

Departamento de Fisiología. Escuela de Medicina de La Habana.

## FUNCIÓN HEPÁTICA EN RATAS CON SÍNDROME DE INTESTINO CORTO TRATADAS CON OZONO Y FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Michel Gómez Pacheco<sup>1¶</sup>, Esmir Camps Calzadilla<sup>2¶</sup>, Mercedes Gámez Fonseca<sup>3¶</sup>, Marianela Estrada del Cueto<sup>3§</sup>, Nelson Merino García<sup>3¶</sup>, Leandro Pérez López<sup>1¶</sup>, Haycelvi Cisneros Betancourt<sup>4§</sup>, Heidys Garrote Santana<sup>5§</sup>.

### RESUMEN

El Síndrome de intestino corto (SIC) es una entidad grave, consecuencia de resecciones intestinales extensas, que provoca alteraciones hepáticas por la interacción funcional entre ambos órganos durante los procesos digestivos y absorptivos. Se evaluó el efecto de la administración de Ozono (O<sub>3</sub>) y Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE) como posibles protectores y regeneradores hepáticos en un modelo animal de SIC después de resección del 75% de la extensión del intestino delgado (ID). Veinticuatro ratas Wistar machos (Edad: 8 semanas; Peso: 300 ± 10 gramos) se dividieron en 3 grupos de 8 animales cada uno para recibir los tratamientos siguientes: Grupo I: O<sub>3</sub>; II: FCE; y III: FCE + O<sub>3</sub>. Se crearon otros 2 grupos para medir el impacto de la resección intestinal (IV: SIC no tratado); y el estrés quirúrgico (V: Laparotomía + Sección intestinal seguida de sutura), respectivamente. Cada grupo experimental se dividió, a su vez, en 2 subgrupos de 4 animales cada uno, según el término de la ventana de observación: 7 y 14 días, respectivamente, después de la resección. El FCE se administró por vía intraperitoneal a 60 µg/Kg peso/día. El O<sub>3</sub> se instiló por vía rectal en dosis de 0.5 mg/Kg peso/día. Las ratas con SIC no tratadas mostraron modificaciones de la arquitectura celular hepática, junto con aumento de la Bilirrubina total, y las enzimas Alanino-Amino Transferasa (ALAT), Aspartato-Amino Transferasa (ASAT), y Láctico deshidrogenasa (LDH), ésta última a expensas de la isoenzima 5. El O<sub>3</sub> y el FCE, independientemente o en combinación, impidieron la elevación postquirúrgica de las transaminasas, pero no tuvieron efecto sobre los otros indicadores de la función hepática, al menos en las dosis y esquemas en que fueron administrados. **Pacheco Gómez M, Camps Calzadilla E, Gámez Fonseca M, Estrada del Cueto M, Merino García N, Pérez López L, Cisneros Betancourt H, Garrote Santana H. Función hepática en ratas con Síndrome de Intestino Corto tratadas con ozono y factor de crecimiento epidérmico. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2010;20(2):175-91. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.**

**Descriptores DeCS:** Síndrome de Intestino Corto / Ozono / Factor de Crecimiento Epidérmico / Estrés Quirúrgico / Daño hepático.

<sup>1</sup> Licenciado, Especialista de Primer Grado en Fisiología Normal y Patológica. <sup>2</sup> Médico, Especialista de Primer Grado en Fisiología Normal y Patológica. <sup>3</sup> Doctor en Ciencias Médicas. <sup>4</sup> Licenciada en Bioquímica. <sup>5</sup> Médico, Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y de Primer Grado en Hematología.

<sup>¶</sup> Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". <sup>§</sup> Instituto de Hematología e Inmunología.

<sup>¶</sup> Instituto de Farmacia de los Alimentos. Ciudad de la Habana. Cuba.

Recibido: 14 de Abril del 2010. Aceptado: 5 de Junio del 2010.

Michel Gómez Pacheco. Departamento de Fisiología. Escuela de Medicina de La Habana. Playa. La Habana.  
Correo electrónico: [hgarrote@infomed.sld.cu](mailto:hgarrote@infomed.sld.cu)

## INTRODUCCIÓN

El Síndrome del Intestino Corto (SIC) es un conjunto de signos y síntomas que incluyen múltiples alteraciones de la anatomía y fisiología intestinales, lo que trae consigo complicaciones nutricionales, infecciosas y metabólicas que dañan el sistema gastrointestinal.<sup>1</sup> El tracto gastrointestinal (TGI) es la vía natural para la nutrición humana. En el SIC, si se elimina entre el 50-75% de la longitud del intestino delgado (ID), se comprometen funciones como la digestión, secreción y absorción de diversas sustancias, lo que conduce a un cuadro grave caracterizado por diarreas, mala absorción intestinal, desequilibrios hidroelectrolíticos, déficit de absorción de nutrientes, anemia, infecciones, e incluso trastornos de la actividad de otros órganos, como el hígado, el pulmón y los riñones.<sup>2</sup> Una resección intestinal mayor del 85% se considera prácticamente incompatible con la vida, y el paciente necesitaría, para sobrevivir, de ingreso hospitalario permanente y soporte vital y nutricional intensivo y constante.<sup>1-3</sup>

La evolución de los pacientes con SIC se ve agravada por factores adicionales como la edad mayor de 50 años, la resección de la porción ileal del ID, la ausencia de válvula ileocecal, y la ausencia de colon.<sup>4</sup> Durante los primeros días y semanas tras la resección intestinal, la diarrea líquida es el síntoma dominante. Además de las diarreas, en el SIC aparecen otras complicaciones como la deshidratación, el déficit de vitaminas, la úlcera duodenal, la litiasis vesicular, las infecciones, la insuficiencia hepática, el fallo multiorgánico, el coma y la muerte.<sup>5-6</sup>

En todas estas complicaciones del SIC son de especial interés las relacionadas con la función hepática. Por ser el hígado el primer destino de todas las sustancias absorbidas en el ID, cualquier alteración de este órgano afectará indiscutiblemente a la

célula hepática. El hígado está constantemente secretando bilis que es transportada, mediante un sistema especializado de conductos, hasta la vesícula biliar, donde se almacena. En respuesta a estímulos originados en el ID, la secreción biliar indispensable para la digestión de las grasas es vertida en la primera porción del duodeno, a través de la ampolla de Váter. La bilis está compuesta de ácidos biliares, Colesterol, fosfolípidos, y Bilirrubina, que son compuestos orgánicos; además de glutatión, proteínas, IgA, 5-nucleotidasa, aminopeptidasa, glucosa, metabolitos de las hormonas tiroideas y esteroideas, y diferentes electrolitos, entre los que se encuentran  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , disueltos en agua. Todos estos elementos contribuyen a la neutralización del pH ácido proveniente del estómago.<sup>7-9</sup>

Otro aspecto importante en la posible repercusión hepática del SIC es la inflamación que ocurre a este nivel.<sup>10-11</sup> El intestino es un ecosistema donde coexisten microorganismos vivos e inertes, y en el que funcionan barreras microbianas que impiden la proliferación y colonización por microorganismos endógenos y exógenos que pueden producir daños en el intestino. También en el ID existe un complejo sistema defensivo que protege al organismo contra el ataque de gérmenes patógenos que, debido a la ingestión de alimentos, tienen una puerta de entrada ideal al interior del organismo. Este sistema defensivo está organizado sobre todo en el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) constituido por nódulos linfoides, placas de Peyer, linfocitos y macrófagos que actúan sobre agentes dañinos potencialmente peligrosos al organismo.<sup>12</sup> En el SIC, por la eliminación de una gran superficie de intestino delgado, se pierde un porcentaje importante del MALT, lo que priva al organismo de esta importante protección. La herida quirúrgica, la manipulación y la contaminación propia

de este proceder, pueden desencadenar un proceso inflamatorio con sepsis secundaria, lo que provoca compromiso hepático posterior, por la relación que se establece entre el ID y el hígado mediante la vena porta.<sup>13</sup> Tan importantes son las complicaciones hepáticas en el SIC, que se ha recomendado la realización de un trasplante de hígado en aquellos pacientes en los que se decida el trasplante de ID.<sup>14</sup>

