

# Efecto de la isquemia sobre el tejido hepático de la rata: un modelo experimental

Mayor M.C. Marco Aurelio **Santiago-Ávila**\*, Tte. Cor. M.C. Héctor **Noyola-Villalobos**\*\*

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Ciudad de México.

## RESUMEN

**Introducción.** La cirugía hepática siempre ha representado un reto para el cirujano; lo complejo de su arquitectura y las grandes posibilidades de hemorragias no controladas, ocasionan una morbilidad muy elevada.

**Objetivo.** Diseñar un modelo experimental de exclusión vascular hepática en ratas.

**Método.** Se incluyeron 106 ratas, un grupo control y cuatro grupos experimentales, el grupo control se sometió a una laparotomía sin exclusión vascular, y los cuatro grupos experimentales se clasificaron con base en los distintos tiempos de exclusión vascular (15, 30, 45 y 60 minutos). El procedimiento de exclusión vascular consistió en la oclusión de la arteria hepática, vena porta y venas suprahepáticas. Para la correcta evaluación del daño hepático, se tomaron muestras de sangre para PFH, y biopsias hepáticas para su análisis mediante microscopía óptica y electrónica, 5 y 10 minutos después de la reperusión, respectivamente.

**Resultados.** Los resultados del estudio mostraron alteraciones metabólicas importantes con elevación de las PFH y cambios inflamatorios significativos sin llegar a la necrosis hepatocelular.

**Conclusiones.** El análisis de los resultados nos permite concluir lo siguiente: a) 60 minutos de isquemia hepática, se inicia una cascada inmunológica, con activación de las células de Kupffer, que conduce finalmente a la lesión hepatocelular; b) la tolerancia a la isquemia en el hígado de ratas permite el estudio y la manipulación de este modelo para futuros proyectos, y c) el entendimiento del daño establecido y la reproducción fiel de la lesión hepática proporcionaron una experiencia y aprendizaje invaluable.

**Palabras clave:** isquemia, hígado, lesión hepatocelular.

## *Effect of ischemia over hepatic tissue of rat: An experimental model*

## SUMMARY

**Background.** Hepatic surgery has been always a challenge to surgeons; the complexity of its architecture and the highest risk of bleeding causes a relevant morbidity and mortality.

**Objective.** To design an experimental model of hepatic vascular exclusion in rats.

**Method.** 106 rats were included, a control and four experimental groups. Control group undergone to a laparotomy without vascular exclusion, the experimental group were classified based on different times of vascular exclusion (15, 30, 45, and 60 minutes). Vascular exclusion procedure consisted in hepatic artery, porta and suprahepatic venous occlusion. Hepatic injury was measured through blood sample for function hepatic test and biopsies 5 and 10 minutes after reperfusion.

**Results.** We found relevant changes such as an increase of function hepatic test and inflammatory significant changes without hepatocellular necrosis.

**Conclusions.** After 60 minutes of hepatic ischemia an immunologic cascade began with activation of Kupffer cells which leads finally to hepatocellular damage. Tolerance to ischemia in rat liver allow its study and manipulation; and the understanding of established damage and the exact reproduction of hepatic lesion were extremely valuable.

**Key words:** Ischemia, hepatic, hepatocellular injury.

\* Graduado del curso de especialización en Medicina Integral y de Urgencias. Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Actualmente Adscrito a la 27a. Z.M. El Ticui, Guerrero, México. \*\* Jefe de Cirugía de Mujeres del Hospital Central Militar. Especialidad en Cirugía General y Cirugía de Hígado y Vía Biliar.

Correspondencia:  
Dr. Marco Aurelio Santiago Ávila.  
27a. Zona Militar. El Ticui, Guerrero, México.

Recibido: Febrero 20, 2002.

Aceptado: Junio 18, 2002.

