

Modificaciones lesionales en la revascularización intestinal experimental mediante inmunosupresión

J. Ortiz Lacorzana *, I. García-Alonso Montoya **, A. Basáñez Amuchastegui **, I. López de Tejada Cabeza ***, E. Barberá-Guillem **** y J. Méndez Martín *****

Laboratorio de Cirugía Experimental (Catedrático J. Méndez Martín). Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco.

Resumen

Se ha investigado la relación existente entre la reacción linfóide producida en el síndrome de revascularización intestinal (SRI) y las lesiones mucosas características del mismo. En un modelo experimental en rata se han valorado el grado lesional, la respuesta regenerativa y la secreción mucosa tras tres tratamientos diferentes: esplenectomía, dexametasona y ciclosporina A (CsA). La dexametasona ha producido un claro agravamiento de los parámetros valorados. La esplenectomía ha presentado resultados poco significativos. El tratamiento con CsA ha producido una clara mejoría en los tres aspectos considerados. Se postula la participación de células de estirpe linfóide (posiblemente «Natural Killer») en la génesis de las lesiones mucosas del SRI.

Palabras clave: Síndrome de revascularización intestinal. Linfocitos. Corticoides. Esplenectomía. Ciclosporina.

Abstract

The relationship between lymphoid reaction in intestinal revascularization syndrome (IRS) and its characteristic mucosal lesions was studied. The lesion grading, regeneration response and mucous secretion was assessed in an experimental model on the rat, following three different treatments: splenectomy, dexametasona and cyclosporin A (CsA). Dexametasona induced marked worsening of the parameters under study. Splenectomy showed scarcely significant results. CsA treatment induced a noticeable improvement of the three aspects under consideration. The participation of lymphoid

cells (possibly «Natural Killer Cells») in the production of the mucosal lesions in IRS has been suggested.

Key words: Intestinal revascularization syndrome. Lymphocytes. Corticoids. Splenectomy. Cyclosporin.

Introducción

La isquemia mesentérica aguda ofrece un interesante campo de experimentación por lo intrincado de su fisiopatología y por su indudable importancia clínica para el cirujano. En ella se pueden distinguir dos aspectos: la patogenia de las lesiones locales y la fisiopatología de las repercusiones generales o sistémicas^{1,2}. Estas últimas, aunque inducidas por la agresión local, una vez iniciadas parecen seguir un curso propio y, hasta cierto punto, independiente^{3,4}.

Nuestro interés se ha centrado en los aspectos locales, especialmente a raíz de la nueva etapa abierta con la incorporación de los radicales libres de oxígeno a la patogenia de las lesiones por revascularización de órganos isquémicos⁵.

En las series de animales utilizadas para perfilar nuestro modelo quirúrgico de isquemia mesentérica aguda observamos la presencia constante de placas de Peyer hipertróficas y una infiltración linfóide del tejido conectivo en zonas alejadas de las placas de Peyer, sin que aumentaran los linfocitos intraepiteliales⁶. Este patrón histológico nos ha sugerido una reacción combinada de los diferentes tipos de linfocitos descritos como constituyentes habituales de la mucosa intestinal⁷.

La precocidad de esta reacción, su exacerbación durante la fase de revascularización y la similitud de las lesiones observadas con las que se describen por acción inmunológica⁸ nos han hecho pensar en una posible asociación entre la citada reacción linfóide y la patogenia de las lesiones mucosas del síndrome de revascularización intestinal (SRI).

* Profesor colaborador. ** Profesor titular interino. *** Profesor titular. **** Catedrático de Histología. ***** Catedrático de Patología Quirúrgica.

Recibido: 11/90.

Correspondencia: Dr. J. Ortiz Lacorzana.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Facultad de Medicina y Odontología.
B. Sarriena, s/n.
48940 Lejona (Vizcaya).

Por eso, el propósito de este trabajo ha sido estudiar las consecuencias que un entorpecimiento de la reacción linfóide puede tener sobre las lesiones del intestino isquémico sometido a revascularización. Para esta manipulación se ha previsto recurrir a tres mecanismos diferentes: uno mecánico (vía esplenectomía), otro inespecífico (corticoides) y otro altamente selectivo (ciclosporina A).

