

Cuantificación de lesiones en el síndrome de revascularización intestinal de la rata: método morfométrico

I. García-Alonso Montoya, J. Ortiz Lacorzana, A. Basañez Amuchastegui, V. Portugal Porras y J. Méndez Martín

Laboratorio de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco.

RESUMEN

Se presenta un método para la cuantificación de las lesiones estructurales producidas en la mucosa intestinal tras diferentes períodos de isquemia intestinal y revascularización. La técnica presentada puede ser utilizada no sólo para cuantificar las lesiones producidas por el fenómeno de isquemia-revascularización, sino, además, para valorar la eficacia de los distintos tratamientos que se utilizan en los estudios fisiopatológicos de este síndrome. Los resultados obtenidos muestran que, como consecuencia de la revascularización, se agravan las lesiones producidas por la isquemia. Así mismo, se describen las lesiones observadas a nivel estructural y ultraestructural (microscopía electrónica de barrido). Por último, se ha podido observar que, cuando la isquemia mesentérica aguda no se prolonga más allá de 2 horas, la mortalidad permanece inferior al 50 %.

QUANTIFICATION OF INTESTINAL LESIONS PRODUCED BY REVASCLARIZATION IN THE RAT: MORPHOMETRIC APPROACH

A method able to quantify the structural alterations produced on the intestinal mucosa after different periods of ischemia followed by reperfusion is presented. This method is useful not only to quantify the lesions produced by the ischemia-revascularization phenomenon but

also to test the efficacy of the different treatments proposed for this physiopathological syndrome. The results herein obtained demonstrate worsening of the ischemia induced lesions after revascularization. The structural and ultrastructural (scanning electron microscopy) alterations are reported. It has been observed that mortality is lower than 50 % when the ischemic process lasted less than 2 hours.

El estudio de la isquemia mesentérica aguda (IMA) en animales se remonta a los trabajos que Virchow y Litten¹ (1875) realizaron en perros con el fin de observar las modificaciones producidas en el intestino tras la interrupción brusca del flujo de la arteria mesentérica superior. Desde entonces se han utilizado diversos modelos experimentales en animales para estudiar los factores que condicionan la evolución de las lesiones producidas por la isquemia mesentérica aguda^{2,3}. Tras observar en la clínica que los primeros intentos de recanalización de los vasos mesentéricos obstruidos se acompañaban de un empeoramiento del cuadro general (lo que ha venido a denominarse «síndrome de revascularización intestinal» —SRI—), estos modelos animales se han vuelto a utilizar para estudiar la fisiopatología de dicho fenómeno^{4,6}. Otro campo de aplicación de las técnicas de IMA y SRI experimentales se sitúa en el estudio de la fisiopatología del shock, cuadro que guarda estrecha relación fisiopatológica con el SRI^{7,8}.

La mayoría de los trabajos publicados se basan en el ensayo de «procedimientos» o «sustancias» que atenúen el SRI, como medio indirecto para mejorar el conocimiento de su fisiopatología o en busca de una aplicación directamente terapéutica^{2,7-11}. Los animales más comúnmente utilizados han sido el perro y el gato, por ser su tamaño adecuado para

Correspondencia: Dr. I. García-Alonso. Laboratorio de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina y Odontología. 48940 Lejona. Vizcaya.

Recibido: 3-1-1990; aceptado para su publicación: 6-11-1990.

la manipulación de los vasos mesentéricos. Sin embargo, su coste y los problemas que actualmente se presentan con las leyes sobre protección de animales hacen más aconsejable trasladar este tipo de estudios a los roedores (al menos en sus etapas iniciales). Con el uso de *clips* vasculares, la técnica quirúrgica en la rata resulta cómoda y fácil de estandarizar.

