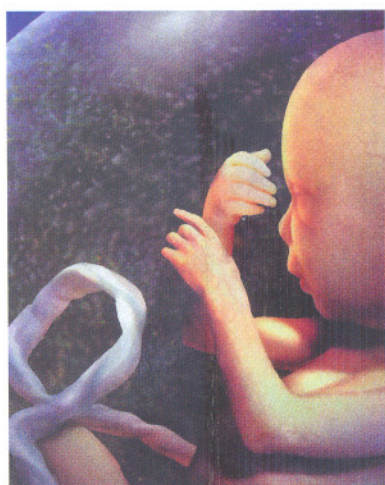




La hiperoxia con oxígeno al 100% daña la mucosa intestinal en ratas recién nacidas luego de asfixia experimental



Autores:

Mario More Flores

Unidad de Investigación Experimental y Servicio de Cirugía del Instituto Especializado de Salud del Niño (IESN).

Arturo Ota Nakasone

Hospital Edgardo Rebagliati (EsSalud)
Departamento Académico de Pediatría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Sonia Pereyra López

Servicio de Anatomía Patológica (IESN).

Roberto Shimabuku Azato

Servicio de Neonatología (IESN)
Departamento Académico de Pediatría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Resumen

Hay una controversia actual sobre el uso de oxígeno al 100% o aire ambiental para la reanimación de recién nacidos asfixiados. Un probable factor de riesgo en la enterocolitis necrosante temprana es la asfixia neonatal con hipoxia, isquemia y reperfusión y el consiguiente daño en la mucosa intestinal.

Hipótesis: Si un animal modelo de asfixia experimental se le expone en un ambiente con oxígeno al 100%, presentará un mayor daño en la mucosa intestinal que si se expone a aire ambiental con oxígeno al 21%.

Objetivo: Determinar si hay mayor daño en la mucosa intestinal en los animales con cuadros de hipoxia-asfixia-reperfusión, expuestos con oxígeno al 100% comparado con aire ambiental.

Métodos: Se usaron 61 ratas recién nacidas de la especie Holzman con un peso de 10 a 14 g. Las ratas de los grupos A (n=30) y B (n=31) fueron sometidas a asfixia experimental. Luego las ratas del grupo A fueron expuestas a hiperoxia con oxígeno al 100% y las de grupo B a aire ambiental con oxígeno al 21%, por 24 horas. Siete días después fueron sacrificadas y muestras de la pared intestinal enviadas a estudio anatomopatológico para tinción hematoxilina-eosina.

Resultados: En las ratas del grupo A hubo 73,3%

(n=22) con injuria intestinal y en las del grupo B 26,7% (n=8). Prueba de Chi cuadrado=3,98 ; p=0,04; OR=2,93; IC 95% de 1,00 a 8,58. En los grupos control no hubo cambios significativos.

Conclusión: Los animales asfixiados sometidos a estas concentraciones altas de oxígeno tienen un riesgo 3 veces mayor de presentar daño en mucosa intestinal.

Introducción

Se ha reportado que una de las causas probables de necrosis intestinal en el recién nacido es el fenómeno isquemia-reperfusión, implicado como causa de enterocolitis necrotizante en el prematuro y en el recién nacido de bajo peso^(1,2,3).

Desde el punto fisiopatológico, la base del proceso radica en el fenómeno de isquemia-reperfusión del intestino, de tal forma que cualquier mecanismo que lleve a una disminución del riego sanguíneo intestinal con reinstalación del mismo, después de cierto tiempo, produce lesión del intestino. En la isquemia reperfusión, sobre todo en la etapa de reoxigenación, se producen radicales libres de oxígeno (ROS) a través de un mecanismo en donde la hipoxia, a nivel celular permitirá que la enzima xantino deshidrogenasa se transforme en xantinoxidasa. Este a su vez favorece la aparición de especies denominados radicales libres de oxígeno tales

como el singlete de oxígeno, peróxido de hidrógeno e hidróxilo, que hiperoxidán las membranas celulares lipídicas, con el consecuente daño multicelular^(2, 4, 5).