Varias han sido las alternativas terapéuticas aplicadas en los pacientes con SIC, y que van desde los cuidados intensivos hasta medicamentos específicos que propician una rápida y marcada proliferación del tejido intestinal remanente, con el objetivo de incrementar la funcionalidad del mismo, y así, minimizar las complicaciones secundarias que ensombrecen el pronóstico y la calidad de vida de estos enfermos.<sup>15-16</sup> Mediante modelos experimentales del SIC reproducidos en ratas se ha estudiado la respuesta adaptativa intestinal ante inductores de la proliferación epitelial, como el factor de crecimiento epidérmico (FCE), con el que se ha demostrado una rápida recuperación de la mucosa intestinal comprometida.<sup>17</sup> El ozono (O<sub>3</sub>) ha sido otro agente que se ha propuesto como inductor de la respuesta compensatoria intestinal debido a las propiedades antioxidantes del mismo, y con el que se han reportado resultados satisfactorios.<sup>18-20</sup> Estos fármacos, con beneficios comprobados sobre la recuperación intestinal, pudieran evitar o reducir las complicaciones que trae aparejado el SIC, en particular el daño hepático secundario, que pudiera quedar atenuado en su magnitud, o mostrarse de forma menos agresiva. Incluso el empleo simultáneo de tales medicamentos pudiera constituir una alternativa de elección en aquellos pacientes con la expresión más grave del SIC.

Por todo lo anterior, en este trabajo se exploró el efecto del O<sub>3</sub> y el FCE, empleados de forma aislada o en combinación, sobre indicadores bioquímicos de la función hepática de ratas a las que se les provocó un SIC después de resección intestinal masiva.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio analítico, prospectivo, en el Departamento de Fisiología del ICBP Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón” (La Habana, Cuba), entre Enero del 2009 y Diciembre del 2009, para responder a los objetivos del trabajo. Se utilizaron 40 ratas machos Wistar, de 8 semanas de edad, y 300 ± 10 g de peso. Las ratas se mantuvieron en un ambiente de humedad y temperatura controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12x12 horas, consumieron agua *ad libitum*, y se alimentaron con una dieta balanceada provista por el CENPALAB Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio hasta el día de los experimentos. La composición nutrimental del pienso es como sigue: harina de maíz, harina de trigo, salvados integrales, y miel de abejas como aglutinador. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con los lineamientos y principios éticos para el manejo y cuidado de los animales de laboratorios normados institucionalmente.<sup>21</sup>

**Diseño experimental:** Las ratas se dividieron en 5 grupos de estudio, compuestos cada uno por 8 ratas. Cada grupo, a su vez, se subdividió en otros 2 subgrupos (A/B) de 4 ratas cada uno, a fin de evaluar los efectos del tratamiento aplicado en 2 momentos diferentes. Las determinaciones bioquímicas previstas se realizaron en el subgrupo A a los 7 días de la intervención quirúrgica; mientras que en el subgrupo B fue a los 14 días.

Los grupos de estudio quedaron constituidos como sigue: Grupo I: SIC-O<sub>3</sub>: SIC tratado con O<sub>3</sub>; Grupo II: SIC-FCE: SIC tratado con FCE; y Grupo III: FCE + O<sub>3</sub>: SIC tratado combinadamente con FCE y O<sub>3</sub>. Se crearon otros 2 grupos para medir el impacto de la resección intestinal: Grupo IV: SIC no tratado; y el estrés quirúrgico: Grupo V: Laparotomía + Sección intestinal seguida de sutura; respectivamente. La conformación de los grupos experimentales se resume a continuación:

de Treitz y la válvula ileocecal. El 75% de la longitud así estimada del intestino delgado se resecó después de ligadura de los vasos sanguíneos con catgut simple, y el tránsito intestinal se restituyó mediante una yeyuno-ileostomía termino-terminal con una catgut 6-0. Durante el desarrollo del acto quirúrgico, los órganos intraabdominales se protegieron con apósitos embebidos en suero fisiológico. Terminada la anastomosis, los órganos se reintrodujeron gentilmente en la cavidad peritoneal, y se rehidrataron con 5

Grupo	Descripción	Tratamiento aplicado
I: SIC-O <sub>3</sub>	Ratas con SIC tratadas con ozono	Dosis empleada: 0.5 mg de O <sub>3</sub> /Kg de peso corporal/día por vía rectal, a partir del primer día postquirúrgico
II: SIC-FCE	Ratas con SIC tratadas con FEC	Dosis empleada: 60 µg de FCE/Kg de peso corporal/día por vía intraperitoneal, a partir del primer día postquirúrgico
III: FCE + O <sub>3</sub>	Ratas con SIC tratadas con una combinación de O <sub>3</sub> + FCE	Dosis empleadas: Iguales que en los grupos anteriores, a partir del primer día postquirúrgico
IV: Control: SIC no tratado	Ratas con SIC no tratadas	No se aplicó tratamiento medicamentoso alguno
V: Estrés quirúrgico	Ratas en las que se realizó una laparotomía con sección transversal del ID, seguida de sutura para restablecer el tránsito	No se aplicó tratamiento medicamentoso alguno

La resección intestinal se realizó según se ha descrito previamente.<sup>22</sup> Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con Pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso corporal) como paso previo al acto quirúrgico, y restringidas en posición de decúbito supino sobre la mesa de operaciones. El abdomen del animal fue rasurado, limpiado, aseptizado y aislado mediante paños estériles. La cavidad abdominal fue abierta por planos tras una incisión en la línea media abdominal. La apertura se mantuvo mediante separadores. La longitud del intestino delgado se midió con un hilo de seda extendido sobre el borde anti-mesentérico del mismo entre el ángulo

mL de suero fisiológico instilados en la cavidad. La apertura de la cavidad abdominal se cerró por planos con catgut crómico para los planos interiores, y seda negra para la piel. La herida quirúrgica fue cubierta con una solución antiséptica. Terminado el acto quirúrgico, las ratas se mantuvieron en jaulas separadas durante las primeras 12 horas posteriores a la operación, durante las cuales solo se les administró agua. Terminado este período, se le permitió al animal el consumo de ración a libre demanda.

Con fines comparativos, se incluyó el Grupo V para estimar la respuesta del animal al estrés quirúrgico. La resección del

75% del intestino delgado comporta un riesgo elevado de complicaciones (incluida la muerte) asociadas a la insuficiencia digestiva y de absorción de los nutrientes, a los que se suma la agresión quirúrgica propia de la intervención a abdomen abierto.<sup>22</sup> Con las ratas de este grupo experimental se procedió de forma similar a las incluidas en los grupos I-IV, hasta el momento de la apertura de la cavidad abdominal. Una vez expuesta la unión ileocecal, el intestino se seccionó transversalmente en un sitio situado a 5 cm por delante de la válvula ileocecal. El tránsito intestinal se reconstituyó con catgut 6-0. Concluido este paso, el acto quirúrgico siguió los mismos procedimientos expuestos previamente.

Todas las ratas ayunaron durante 48 horas antes de la operación, y solo se les permitió la ingestión de agua.