Junto al modelo experimental, resulta muy importante disponer de uno o varios parámetros que permitan valorar las modificaciones introducidas en aquél por los diversos «tratamientos» ensayados. En un trabajo previo¹² presentamos los resultados del porcentaje de mortalidad en las primeras 48 h. En éste, se analiza la utilidad de un método paramétrico de valoración de la intensidad de las lesiones que permite estudios «semicuantitativos» y una adecuada comparación de resultados, así como de la microscopía electrónica de barrido (MES) aplicada al estudio de la mucosa intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos (200 g de peso) facilitadas 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 realizaron siempre entre las 9 y las 13 horas. Previa anestesia con nembutal (pentobarbital sódico, Servá) al 1,5 % (35 mg/kg), se practicó laparotomía media y, tras abrir el retroperitoneo, se diseccionó y pinzó la arteria mesentérica superior. La anulación del riego intestinal

se comprobó observando el cese del latido en los vasos intestinales. La pared abdominal se cerró con sutura continua de seda 000. Una vez hubo transcurrido el período de isquemia, y tras comprobar la eficacia de la misma 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.

La primera parte del trabajo ha consistido en seleccionar los tiempos de isquemia y de revascularización óptimos para el estudio de las lesiones producidas en la mucosa. Para ello se han utilizado cuatro grupos de 18 animales a los que se ha sometido a 15, 30, 60 y 120 min de isquemia, respectivamente. Dentro de cada grupo, los animales se han sacrificado en grupos de tres; se comenzó al concluir el período previsto de isquemia y se continuó a los 10 min, 30 min, 60 min, 4 h y 24 h respectivamente. Como grupo control se han utilizado 6 animales sometidos a idéntica manipulación quirúrgica y se ha omitido el pinzamiento vascular. En la segunda, destinada a probar la utilidad de nuestra técnica de cuantificación, se han utilizado 3 lotes de 10 animales a los que se ha sometido respectivamente a: a) 30 min de isquemia y 30 de revascularización, b) 120 min de isquemia y 30 de revascularización y c) 150 min de isquemia.

Una vez sacrificado el animal, y previa perfusión esplácnica con suero fisiológico heparinizado y glutaraldehído al 2,5 %, se procedió a extraer los 7 cm últimos del ileon, seccionándolos en 7 fragmentos: seis de ellos, una vez fijados con Bouin, se incluyeron en parafina; el séptimo se fijó con glutaraldehído y se procesó para microscopía electrónica del barrido. En los animales no revascularizados se omitió la perfusión.

La valoración de la intensidad de las lesiones se llevó a cabo mediante un método original diseñado en nuestro laboratorio (fig. 1). Las 6 secciones consecutivas de ileon se incluyen en un mismo bloque de parafina del que se obtienen tres secciones histológicas de 5 micras de espesor (separadas entre sí por 1-2 mm), que se colocan en un único porta y se tiñen con hematoxilina-eosina. En cada animal se contabilizan el número de regiones que presentan daño grave de la mucosa en alguna de las tres secciones histológicas correspondientes a cada región. De esta manera se obtiene un índice lesional que oscila entre 0 y 6. Se ha conside-

