

Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperfusión

J. Bilbao*, I. García-Alonso**, V. Portugal***, P. Barceló****, A. Apecechea* y J. Méndez*****

*Médico adjunto. **Profesor Titular. ***MIR. ****Investigador colaborador. *****Catedrático.

Servicio de Cirugía General "B" (Dr. J. Méndez). Hospital de Basurto y Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco.

Resumen

Un gran número de estudios experimentales han intentado constatar el papel de los radicales libres del oxígeno en la génesis del síndrome de reperfusión intestinal. En este sentido, han sido utilizadas numerosas sustancias, previamente al establecimiento de la isquemia, que interferían, neutralizaban o catabolizaban los radicales libres del oxígeno. Sin embargo, su aplicabilidad terapéutica no ha sido probada. En este trabajo se ensaya la utilidad del alfatocoferol y el ácido fólico en un modelo de isquemia y reperfusión intestinal en la rata. Su administración se ha realizado por vía parenteral durante los momentos finales de la isquemia. Su eficacia se ha valorado mediante la tasa de supervivencia y parámetros histológicos y bioquímicos. Ambas sustancias han mejorado los parámetros considerados, mostrándose significativamente más eficaz el ácido fólico.

Palabras clave: *Isquemia. Reperfusión. Intestino. Rata. Alfatocoferol. Ácido fólico. Tratamiento.*

EFFICACY OF ANTIOXIDANT THERAPY (FOLIC ACID AND ALPHATOCOPHEROL) IN INTESTINAL LESIONS PRODUCED BY REPERFUSION

A large number of experimental studies have attempted to determine the role of oxygen free radicals on the genesis of the intestinal reperfusion syndrome. Several substances able to interfere, neutralize, or catabolize the oxygen free radicals have been administered before the onset of the ischemic process. However their therapeutic applicability has not yet been proven. In this study we assess the usefulness of alfatocopherol and folic acid in an experimental model of ischemia and reperfusion in rats. These drugs have been parenterally administered at the last stage of ischemia. The efficacy of this treatment has been evaluated on survival rate, and on histological and biochemical parameters. Both substances have improved the variables studied in this investigation but folic acid was significantly more efficacious.

Key words: *Ischemia. Reperfusion. Intestine. Rat. Alfatocopherol. Folic acid. Therapy.*

Introducción

Numerosos autores han estudiado la fisiopatología del síndrome de reperfusión intestinal (SRI), constatando que en su patogenia participan los radicales libres de oxígeno (RLO).

Los primeros trabajos se centraron en valorar los efectos de ciertos fármacos al interferir la producción, neutralizar o catabolizar los citados RLO. Sin embargo, por estar centrados en

estudios fisiopatológicos o patogénicos, los modelos experimentales utilizados no han buscado remedar situaciones clínicas, y los fármacos se han aplicado, casi en la totalidad de los casos, antes o en los primeros momentos de la isquemia. Y así, se ha dado más importancia a las implicaciones patogénicas de los efectos observados tras la aplicación de los fármacos en la producción de RLO, que al estudio de sus posibilidades terapéuticas.

Experiencias previas en nuestro laboratorio¹ han ilustrado la utilidad terapéutica del alopurinol (ALLO) y de la superóxido-dismutasa (SOD) administrados en perfusión lenta durante los últimos minutos de un episodio de isquemia mesentérica aguda en la rata. De los citados fármacos, el ALLO resultó notablemente más efectivo, lo que justificamos por su actuación a un nivel más precoz de la secuencia fisiopatológica. Así, mientras la SOD facilita la neutralización² de los RLO, el ALLO dificulta su formación.

El presente trabajo estudia, en el mismo modelo experimental, el efecto de otros 2 fármacos con igual mecanismo genérico

Este trabajo ha sido financiado con cargo al Proyecto 094-327-0058/89 de la UPV/EHU. Los fármacos utilizados han sido gentilmente suministrados por el Hospital de Basurto.

Correspondencia: Dr. J. Bilbao.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Facultad de Medicina. 48940 Lejona. Vizcaya.

