

# Consecuencias del preconditionamiento sobre los efectos de la isquemia intestinal en un modelo experimental en ratas

L. Hernández Cosido\*, J. García García\*\*, F.J. García Criado\*\*, M.D. Ludeña Cruz\*\*, M.A. Benito Persona\* y A. Gómez Alonso\*\*\*

\*Médico Adjunto. Servicio de Cirugía General. \*\*Profesor Titular de Cirugía. Médico Adjunto. \*\*\*Catedrático de Cirugía. Jefe de Departamento. Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

## Resumen

**Introducción.** El preconditionamiento isquémico se define como el efecto protector frente a la isquemia de larga duración experimentado por un órgano si previamente ha sido sometido a cortos períodos de isquemia. El fenómeno no es bien conocido y su duración y el grado de protección que proporciona varía según el tipo de tejido y modelo experimental utilizado. El objetivo de la presente publicación es estudiar el efecto del preconditionamiento en un modelo de isquemia/reperfusión intestinal en la rata evaluando los valores de superóxido dismutasa (SOD), principal enzima detoxificante, frente a los radicales libres del oxígeno, la lesión histológica y la mortalidad.

**Material y métodos.** Se han utilizado ratas adultas, aleatoriamente asignadas a tres grupos: grupo simulado, grupo control en el que se provocó isquemia intestinal y grupo de estudio en el que, antes de la isquemia, los animales fueron sometidos a preconditionamiento. La isquemia se realizó por pinzamiento de la arteria mesentérica en su origen durante 90 min. El preconditionamiento consistió en 5 min de isquemia seguidos de 10 min de reperfusión previos a la isquemia de 90 min. Estudiamos la supervivencia a las 24 y 72 h, los niveles de SOD en la pared intestinal y los cambios morfológicos de la mucosa intestinal.

**Resultados.** En los animales sometidos a preconditionamiento, se evidencian mayores valores de SOD y un incremento de la supervivencia con respecto a los grupos sin preconditionamiento, tanto a las 24 h (el 84 frente al 73%) como a las 72 h (el 83 frente al 53%) aunque estas diferencias no resultan significativas. El estudio histológico objetiva un menor grado

de lesión de la pared intestinal en los animales sometidos a preconditionamiento (predominio de lesiones de los grados I y II de Chiu).

**Conclusiones.** La realización de cortos períodos de isquemia intestinal provoca aumento de la resistencia del intestino a isquemias posteriores de mayor duración. Este efecto beneficioso se objetiva por un incremento de la supervivencia y un menor grado de lesión histológica del intestino, y se asocia con valores significativamente más elevados de SOD en la pared intestinal.

**Palabras clave:** Preconditionamiento. Isquemia-reperfusión. Intestino delgado.

## CONSEQUENCES OF PRECONDITIONING ON THE EFFECTS OF INTESTINAL ISCHEMIA IN A RAT EXPERIMENTAL MODEL

**Introduction.** Ischemic preconditioning is defined as a protective effect that develops after brief ischemia and induces tolerance to a subsequent, otherwise lethal, ischemic insult. The process is not well known and its duration and the degree of protection it confers varies according to the type of tissue and the experimental model. The aim of this study was to analyze the effect of preconditioning in an intestinal ischemia-reperfusion rat model by assessing survival, superoxide dismutase (SOD) concentrations, the main detoxifying enzyme, free oxygen radicals, histologic damage in the intestinal wall, and mortality.

**Material and methods.** Adult rats were randomized to three groups: sham group, the control group in which intestinal ischemia was provoked, and the study group in which the animals underwent preconditioning prior to ischemia. Preconditioning was achieved by 5 minutes of intestinal ischemia followed by 10 minutes of reperfusion. Intestinal ischemia was provoked by clamping the superior mesenteric artery at its origin for 90 minutes. Survival at 24 and 72

Correspondencia: Dra. L. Hernández Cosido.  
Doña Petronila, 2, 1.º A. 37001 Salamanca.  
Correo electrónico: lcosido@yahoo.com

Aceptado para su publicación en noviembre de 2001.

hours post-ischemia, SOD concentrations in the intestinal wall and morphologic changes in intestinal mucosa were assessed.

**Result.** Animals who underwent preconditioning showed higher SOD concentrations and longer survival than those without preconditioning, both at 24 hours (84% vs. 73%) and at 72 hours (83% vs. 53%), although these differences were not significant. Histologic study revealed that damage in the intestinal wall was lesser in animals that underwent preconditioning (predominance of Chiu grades I and II).