**Administración del tratamiento medicamentoso:** Los tratamientos medicamentosos se le administraron diariamente al animal de experimentación, a partir del primer día de evolución post-quirúrgica, hasta el día del sacrificio, según el grupo de estudio correspondiente. El FCE se administró por vía intraperitoneal en dosis de 60 µg/Kg de peso corporal. El FCE es producido por el CIGB Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana (Cuba), y se presenta en forma liofilizada como bulbos de 250 µg. El O<sub>3</sub> se administró por vía rectal mediante una cánula en dosis de 0.5 mg/Kg de peso corporal, y empleando un equipo OZONIZAN PM 83K, a una presión de oxígeno de 0.10 mm Hg.<sup>20</sup> El O<sub>3</sub> fue producido en el Laboratorio de Fisiología Renal del ICBP "Victoria de Girón" de La Habana (Cuba) mediante un equipo OZOMED 400 (Centro de Investigaciones del Ozono de La Habana, Cuba).

**Determinaciones analíticas y análisis histológicos:** El protocolo experimental se

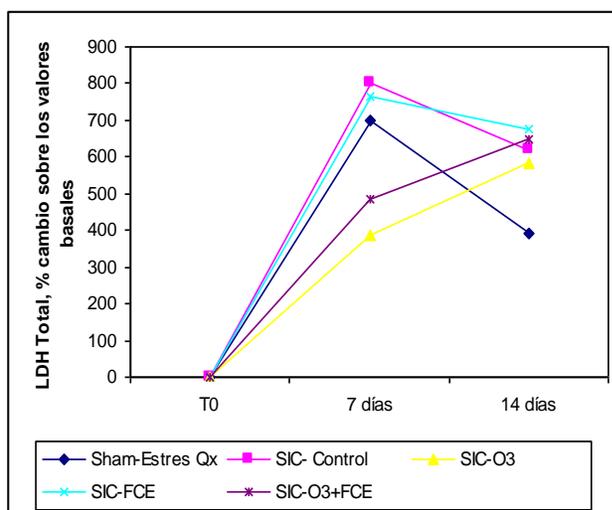
concluyó indistintamente en los días 7 y 14 de evolución post-quirúrgica, con el sacrificio del animal por inhalación de éter en cámara creada *ad hoc*, previa anestesia general, y la toma de muestras de sangre y tejidos. En las muestras de sangre se ensayaron la Deshidrogenasa láctica total y las isozimas correspondientes;<sup>23-24</sup> la Alanino-Aminotransferasa (ALAT);<sup>25</sup> la Aspartato-Amino-transferasa (ASAT);<sup>25</sup> la Fosfatasa alcalina (FAL);<sup>25</sup> la Bilirrubina Total (BT),<sup>25</sup> la Bilirrubina Directa (BD),<sup>25</sup> y la Bilirrubina Indirecta (BI);<sup>25</sup> el Colesterol,<sup>25</sup> y la Albúmina.<sup>25</sup> Se retiraron fragmentos de tejido hepático, que se colocaron en frascos con formol tamponado al 7%, y se enviaron al Departamento de Anatomía Patológica del IFAL Instituto de Farmacia y Alimentos de La Habana (Cuba) para la inclusión en parafina, corte, coloración con Hematoxilina-Eosina, y análisis histológico.<sup>25</sup>

**Procesamiento de datos y análisis estadístico-matemático de los resultados:** Las características de los animales, los valores de las enzimas hepáticas, Bilirrubina, Albúmina y Colesterol, y los resultados de los análisis histológicos de las muestras de tejido hepático, se almacenaron en un contenedor digital creado con EXCEL® para OFFICE® de WINDOWS® (Microsoft, Redmond, Virginia, Estados Unidos). Los valores de las variables bioquímicas observados en los días 7 y 14 se expresaron como porcentajes de los valores de referencia del animal, según lo determinado en el Departamento de Fisiología del ICBP "Victoria de Girón". Las diferencias en el comportamiento de las variables de interés se exploraron mediante técnicas de análisis de varianza basadas en la distribución F de Fisher-Snedecor.<sup>26</sup> En todo momento se utilizó un valor  $\alpha$  del 5% para denotar las asociaciones como significativas.<sup>26</sup>

## RESULTADOS

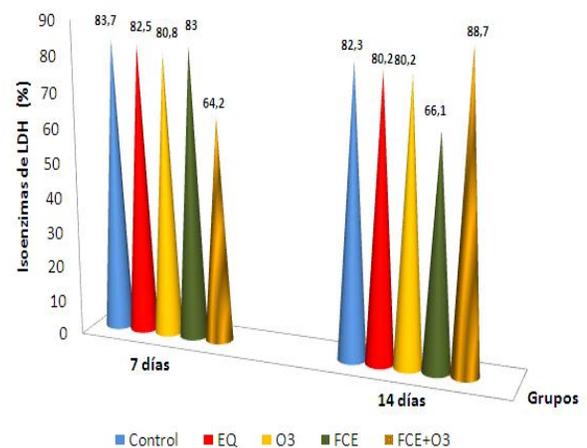
La Figura 1 muestra el comportamiento de la LDH total en los distintos grupos experimentales. El estrés quirúrgico provocó un incremento del 700% de los valores basales de la enzima en el día 7 de evolución postquirúrgica, seguida de una leve disminución en el día 14. Un comportamiento similar se observó en las ratas en las que se provocó un SIC. Los protocolos experimentales no causaron cambios significativos en el comportamiento de la LDH total.

Figura 1. Comportamiento de la LDH total en los distintos grupos experimentales. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



de la actividad transaminasa hepática; más bien, una reducción del 20% respecto de los valores basales. Por el contrario, la resección intestinal masiva provocó un aumento significativo de la actividad de tales enzimas, que llegó a ser del 100% en el día 14 de evolución post-quirúrgica. El tratamiento aplicado impidió el incremento de la actividad transaminasa hepática tras la resección intestinal: hallazgos denotados como significativos (ANOVA de una vía seguido de test *post hoc*:  $p < 0.05$  para los grupos I-III).

Figura 2. Comportamiento de la isozima 5 de la LDH. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



La Figura 2 muestra el comportamiento de la isozima 5 de la LDH según el grupo experimental. No importa el momento de observación, o el protocolo experimental, esta isozima constituyó más del 60% del total de la LDH.

La Figura 3 muestra el comportamiento de las enzimas ALAT y ASAT en los diferentes grupos experimentales. El estrés quirúrgico no trajo consigo un incremento

La Figura 4 muestra el comportamiento de la BT en los diferentes grupos experimentales. El estrés quirúrgico provocó un aumento del 200% de los valores de la BT a los 7 días de la evolución post-quirúrgica, respuesta que se mantuvo también a los 14 días. La resección intestinal causó un incremento similar en las cifras de la BT. Ninguno de los tratamientos aplicados resultó en un cambio de la