Aceptado para su publicación el 20 de octubre de 1991.

de acción (actividad antioxidante), pero actuando a diferente nivel (fig. 1): el ácido fólico y el alfatocoferol.

Material y métodos

Los estudios se han llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley hembras de 200 g (± 10 g). Para aproximar el modelo experimental a una situación clínica, las ratas no han sido sometidas a ayuno previo. Todas las experiencias se han realizado a la misma hora, evitando de este modelo las variaciones derivadas de los ritmos biológicos.

Bajo anestesia con Nembutal® (pentobarbital sódico, 30 mg/kg i.p.) se sometió a los animales a 2 horas de isquemia intestinal mediante pinzamiento de la arteria mesentérica superior (AMS)¹. Los diferentes tratamientos se han administrado por vía femoral en perfusión lenta durante los últimos 20 minutos de isquemia¹.

Se han considerando 4 grupos experimentales según el tratamiento administrado: 1) animales no tratados; 2) suero fisiológico; 3) ácido fólico, y 4) alfatocoferol. En los tres últimos grupos la cantidad perfundida ha sido de 2 ml, administrándose el ácido fólico (sal cálcica del ácido folínico -factor *citrovorum*-Lederfolin -Lederle-) en dosis de 0,1 mg/kg y el alfatocoferol (vitamina E en forma de acetato hidrosoluble -suministrado por el Servicio de Farmacia del Hospital de Basurto-) en dosis de 20 mg/kg. El grupo de animales a los que únicamente se perfundió suero, se incluyó para conocer qué repercusiones se producirían al inocular la cantidad de 2 ml, por ser la cifra en la que iban a diluirse los citados fármacos (ácido fólico y alfatocoferol).

Dentro de cada grupo se han realizado dos series de experiencias. En la primera se han utilizado un mínimo de 5 lotes de 4 animales, a los que se ha dejado evolucionar valorándose la mortalidad en las primeras 48 horas. En la segunda se han utilizado 5 animales para cada grupo experimental, sacrificándolos 30 minutos después de restablecer el flujo sanguíneo para practicar estudios morfológicos y bioquímicos según el protocolo que detallamos a continuación.

Bajo anestesia con éter, se reabrió la laparotomía procediendo a canular, sucesivamente, duodeno, válvula ileocecal y aorta

abdominal. Tras extraer 5 ml de sangre, se lavó la luz intestinal con suero fisiológico a 37 °C para, a continuación, extender el paquete intestinal en toda su longitud. De esta manera se pudo medir la longitud del intestino infartado, así como las zonas de hiperemia peristáltica.

Los estudios histológicos se realizaron sobre dos muestras tomadas del ileon terminal (desechando los tres últimos cm) y otra extraída de una zona infartada.

Los 3 fragmentos de intestino de cada animal se incluyeron en un mismo bloque de parafina. De cada bloque se practicaron tres secciones sucesivas que se montaron en un mismo porta y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para proporcionar mayor sensibilidad a la prueba, cada sección de intestino se ha dividido en 4 cuadrantes, valorándose en ellos el grado de lesión histológica según la siguiente escala diseñada en nuestro laboratorio (modificada de Chiu):

Grado 0: vellosidad intestinal totalmente normal

Grado 1: epitelio de las vellosidades conservado, pero con presencia de pequeños despegamientos a nivel apical (espacios de Grünhagen).

Grado 2: denudación apical de las vellosidades.

Grado 3: hemorragia intramucosa e importante desestructuración de la vellosidad.

Grado 4: desestructuración total de la mucosa con pérdida de vellosidades y alteración morfológica de la lámina propia con despegamiento de la capa muscular.

Con el fin de dotar de un carácter más objetivo a este estudio, las muestras se identificaron con números aleatorios. El grado de lesión mucosa (GL) se ha obtenido calculando la media de las 9 secciones histológicas de cada animal.