## Antecedentes

Muchos estudios experimentales se han enfocado a la patogénesis ocasionada por los radicales libres de oxígeno en las lesiones de isquemia-reperfusión del hígado. Los neutrófilos y el Factor de Necrosis Tumoral (FNT) son implicados en este tipo de lesión; la aplicación de dosis subletales de lipopolisacárido bacteriano (LPS), ha demostrado ejercer efecto protector contra la isquemia-reperfusión por inhibición del FNT.<sup>1</sup>

La adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales y su activación, es el mecanismo que ocasiona lesión, ya que liberan radicales libres de oxígeno y factores quimiotácticos después de la repercusión; esto ocasiona un fenómeno de "no reflujo". Es posible que los neutrófilos generen radicales libres reactivos que ingresan al espacio extracelular, donde ocasionan lesión hepática por medio de la lipoperoxidación de la membrana del hepatocito.<sup>2-6</sup> La lesión ocasionada a las células endoteliales conduce a la liberación de Factor Agregante de Plaquetas (FAP) que lleva a cambios en la microcirculación por adherencia plaquetaria. Cuando se usan agentes inhibidores de este autacoide, como el caso de WEB 2170, se logra disminuir la lesión hepática secundaria.

Los ensayos más recientes hechos en células de Kupffer, muestran que el daño ocasionado posterior a la reperfusión es consecuencia de la liberación de radicales libres de oxígeno. Otra teoría es que el daño ocasionado por el anión superóxido puede ser limitado si se emplea cloruro de gadolinio o partículas de látex que suprimen a las células de Kupffer.<sup>3</sup> Cuando se usan soluciones de preservación como la de la UW se logra detener parcialmente la lesión por este tipo de células.<sup>5</sup>

Además, las células de Kupffer son capaces de producir mediadores inflamatorios como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), FNT y FAP que actúan como quimiotácticos de los neutrófilos. La xantina oxidasa es originada a partir de xantina deshidrogenasa en el interior de las células endoteliales al ser sometidas a isquemia y cataliza la generación de superóxido a partir de oxígeno molecular. Los cambios antes mencionados son *in vitro* y demuestran que la unión de los neutrófilos al endotelio puede ocurrir a través de receptores que se encuentran en la superficie de la célula endotelial.<sup>7,8</sup>

## Material y métodos

Para el trabajo de investigación se utilizaron ratas de raza Wistar, adultos, con peso de entre 300 y 350 gramos, proporcionadas por el bioterio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Los objetos de estudio se encontraban previamente sanos, nutridos con alimentos especiales para esta especie, e hidratados con agua purificada. Cada animal se sometió al procedimiento quirúrgico que posteriormente se menciona y se incluyeron en forma aleatoria en los grupos de estudio; cuatro grupos experimentales y un grupo control.

El material quirúrgico utilizado consistió en un equipo de pequeña cirugía que fue complementado con pinzas hemostáticas curvas y rectas para pinzamiento de pequeños vasos; en la preparación del espécimen se utilizaron portaagujas finos, pinzas de Adisson y separadores finos.

Tomando en cuenta las necesidades de obtención y transporte para procesamiento de muestras biológicas, se obtuvieron tubos de ensayo con glutaraldehído en los que se preservaban en forma adecuada las biopsias hepáticas para ser transportadas al Departamento de Patología Clínica del Hospital Central Militar (HCM). Las Pruebas de Funcionamiento Hepático (PFH), únicamente requirieron tubos de ensayo, ya que no era necesario anticoagulante alguno. Las biopsias fueron fijadas con formol al 10% en cantidad suficiente para bañar los tejidos, y ser interpretadas en microscopia óptica.

Cada sujeto de estudio fue anestesiado con éter sulfúrico inhalado al introducir al animal en una campana de cristal, previamente impregnada con anestésico volátil. El tiempo de anestesia en campana fue de 10 minutos para cada individuo, vigilando estrechamente la mecánica ventilatoria para evitar el paro respiratorio. Cada espécimen se mantuvo anestesiado mediante la colocación de un cono impregnado de éter, procurando no llegar a provocar paro respiratorio y muerte. El procedimiento se llevó a cabo con los especímenes anestesiados, sobre una mesa quirúrgica cubierta con corcho.

## Resultados

El procedimiento es un modelo experimental en el cual se incluyeron 96 ratas, 15 correspondieron a los testigos del estudio, y 81 a los cuatro grupos experimentales de exclusión vascular. De las 81 ratas que se emplearon fallecieron 21, las restantes 60 entraron en los grupos de isquemia hepática, 15 ratas por grupo.