Asimismo se ha demostrado en animales que, luego de asfixia experimental, cuando se reaniman estos casos con oxígeno al 100% se establece un estado de hiperoxia, que produce daño morfológico en el cerebro⁽⁸⁾.

El intestino es un órgano muy sensible a estos cambios orgánicos principalmente a nivel ileal, por lo que nos preguntamos: ¿Qué efectos se producirán en el intestino de animales modelos de isquemia-hipoxia cerebral?

Nosotros planteamos la hipótesis que el intestino, luego de asfixia experimental, debe sufrir lesión, y que este daño es mayor cuando se le expone a hiperoxia con oxígeno al 100%.

Material y métodos

El estudio experimental se llevó a cabo en ratas recién nacidas lactantes, nacidas de parto espontáneo y amamantadas por sus madres hasta el momento del experimento. Las ratas Holzmann adultas, de ambos géneros, fueron adquiridas inicialmente en el Instituto Nacional de Salud (Lima), criadas y reproducidas en el Bioterio de la Unidad de Investigación Experimental del IESN. El estudio cumplió con las Normas Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales⁽⁶⁾.

Para conseguir el modelo animal de asfixia neonatal se empleó la preparación de Levine modificada⁽⁷⁾. El experimento se efectuó con ratas de 7 días de edad que pesaban entre 10 y 14 gramos. Fueron anestesiadas con éter inhalado. Usando un microscopio estereoscópico se hizo una incisión para llegar a la arteria carótida izquierda, la cual fue ligada con sutura quirúrgica, para lograr la isquemia. El procedimiento fue realizado a temperatura ambiente de 22 a 26 °C, y no duró más de 5 minutos por espécimen. Luego las ratas fueron introducidas en una cámara de plexiglás transparente 20x20x20 cm, que estaba dentro de una incubadora estándar reciclada (Isolette, Air-Shields, Inc., Hatboro, Pensilvania), 19040, EE.UU.) a 32 y 33 °C. Para lograr el efecto de hipoxia, dentro de la cámara se introdujo una mezcla de oxígeno humidificado al 8%, balanceado con nitrógeno (Praxair Perú S.A.), por 2 horas.

Después de la hipoxia-isquemia a las ratas se les inyectó subcutáneamente dextrosa al 5% en un volumen igual al 5% de su peso corporal para contrarrestar el efecto del ayuno. Luego fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos: unas (Grupo A) fueron reoxigenadas con oxígeno al 100% y otras (Grupo B) con aire ambiental (oxígeno al 21%), por 24 horas, dentro de una misma incubadora. Hubo dos grupos control que no fueron

Foto 1

Mucosa normal del intestino de rata. Se observa las vellosidades intestinales íntegras. Foto a 20x (H-E).

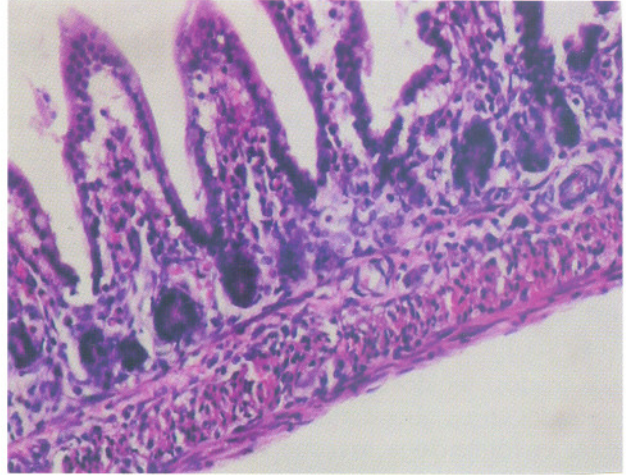


Foto 2

Mucosa intestinal afectada con fragmentación de vellosidades. Foto a 20x (H-E).