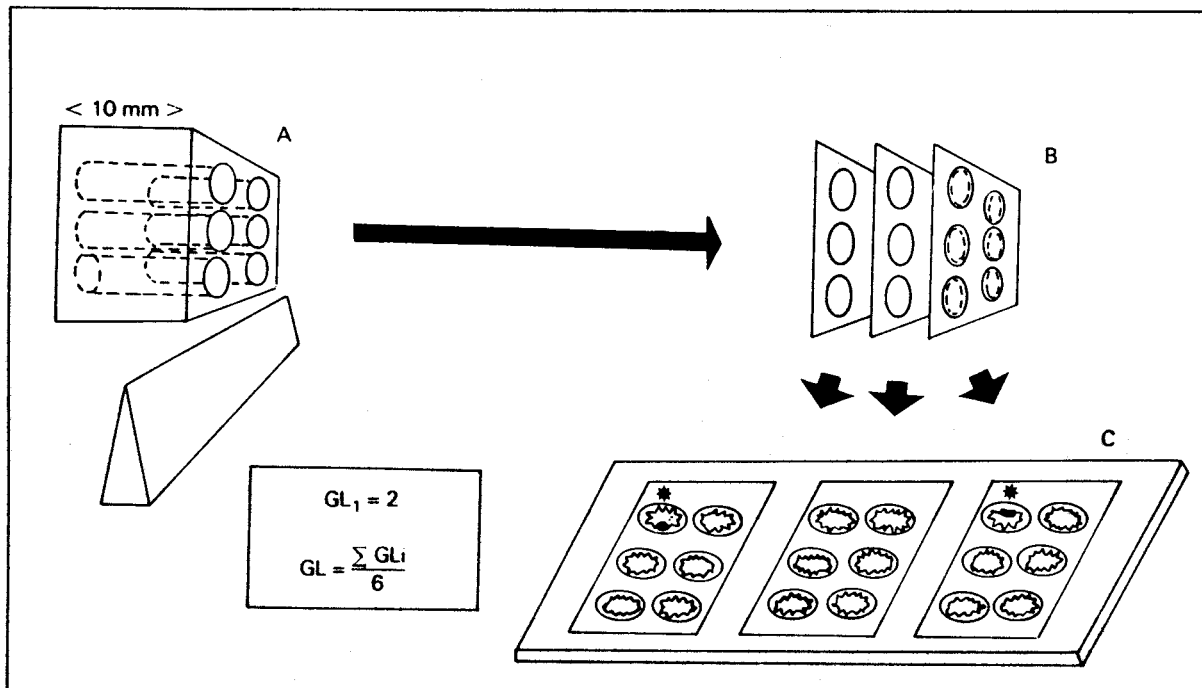
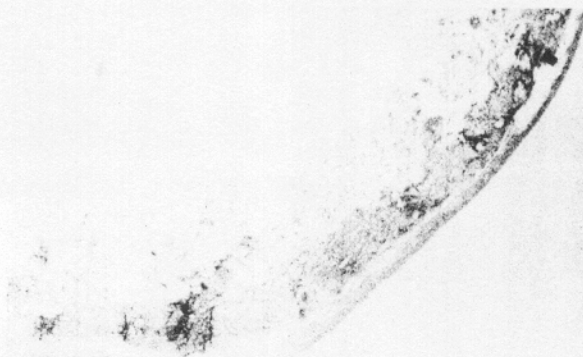
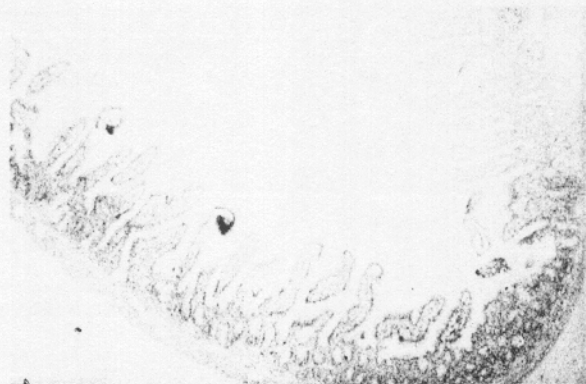


Fig. 1. Esquema de preparación de las muestras para establecer el grado de lesión y el índice de preservación.



Figs. 2a y 2b. Aspecto histológico que presenta la mucosa intestinal. En la figura 2a se aprecia una mucosa intestinal conservada en la que, a pesar de observarse signos de isquemia intestinal (edema y aplanamiento de vellosidades, espacio subepitelial de Gruenhagen, etc.), se conserva la mucosa intestinal. En la figura 2b existe una grave desestructuración de la mucosa.



Fig. 3. Aspecto de las placas de Peyer cuya aparición es constante a los pocos minutos de iniciarse la isquemia.

rado daño grave la presencia de una zona de desestructuración de las vellosidades o la denudación epitelial de la mucosa (figs. 2a y 2b). Con el fin de disminuir los errores subjetivos, el estudio de las muestras se ha realizado por dos observadores independientes tras sustituir los identificativos de las preparaciones por una numeración aleatoria. Dada la buena concordancia existente entre los dos juegos de medidas (test de concordancia de Kendall), la media de cada par de mediciones se adoptó como índice lesional de cada animal.