**Conclusions.** Short periods of intestinal ischemia increased tolerance to subsequent longer periods of ischemia. This protective effect was demonstrated by increased survival and a lower degree of histologic lesion in the intestinal wall and was associated with significantly increased SOD concentrations in the intestinal wall.

**Key words:** Preconditioning. Ischemia-reperfusion. Small intestine.

## Introducción

Pese a los avances diagnósticos y terapéuticos, la isquemia intestinal sigue siendo un problema clínico de excepcional gravedad, y constituye un tema de constante interés en la investigación. Desde la primera descripción del fenómeno de preconditionamiento isquémico (PCI) por Reimer (1989)<sup>1</sup> el tema suscitó enorme interés tanto por sus implicaciones experimentales (de conocimiento de la fisiopatología y de los mecanismos íntimos de producción de la lesión isquémica) como por sus posibles implicaciones terapéuticas<sup>2</sup>.

El fenómeno ha sido estudiado en diferentes modelos experimentales que difieren en la duración tanto del período de isquemia como del de reperfusión antes de la isquemia definitiva<sup>3,4</sup>. En clínica humana se ha puesto de manifiesto recientemente en el hígado<sup>5</sup>. Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de publicaciones aún no se conoce la naturaleza íntima del fenómeno, en el que se ha visto que intervienen o que está mediado por diversas sustancias<sup>6-11</sup> y es probable que la importancia de uno u otro mecanismo dependa, al menos en parte, del órgano.

Es conocido que gran parte del daño inducido por la reperfusión está mediado por una sobreproducción de radicales libres del oxígeno (RLO) que superan los mecanismos fisiológicos de neutralización, lo que se conoce como estrés oxidativo<sup>12</sup>. El efecto favorecedor del PCI se explicaría por cambios en la situación de estrés oxidativo que hacen al órgano más resistente a isquemias ulteriores de larga duración.

El objetivo de este estudio es clarificar el efecto del preconditionamiento en un modelo de isquemia intestinal perfectamente validado por nuestro grupo en estudios previos<sup>13</sup> sobre otros aspectos de la isquemia-reperfusión intestinal. Para ello estudiamos la supervivencia a las 24 y 72 h, las lesiones histológicas que se producen en la

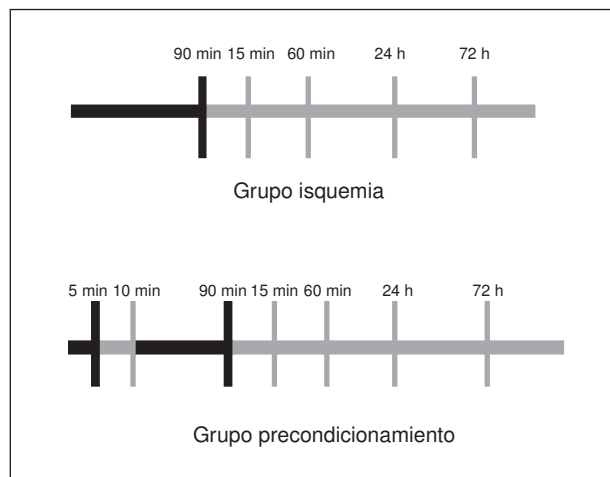


Fig. 1. Grupos de estudio.

mucosa intestinal y el comportamiento de la principal enzima detoxificante de los RLO, la superóxido dismutasa (SOD).

## Material y métodos

Hemos utilizado ratas adultas, hembras, de la cepa Wistar, con un peso medio de 225 g que fueron mantenidas exclusivamente con agua ad libitum durante las 12 h previas a la intervención quirúrgica. Durante todo el proceso de experimentación se siguieron estrictamente las normas sobre utilización y cuidado de los animales utilizados en investigación recogidas en las disposiciones del Consejo de Europa 86/609/CEE y ratificadas por nuestro país: Real Decreto 223/1988 y Disposición general N.º 25805, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### Técnica quirúrgica

Los animales fueron sometidos a una anestesia general intraperitoneal con una mezcla de ketamina a una dosis de 75 mg/kg de peso, diazepam a una dosis de 50 mg/kg de peso y atropina a una dosis de 20 mg/kg de peso y asignados de modo aleatorio en los diferentes grupos de estudio (fig. 1).