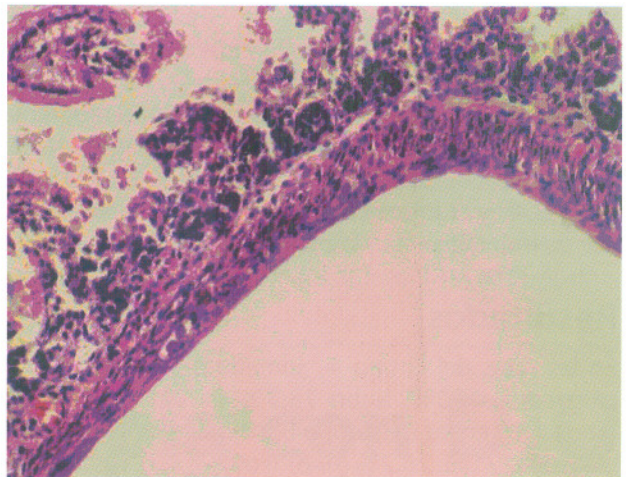
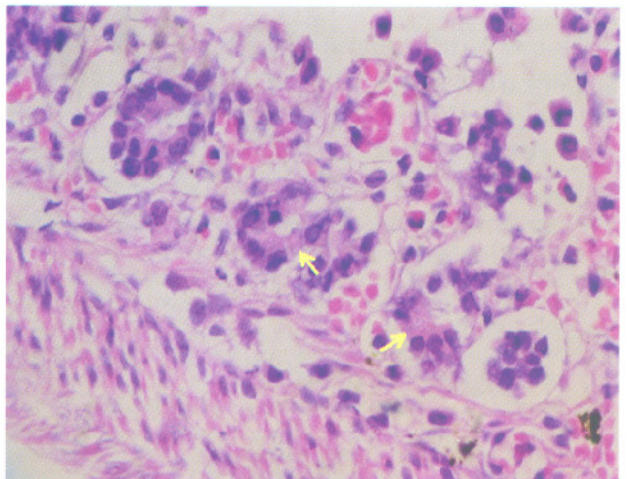


Foto 3

Mucosa intestinal con desaparición de vellosidades. Presencia de células necróticas sin núcleo (células ghost), señaladas con flechas amarillas. Foto a 40x (H-E).



sometidas a asfixia experimental: Grupo C (n=6) con oxígeno al 8% y Grupo D (n=9) con oxígeno al 100%, ambos por 24 horas.

La concentración de oxígeno fue controlada mediante un oxímetro ambiental (Ohmeda 5120, BOC Health Care, Madison, EE.UU.).

Al término de las 24 horas, las ratas de ambos grupos fueron devueltas en jaulas con sus madres, donde continuaron con la lactancia natural. Los pesos corporales fueron controlados diariamente con una balanza analítica digital (Sartorius, AG Göttingen, Alemania). Seis días después, a los 14 días de edad fueron sacrificadas y se les extrajo muestras de intestino delgado, porción yeyuno-ileal, los que se conservaron en formol al 10%.

Los tejidos, teñidos con hematoxilina-eosina, fueron revisados en los laboratorios de anatomía patológica del IESN, en forma ciega, sin conocer a qué grupo pertenecía el espécimen. La observación se hizo con un microscopio óptico y magnificación a 400x. Se consideró lesión de mucosa intestinal si había algunas de las siguientes características de grados 1 al 5: bulas subepiteliales con áreas de pérdida epitelial, pérdida total de epitelio veloso, compromiso de criptas parcial o total y necrosis de estroma y trombosis vascular⁽⁹⁾.