El índice de lesión correspondiente a cada grupo experimental se obtuvo calculando la media aritmética.

El índice de preservación se obtuvo restando de 6 (puntuación lesional máxima) el índice de lesión, y dividiendo a su vez este valor por seis (máxima puntuación de preservación).

Las piezas fijadas con glutaraldehído se procesaron siguiendo la técnica de Muratami modificada: impregnación con ácido tánico, tinción con tetraóxido de osmio, deshidratación gradual con acetona, desecación por punto crítico. Tras fragmentar y dorar, las piezas se estudiaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM35C.

Considerando que cada serie experimental constaba de 60 piezas histológicas que podían presentar o no una determinada cualidad (una zona de mucosa gravemente dañada), el análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el test de χ^2 . Se han considerado diferencias estadísticamente significativas los valores con $p < 0,05$.

RESULTADOS

Con respecto a la serie de experiencias orientadas a definir un período óptimo de isquemia y revascularización para el estudio de las lesiones producidas por dichos procesos, se han constatado las siguientes observaciones:

1. A nivel macroscópico, las lesiones han presentado un carácter discontinuo (parcheado) siendo más intensas y frecuentes en las porciones terminales del íleon. Las primeras modificaciones llamativas del intestino han aparecido a los 15 min de pinzar la arteria mesentérica superior: palidez y dilatación de las asas que progresivamente van adoptando un tinte cianótico. Junto a ello, y desde los primeros momentos, las placas de Peyer adquieren un aspecto hipertrofico y una apariencia prominente en la serona del intestino isquémico (fig. 3).

Al restaurar el flujo mesentérico se acumula en la luz intestinal un exudado sanguinolento mezclado con abundante moco, a la par que el intestino adquiere una coloración negro-rojiza. Durante esta fase de la experiencia persiste la protrusión de las placas de Peyer.

2. A nivel microscópico, en todos los grupos experimentales se ha objetivado la presencia constante de alteraciones en la pared intestinal: engrosamiento y acortamiento de las vellosidades intestinales, edema de las vellosidades, áreas de descamación epitelial, aumento del número de mitosis en el epitelio de las criptas glandulares e hipertrofia de las placas de Peyer (tanto de su centro germinativo como del manto linfocitario), que se extiende ampliamente por el tejido conectivo de la submucosa desdibujando las vellosidades adyacentes.

Estas alteraciones se han presentado de manera constante con carácter discontinuo, sin ningún patrón de localización definido. Por otra parte, su extensión, número e intensidad aumentan al incrementar el tiempo de isquemia, aunque coexisten en el mismo animal lesiones de muy distinta intensidad. Al reanudarse el flujo mesentérico se acentúa el engrosamiento y acortamiento de las vellosidades, así como la infiltración linfocítica de la pared (que se extiende hasta la mucosa). También puede apreciarse

TABLA I. Comparación de las lesiones observadas en los animales sometidos a diferentes tiempos de isquemia y revascularización

Isquemia	Revascularización					
	0'	10'	30'	60'	4 h	24 h
15'	15	33	42	24	21	12
30'	24	39	39	18	27	27
60'	24	45	33	45	27	21
120'	15	33	42	27	21	12

que las áreas de denudación epitelial coinciden con placas de Peyer hipertróficas.

En conjunto pudo observarse que, a nivel mucoso, la simple isquemia provocó daños mínimos, mientras que la revascularización —incluso a tiempos muy cortos (10 min)— provocó un gran aumento de las lesiones. Sin embargo, transcurridas 24 h de la revascularización, se observó cierta tendencia a la disminución de las lesiones en los animales que sobrevivieron. La mortalidad fue elevada (más del 50 % después de 24 h de la revascularización) en los animales sometidos a 120 min de isquemia. Con tiempos menores, la mortalidad a las 24 h fue inferior al 50 %.

