinal por su borde mesentérico, se extendió y se colocó en un corcho con alfileres, para fijarlo en una solución de Formol al 10%. Cada bloque se incluyó en parafina y se realizaron cortes de 4 micrómetros de espesor. Cada corte se montó y se tiñó con Hematoxilina y Eosina (H y E) y con PAS. Los cambios histológicos de la mucosa intestinal se evaluaron de acuerdo a Agren y Haglund de la siguiente manera:

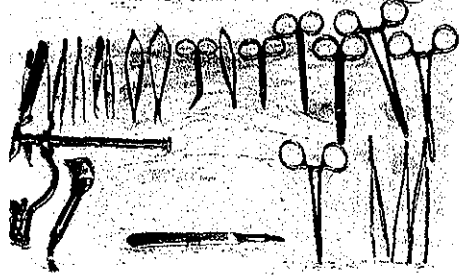
Características microscópicas de la estratificación de las lesiones de la mucosa intestinal

Grado	Mucosa		Submucosa y muscular
	Epitelio	Lámina propia	
0	Normal	Normal	Normal
I	Espacio subepitelial en las puntas de las vellosidades	Normal	Normal
II	Levantamiento del epitelio en la punta de las vellosidades	Normal	Normal
III	Levantamiento epitelial masivo	Hemorragia ocasional	Normal
IV	Denudamiento de la vellosidad	Hemorragia	Normal
V	Denudamiento de la vellosidad	Desintegración, hemorragia, ulceración	Hemorragia

Estructura del Estudio

La aleatorización de los animales para los grupos se realizó preparando papeles doblados con inscripción de signos de los grupos en forma ciega seleccionando uno de los papeles de un recipiente cerrado. Un patólogo realizó los estudios histológicos de los segmentos intestinales resecados al completar cada etapa del estudio para evaluar la lesión por isquemia-reperfusión y la cicatrización de la anastomosis intestinal.

Técnica Quirúrgica



Utilización de microscopio e instrumental de microcirugía



Laparotomía exploradora

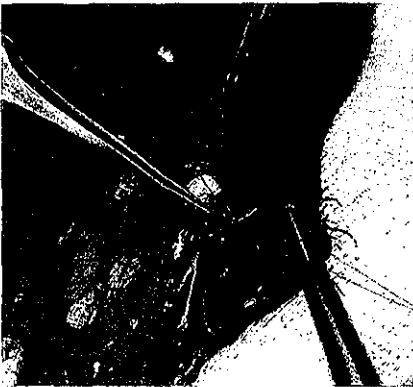


Producción de la isquemia mediante el pinzamiento de la arteria mesentérica superior

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Resección de 1 cm de intestino



Anastomosis intestinal en 1 solo plano con polipropileno 5-0 cardiovascular

Reintervención a las 24 horas con resección del segmento anastomosado para estudio histopatológico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba exacta de Fisher de dos colas para la evaluación de los resultados. Probabilidades menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RECURSOS

Humanos

Dr. Eduardo Cardenas Lailson: Captación de la información, procedimientos quirúrgicos y análisis de resultados.

Dra. Ivonne Cedillo Ley: Capatación de información, procedimientos quirúrgicos y análisis de resultados.

Dr. Juan Manuel Mijares García. Capatación de la información.

Dra. Blanca Eugenia Duffy Verdura. Capatación de la información.

Dra. Sara Parraguirre. Evaluación histopatológica de las muestras obtenidas.

Materiales

45 Conejos de Laboratorio raza Nueva Zelanda, alimento para conejo Lab Rabbit diet , agua, jaulas para conejos.

Acido ascórbico y alfatocoferol.

Equipo de venoclisis, equipo de cirugía, material de sutura (prolene 5-0 y del 0 , tubo látex doble lumen)

Microscopio óptico para estudio histopatológico y tinciones especiales.

Material de oficina.

Computadora Hewlett Packard Pavilion 877 1C

Monitor Hewlett Packard M50

Impresora HP Laser Jet 1100

Hoja de captura de datos

Financieros

Del hospital.

RESULTADOS

Se estudiaron a 45 conejos, los cuales fueron divididos en 3 grupos. (Tabla1)
Todos los animales fueron alimentados con dietas para conejo (Lab Rabbit diet) y con agua a libre demanda, esto desde una semana previa a la primer cirugía y la continuaron hasta ser sacrificados.