1. Grupo simulado: un total de 30 animales sometidos a todas las maniobras, incluyendo la liberación de la arteria mesentérica superior, excepto su pinzamiento.
2. Grupo isquemia (I): un total de 30 animales sometidos a una isquemia intestinal de 90 min.
3. Grupo preconditionamiento (PC): un total de 20 animales sometidos a preconditionamiento isquémico antes de la realización de la isquemia intestinal de 90 min.

La isquemia intestinal fue provocada colocando una pinza vascular traumática en la arteria mesentérica superior, lo más próximo posible a su nacimiento en la aorta. Transcurrido el período de isquemia, la pinza vascular es retirada y se comprueba la revascularización por la recuperación del latido arterial en las arcadas mesentéricas. Cuando no se consiguió la recuperación del latido arterial en las arcadas el animal fue retirado del estudio.

El preconditionamiento consistió en 5 min de isquemia intestinal seguidos de 10 min de revascularización previos a la isquemia de 90 min.

Las muestras de intestino delgado para el estudio histológico y la determinación de la SOD se tomaron siempre a 5 cm de la válvula ileocecal. Se tomaron muestras inmediatamente después de finalizado el pe-

TABLA 1. Valores de SOD (U/mg proteínas) expresados como media  $\pm$  EE

Subgrupos	Isquemia (I)	Precondicionamiento (PC)
I	63,4 $\pm$ 2,2	52,7 $\pm$ 2,3
R15	53,8 $\pm$ 2,3	58,1 $\pm$ 3,3
R60	77,6 $\pm$ 3,6	91,0 $\pm$ 2,6*
R24	86,5 $\pm$ 5,8	110,3 $\pm$ 5,6*
R72	75,7 $\pm$ 5,4	88,4 $\pm$ 4,3

\*p = 0,05. EE: error estándar; I: isquemia; R15: revascularización de 15 min; R60: revascularización de 60 min; R24: revascularización de 24 h; R72: revascularización de 72 h.

río de acondicionamiento (grupo PC), a la finalización de la isquemia de 90 min (subgrupos I y PC-I), a los 15 min de revascularización (subgrupos R-15 y PC-R15), a los 60 min (subgrupos R-60 y PC-R60) y a las 24 y 72 h de la misma (subgrupos R-24, R-72, PC-R24 y PC-R72, respectivamente).

La supervivencia se determinó a las 24 y 72 h.

### Medida de la SOD en homogeneizado de pared intestinal

La medida de la actividad SOD en la pared intestinal fue determinada valorando la inhibición de la autooxidación de la adrenalina según la técnica de MISRA y FRIDOVICH<sup>14</sup>. Alícuotas de homogeneizado de pared intestinal fueron ultracentrifugadas (fracción soluble) y mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de la prueba y fueron añadidos a una solución de 0,05 ml/l de carbonato sódico ajustando el pH a 10,2.

Posteriormente se añadió epinefrina hasta alcanzar una concentración final de 9,10-4 mol/l y se valoró el aumento de la absorción a 480 nm durante 6 s en un espectrofotómetro BECKMAN D U-5. El porcentaje de aumento al minuto 4 (el punto medio de la porción lineal de la curva) se usó para el cálculo del porcentaje de inhibición de la autooxidación de la adrenalina. Las proteínas de la fracción soluble fueron medidas utilizando un refractómetro Shibuya Optical LTD.

Los valores se han expresado en UI de SOD por mg de proteína de la fracción soluble. Se define como U de SOD la cantidad de enzima que es capaz de producir la inhibición del 50% de la autooxidación de la adrenalina.

### Análisis histológico

El estudio histológico del intestino de la rata se efectuó sobre segmentos de 2 cm de longitud. Se realizó recuento de 500 vellosidades intestinales de la muestra, valorándose el porcentaje y el grado de lesión, según los criterios de Chiu modificados<sup>15</sup>:

- Grado 1: vellosidad normal.
- Grado 2: denudación del tercio apical del epitelio de revestimiento de la vellosidad.
- Grado 3: denudación de la parte media, engrosamiento del corion con congestión y/o hemorragia en el tercio distal.
- Grado 4: denudación total de la vellosidad, afección del corion con edema, congestión y/o hemorragia en toda la vellosidad.
- Grado 5: desintegración con necrosis total de la vellosidad y corion.