Los estudios bioquímicos (glucosa, SGOT, SGPT y GGT) se realizaron utilizando como controles a 10 ratas no manipuladas. La sangre de aorta fue recogida y centrifugada a 2.000 rpm, durante 15 minutos. Las mediciones se han llevado a cabo utilizando un autoanalizador Hitachi 717, valorándose la glucemia por colorimetría (reacción de Trinder), la transaminasas (método de Henry) y la LDH basándose en el método de Wacker et al.

Dada la distribución no normal de los resultados, las modificaciones de los mismos se han estudiado mediante el *rank sum test*, considerando significativas las diferencias con una $p < 0,05$.

Resultados

Como puede apreciarse en la figura 2, tanto la administración de suero como de alfatocoferol han disminuido la mortalidad (55,95 % y 55 % vs 75 %); sin embargo, la escasa homogeneidad de los resultados de cada serie resta significación a este hallazgo ($p = 0,20$ y $p = 0,08$). En cambio, los animales tratados con ácido fólico presentan un descenso constante de la mortalidad (25 % vs 75 %; $p < 0,01$).

La extensión de la lesión intestinal (áreas hiperémicas y de infarto hemorrágico) se representa en las figuras 3 y 4. En ellas puede observarse cómo la administración de suero fisiológico se ha acompañado de un aumento importante de ambos tipos de lesiones ($p < 0,01$). La adición de alfatocoferol al suero ha disminuido de modo significativo la extensión de las lesiones consideradas en su conjunto ($p = 0,02$). Si el estudio se restringe a las zonas de infarto, los valores se aproximan a los del grupo

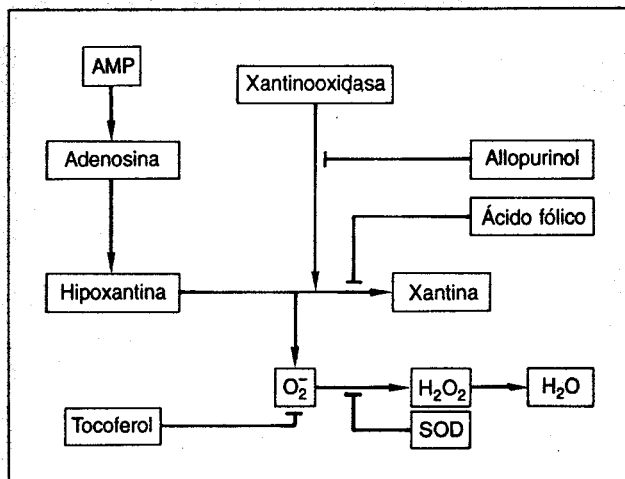


Fig. 1. Esquema de la fisiopatología general del síndrome de reperfusión en el que se señalan los mecanismos de acción de los fármacos analizados en este trabajo.

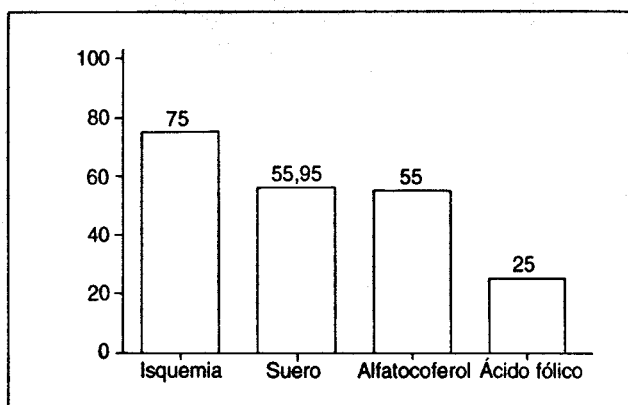


Fig. 2. Mortalidad observada en cada una de las series experimentales. Destaca el efecto beneficioso del ácido fólico.