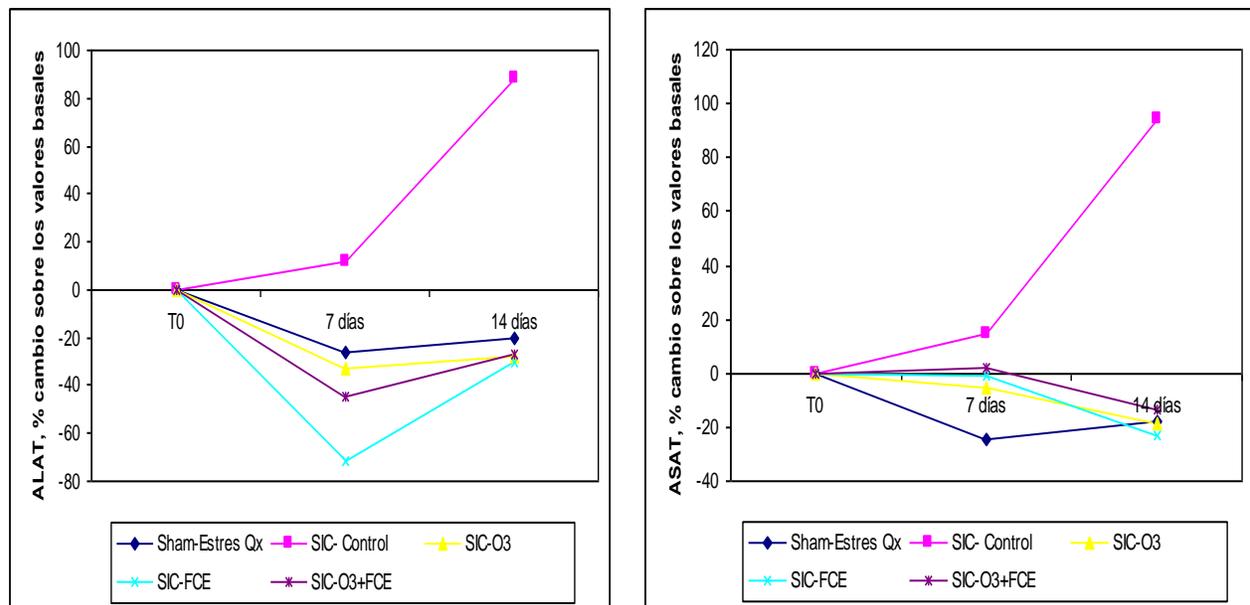
respuesta observada en la BT tras el acto quirúrgico.

La Figura 5 muestra el cambio observado en las formas conjugada (directa) y no conjugada (indirecta) de la Bilirrubina tras el acto quirúrgico en los diferentes grupos experimentales. El cambio en la BD fue similar al observado con la BT, siendo los valores cercanos al 1000% de los valores basales. El cambio observado se mantuvo en el día 14 de la evolución post-quirúrgica. Por el contrario, la actividad quirúrgica, independientemente de la resección intestinal o no, resultó en una disminución de los valores de la forma no conjugada (indirecta) de la Bilirrubina.

tratamiento medicamentoso no afectó la respuesta observada en la actividad de la FAL tras la resección intestinal. Se debe hacer notar que los valores de la FAL siempre estuvieron dentro de los intervalos de referencia propios del animal de experimentación.

La Figura 7 muestra el comportamiento de la Albúmina sérica tras el acto quirúrgico. El estrés quirúrgico produjo un incremento del 100% de los valores basales de esta proteína secretora hepática. La resección intestinal masiva causó un comportamiento similar. Los protocolos medicamentosos redujeron a la mitad el aumento observado en el día 7 tras el acto quirúrgico, pero los

Figura 3. Comportamiento de las enzimas ALAT y ASAT en los diferentes grupos experimentales. Izquierda: ALAT. Derecha: ASAT. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.

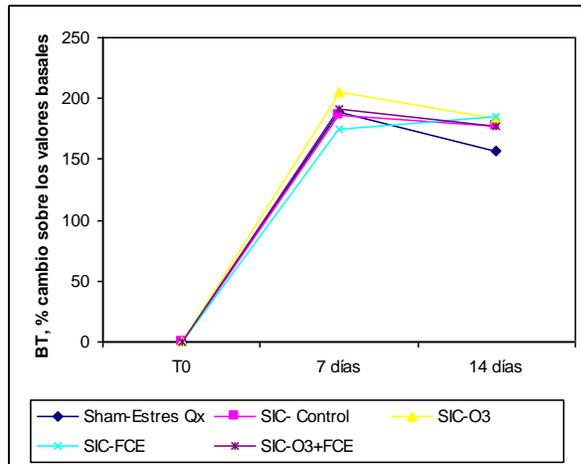


La Figura 6 muestra el comportamiento de la FAL tras el acto quirúrgico. El estrés quirúrgico se tradujo en una reducción del 50% de los valores basales de la enzima. La resección intestinal provocó un cambio similar en la actividad de la FAL. El

cambios no alcanzaron significación estadística. En el día 14 de la evolución post-quirúrgica también se observó reducción en el aumento de las cifras de Albúmina sérica, llamativo para los casos en los que se aplicó el FCE solo o en

combinación. Tampoco los cambios observados en el día 14 fueron estadísticamente significativos.

Figura 4. Comportamiento de la BT en los diferentes grupos experimentales. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



La Figura 8 muestra el comportamiento del Colesterol sérico en los diferentes grupos experimentales tras el acto quirúrgico. El estrés quirúrgico resultó en una reducción del 50% de los valores basales del Colesterol. La resección intestinal trajo consigo tan solo una disminución del 20% de los valores iniciales del esteroide. Los protocolos medicamentos aplicados no introdujeron cambios diferentes en la respuesta post-quirúrgica del Colesterol.

Finalmente, la Figura 9 muestra los hallazgos observados en los cortes de tejido hepático al cierre de la ventana de observación. Independientemente del protocolo experimental aplicado, en todos los animales se observaron picnosis nuclear, con deformidad de los núcleos de los hepatocitos, eosinofilia, formación de microgranulomas, y focos de reactividad de histiocitos.

## DISCUSIÓN

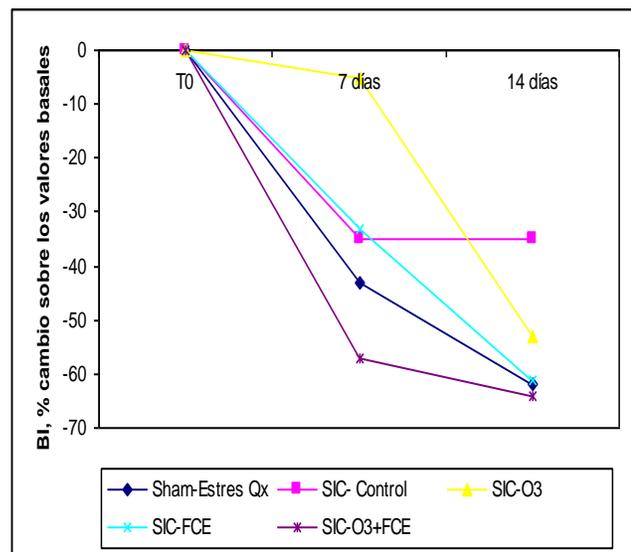
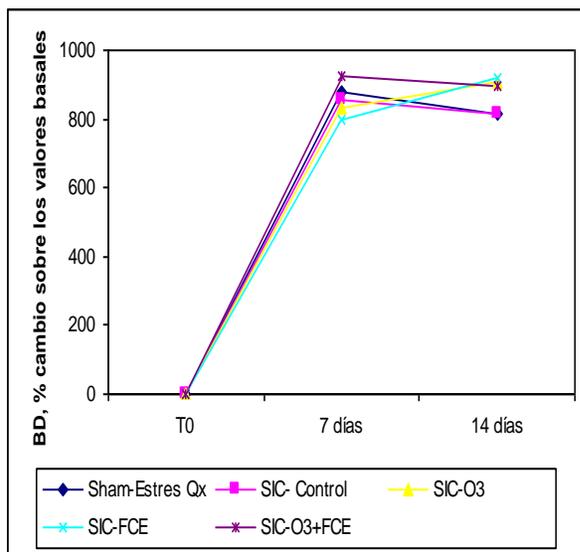
Las modificaciones hepáticas secundarias al SIC pueden aparecer en el paciente en el día 7 después la resección intestinal masiva.<sup>2</sup> La mayoría de los estudiosos justifican estas alteraciones como consecuencia del uso de la Nutrición parenteral.<sup>7,13,27</sup> Otros autores plantean que el daño hepático surge independientemente de esta alternativa nutricional, y está dado por las modificaciones anatómicas y funcionales que provoca el SIC *per se*.<sup>28</sup> Cada vez más se piensa en una consecuencia ligada al fracaso intestinal, la disminución del pool de sales biliares, el sobrecrecimiento bacteriano, y la traslocación de toxinas desde el intestino delgado al hígado, condición que la Nutrición parenteral puede agravar.<sup>13,29</sup>