### Estudio estadístico

Expresamos los resultados de las variables cuantitativas con el valor de la media y error estándar. La significación estadística de las diferencias entre los grupos se ha realizado mediante la prueba de la t de Student. Se han considerado como significativas estas diferencias cuando su nivel de significación era menor de 0,05.

## Resultados

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la ausencia de mortalidad en el grupo simulado y una supervivencia del 73 y el 53% a las 24 h y a las 72 h, respectivamente, en el grupo isquemia. En el grupo con acondicionamiento, se evidencia un incremento de la supervivencia, tanto a las 24 h (el 84 frente al 73%) como a las 72 h (el 83 frente al 53%) aunque esta diferencia no resulta significativa cuando se la compara con el grupo isquemia.

### Resultados de la determinación de la SOD

El acondicionamiento provoca una liberación de SOD ( $47 \pm 1,6$  U/mg prot) respecto a los valores basales detectados en la pared intestinal normal ( $29,9 \pm 1$  U/mg prot) ( $p = 0,001$ ).

Los valores de SOD en los primeros momentos (subgrupos I y R-15) son mayores en el grupo sometido a acondicionamiento, aunque las diferencias no son significativas.

En las determinaciones posteriores en el grupo sometido a acondicionamiento los valores medidos de SOD son significativamente mayores que en el grupo isquemia (tabla 1).

### Estudio morfológico

El grado de lesión de la mucosa intestinal y el porcentaje de frecuencia en la muestra histológica se exponen en la figura 2.

En el grupo isquemia y 15 min de reperfusión predominan las lesiones de grado 3. Hay denudación completa de las vellosidades con gran necrosis apical y la mucosa aparece hemorrágica incluso con extravasación a la luz intestinal de células inflamatorias (fig. 3). A los 60 min de reperfusión predomina el grado 4 e incluso algunas en grado 5, estadios ambos de necrosis importante de la vellosidad intestinal. A las 24 y 72 h de reperfusión comienzan a aparecer imágenes de "regeneración" del proceso, que dificultan la visualización y valoración de las vellosidades y el grado de lesión.

En los animales sometidos a acondicionamiento el número de vellosidades en grados bajos (grados 1 y 2) es mucho mayor en todos los grupos. En estos animales a las 24 y 72 h de reperfusión la regeneración es mayor y el número de vellosidades denudadas es muy escaso, predominan las vellosidades revestidas por epitelio cúbico y/o cilíndrico (fig. 4).

## Discusión

Se entiende por acondicionamiento isquémico (PCI) el fenómeno por el cual la resistencia de un determinado órgano a la isquemia aumenta cuando previamente ha sido sometido a cortos períodos de isquemia<sup>16</sup>.

Desde los estudios de Reimer (1986)<sup>1</sup>, que pusieron de manifiesto que si el miocardio era sometido a períodos