Material y métodos

El estudio se ha llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos (200 g de peso) suministradas por el estabulario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco. Los animales han estado sometidos a condiciones constantes de temperatura, ritmo luz/oscuridad y libre acceso a la comida (A04 de Panlab, S. L.) y al agua.

Con el fin de evitar las posibles variaciones debidas a los ritmos biológicos de los animales, las experiencias se han realizado siempre entre las nueve y las trece horas. Previa anestesia con pentobarbital sódico (35 mg/kg), se practicó laparotomía media y, tras abrir el retroperitoneo, se disecó y grapó la arteria mesentérica superior. La anulación del riesgo intestinal se comprobó apreciando el cese del latido en los vasos intestinales. La pared abdominal se cerró con sutura continua de seda 000. Dos horas después, y tras comprobar la eficacia de la isquemia y las alteraciones macroscópicas existentes, se retiró el clip y se investigó la recuperación de los latidos en territorio mesentérico. La herida laparotómica se cerró con puntos sueltos de seda 00. En todo momento se cumplieron las normas de la Draft Convention for the Protection of animals used for Experimental Purposes.

Se han utilizado un total de 50 animales de los que 10 constituyeron el grupo control (I); el resto fueron sometidos a ciento veinte minutos de isquemia. De éstos, 10 no recibieron tratamiento alguno (II), 10 recibieron una dosis de dexametasona (6 mg/kg i.p.) a los sesenta minutos de instaurarse la isquemia (III), 10 fueron tratados con ciclosporina A (CsA) (20 mg/kg i.p.) la víspera y cuatro horas antes de iniciar la isquemia (IV) mientras que los 10 restantes fueron esplenectomizados inmediatamente antes de restaurarse el flujo mesentérico (V).

Tras sacrificar los animales a los treinta minutos de retirar el grapaje, se procedió a extraer los seis últimos centímetros del íleon terminal. La pieza obtenida se dividió en seis fragmentos que se incluyeron en parafina.

Estudios estructurales

Sobre cortes histológicos teñidos con H-E y mediante una técnica semicuantitativa previamente descrita⁴,

se ha calculado el grado de lesión intestinal en cada animal.

Valoración de la regeneración epitelial

Se han utilizado dos técnicas complementarias: recuento de figuras mitóticas sobre tinciones de H-E (número promedio por fondo glandular), y cuantificación citofotométrica del DNA nuclear sobre tinciones de Feulgen (microespectrofotómetro UMSA-0,5, Carl Zeiss).

Actividad mucosecretora

La densidad numérica de células caliciformes se ha determinado contando su número en una *longitud tipo* de epitelio, y se ha especificado como *densidad celular por vellosidad*. Esta estimación se ha realizado con un microscopio de platina móvil motorizada, controlada por microprocesador. Para estimar la concentración de moco en los cortes histológicos se ha medido la concentración de azúcares terminales mediante citofotometría sobre tinción de PAS.

Estudios estadísticos

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante el test de *chi-cuadrado* y la *t* de Student.⁷ Se han considerado diferencias estadísticamente significativas a los valores con $p < 0,05$.

Resultados

Estudio estructural

El estudio semicuantitativo del grado lesional de la mucosa ha producido los siguientes resultados: grupo control, 2,4; dexametasona, 4,9; CsA, 1,1; y esplenectomía 1,8. El análisis estadístico de estos resultados (tabla I) ha demostrado que tan sólo la CsA logró dismi-

Tabla I
Resultados de la comparación del grado lesional mediante la prueba de *chi-cuadrado*

| | Normal | Lesión | χ^2 | P |
|----------------|--------|--------|----------|-------|
| Isq. + revasc. | 36 | 24 | — | — |
| Dexametasona | 11 | 49 | 21,86 | <0,01 |
| Esplenectomía | 42 | 18 | 1,32 | ns |
| Ciclosporina A | 49 | 11 | 6,82 | <0,05 |

nuir de forma significativa el grado de lesión. Por el contrario, las lesiones de los animales tratados con dexametasona sufrieron un agravamiento significativo.