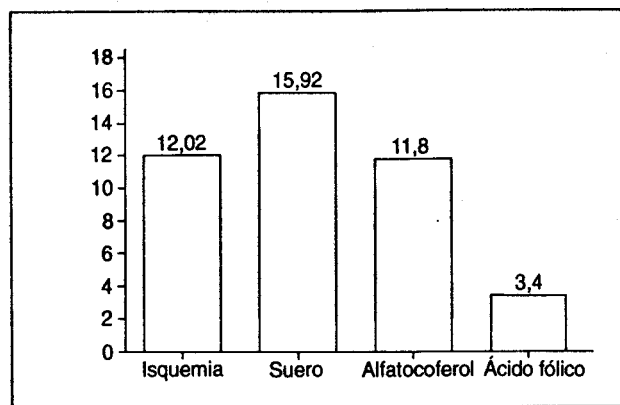


Fig. 4. Extensión de la lesión macroscópica, restringida a los segmentos de infarto hemorrágico y expresada como porcentaje de la longitud intestinal total.

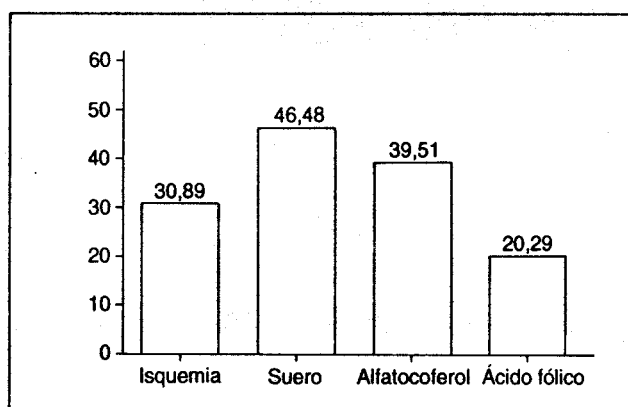


Fig. 3. Extensión de la lesión macroscópica expresada como porcentaje de la longitud intestinal total.

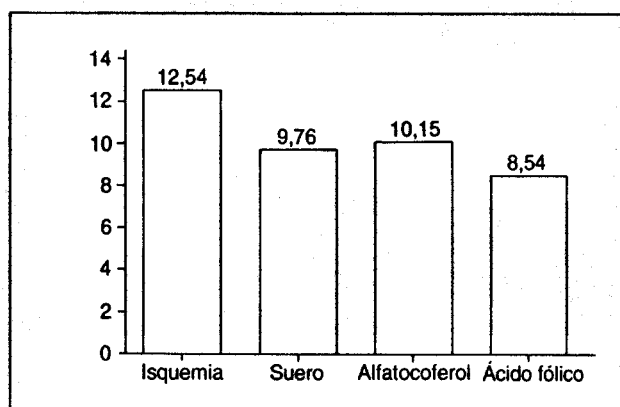


Fig. 5. Grado de lesión mucosa en las distintas series experimentales. Se aprecia el efecto beneficioso de la reposición volémica, que se ve incrementado por la adición de ácido fólico.

control ($p = 0,55$). En cambio el ácido fólico ha logrado disminuir notablemente el porcentaje de intestino lesionado frente a todos los grupos ($p < 0,01$).

Los animales que, sometidos a isquemia, no recibieron medicación, han presentado un daño mucoso más acentuado que los tratados ($GL = 12,54$), tal y como puede apreciarse en la figura 5. El alfatoferol ($GL = 10,15$) ha dado lugar a una disminución estadísticamente significativa frente al grupo de animales no tratados ($p < 0,05$). De nuevo, la administración de ácido fólico ha disminuido de forma intensa el grado de lesión ($GL = 8,54$), con significación estadística frente a todos los grupos. En el caso de la administración de suero, el GL fue de 9,76, existiendo diferencias significativas frente el grupo control ($p < 0,01$).

En las determinaciones bioquímicas se observaron comportamientos distintos (fig. 6). Por un lado, la glucemia apenas se ha visto modificada por la isquemia, mientras que aumenta significativamente en los animales tratados. Con respecto a las enzimas estudiadas, en todas ellas se ha constatado una elevación significativa de sus niveles plasmáticos en los animales sometidos a isquemia. La administración de suero y alfatoferol no provocó modificaciones sensibles de estos parámetros, aunque los animales tratados con ácido fólico presentaron una elevación significativa de SGOT y LDH frente a los no tratados.