Los valores encontrados en las pruebas de funcionamiento hepático se elevaron en forma significativa con más tiempo de isquemia ( $p < 0.01$ ); 0.8.

## Discusión

En este trabajo se hicieron cuatro grupos de estudio con diferentes periodos de isquemia hepática por oclusión de la arteria hepática, vena porta y venas suprahepáticas. Los resultados muestran una elevación sostenida y directamente proporcional de las PFH, al tiempo de isquemia hepática total; esto habla del establecimiento progresivo del daño hepatocelular. Únicamente en el grupo de 60 minutos se encontraron cambios inflamatorios significativos (66.67%), con aumento a las células de Kupffer e infiltración de células del proceso inflamatorio agudo. Los grupos sometidos a 30 y 45 minutos de isquemia, presentaron alteraciones histológicas severas, sin llegar a cambios inflamatorios (Grado 3 B); con esto se deduce que los cambios inflamatorios por el fenómeno de isquemia-reperfusión ocurren a los 60 minutos, sin llegar a la necrosis hepatocelular.<sup>9,10</sup> Los cambios histológi-

cos de dilatación y congestión de las venas centrales y de la vena porta, se deben al secuestro sanguíneo ocasionado por el pinzamiento de las venas suprahepáticas, y no al daño por el fenómeno de isquemia-reperusión.<sup>11</sup>

El no realizar un cortocircuito portosistémico, o el no utilizar un método de circulación extracorpórea, puede perfectamente explicar la muerte de algunos especímenes; el edema de los órganos dependientes de la circulación esplácnica, las alteraciones hídricas y electrolíticas, y algunas alteraciones metabólicas ocasionadas por el fenómeno de isquemia-reperusión son los responsables.

## Conclusiones

1. El modelo experimental es representativo y puede ser el fundamento para futuros proyectos de investigación en cirugía hepática avanzada.
2. El modelo experimental resultó ser práctico, económico y reproducible, creemos que podrá ser manipulado para nuevos proyectos de investigación.
3. La información adquirida mediante el análisis de las PFH y los resultados de las lesiones histopatológicas, traducen finalmente la lesión por el fenómeno de isquemia-reperusión a nivel hepático. Esto deja una enseñanza invaluable.
4. La tolerancia del hígado de rata a periodos prolongados de isquemia (45-60 minutos), permitió el establecimiento del modelo experimental y un estudio detallado del daño por isquemia-reperusión.
5. La realización de este proyecto nos permitió aplicar el método científico en forma adecuada.
6. Este modelo experimental apoya el progreso de la cirugía hepática avanzada, y da un giro a las posibilidades terapéuticas.
7. El empleo de este modelo experimental debe constituir la base para nuevos proyectos de investigación.

## Referencias

1. Colletti LM, Remic DG, Campbell DA. LPS pretreatment protects from hepatic ischemial reperfusion. *J Surg Res* 1994; 57: 337-43.
2. Susuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; 57: 253-8.
3. Shitori Y, Kiriya U, Fukushi Y, et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 1265-72.
4. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger NM. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatology* 1994; 20: 301-4.
5. Carles J, Fawaz R, Hamoudi EN, Neaud Y, Lalabaud C, Bioulac SP. Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and alter ischemia-reperfusion. *Liver* 1994; 14: 50-56.
6. Susuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodríguez F, López F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Cir Shock* 1994; 42: 204-9.
7. Toledo-Pereyra LH, Susuki S. Cellular and biomolecular mechanisms of liver ischemia and reperfusion injury. *Trans Proc* 1994; 26: 325-7.
8. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Oslen MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992; 16: 1236-40.