En el presente estudio se observó el comportamiento de indicadores seleccionados de la función hepática, y la histología hepática, después de enterectomías masivas en ratas de laboratorio. La LDH: un tetrámero de 2 polipéptidos denominados M (del inglés *muscle*, “músculo”) y H (del inglés *heart*, “corazón”), es una enzima que participa en la vía glicolítica y cuya actividad es necesaria para la interconversión entre los ácidos láctico y pirúvico.<sup>23-24</sup> La concentración tisular de LDH es mayor que la presente en el plasma, por lo que niveles plasmáticos elevados de esta enzima pueden reflejar liberación de la misma por parte de la célula dañada.<sup>23-24,30-32</sup> Tras la resección intestinal se encontraron valores altos de la LDH en la sangre del animal. Los valores elevados de LDH fueron similares a los encontrados por estudiosos egipcios en ratas bajo el efecto del tetracloruro de carbono: un potente tóxico químico.<sup>30</sup> Tal comportamiento también se observó en las ratas sujetas a estrés quirúrgico, lo que pudiera estar dado por ser la LDH uno de los

reactantes de fase aguda que alcanza su máxima expresión en estadios iniciales del proceso inflamatorio.<sup>23-24,30-32</sup> Los tratamientos aplicados no modificaron este comportamiento.

patrón electroforético donde predominó la isoenzima 5 en relación al resto de las isozimas, que se mostraron disminuidas. Los valores de LDH-5 fueron superiores a los tenidos como normales, e incluso a los

Figura 5. Comportamiento de las formas conjugada (directa) y no conjugada (indirecta) de la Bilirrubina en los diferentes grupos experimentales. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



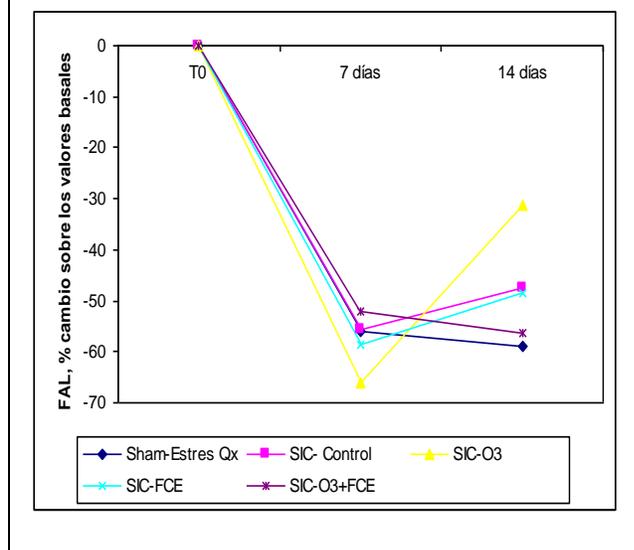
La LDH es una enzima citoplasmática que se encuentra en la mayoría de los órganos. Dada la extensa distribución de la misma, la presencia de ésta en la sangre puede responder a diferentes injurias originadas en múltiples localizaciones.<sup>33-34</sup> La determinación del patrón de distribución de las isozimas que componen la LDH puede orientar al investigador en cuanto al origen de la afectación, pues el predominio de una u otra isoenzima se relaciona con el posible órgano o sistema afecto. La LDH-1 y la LDH-2 se encuentran en el corazón, riñón y hematíes; mientras que la LDH-3 en los tejidos linfáticos, plaquetas y tejidos malignos.<sup>23-24</sup> Por su parte, la LDH-4 y la LDH-5 se concentran en el hígado.<sup>23-24,30-32</sup> En las determinaciones hechas en los animales de experimentación, se observó un

encontrados en ratas expuestas a estrés agudo,<sup>33</sup> químicos industriales como el clorocanpeno,<sup>34</sup> o potentes tóxicos como el tetracloruro de carbono.<sup>35</sup> El daño intestinal reflejado por la presencia sanguínea de la isoenzima 5 tampoco fue afectado por el tratamiento medicamentoso aplicado.

La BT mostró un comportamiento similar a la LDH total en las ratas, independientemente del grupo experimental de pertenencia, con valores incrementados significativamente respecto de los tenidos como normales. El incremento observado en la BT fue a expensas de la BD. Estos resultados son similares a los encontrados en perros en los que se practicaron resecciones intestinales masivas, y en los que la elevación de la BT a expensas de la forma conjugada (directa) se interpretó como un

signo de colestasis y daño hepático, que tiende a recuperarse en el tiempo.<sup>36</sup>

Figura 6. Comportamiento de la FAL en los diferentes grupos experimentales. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



En la ictericia hepatocelular existen alteraciones en la captación, conjugación y excreción de la Bilirrubina, por lo que se producen aumentos paralelos de la formas conjugada y no conjugada de este compuesto. Sin embargo, en la colestasis pura solo se producen alteraciones de la excreción, por lo que se acompaña de hiperbilirrubinemia conjugada, junto con una discreta elevación de la bilirrubina no conjugada por competencia en la captación.<sup>37</sup> En el SIC pueden establecerse estos dos mecanismos, ya que el hígado está forzado a sintetizar grandes cantidades de colesterol, que es el precursor de los ácidos biliares, con el consecuente aumento en la producción de litiasis que modifica el normal funcionamiento de los hepatocitos, produciéndose así alteraciones de la membrana canalicular de la célula hepática, además de inflamación y aceleración de los procesos intracelulares que conducen a la

aparición de los fenómenos de apoptosis.<sup>36</sup> Este comportamiento tras la enterectomía masiva evidencia el compromiso hepático establecido,<sup>38</sup> y que las alternativas empleadas de tratamiento medicamentoso a las dosis utilizadas no pudieron modificar.

La actividad de la FAL disminuyó tras el acto quirúrgico, independientemente de que éste incluyera la sección transversal del intestinal, o una enterectomía, si bien los valores observados se mantuvieron dentro de los intervalos de referencia biológicos. Estudios similares conducidos en perros mostraron un descenso progresivo de la actividad FAL en relación con el tiempo de evolución post-quirúrgica. Tal comportamiento parece ser dependiente de la isozima intestinal, debido a la pérdida de masa intestinal tras la resección y/o la reducción del contenido intestinal de Zinc y vitamina D que se produce posteriormente.<sup>36</sup> Tal vez ello explique la ausencia de respuesta del animal al tratamiento medicamentoso aplicado. Otros autores han reportado un incremento significativo de la actividad de esta enzima transcurridos 14 días de la resección intestinal, pero el aumento observado siempre se ha relacionado con el uso de la Nutrición parenteral concomitante.<sup>13</sup>