Tabla 1

Grupo	Número
I Con suplemento de antioxidantes 3mg/100g de peso corporal de vitamina E y 10mg de vitamina C + isquemia intestinal.	15
II Sin suplemento de antioxidantes e isquemia intestinal	15
III Sin suplemento de antioxidantes , sin isquemia intestinal	15

Todos los animales fueron sometidos a laparotomía exploradora a través de línea media, bajo anestesia con pentobarbital. A los grupos I y II se les realizó isquemia intestinal por un periodo de 30 minutos, esto a través de la ligadura temporal de la arteria mesentérica superior por una sutura de nylon, y posteriormente liberándola, con lo que se restauró el pulso arterial. Al grupo III no se le realizó isquemia intestinal. Al terminar el periodo de isquemia en el grupo I y II se les reseco 1 segmento de aproximadamente 1 cm de intestino delgado y se envió a estudio histopatológico. A todos los conejos se les realizó anastomosis término-terminal con prolene 5-0. Al grupo III solo se realizó la resección intestinal y posteriormente la anastomosis término-terminal con prolene del 5-0. Todos los animales fueron reintervenidos a las 24 hrs de la primera cirugía y se les reseco el segmento anastomosado para estudio histopatológico y fueron sacrificados los animales con sobredosis de pentobarbital.

Se eliminaron a 5 conejos, 3 del grupo I y 2 del grupo III por complicaciones anestésicas. No hubo dehiscencias de las anastomosis intestinales.

Complicaciones por grupo:

Grupo I.- Una eventración, una obstrucción intestinal por adherencias
Grupo II.- Una obstrucción intestinal a nivel de la anastomosis intestinal
Grupo III.- Sin complicaciones

Resultados de la primera muestra obtenida: Tablas 2, 3, 4 y 5

En el grupo I se encontró que el epitelio fue normal en 11 conejos y 1 presentó denudamiento de las vellosidades. En cuanto a la lámina propia, en 11 conejos fue normal y uno con desintegración, hemorragia y ulceración. La submucosa fue normal en los 12 casos.

En el grupo II la mucosa, la lámina propia y la submucosa fueron normales en los 15 conejos.

En el grupo III se encontró que el epitelio y la submucosa fueron normales en los 13 conejos; la lámina propia fue normal en 12 casos y uno presentó hemorragia.

Con los datos obtenidos de la primera muestra no hubo diferencias significativas en los tres grupos de estudio en cuanto a cambios en el epitelio, lámina propia y en la submucosa.

Estos cambios se encuentran en las tablas 2 a 5.

PRIMERA MUESTRA

Tabla 2. Epitelio

Grupo	Casos	Clasificación
I	11	0 Normal
	1	IV Denudamiento de las vellosidades
II	15	0 Normal
III	13	0 Normal

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 3. Lámina propia

Grupo	Casos	Clasificación
I	11	0 Normal
	1	V Desintegración, hemorragia, ulceración
II	15	0 Normal
III	12	0 Normal
	1	III Hemorragia ocasional

Tabla 4. Submucosa y muscular

Grupo	Casos	Clasificación
I	12	0 Normal
II	15	0 Normal
III	13	0 Normal

Tabla 5. Observaciones de la Primera muestra

Grupo	Casos	Clasificación
I	1	Necrosis de centros germinales de tejido linfoide
II	1	Sangre en la luz intestinal
III	1	Congestión
	3	Hemorragia en la serosa

De las muestras que se obtuvieron a las 24 horas de la primera cirugía (zona anastomosada) se encontraron los siguientes cambios en el epitelio:

Segunda Muestra (Sacrificio a las 24 hrs)

Tabla 6. Epitelio

Grupo	Casos	Clasificación
I	13	V Denudamiento de la vellosidad
II	1	0 Normal
	14	V Denudamiento de la vellosidad.
III	1	0 Normal
	12	V Denudamiento de la vellosidad.

Hallazgos del epitelio

Grupo II

- 1 Ulceras en zona de sutura y presencia de músculo liso.
- 2 Neutrófilos +++

Grupo III

- 3 Neutrófilos

Tabla 7. Lámina propia

Grupo	Casos	Clasificación
I	1	0 Normal
	11	V Desintegración, hemorragia, ulceración
II	1	0' Normal
	14	V Desintegración, hemorragia, ulceración
III	13	0 Normal
		V Desintegración, hemorragia, ulceración

Hallazgos de la lámina propia:

Grupo I

Ninguno

Grupo II

1 Neutrófilos +++

Grupo III

1 Necrosis coagulativa

2 Neutrófilos +++

Tabla 8. Submucosa y muscular

Grupo	Casos	Clasificación
I	12	V Hemorragia
II	1	0' Normal
	14	V Hemorragia
III	13	V Hemorragia

Al realizar el análisis de los cambios observados en el epitelio, lámina propia y submucosa de los tres grupos de estudio en la segunda muestra que corresponde al segmento anastomosado, no se observaron diferencias significativas.