Regeneración epitelial

El recuento del índice mitótico ha proporcionado los resultados que se expresan en la tabla II. Este índice está significativamente aumentado en el grupo control. Los animales tratados con dexametasona o esplenectomía presentan un índice mitótico significativamente inferior al del grupo control y que no se diferencia de los animales normales. En cambio, en el caso de los animales tratados con CsA, existe un aumento en este índice que, si bien no muestra diferencias estadísticamente significativas con el grupo control, tampoco lo hace con los animales normales.

Los resultados de la cuantificación citofotométrica del DNA nuclear se recogen en la tabla III. Todos los animales sometidos a isquemia y revascularización (con o sin tratamiento asociado) presentan un aumento en el contenido medio de DNA nuclear; sin embargo, dicho aumento es menor en aquellos animales tratados con CsA o sometidos a esplenectomía. El contenido medio en DNA de los animales tratados con dexametasona no muestra diferencias significativas frente al grupo control.

Tabla II

Índice mitótico de cada serie experimental y su comparación con animales normales y con el grupo control

| | Ind. mit. | DS | p frente a normal | p frente a Isq. + rev. |
|----------------|-----------|------|-------------------------|------------------------------|
| Normal | 0,65 | 0,24 | — | — |
| Isq. + revasc. | 0,95 | 0,28 | <0,05 | — |
| Dexametasona | 0,57 | 0,21 | ns | <0,05 |
| Esplenectomía | 0,77 | 0,24 | ns | <0,05 |
| Ciclosporina A | 0,80 | 0,27 | ns | ns |

Tabla III

Contenido medio en DNA de las células epiteliales expresado en unidades arbitrarias de DNA-Feulgen

| | Contenido DNA | DS | p frente a normal | p frente a Isq. + rev. |
|----------------|------------------|-------|-------------------------|------------------------------|
| Normal | 46,48 | 18,17 | — | — |
| Isq. + revasc. | 77,49 | 38,87 | <0,01 | — |
| Dexametasona | 93,14 | 89,38 | <0,01 | ns |
| Esplenectomía | 56,52 | 25,77 | <0,01 | <0,01 |
| Ciclosporina A | 64,29 | 25,66 | <0,01 | <0,01 |

Actividad mucosecretora

En la tabla IV se recogen los resultados del recuento de células caliciformes por fondo glandular. Tras la isquemia-revascularización no se aprecian variaciones significativas en el número de células caliciformes. Por el contrario, tanto los animales tratados con CsA como los sometidos a esplenectomía presentan un aumento significativo en el número de células caliciformes por fondo glandular. La dexametasona no ha modificado este parámetro.

En cuanto al contenido de secreción mucosa (estimado en función de la concentración de azúcares terminales) el modelo experimental utilizado no ha producido variaciones significativas. Sin embargo, los tres tratamientos ensayados han aumentado significativamente este parámetro (tabla V). Este aumento es especialmente significativo en el caso de la esplenectomía.

Discusión

Los estudios sobre la fisiopatología de la isquemia-revascularización intestinal se han venido centrando durante los últimos años en el papel que indudablemente juegan los radicales libres. Algunos autores^{9,10} han propuesto que estos radicales constituyen la vía efectora de una respuesta inflamatoria aguda mediada fun-

Tabla IV

Densidad celular por vellosidad, expresada en número de células/longitud tipo

| | N.º células | DS | p frente a normal | p frente a Isq. + rev. |
|----------------|----------------|-------|-------------------------|------------------------------|
| Normal | 24,00 | 6,37 | — | — |
| Isq. + revasc. | 31,60 | 12,28 | ns | — |
| Dexametasona | 32,24 | 8,92 | ns | ns |
| Esplenectomía | 38,32 | 7,08 | <0,01 | ns |
| Ciclosporina A | 33,72 | 6,13 | <0,05 | ns |

Tabla V

Concentración de azúcares terminales en el moco de las vellosidades intestinales

| | [Azúcar] | DS | p frente a normal | p frente a Isq. + rev. |
|----------------|----------|------|-------------------------|------------------------------|
| Normal | 9,31 | 3,33 | — | — |
| Isq. + revasc. | 6,66 | 3,67 | ns | — |
| Dexametasona | 13,66 | 4,32 | ns | <0,05 |
| Esplenectomía | 13,80 | 2,21 | <0,05 | <0,05 |
| Ciclosporina A | 13,52 | 3,80 | ns | <0,05 |

damentalmente por los neutrófilos. Durante la puesta a punto de nuestro modelo quirúrgico nos llamó la atención la hipertrofia de las placas de Peyer y la infiltración linfoide que presentaba el intestino durante el proceso de isquemia, así como su exacerbación tras la revascularización. Esto nos llevó a incluir dentro de la hipótesis fisiopatológica no sólo a los neutrófilos y su producción de radicales, sino también a células de estirpe linfoide, que serían activadas por las modificaciones bioquímicas inducidas en el medio intersticial por los radicales libres.