9. Usami M, Furuchi K, Shiroiwa H, Saitoh Y. Effect of repeated portal-triad cross-clamping during partial hepatectomy on hepatic regeneration in normal and cirrhotic rats. *J Surg Res* 1994; 57: 541-8.
10. Morl S, Tanaka A, Kitai T, et al. Primary and reversible injury of HAT phase in warm ischemia and reperfusion of rat liver in relation to intramitochondrial adenine nucleotide. *J Surg Res* 1995; 58:175-81.
11. Guyton AC. México. Tratado de fisiología Médica. Interamericana McGraw-Hill; 1991, p. 807-8.
12. Butter G, Lindell SL, Sumimoto R, Schilling MK, Suothard JH, Belzer FO. Effect of glycine in dog and rat liver transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 817-22.
13. Chandrasekar R, Wu AVO. Control of haemorrhage during liver resection: A simple and effective technique. *Br J Surg* 1994; 81: 97.
14. Durham RM, Buckley J, Keegan M, Fravell S, Shapiro MJ, Mazuki J. Management of blunt hepatic injuries. *Am J Surg* 1991; 164: 477-81.
15. Feliciano DV. Continuing evolution in the approach to severe liver trauma. *Ann Surg* 1992; 216: 521-3.
16. Ganong FW. Fisiología médica. México: El Manual Moderno; 1988. p. 423-4.
17. Gulik VTM, Reinders NM, Nio R, et al. Preservation of canine liver grafts using HTK solution. *Transplantation* 1994; 57: 167-71.
18. Gurley B, Voorst V, Dean P, Buice R, Adamec T, Ruston S. In situ hypothermic asanguineous liver perfusion with whole blood reperfusion: A canine hepatic autotransplantation model. *Trans Proc* 1993; 25: 2969-72.
19. Hannuon H, Borie D, Delva E, et al. Liver resection with normothermic ischemia exceeding 1 h. *Br J Surg* 1993; 1161-5.
20. Huguet C, Gavelli A, Addario C, et al. Liver ischemia for hepatic resection: Where is the limit? *Surgery* 1992; 11 1: 251-9.
21. Huguet C, Gavelli A, Bona S. Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. *J Am Coll Surg* 1994; 178: 454-8.
22. Hui AM, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Toshihiko Y, Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 1994; 20: 1287-93.
23. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: Difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16: 454-61.
24. John TG, Greig JD, Johnstone AJ, Garden OJ. Liver trauma: A 10-year experience. *Br J Surg* 1992; 79: 1352-6.
25. Kasai T, Kobayashi K. Searching for the best operative modality for severe hepatic injuries. *Surg Gyn Obs* 1993; 177: 551-6.
26. Kasuga T, Nakao A. Experimental study on catheter-bypass between superior mesenteric and hepatic hilar portal veins (SMV-I-IPV bypass). *J Jap Surg Soc* 1992; 93: 811-7.
27. Lin PJ, Jeng LB, Chen RJ, Kao CL, Chu JL, Chang CH. Femoro-arterial bypass using Gott shunt in liver transplantation following severe hepatic trauma. *Int Surg* 1993; 78: 295-7.
28. Menegaux F, Langlois P, Chigot JP. Severe blunt trauma of the liver: Study of mortality factors. *J Trauma* 1993; 35: 865-9.
29. Mochida S, Aral M, Ohno A, Masaki N, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 1994; 14: 234-40.
30. Ochoa EJ, Mamprin llyffi, Torres AM, Rodríguez JV. Hypothermic preservation of the liver. Evaluation of Eurocollins solution using rats liver slices. *Med* 1994; 54: 221-9.
31. Schiff L, Schiff ER. Diseases of the liver. Philadelphia: JB Lippincott, 1993, p. 370-5.
32. Soyer P. Segmental anatomy of the liver: Utility of a nomenclature accepted worldwide. *AJR* 1993; 161: 572-3.
33. Walker MI. The operative and non-operative management of blunt liver injury. *J Nat Med Assoc* 1994; 86: 29-32.
34. Wolf RF, Butter G, Kamman RL, Deketh HP, Sluiter WJ, Slooff MJ. The tissue hydration state in UW-preserved human donor livers. A clinical study of the relation between proton magnetic resonance relaxation times, donor condition preservation procedure, and early graft function. *Transplantation* 1994; 57: 1189-94.
35. Knudson M, Lim R, Olcott EW. Morbidity and mortality following major penetrating liver injuries. *Arch Surg* 1994; 129: 156-261.