Discusión

El carácter antioxidante del alfatoferol en los sistemas biológicos es un hecho bien establecido^{4,5}. Su liposolubilidad le permite situarse con facilidad entre los lípidos de las membranas celulares, por lo que se sospecha que es a este nivel donde ejerce su acción antioxidante, evitando o disminuyendo la peroxidación lipídica producida por los RLO en el citosol^{6,7}. Al igual que otros antioxidantes naturales, se ha utilizado en algunos trabajos experimentales para controlar las lesiones producidas por la reperusión de tejidos isquémicos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la SOD, ALLO, ácido fólico, etc., estos estudios se han limitado al hígado^{8,9}.

El ácido fólico, por su parte, resulta ser un potente inhibidor de la xantinoxidasa (XO), dificultando de esta manera la producción de RLO durante la revascularización. Se ha demostrado que esta substancia es 10 veces más efectiva que el ALLO para inhibir la oxidación de la xantina por la XO en mamíferos¹⁰.

En la literatura revisada no existe más que un trabajo sobre el ácido fólico en el SRI¹¹, y en él se estudia su efecto sobre el aumento de permeabilidad vascular producida por la isquemia de 60 minutos en un modelo experimental de asa aislada de gato. Los autores refieren haber logrado con este fármaco una reducción significativa del aumento en la permeabilidad vascu-

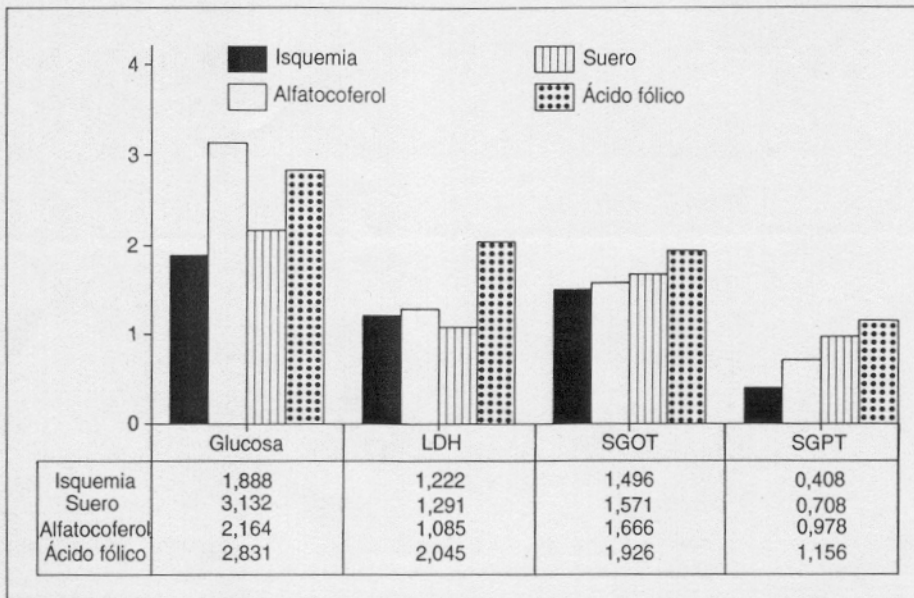


Fig. 6. Niveles plasmáticos de glucosa, LDH, SGOT y SGPT en cada una de las series experimentales.

lar, y concluyen que sus resultados avalan la hipótesis de que la XO es una fuente importante de RLO en el SRI.

Nuestros resultados corroboran los hallazgos de estos autores, ya que el ácido fólico, administrado justo antes de restablecer el flujo sanguíneo, ha disminuido la mortalidad y la lesión intestinal, tanto microscópica como macroscópica. Con respecto a la mortalidad, el descenso ha sido superior al provocado por el ALLO y la SOD, a la vez que en los parámetros lesionales ha igualado los resultados de dichos fármacos. En cambio, el alfatocofeol, a pesar de mejorar los diferentes aspectos estudiados, lo ha conseguido de una forma mucho menos intensa que cualquiera de las otras sustancias analizadas¹.