Los estudios morfométricos mostraron que las lesiones más notorias tuvieron lugar entre los 10 y los 30 min de revascularización (tabla I), para luego enmascararse en los tiempos de 60 min a 24 h debido a que sólo se podían valorar los animales supervivientes, con lo cual se introducía un error en el muestreo.

Las alteraciones debidas a la revascularización parecen no estar inicialmente ligadas al tiempo que duró la isquemia (tabla I: columna de 10 y 30 min), e igualmente es difícil discernir las diferencias entre los efectos provocados por 10 o 30 min de revascularización. Por ello, se decidió ampliar la muestra experimental para comprobar si realmente existía una diferencia en el tiempo de duración de la isquemia en relación con el efecto lesivo que provoca la revascularización.

4. La valoración semicuantitativa de las lesiones intestinales, realizada en los tres grupos que constituyeron la segunda experiencia, otorgó a los animales sometidos a 150 min de isquemia un índice lesional de 1,3. En cambio, en aquellos sometidos a 120 min de isquemia y 30 min de revascularización, este índice alcanzó 2,4, diferencia que estadísticamente es significativa ($p < 0,05$). O, dicho en términos relativos, la reperusión del intestino tras 2 h de isquemia provoca un aumento del 84 %

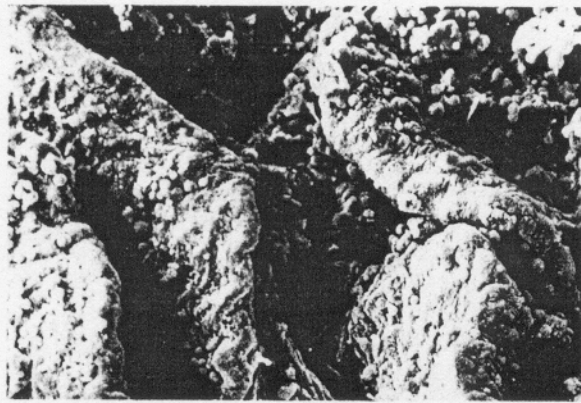


Fig. 4. Microscopia electrónica de barrido. Se observa una abundante secreción de las células mucosas e infiltración de elementos linfoides en las vellosidades.

en el índice lesional (tabla II). Viéndolo de otro modo, se puede considerar que la preservación de la mucosa se reduce en un 77 % por el hecho de revascularizar el intestino (tabla II).

Por otra parte, los animales sometidos a 30 min de isquemia y 30 min de revascularización presentaron un índice lesional de 1,7 que no se diferenciaba significativamente del de los animales sometidos a 2 h de isquemia y 30 min de revascularización.

5. El estudio con el microscopio electrónico de barrido confirmó las observaciones realizadas mediante microscopia convencional, fundamentalmente la distribución heterogénea de las lesiones, su mayor intensidad en los animales revascularizados, así como la infiltración del tejido conectivo submucoso por células esféricas de superficie vellosa, que parecen corresponder a linfocitos (fig. 4).

DISCUSIÓN

La experiencia clínica y experimental demuestra que durante la isquemia mesentérica se producen una serie de alteraciones que se agravan al restaurarse la circulación sanguínea^{4,13,14}.

Los hallazgos de nuestra experiencia, tanto a nivel macroscópico como microscópico, coinciden con los descritos previamente por otros autores^{2-5,7}. El problema surge al intentar comparar la gravedad o intensidad de dichos hallazgos. El carácter discontinuo y la variabilidad que presentan las lesiones han sido la causa de que las valoraciones en torno a la gravedad de las mismas se hayan hecho de manera subjetiva, de modo que resulta difícil comparar los resultados de distintos grupos de investigadores.

TABLA II. Comparación del índice lesional y de preservación en los animales sometidos a 10' de isquemia y los sometidos a 120' de isquemia seguida de 30' de revascularización

	Índice lesional	Daño relativo	Índice de preservación	Preservación relativa
Isquemia + revascularización 150 min	1,3	1	0,78	1
Isquemia + revascularización 120/30 min	2,4	1,84	0,6	0,77

Es verdad que Chiu et al² ya propusieron una escala lesional, pero dicha escala sólo es aplicable a lesiones individuales y no al conjunto de lesiones presentes en un animal.