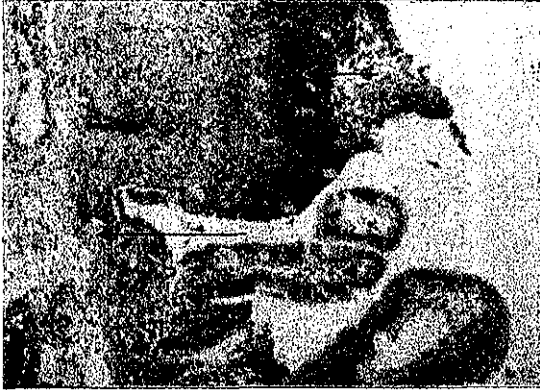
Tampoco hubo diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a los neutrófilos, edema fibroblastos y hemorragia

En la segunda muestra hubo diferencia significativa ($p= 0.007$) entre el grupo I y grupo II en la desintegración de la submucosa y muscular, al igual que con la hemorragia y ulceración de la submucosa y muscular ($p= 0.043$ y $p= 0.007$ respectivamente).

No hubo diferencia significativa entre el grupo I y II del epitelio en cuanto a las úlceras y a los neutrófilos, así como en los neutrófilos del epitelio entre el grupo II y grupo III.

No hubo diferencia significativa en los neutrófilos de la lámina propia entre el grupo I y II y entre el grupo II y III, así como en la necrosis entre el grupo II y grupo III.

Estudio Histopatológico



Microfotografía 1.-
Primera muestra del Grupo 1:
hemorragia (flecha), edema del
epitelio (cabeza de flecha) e
infiltrado inflamatorio (flecha larga)



Microfotografía 2.-
Primera muestra del Grupo2:
hemorragia (flecha), necrosis
coagulativa (cabeza de flecha) e
infiltrado inflamatorio (flecha larga)



Microfotografía 3.-
Segunda muestra del Grupo2:
hemorragia (flecha), edema
(cabeza de flecha) e necrosis
(flecha larga)

DISCUSIÓN

El daño celular por isquemia es bifásica, con lesión que inicia con la isquemia y se exagera durante la reperfusión. El daño por reperfusión es mediado por la interacción de radicales libres, factores endoteliales y neutrófilos. El efecto más dañino de los radicales libres es la peroxidación de lípidos que resulta en daño estructural y funcional de la célula.⁽⁶⁾ Mientras varios radicales libres se producen, el más reactivo es el radical hidroxil, el cual es capaz de iniciar la peroxidación de lípidos. La mayoría de los radicales libres de oxígeno pueden ser producidos por la reducción o excitación de las moléculas de oxígeno. La enzima xantina-oxidasa es la mayor fuente de radicales libres en tejido post-isquémico. Durante la isquemia la xantina-oxidasa se produce por conversión de la xantina-deshidrogenasa, la cual se acumula en los tejidos.

La reperfusión puede producir daño sistémico, especialmente cardiaco y pulmonar, mediada por bioproductos tóxicos de la alteración celular, por ejemplo iones potasio, ácido láctico, enzimas musculares y mioglobina. Los neutrófilos también juegan un rol pivote en la lesión sistémica. Los neutrófilos activados en la vasculatura pulmonar predisponen al síndrome de dificultad respiratoria.

En situación clínica, la naturaleza y rapidez de el proceso de isquemia se puede afectar por dos factores: Circulación colateral y desórdenes de la autorregulación esplácnica. En humanos la circulación colateral que protege al intestino de la isquemia ocurre por la segunda y tercer arcadas del intestino delgado, la arteria marginal de Drumond, el arco de Riolo, el arco de Bühler, así como los vasos de la submucosa que existen en todo el intestino.

Las terapias basadas en abordajes fisiológicos (superóxido dismutasa, catalasa, óxido nítrico), farmacológico (manitol, alopurinol y antioxidantes) y físicos (isquemia preconditionante, hipotermia, reperfusión hipóxica) se han utilizado para limitar el daño secundario a la isquemia – reperfusión.