Los cálculos estadísticos fueron hechos con el programa Epiinfo de Epiinfo. La prueba Chi cuadrado (χ^2) fue usada para comparar proporciones. Se estimó el *odds ratio* (OR) y el intervalo de confianza al 95% $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

En las ratas del Grupo A, sometidas a hiperoxia con oxígeno al 100%, hubo 73,3% (n=22) con injuria intestinal y en las del Grupo B, bajo aire ambiental con oxígeno al 21%, 26,7% (n=8) (Fotos 1,2,3). Las lesiones fueron de grado 1 al 4, no se encontraron lesiones de grado 5⁽⁹⁾. Al comparar ambas proporciones (Tabla 1) la prueba χ^2 tuvo un valor de 3,98 con un $p=0,04$; el *odds ratio* fue (OR) fue de 2,93, con un intervalo de confianza al 95% de 1,00 a 8,58. En los grupos control no hubo cambios significativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bulkley B G. Reactive oxygen metabolites and reperfusion: injury aberrant triggering of rethiculoendothelial function. *Lancet* 1994; 344:934-936.
2. Dale AP, Bulky BG, Gauger S O. Role of oxygen derived free radicals in digestive tract disease. *Surgery* 1983 ;94 (3):415-421.
3. Sibbons PD, Spitz L, Vetzen Van D . Necrotizing enterocolitis induced by circulatory interruption in the ileum of the neonatal piglet *Pediatric Pathology* 1982;12 :1-14.
4. Mc Cord J M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985;312 (8):158-163.
5. Dormandy T.L. An approach to free radicals. *Lancet*. 1983; 2(8357):10104.
6. Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas: Normas internacionales para la investigación biomédica con animales. *Bol Of Sanit Panam* 1990; 108: 637-641.
7. Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K. Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177 (3): 519-526.
8. Shimabuku R, Ota A, Pereyra S, Véliz B, Paz E, Nakachi G, More M, Oliveros M. Hyperoxia with 100 % oxygen following hypoxia-ischemia increases brain damage in newborn rats. *Biology of the Neonate* 2005; 88:169-171.
9. Kurana B, Corbally MI, Manning T et al: Glutathion S trasferasa: A potencial new marker Of intestinal Ischemia. *J Pediatric Surg* 2002;27(1):1543-1545.
10. More Flores M, Achata Muñoz R, Paz Edith, Pereira S: Enterocolitis Necrotizante en el lactante aspectos clinicos y quirúrgicos de 25 casos. *Paediatrica* 2000; 3(2):6-10.

Tabla 1
Lesión de la mucosa intestinal por hiperoxia con oxígeno al 100% en ratas recién nacidas

Grupos	Con lesión (N°)	Sin lesión (N°)
Hiperoxia O ₂ 100%	22	8
Aire ambiental O ₂ 21%	15	16

$\chi^2=3,98$, $p=0,04$

Discusión

En este estudio se pudo determinar que un mayor número de animales asfixiados presentan lesión de mucosa intestinal cuando se exponen a hiperoxia con oxígeno al 100%, siendo el riesgo tres veces mayor en comparación con los que se reoxigenan en aire ambiental.

La isquemia y reperfusión intestinal han sido descritas y explicadas por el reflejo de buceo al momento de la asfixia; reflejo que se presentan en los mamíferos acuáticos, y en los que la sangre abandona el lecho esplácnico para irrigar áreas vitales como el cerebro y corazón^(1, 2).

Los cambios bioquímicos durante el período de isquemia son la base para la producción de radicales libres de oxígeno al momento de la reperfusión y reoxigenación^(2, 4, 5).

Por lo anterior podemos deducir que en nuestro modelo de isquemia-hipoxia en ratas recién nacidas, en el que se producen lesiones del Sistema Nervioso Central⁽⁸⁾, también se encuentran lesiones de la mucosa intestinal caracterizadas por despoblamiento de la mucosa intestinal y necrosis epitelial, y que este hecho es más frecuente cuando se expone a los animales asfixiados a un ambiente con oxígeno al 100%.

Sugerimos que mecanismos semejantes podrían ser los pasos iniciales, para el desarrollo de una lesión intestinal como la enterocolitis necrosante que se desarrolla en el paciente pediátrico⁽¹⁰⁾.