De acuerdo con esta hipótesis la dexametasona se ha utilizado por sus acciones generales antiinflamatorias: estabiliza las membranas lisosómicas y deprime la citólisis inmunodependiente, las acciones mediadas por inmunocomplejos, las reacciones de hipersensibilidad retardada y las propias células K citotóxicas.

La esplenectomía ha seguido producir una cierta depleción linfoide aguda que de alguna manera evite o dificulte el reclutamiento de linfocitos en la mucosa intestinal. Mientras que la CsA se ha elegido por su conocido efecto supresor sobre los linfocitos T citotóxicos. De esta manera los tres tratamientos deberían disminuir los efectos locales del SRI.

La utilidad de la estimación semicuantitativa del grado de lesión mucosa ha sido previamente discutida⁶. En cambio, los otros parámetros valorados no se habían usado con anterioridad en el síndrome de revascularización intestinal. La actividad mucosecretora y la respuesta regenerativa del epitelio intestinal tienen un doble significado: a) como reacciones que son a un estímulo irritativo pueden ser un índice relativo de éste; b) a su vez, su disminución o abolición puede traducir un daño tisular excesivo.

Los resultados obtenidos no se han adecuado plenamente a nuestras ideas iniciales. El empeoramiento del grado lesional en los animales tratados con dexametasona, si bien no previsto, tampoco resulta excesivamente sorprendente si se tiene en cuenta la gran variedad de efectos atribuidos a los esteroides¹¹. Sin embargo, la escasez de datos obtenidos en la revisión bibliográfica no nos ha permitido esbozar una teoría fisiopatológica que lo justifique.

Más llamativos han sido los resultados obtenidos con la CsA. Su acción positiva no podemos explicarla por un efecto general antiinflamatorio ni por la depleción linfocitaria (vistos los resultados de la esplenectomía). Por tanto habría que concluir que: a) la inmunosupresión específica inducida por la CsA es responsable del mejoramiento de las lesiones, o bien b) la CsA ejerce una acción directa, independiente del sistema inmunitario.

El efecto más conocido de la CsA es su inhibición de los linfocitos T en su respuesta de rechazo del injerto. Sin embargo, dada la precocidad del fenómeno lesional, no parece probable que sea éste el mecanismo de acción en nuestro caso. Ahora bien, existen datos

acerca de la capacidad de la CsA de inhibir la actividad «Natural Killer» merced a su bloqueo de la síntesis de interferón y de interleukina II¹². Teniendo en cuenta que las células NK no requieren de estimulación antigénica previa, esta posible vía de acción merece ser considerada con atención. En cualquier caso, para poder ofrecer una explicación consistente al efecto beneficioso de la CsA en el SRI resulta necesario realizar nuevos ensayos con tratamientos que «disequen» las diferentes acciones de este fármaco.

El estudio de la actividad regenerativa epitelial ha permitido afinar los datos obtenidos con la valoración del grado lesional. En el grupo control el aumento tanto del número de mitosis como de células en fase de síntesis, traduce la respuesta normal frente a una agresión¹³. También es lógico que al acentuarse la agresión (animales tratados con dexametasona) la respuesta regenerativa sea más difícil; esto se manifiesta por una disminución del número de células que, a los treinta minutos de revascularizar el intestino, han alcanzado la fase de mitosis. Pero, al ser mayor la agresión, también es mayor el número de células que intentan la división celular (fase S), aumentando por lo tanto el contenido medio de DNA.