Para prevenir el daño tisular secundario a isquemia-reperfusión se han utilizado los **antioxidantes**, que son agentes que interrumpen la peroxidación, previenen el daño y la producción de peróxidos y otros radicales libre.⁽⁶⁾ Muchos antioxidantes han sido utilizados de forma experimental para demostrar sus efectos citoprotectores, estos incluyen a la vitamina E, el propranolol, bloqueadores de los canales de calcio.

La dieta con vitamina E puede atenuar efectivamente la peroxidación de lípidos; inhibe la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados en la membrana de fosfolípidos o lipoproteínas plasmáticas. Se ha postulado que a través de este mecanismo, la vitamina E puede disminuir las lesiones causadas por la isquemia-reperusión. Esto ha sido corroborado en varios estudios donde hay disminución de la vitamina E en plasma y tejidos posterior a un evento de isquemia-reperusión⁽⁶⁾

En nuestro modelo de isquemia reperusión no fue de utilidad la suplementación en la dieta con antioxidantes (vitamina E y vitamina C) para atenuar el daño por isquemia- reperusión.

Debido a los diferentes resultados en múltiples estudios de investigación, en cuanto a la efectividad de los antioxidantes, se ha sugerido que probablemente se necesite combinar varios fármacos que actúen de diferente manera para tratar de aminorar el daño producido por la isquemia-reperusión, ya que una sola modalidad terapéutica no logra limitar efectivamente este daño.

CONCLUSIONES

El suplemento en la dieta con alfa-tocoferol y ácido ascórbico, no mostró tener efectos protectores sobre las anastomosis intestinales administrados 1 semana previa al evento de isquemia-reperfusión en intestino delgado en nuestro modelo en conejos.

Se ha reportado que se necesita combinar varias terapias para aminorar el daño por isquemia-reperfusión como son: antioxidantes alfa-tocoferol, propranolol, bloqueadores de los canales de calcio, captopril; inhibidores de la producción de radicales libres: inhibidores de la xantin-oxidasa; manitol, histidina, nafazatrom, catalasa, superóxido dismutasa, alopurinol, antiproteasas, hipotermia.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Udassin R., Ejmerl D., Schiffman J.; Postischemic intestinal motility in rat is inversely correlated to length of ischemia. *Dig Dis Sci.* 1995;40(5):1035-1038
- 2.- Dipak,K.: Cellular, Biochemical and Molecular Aspects of Reperfusion injury. *Ann of The N.Y. Acad of Sci.*1994;723:209-228
- 3.- Ar'Rajab A.: Reperfusion Injury. *New Horiz* 1996;4(2):224-234
- 4.- Dipak K.: antioxidant Effectiveness in Ischemia-Reperfusion Tissue Injury. *Methods in Enzymology.* 1994; 233:601-618
- 5.- Willy Ch., Thiery J., Menger M., et al.; Impact of Vitamin E supplement in Standard laboratory animal diet on microvascular manifestation of ischemia/reperfusion injury: *Free Radic. Biology & Medicine* 1995;19(6):919-926
- 6.- Montgomery R.: Mesenteric Vascular Insufficiency. *Current Problems in Surgery* 1997;34(12):943-997
- 7.- Grace P.A.; Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647
- 8.- Hernández L.A., Grisham,M.B.; Role of Neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am.J. Physiol.* 1987;253:H699-H703
- 9.- Yoshikawa T., Ysuda,M.; Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion. *Am. J. Clin. Nut* 1991;53:210S-214S.
- 10.- Sokol, R.J., McKim J.M., Colby G.; Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* 1998;114:164-174
- 11.- Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British Journal of Experimental pathology* 1989;70:737-57

12.- McCord J.M.; Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985;312-:159-63

13.- Maxwell S.R.: Prospects for the Use of Antioxidant Therapies. Drugs 1995;49(3):345-361

14.- Kukreja R.C., Hess M.L.; The oxygen free radical system:from equations through membrane protein interactions to cardiovascular injury and protection. Cardiovasc Res 1992;26:641-55

15.- Boley S.J., Freiber W., et al. Circulatory responses to acute reduction of superior mesenteric arterial flow. Physiologist 1969;12:180

16.- Feldman M., Scharschmidt B.F., Sleisenger M. Enfermedades Gastrointestinales y Hepáticas. 6^a. Edición . tomo 2. Editorial Panamericana. 2000.