Estos resultados son coherentes con la hipótesis ya comentada: cuanto más precoz sea el nivel de actuación del fármaco mayor efectividad mostrará en el control del SRI. De este modo, el ácido fólico, que actúa a un nivel similar al del ALLO, resulta ser el más potente. En cambio, el alfatocofeol, que actúa posteriormente a la SOD, resulta menos eficaz que ésta.

Así, nuestros resultados apoyan la sugerencia de Sugino et al⁸ en el sentido de que el alfatocofeol exógeno colabora con los antioxidantes endógenos para disminuir la lesión provocada por el SRI, actuando de un modo inespecífico a los RLO ya formados.

Los trabajos que estudian las alteraciones bioquímicas que se producen en el SRI son poco concluyentes. Así, Pérez-García et al¹² observaron que la ligadura de la AMS durante 3 horas en el perro se seguía de hipoglucemia y aumento moderado de las transaminasas. Sin embargo, una experiencia más reciente de los mismos autores¹³, en la que se comparan las modificaciones producidas por el pinzamiento de la AMS frente a las inducidas por la oclusión de la arteria hepática, concluye que en el SRI existe un claro aumento de la GPT y GOT, y que este aumento no puede atribuirse a un SRI por disminución del flujo de sangre portal.

Podría interpretarse que, como consecuencia de la disminución del flujo portal derivado de la isquemia mesentérica, se produciría un sufrimiento hepático dando lugar a una hiperglucemia (por vía de la glucogenólisis) y un aumento de enzimas liberadas por los hepatocitos (GOT, GPT, LDH).

Estos resultados positivos a nivel experimental aconsejan proseguir los ensayos con finalidad terapéutica utilizando los diferentes fármacos de tipo antioxidante. Además de ampliar el espectro de sustancias para seleccionar las más eficaces, podría ser interesante valorar asociaciones de fármacos con mecanismos de acción complementarios.

Bibliografía

1. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Ortiz J, Méndez N. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidante en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enf Dig* 1991; 80:237-241.
2. Dalsing M, Grosfeld J, Shiffler N. Superoxide dismutase: A cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res* 1983; 34:589-596.
3. Parks D. Oxygen radicals: Mediators of gastrointestinal pathology. *Gut* 1989; 30:293-298.
4. Omar R, Nomikos I, Picorelli G, Sabino J, Agarwal N. Prevention of postischemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 1989; 30:510-514.
5. Castro del Pozo S. Intervención de los radicales libres de oxígeno en la patología. *Rev Clin Esp* 1989; 7-13.
6. Gutteridge J. The role of oxygen radicals in tissue damage and ageing. *Pharm J* 1987; 10:401-406.
7. Grek O. Changes in the lipid component of liver microsomal membranes during the postischemic period after administration of alpha-tocopherol and lidocaine. *Vopr Med Khim* 1988; 34:57-53.
8. Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki Y. Changes in the level of endogenous antioxidants in the liver of mice with experimental endotoxemia and the protective affects of antioxidants. *Surgery* 1989; 105:200-206.
9. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery* 1986; 99:184-192.
10. Lewis A, Murphy L, McCalla C, Fleary M, Porcell S. Folic acids a potent inhibitor of xantine oxidase. *J Biol Chem* 1984; 259:12-15.
11. Granger D, McCord J, Parks D, Hollwarth M. Xantine oxidase inhibitors attenuate ischemic-induced vascular permeability changes in the rat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90:80-84.
12. Pérez García M, Gómez Alonso A, Pérez García A, Battaner E. Función hepática intestinal (Datos analíticos). Estudio experimental. *Cir Esp* 1980; 34:93-102.
13. Suso Alea F, Gómez Alonso A, González Orus J, García García J, Cuadrado Idogoya F, Ramos Hidalgo A. Repercusión hepática de la isquemia intestinal aguda. Estudio experimental. *Rev Esp Enf Dig* 1988; 74:219-224.