En contraposición, los animales sometidos a esplenectomía presentan una disminución en el número de mitosis, que se acompaña de un menor contenido medio en DNA. Esto puede interpretarse como que la lesión mucosa es menos intensa (aunque esta mejoría no se manifieste en el grado lesional) y, por tanto, también es menor la respuesta regenerativa. O bien, podría considerarse que la esplenectomía no sólo no mejora el grado lesional, sino que también frena de manera global la respuesta regenerativa del epitelio intestinal frente a la agresión isquémica.

En el caso de los animales tratados con CsA el descenso experimentado por la respuesta regenerativa puede considerarse consecuencia lógica de una menor agresión epitelial.

El aumento de la secreción mucosa en el intestino es una respuesta inespecífica a los estímulos irritativos¹⁴. Sin embargo, el daño provocado por la isquemia y revascularización han frenado esta respuesta. En los animales tratados con dexametasona pudo observarse el mismo fenómeno, lo cual es lógico si consideramos que este tratamiento, lejos de mejorar el cuadro, lo ha empeorado. Por último, tanto la esplenectomía como la CsA han permitido, en el intestino dañado, la recuperación de la respuesta mucosecretora.

Conclusiones

Desde un punto de vista metodológico puede concluirse que el estudio de la actividad mucosecretora y regenerativa epitelial son pruebas que aportan pocos

datos en la valoración de la intensidad de las lesiones en el SRI.

El tratamiento con CsA (a las dosis empleadas) determina una disminución de las lesiones provocadas por la isquemia y revascularización intestinales. Este efecto se acompaña además de la normalización del índice mitótico y del contenido medio en DNA del epitelio, y no interfiere en la reacción de hipersecreción de las células mucosas. Los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar la participación de células linfoides (probablemente NK) en el agravamiento de las lesiones provocado por la revascularización del intestino isquémico.

Bibliografía

1. Carbonell-Canti A: Aspectos morfológicos experimentales tras diversos periodos de isquemia aguda intestinal. I. *Rev Quir Esp*, 1978, 25:91-96.
2. Marston A: Enfermedad vascular mesentérica. En: Maingot R. (Ed.) *Operaciones abdominales*. Madrid, Ed. Panamericana, tomo I, 8.ª edición, 1986, pp. 457-472.
3. Mózes T, Wieszt E y Zahajszky T: Role of PGF2 alfa in the superior mesenteric artery-induced shock. *J Surg Res*, 1989, 47:476-481.
4. Suso FJ, Gómez A, González JM, García J, Cuadrado F y Ramos A: Repercusión hepática de la isquemia intestinal aguda. Estudio experimental. *Rev Esp Enf Ap Digest*, 1988, 74:219-224.
5. Parks DA: Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal parhophysiology. *Gut*, 1989, 30:293-298.
6. García-Alonso I, Ortiz J, Basáñez A, Portugal V y Méndez J: Cuantificación de lesiones en el síndrome de revascularización intestinal de la rata: método morfométrico. *Gastroenterología y Hepatología*. (En prensa).
7. James SP, Zeitz M, Kagnoff MF y Kwan WC: Intestinal lymphocyte populations and mechanism of cell-mediated immunity. En: Kagnoff MF (Ed.), *Intestinal Immunology (Immunology and Allergy Clinics of North America)*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1988, 8:369-391.
8. Ferguson A: Models of immunologically driven small intestinal damage. En: Marsh, MNE., *Immunopathology of the small intestine*. Chichester, John Wiley, 1987, pp. 225-252.
9. Grisham MB, Hernández LA y Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*, 1986, 251:567-574.
10. Otamiri T: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery*, 1988, 105:593-597.
11. Hess ML y Manson NH: The paradox of steroid therapy: Inhibition of oxygen free radicals. (Letter.) *Circ Shock*, 1983, 10:1-5.
12. Reem GH, Cock LA y Palladino MA: Cyclosporin inhibits interleukin 2 and interferon-gamma synthesis by human thymocytes. *Trans Proc*, 1983, 15:2387-2389.
13. Riecken EO, Stallmach A, Zeitz M, Schulzke JD, Menge H y Gregor M: Growth and transformation of the small intestinal mucosa: importance of connective tissue, gut associated lymphoid tissue and gastrointestinal regulatory peptides. *Gut*, 1989, 30:1630-1640.
14. Cross CE, Halliwell B y Allen A: Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet*, 1984, i:1328-1330.