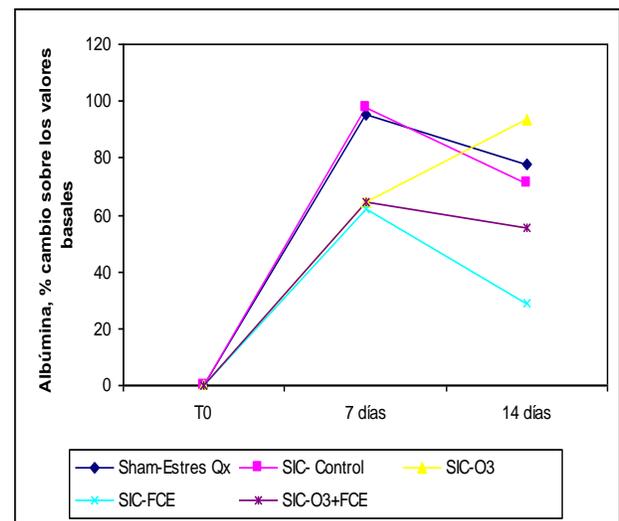
La FAL corresponde a un grupo de enzimas cuya función se centra en la hidrólisis de las uniones éster del ácido orto-fosfórico a pH alcalino. La ubicación de esta enzima en la membrana celular sugiere que interviene en el transporte de sustancias a través de ellas. La FAL sérica tiene varios orígenes, aunque las fuentes más importantes son el hígado, los huesos y el intestino. El aumento de la FAL de origen hepático revela obstrucción biliar intrahepática o extrahepática, así como la existencia de un proceso hepático expansivo, infiltrativo o de naturaleza granulomatosa.<sup>37</sup> En la presente investigación, los valores de la enzima, a pesar de la caída observada, se

mantuvieron dentro de la normalidad en todo el período de observación. Este resultado pudiera estar relacionado con la pérdida de la isoenzima intestinal, al resecar gran parte del ID, quedando enmascarado el posible incremento progresivo de la enzima.<sup>13,36-37</sup> Por otra parte, en la mayoría de los estudios revisados, los valores de la FAL se elevan alrededor de la segunda semana de tratamiento, y coincide, en todos ellos, el uso de la Nutrición parenteral.<sup>13,37</sup>

Los cambios más interesantes se observaron en el comportamiento de las transaminasas hepáticas. Tras la resección intestinal se constató un aumento de la actividad de estas enzimas que fue cada vez mayor según fuera el tiempo de evolución post-quirúrgica, con los niveles mayores de actividad observados en el día 14. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores que han reportado una elevación tardía de las transaminasas cuando se compararon con otras pruebas funcionales hepáticas.<sup>13,36</sup> La ALAT es un marcador fundamental para el diagnóstico de las enfermedades hepatobiliares agudas, mientras que la ASAT se eleva considerable y especialmente en los casos de necrosis cardíaca.<sup>30</sup> La elevación de la actividad ALAT indica una alteración de la membrana citoplasmática, mientras que el aumento de la ASAT revela una lesión de las organelas citoplasmáticas. Debido a que la ASAT se presenta en formas diferentes en la célula y la mitocondria, y la ALAT está confinada casi exclusivamente a la fracción soluble del hígado, se pudiera definir entonces cuál de las dos enzimas predominará en los procesos hepáticos inflamatorios o necróticos.<sup>30</sup> Por lo tanto, la observación de valores elevados de la actividad de estas 2 enzimas tras la resección intestinal pudiera estar justificada por el daño hepático existente, sumado a las complicaciones inflamatorias multi-sistémicas que trae aparejado el SIC.<sup>8,13,36,39,40-41</sup>

Los tratamientos aplicados modificaron el comportamiento post-enterectomía de las transaminasas hepáticas. Este hallazgo es interesante, por cuanto pudiera hablar del efecto hepato-protector del medicamento aplicado, y así, mejorar la capacidad de respuesta del animal a los eventos sistémicos que se presentan tras el SIC.

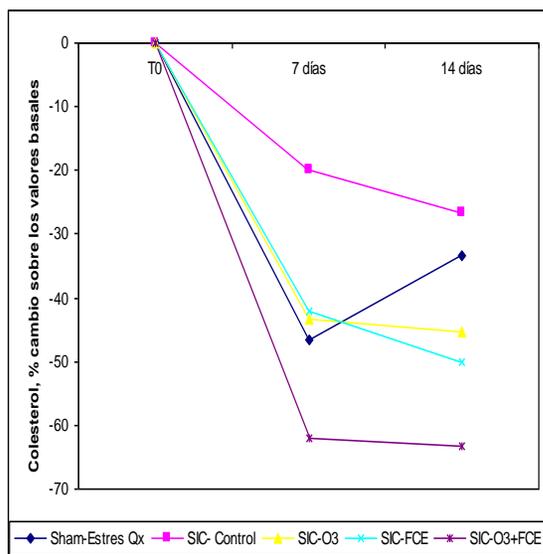
Figura 7. Comportamiento de la Albúmina sérica en los diferentes grupos experimentales. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



El Colesterol y la Albúmina fueron los otros indicadores de la función hepática que se incluyeron en este estudio para modelar la respuesta del animal a la resección intestinal. Si bien se observó una reducción de los niveles séricos de Colesterol tras el acto quirúrgico, los valores observados se correspondieron con la normalidad propia del animal. Los estudios revisados han reportado un descenso discreto de los valores séricos de Colesterol que pudiera estar relacionado con la resección ileal.<sup>36,39</sup> Se debe hacer notar que el pool corporal de Colesterol es pequeño, pero sujeto a una estricta homeostasis, ya que ante una

disminución del aporte exógeno ocurre un incremento de la síntesis endógena por el hígado. En las ratas enterectomizadas se produce precisamente una disminución del aporte exógeno debido a la resección del íleon, que constituye el área digestiva especializada en la absorción de las grasas alimentarias.<sup>40-41</sup>

Figura 8. Comportamiento del Colesterol sérico en los diferentes grupos experimentales. En cada momento de observación se presenta la media de los valores observados en 4 animales diferentes.



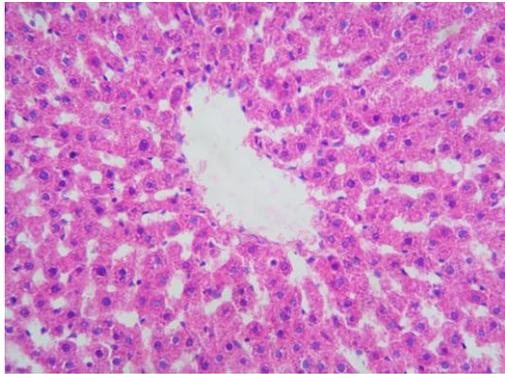
El hígado ocupa un papel central en la síntesis de proteínas, por lo que las enfermedades de este vital órgano modifican el espectro seroproteico del animal. El descenso de la Albúmina sérica traduce insuficiencia hepatocelular.<sup>37</sup> En el presente estudio se observó un incremento de la Albúmina sérica tras el acto quirúrgico, pero este comportamiento pudiera estar relacionado con la deshidratación que aparejado al acto quirúrgico y/o la resección intestinal, y denotaría, por lo tanto, hemoconcentración.<sup>36,40-41</sup> Además, como esta proteína tiene una vida media de 20-26

días, cualquier cambio en la concentración sérica de la misma pudiera quedar enmascarado en los estadios incipientes del compromiso hepático.<sup>37</sup> Otros autores también han señalado disminución de las cifras de albúmina en las primeras semanas después de la resección intestinal, debido al compromiso de la síntesis proteica hepática, probablemente por absorción en la sangre portal de algunos metabolitos bacterianos tóxicos.<sup>42</sup> No se puede dejar de mencionar que la Albúmina sérica puede actuar como un reactante negativo de fase aguda.