Nuestro grupo se propuso idear un método morfométrico que permitiera traducir la intensidad de las lesiones en un parámetro cuantitativo susceptible de ser manipulado estadísticamente. Dicho parámetro debía englobar el número, tamaño y profundidad de las lesiones presentes a lo largo del intestino. Desde ese punto de vista el método óptimo sería el estudio anatomopatológico de toda la longitud intestinal y la valoración del diámetro y profundidad de cada una de las lesiones individuales. Sin embargo, lo tedioso de la técnica la haría difícilmente viable. El método propuesto en este trabajo tiene en cuenta la variabilidad, aleatoriedad y mayor concentración lesional en íleon terminal^{2,15}, por lo que puede considerarse ventajoso frente a los métodos netamente subjetivos. Sin embargo, es cierto que presenta algunos inconvenientes, como son el no aportar el número absoluto o la concentración de zonas lesionadas por unidad de superficie sino una cifra más o menos proporcional y el no distinguir valores como superficie o profundidad media de las lesiones. Con todo, su carácter paramétrico permite estudios o valoraciones semicuantitativos y la aplicación de tests estadísticos, ventajas que justifican su elección en estudios lesionales de la mucosa en el síndrome de revascularización intestinal. Con respecto a los resultados obtenidos mediante la aplicación del método morfométrico descrito, pueden hacerse algunas consideraciones de interés. El hecho de que a los 150 min de haberse interrumpido el flujo mesentérico el grado de lesión sea mayor en los animales revascularizados (120 min de isquemia + 30 min de revascularización) que en los que perdura la isquemia, constata las valoraciones subjetivas realizadas por otros autores en torno a esta cuestión^{6,16}.

Por otra parte, este trabajo ha puesto de manifiesto que a los 30 min de revascularizar el intestino, el grado de lesión no muestra variaciones en función del tiempo previo de isquemia (al menos entre los 30 y los 120 min). Nosotros no hemos encontrado ninguna referencia en este sentido en la bibliografía consultada.

En general, hemos podido observar que no es posible establecer una correlación estricta entre el grado de lesión y la duración de la isquemia, ya que en unas ocasiones aparecen grandes lesiones con poco tiempo de isquemia y, en otras, lesiones leves con un tiempo de isquemia elevado.

Estas diferencias han sido atribuidas a factores mecánicos, bioquímicos y hormonales intercurrentes con el accidente de la isquemia^{4,17}. Se ha demostrado, además, que el contenido químico y bacteriano del intestino ejerce efectos importantes sobre la rapidez de la necrosis consecutiva a oclusión de la arteria mesentérica superior¹⁸⁻²⁰.

La influencia de factores intercurrentes, como la gravedad, la posición del asa antes del episodio isquémico, se ve también reforzada por los resultados de nuestra experiencia, ya que los lotes de animales fueron seleccionados con homología de raza, peso y dieta, y, sin embargo, presentaron diferentes grados de lesión tras idénticos tiempos de isquemia. En nuestro trabajo, las alteraciones debidas a la revascularización parecen no estar ligadas al tiempo de isquemia e igualmente es muy difícil discernir las diferencias entre los efectos provocados por 10 y 30 min de revascularización. Sí se aprecia que, si bien las lesiones se agravan rápidamente al reanudar el flujo (30 min), la recuperación es mucho más lenta, y todo parece indicar que se inicia a los 30-60 min de haber repermeabilizado los vasos.

Otros autores han publicado que la normalización de la mucosa intestinal en la rata, tras un período isquémico de 1 h, se produce a las 48-72 h^{15,16}. Cuando el período isquémico se prolongó hasta las 3 horas, la recuperación estructural *ad integrum* tanto de la vellosidad como del epitelio que lo cubre, podía prolongarse hasta una semana en aquellos animales que sobrevivían¹⁵. La explicación a este patrón cronológico hay que buscarla en la peculiar fisiopatología de este síndrome, campo que en la actualidad es objeto de numerosos estudios y que excede los límites marcados para nuestro trabajo.