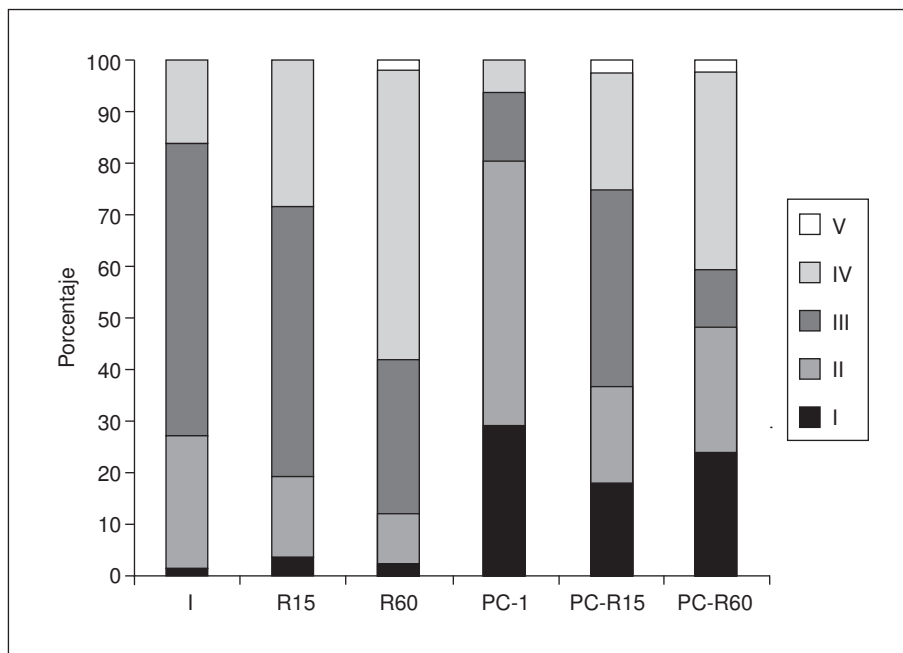


Fig. 2. Grado de lesión histológica según los grupos de estudio. I: isquemia; R15: revascularización de 15 min; R60: revascularización de 60 min; R24: revascularización de 24 h; R72: revascularización de 72 h; PC-I: preconditionamiento + isquemia; PC-R15: preconditionamiento + revascularización de 15 min; PC-R60: preconditionamiento + revascularización de 60 min.



Fig. 4.

Fig. 3.

de isquemia de 5 min de duración, isquemias ulteriores disminuían sensiblemente el tamaño del infarto, el tema ha sido objeto de numerosos estudios utilizando diferentes modelos experimentales. El grado de protección que otorga en ningún caso es completo y el fenómeno ha sido valorado utilizando diversos parámetros de respuesta (disminución de la extensión del infarto, perfil bioquímico, criterios histológicos, etc.)<sup>17</sup>.

Las circunstancias necesarias para la provocación del preconditionamiento varían en las distintas especies<sup>3-5</sup>. Tampoco se conoce la duración del período de protección pero parece que el preconditionamiento es bifásico, con una primera ventana de protección que puede durar hasta 3 h, seguida de una segunda, que puede llegar a las 72 h después de la oclusión<sup>18</sup>.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el fenómeno puede estar relacionado con la existencia de al-

teraciones en el metabolismo de las prostaglandinas<sup>6</sup>, de la adenosina<sup>7</sup>, factores de transcripción nucleares como el NFkB<sup>8</sup>, producción de radicales libres del oxígeno (RLO)<sup>3,9</sup>, metabolismo del óxido nítrico<sup>10</sup>, síntesis de enzimas antioxidantes<sup>12</sup>, expresión de moléculas de adhesión endotelial<sup>4</sup>, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), ceramidas<sup>11</sup>, entre otros. Estos mecanismos no son excluyentes entre sí y su importancia podría estar en relación con el tipo de órgano e incluso con el modelo de preconditionamiento utilizado.

Los órganos en los cuales el PCI ha sido inducido representan sistemas estables o permanentes (corazón, riñón, etc.) con poca o nula proliferación celular después de la diferenciación. No existe mucha información acerca de este fenómeno en sistemas orgánicos que contienen tejidos con un elevado *turnover*, como por ejemplo el tracto gastrointestinal donde el epitelio es reemplazado

cada 2-3 días. Según Osborne<sup>19</sup>, el desarrollo de la tolerancia parece estar asociado a un incremento del estado antioxidante de la mucosa.

Durante la isquemia-reperfusión se generan especies reactivas de oxígeno que en parte son las responsables de las lesiones atribuidas a la perfusión, produciéndose una situación de estrés oxidativo, es decir, una situación en la que los mecanismos de defensa de la mucosa son superados por la producción de RLO<sup>12</sup>.

Las células pueden adaptarse a estas situaciones hasta cierto punto, particularmente si se establecen de modo relativamente lento. El preconditionamiento actuaría bien disminuyendo la capacidad de producción de RLO o estimulando la producción de sistemas antioxidantes en virtud de los fenómenos de adaptación de las células a la isquemia o de ambas formas<sup>10,12</sup>.

Hemos utilizado un tipo de preconditionamiento (5 min de isquemia y 10 de perfusión)<sup>4,17,20</sup> sobre un modelo de isquemia utilizado previamente por nosotros para estudiar el fenómeno isquemia-reperfusión<sup>13</sup>.

La mortalidad aumentó de forma proporcional al tiempo de revascularización, y se produce en prácticamente la mitad de las ratas a las 72 h de perfusión. En nuestro modelo experimental, el grupo sometido a preconditionamiento isquémico presenta un incremento de la supervivencia tanto a las 24 h como a las 72 h. Este aumento de la supervivencia pone de manifiesto el papel protector que ejerce el preconditionamiento isquémico y podría ser la consecuencia final de los cambios bioquímicos y morfológicos, que ocurren en la mucosa intestinal.