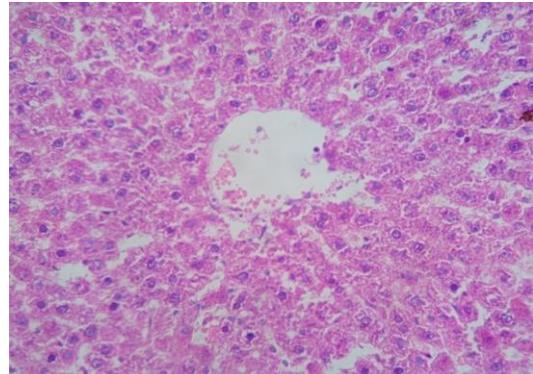
Los estudios histológicos del tejido hepático conducidos en la presente investigación sirvieron para determinar la integridad del órgano estudiado, y demostrar la presencia de alteraciones estructurales que pudieran comprometer su normal funcionamiento. Tras la enterectomía masiva se observaron alteraciones del núcleo del hepatocito, interpretadas como indicios de cariopexis incipiente asociada a manifestaciones de autólisis. También se constató la presencia de eosinofilia, y focos de histiocitos, eventos que tienen lugar en los procesos agudos, reactivos e inflamatorios, y que pudieran estar relacionados con el compromiso hepático secundario al SIC.

Fue llamativo que estos hallazgos histológicos también se observaran en las ratas en las que se practicó la sección transversal del asa ileal, seguida de anastomosis, y ello apunta a la intensidad de la agresión que comporta el acto quirúrgico *per se*. También llamó la atención que las alteraciones descritas tras la enterectomía se encontraron en los animales tratados con uno u otro protocolo, lo que apunta a que las alternativas de tratamiento no modificaron los cambios estructurales que tienen lugar en el hígado en el período de tiempo explorado.

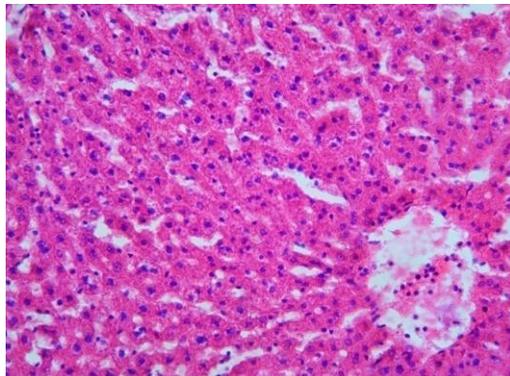
Figura 9. Hallazgos histopatológicos en los cortes de tejido hepático.



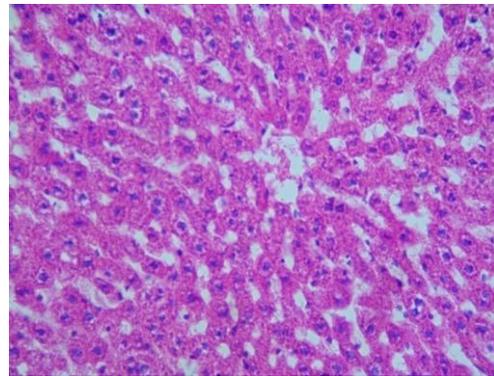
Grupo I: O3: Picnosis y tumefacción mitocondrial.



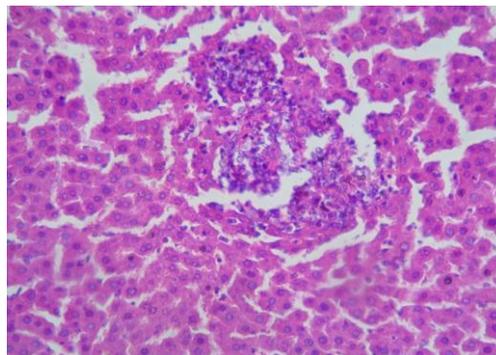
Grupo II: FCE: Picnosis nuclear, tumefacción mitocondrial, y reactividad de las células de Kupffer.



Grupo III: Ozono + FCE: Marcada eosinofilia y condensación con deformidad de los núcleos de los hepatocitos.



Grupo IV: Control: SIC no tratado: Focos aislados con reactividad de histiocitos, eosinofilia, retracción y picnosis nuclear con deformidad de los núcleos.



Grupo V: Estrés quirúrgico: Eosinofilia, numerosos focos reactivos de células de Kupffer, y formación de microgranulomas semejantes a los nódulos paratifoideos.

## CONCLUSIONES

Tras la resección intestinal masiva aparecen en el hígado de la rata alteraciones estructurales y funcionales que pueden ser explicadas por la agresión que representa el acto quirúrgico y/o los cambios sistémicos que ocurren secundariamente a la pérdida del intestino delgado. El empleo de FCE y O<sub>3</sub>, ya sea por separado o en combinación, no repercutió favorablemente sobre los indicadores bioquímicos estudiados de función hepática, a las dosis utilizadas, durante el tiempo prescrito. Las alteraciones estructurales encontradas en el hígado de las ratas enterectomizadas no se modificaron tampoco con la aplicación de los tratamientos experimentales. Se debe hacer notar, no obstante, que es probable que estos tratamientos puedan tener un efecto hepatoprotector debido al comportamiento observado en las transaminasas hepáticas. Nuevos estudios pudieran servir para caracterizar mejor la respuesta del animal a la resección intestinal, y el papel beneficioso de los tratamientos propuestos sobre la estructura y función hepáticas, así como de otros órganos de la economía.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Sergio Santana Porbén, Editor-Ejecutivo de la RCAN Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, por toda la ayuda brindada en la redacción de este manuscrito.

## SUMMARY

*Short Bowel Syndrome (SBS) is a severe illness, resulting from extensive bowel resections, and causing liver dysfunctions in view of the functional interactions between these two organs during digestive and absorptive processes. The effect of the administration of Ozone (O<sub>3</sub>) and Epidermal Growth Factor (EGF) as potential liver protectors and regenerators were assessed by means of an SBS animal model after*

*resection of 75% of the length of the small bowel. Twenty-four male Wistar rats (Age: 8 weeks; Weight: 300 ± 10 grams) were distributed between 3 groups each of 8 animal in order to receive the following treatments: Group I: O<sub>3</sub>; II: EGF; and III: EGF + O<sub>3</sub>. Another 2 groups were constructed with the purpose of measuring the impact of bowel resection (IV: untreated SBS); and surgical stress (V: Laparotomy + Bowel section followed by suture), respectively. Each experimental was further divided into two subgroups of 4 animals each, in keeping with the length of the observation window: 7 and 14 days, respectively, after surgery. EGF was administered by intraperitoneal route at doses of 60 µg/Kg body weight/day. O<sub>3</sub> was instilled by rectal route at doses of 0.5 mg/Kg body weight/day. Untreated SBS rats showed modifications of liver cell architecture, along with increase in Total Bilirubin, liver Alanine-Amino Transpherase (ALAT), Aspartate-Amino Transpherase (ASAT), and Lactic dehydrogenase (LDH), this last one at the expense of isoenzyme 5. O<sub>3</sub> and EGF, independently or combined, prevented the post-surgical rise of liver transaminases, but had no effect upon the other indicators of liver function, at least at current doses and schemes of administration. Pacheco Gómez M, Camps Calzadilla E, Gámez Fonseca M, Estrada del Cueto M, Merino García N, Pérez López L, Cisneros Betancourt H, Garrote Santana H. Hepatic function in rats with Short Bowel Syndrome treated with epidermal growth factor and ozone. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2010;20(2):175-91. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929*