Los estudios con MES no proporcionaron información adicional sobre la morfología de las lesiones y resultaron de utilidad únicamente como constatación de las observaciones realizadas con la microscopía convencional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Litten M. Über die folgen des verschlusses des arteria mesaraica superior. Virchows Arch Pathol Anat 1875; 63: 289-312.
2. Chiu CJ, Mc Ardle AM, Brown R, Scott HJ. Intestinal mucosal lesions in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. Arch Surg 1970; 101: 478-483.
3. Carbonell-Canti A. Aspectos morfológicos experimentales tras diversos períodos de isquemia aguda intestinal. I. Rev Quir Esp 1978; 5: 91-96.
4. Marston A. Enfermedad vascular mesentérica. En: Seymour I. Schwartz y Harold Ellis: Maingot Operaciones Abdominales. Tomo I. Octava Edición. Buenos Aires, Panamericana, 1986; 457-472.
5. Ben-Dahan J, Gross D, Abu-Dalu H et al. Effect of prostaglandin and leukotriene antagonists in acute mesenteric artery occlusion. Eur Surg Res 1988; 20: 310-319.
6. Rosendo A, Latorre J, Gómez F et al. Síndrome de revascularización intestinal. Estudio secuencial en perros. Angiología 1984; 36: 207-218.
7. Manohar M, Tyagi RPS. Experimental intestinal ischemia shock in dogs. Am J Physiol 1975; 225: 887-892.
8. Schoeffel U, Windfuhr M, Freudenberg N, Treuter KH, Jacobs E, Galanos C. The role of intestinal endotoxin in experimental peritonitis. Circ Shock 1989; 27: 83-91.
9. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. Surgery 1989; 105: 593-597.

10. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemic-induced vascular permeability changes in the rat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84.
11. Boorstein JM. Pharmacologic treatment of occlusive mesenteric ischemia in rats. *J Surg Res* 1988; 44: 555-560.
12. Ortiz Lacorzana J, García-Alonso I, Portugal Porras V, Méndez Martín JJ. Influencia del peso corporal y del período de isquemia mesentérica aguda en la mortalidad de ratas sometidas a revascularización intestinal. *Rev Esp Enf Ap Diges* (Pendiente de publicación).
13. Winninger L. L'ischémie aiguë de l'intestin et sa revascularization. *J Chir* 1972; 104: 441-450.
14. Sánchez-Lozano J. El síndrome de revascularización intestinal. Estudio experimental. *Rev Quir Esp* 1980; 7: 58-63.
15. Wagner R, Gabert H, Hohn D. Ischemia and post-ischemic regeneration of the small intestinal mucosa. *Virchows Arch Cell Pathol* 1979; 31: 259-262.
16. Pérez García A, Santos Briz J, Terrón Mirón J, Gómez Alonso A. Aspectos morfológicos y evolutivos de la isquemia intestinal experimental. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1980; 57: 231-240.
17. Robinson JW, Mirkovitch V, Winistorfer B, Saegesser F. Response of the intestinal mucosa to ischaemia. *Gut* 1981; 22: 512-527.
18. Bounus G, Brown R, Mulder DS, Hampson LG, Gurd FN. Abolition of tryptic enteritis in the shocked dogs. *Arch Surg* 1965; 91: 371-376.
19. Jamieson WG, Pliagus G, Marchuk S et al. Effect of antibiotic and fluid resuscitation upon survival time in experimental intestinal ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 167: 103-108.
20. Plonka AJ, Schentag JJ, Messinger S, Adelman NH, Francis KL, Williams JS. Effects of enteral and intravenous antimicrobial treatment on survival following intestinal ischemia in rats. *J Surg Res* 1989; 46: 216-220.