Cuando se comparan los grupos se observa que en el grupo sometido a preconditionamiento tiene lugar una mayor liberación de SOD respecto al grupo sometido a isquemia sin preconditionamiento desde el inicio de la perfusión, seguramente en relación con cambios subyacentes en la producción de radical superóxido<sup>3,9</sup>, ligados a estimulación de factores de transcripción nucleares tipo NFκB<sup>9</sup>. La pared intestinal estaría así más protegida frente al daño por perfusión al tener valores más elevados de enzimas detoxificantes.

Nuestros resultados muestran que existe un aumento de SOD en relación con el tiempo hasta alcanzar el máximo valor a las 24 h. Estos resultados son concordantes con los trabajos de otros autores<sup>18</sup>, según los cuales el efecto protector de la SOD tendría un papel más importante en la fase tardía o segunda ventana de protección (a partir de las 24 h).

El análisis de los hallazgos histológicos pone de manifiesto el efecto protector del preconditionamiento en este modelo experimental de revascularización en intestino. Los animales sometidos a preconditionamiento presentan no sólo una reducción importante del grado 4 de lesión sino también del grado 3, a expensas de un aumento de los grados 1 y 2 (desarrollo de espacios de Grunhgen en el vértice de las vellosidades y ensanchamiento de los espacios con despegamiento de la lámina epitelial y lámina propia), que representa un estadio de lesión muy leve con posibilidad de *restitutio ad integrum* de las vellosidades.

A las 24 y 72 h de la perfusión lo más importante es el fenómeno de regeneración que ocurre. En el grupo de

preconditionamiento la regeneración es mayor y el número de vellosidades deformadas y denudadas es escaso.

En conclusión, según nuestro modelo experimental, el PCI puede ser inducido en el intestino y se asocia con un incremento de los niveles de SOD medidos en la pared intestinal. Esto tiene repercusión en la histología, ya que los resultados sugieren que la mucosa intestinal se hace más resistente a la isquemia-reperfusión.

## Bibliografía

1. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251:1306H-15H.
2. Bulkley GB. Preconditioning for protection from ischemic injury: Discriminating cause from effect from epiphenomenon. *Ann Surg* 2000;232:163-5.
3. Sola A, Hottter G, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. *Transplantation* 2000;69:767-72.
4. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korhuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999;277:2476H-2481H.
5. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:155-62.
6. Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Participation of prostaglandin E2 in the endothelial protective effect of ischemic preconditioning in isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2000;45:418-27.
7. Konturek SJ, Brzozowski T, Pajdo R, Konturek PC, Kwienien S, Sliwowski Z, et al. Gastric preconditioning induced by short ischemia: the role of prostaglandins, nitric oxide and adenosine. *Med Sci Monit* 2001;7:610-21.
8. Ravati A, Ahlemeyer, B Becker A, Klump S, Krieglstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear-kappaB. *J Neurochem* 2001;78:909-19.
9. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 1999;196:59-6.
10. Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. Nitric oxide, nitrates and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1999;43:621-7.
11. Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol* 2000;278:144C-53C.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52:253-65.
13. García García J, García Criado FJ, Zambrano Cuadrado Y, Silva Benito I, Benito Persona MA, Pina Arroyo J, et al. Radicales libres del oxígeno (RLO) y neutralizadores endógenos en la isquemia-reperfusión intestinal. *Cir Esp* 1995;57:412-6.
14. Misra HP, Fridovich Y. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170.
15. Chiu CJ, McArdle AH, Brohw R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low flow states. *Arch Surg* 1970;101:478-83.
16. Murry CE, Jennings PB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
17. Sumeray Ms, Yellon DM. Ischemic preconditioning. En: Grace PA, Mathie RT, editors. *Ischemia-reperfusion injury*. London: Blackwell Science Ltd., 1999; p. 328-43.
18. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G. Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci* 2001;25(69):1-15.
19. Osborne DL, Aw TY, Cepinskas G, Kvietys PR. Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. *J Clin Invest* 1994;94:1910-8.
20. Zhang Y, Wu YX, Hao YB, Dun Y, Yang SP. Role of endogenous opioid peptides in protection of ischemic preconditioning in rat small intestine. *Life Sci* 2001;68:1013-9.