*Subject headings: Short Bowel Syndrome / Ozone / Epidermal Growth Factor / Surgical Stress / Liver damage.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donohoe CL, Reynolds JV. Short bowel syndrome. *Surgeon* 2010;8:270-9.
2. DiBaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA. Intestinal rehabilitation and the Short

- Bowel Syndrome: Part 1. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1386-95.
3. Jackson C, Buchman AL. Advances in the management of short bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2005;7:373-8.
  4. Modi BP, Langer M, Ching YA, Valim C, Waterford SD, Iglesias J, Duro D, Lo C, Jaksic T, Duggan C. Improved survival in a multidisciplinary short bowel syndrome program. *J Pediatr Surg* 2008;43:20-4.
  5. O'Keefe SJD, Buchman AL, Fishbein TM, Jeejeebhoy KN, Jeppesen PB, Shaffer J. Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006; 4:6-10.
  6. Beattie LM, Barclay AR, Wilson DC. Short bowel syndrome and intestinal failure in infants and children. *Paediatrics and Child Health* 2010;20:485-91.
  7. Meehan JJ, Georgeson KE. Prevention of liver failure in parenteral nutrition-dependent children with short bowel syndrome. *Journal of Pediatric Surgery* 1997;32:473-5.
  8. Nasr A, Avitzur Y, Ng VL, De Silva N, Wales PW. The use of conjugated hyperbilirubinemia greater than 100  $\mu\text{mol/L}$  as an indicator of irreversible liver disease in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2007;42: 359-62.
  9. Weber TR, Keller MS. Adverse effects of liver dysfunction and portal hypertension on intestinal adaptation in short bowel syndrome in children. *Am J Surg* 2002;184:582-6.
  10. Sondheimer JM, Asturias E, Cadnapaphornchai M. Infection and cholestasis in neonates with intestinal resection and long-term parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:131-7.
  11. O'Brien DP, Nelson LA, Kemp CJ, Williams JL, Wang Q, Erwin CR, Hasselgren PO, Warner BW. Intestinal permeability and bacterial translocation are uncoupled after small bowel resection. *J Pediatr Surg* 2002;37:390-4.
  12. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol Pathol* 2006;34:599-608.
  13. Moreno Villares JM. Complicaciones hepáticas asociadas al uso de Nutrición parenteral. *Nutr Hosp [España]* 2008;23(Supl 2):25-33.
  14. Spagnuolo MI, Ruberto E, Guarino A. Isolated liver transplantation for treatment of liver failure secondary to intestinal failure. *Ital J Pediatr* 2009; 35:28-33.
  15. DiBaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA. Intestinal rehabilitation and the Short Bowel Syndrome: Part 2. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1823-32.
  16. Zhu W, Li N, Ren J, Gu J, Jiang J, Li J. Rehabilitation therapy for short bowel syndrome. *Chin Med J* 2002;115:776-8.
  17. McMellen ME, Wakeman D, Longshore SW, McDuffie LA, Warner BW. Growth factors: possible roles for clinical management of the short bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg*. 2010;19:35-43.
  18. Antoszewski Z, Kulej J, Wygledowski M, Kozakiewski L, Moszkowicz T, Chmurzewska H. Some aspects of ozone therapy. *Przegl Lek* 1997;54:561-4.
  19. Calunga JL, Zamora ZOB, Borrego B, del Río S, Barber E, Menéndez S y cols. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediator Inflammation* 2004;13:13-9.
  20. López Miranda J. Ozono como promotor de la rehabilitación intestinal de ratas sujetas a enterectomías masivas. *RCAN*

- Rev Cubana Aliment Nutr 2007;17:109-28.
21. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Publication number 85-23 (revised). NIH National Institutes of Health. Bethesda (Maryland, United States): 1985.
  22. Santana Porbén S, Rodríguez Sosa V, Rodríguez Sotelo P, Wong Navarro R, Martínez Canalejo H. Resección intestinal en ratas. Boletín de Cirugía Experimental [Centro de Cirugía Experimental de la Escuela de Medicina de La Habana] 1987;1:19-29. Reimpreso en: RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2009;19:343-60.
  23. Babson AL, Babson SR. Kinetic colorimetric measurement of serum Lactate Dehydrogenase activity. Clin Chem 1973;19:766-9.
  24. Fritz PJ, Morrison WJ, White EL, Vesell ES. Comparative study of methods for quantitation of lactate dehydrogenase isozymes. Analytical Biochemistry 1970;30:443-53.
  25. Fox JG. Laboratory Animal Medicine. ACLAM Series. Academic Press. New York:1994.
  26. Berry G, Matthews JNS. Statistical methods in medical research. Fourth Edition. Blackwell Publishers. Massachussets: 2002.
  27. Larrondo H, León D, Pérez H, Herrera ML, Duarte M, Rivero E, González M. Nutrición enteral vs. Nutrición parenteral en el paciente crítico. Acta Médica del Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" 2003;11:26-37.
  28. Williamson RCN, Chir M. Intestinal adaptation: Structural, functional and cytokinetic changes. N Engl J Med 1978;298:1393-1402.
  29. Gouttebel MC, Saint-Aubert B, Astre C, Joyeux H. Total parenteral nutrition needs in different types of short bowel syndrome. Dig Dis Sci 1986;31:718-23.
  30. Marino O, Ramírez M, Bastardo G, Silva T, Alarcón AO. Alteraciones enzimáticas séricas en ratas tratadas con bisulfito de sodio. Acta Científica Venezolana 2000;51:257-63.
  31. Drent M, Cobben NA, Henderson RF, Wouters EF, van Diejen-Visser M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. Eur Respir J 1996;9:1736-42.
  32. Torres S, Montes de Oca M, Loeb E, Zabner-Oziel P, Wallis V, Hernández N. Isoenzimas de lactatodeshidrogenasa en el músculo esquelético de pacientes con EPOC. Arch Bronconeumol 2009;45:75-80.
  33. Sánchez O, Arnau A, Pareja M, Poch E, Ramírez I, Soley M. Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress. Cell Stress & Chaperones 2002;7:36-46.
  34. Kuzminskaya UA, Alekhina SM. Effect of chlorocamphene on the isoenzyme spectrum of Lactate Dehydrogenase in rat serum and liver. Environmental Health Perspectives 1976; 13:127-32.
  35. Faddah L, Abdel-Hamid N, Abul-Naga Y, Ibrahim S, Mahmoud A. Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the liver tissue of chemically-injured rats treated by combinations of diphenyl dimethyl bicarboxylate. J Appl Biomed 2007;5:77-80.
  36. Alvar M. El síndrome de intestino corto como desencadenante de traslocación bacteriana y fallo multiorgánico. Trabajo de tesis. Universidad Complutense de Madrid. Madrid: 1993.
  37. Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodés J, Sherlock S, Dooley J y cols. Enfermedades del Aparato Digestivo: Hepatología. En: Medicina Interna

- (Editor: Farreras R). Decimocuarta Edición. Harcourt. Madrid: 2000.
38. Kocoshis S, Beath S, Booth I, García CA, Goulet O, Kaufman S; *et al.* Intestinal failure and small bowel transplantation, including clinical nutrition: Working Group Report of the Second World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39 Suppl 2:S655-S661.
  39. Maruy A. Short bowel syndrome in children. *Rev Peru Pediatr* 2008;61: 234-8.
  40. Alarcón T. Síndrome de intestino corto. *Gastr Latinoam* 2007;18:175-8.
  41. Fernández A. Insuficiencia intestinal. *Colombia Médica* 2005;36:29-31.
  42. Rodríguez C. Alteraciones analíticas después de la resección subtotal del intestino delgado en el perro. *Rev AVEPA* 1984;4:127-34.