

Nivel de la Creatina Quinasa en el Diagnóstico Precoz de Enterocolitis Necrotizante en Ratas

CARMEN QUISPE

Unidad de Cirugía Experimental, Instituto de Salud del Niño

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar el comportamiento de la creatina quinasa total sérica en un modelo experimental de enterocolitis necrotizante. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se utilizó ratas albinas Wistar de la Unidad de Cirugía Experimental del Instituto de Salud del Niño, de las que se obtuvo muestras séricas dosando la enzima antes de la oclusión vascular selectiva del mesenterio, y después de la oclusión a las 2, 4 y 6 horas. **RESULTADOS:** Se obtuvo una media basal de 3 304 U/L. La creatina quinasa total sérica mostró cambios manifiestos durante las seis horas de realizado el estudio, se elevó marcadamente a las 2 horas (media = 6333 U/L) para luego descender a las 4 (media = 5766 U/L) y 6 (media = 4284 U/L) horas, sin llegar a ser inferior al valor de la media basal. **CONCLUSIONES:** Los resultados sugieren que la obstrucción selectiva de las arcadas vasculares mesentéricas por 6 horas, que produce cambios histopatológicos compatibles con enterocolitis necrotizante, condiciona un incremento de los valores del marcador bioquímico en estudio en lo que correspondería al grado III de enterocolitis necrotizante en humanos, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Palabras claves: Enterocolitis, Necrotizante; Creatina Quinasa; Investigación.

SERUM CREATINE KINASE AS EARLY PREDICTOR OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN RATS

SUMMARY

OBJECTIVE: To assess serum variations of creatine kinase in an experimental model of necrotizing enterocolitis. **MATERIAL AND METHODS:** Serum levels of creatine kinase were measured before and 2, 4 and 6 hours after a selective occlusion of vessels in the mesenteric vascular arcades in albino Wistar rats at the Experimental Surgery Department, Instituto de Salud del Niño. **RESULTS:** Baseline level obtained was 3304 U/L. Serum levels of total creatine kinase varied in the six-hours period, showing a marked increase in the first two hours (mean = 6333 U/L) and slowly decreased by the fourth hour (mean = 5766 U/L) and by the sixth hour (mean = 4284 U/L); although it did not either achieve the baseline values nor decline below it again. **CONCLUSIONS:** Our results suggests that selective occlusion of vessels in the mesenteric vascular arcades during a 6-hours-period, produces changes similar to those observed in necrotizing enterocolitis, and results in an increase of creatine kinase levels when the involvement is consistent with grade III human necrotizing enterocolitis, but these increase was non-significant.

Key words: Enterocolitis, Necrotizing; Creatine Kinase; Research.

Correspondencia:

Dra. Carmen Quispe Orejón
Departamento de Pediatría
Hospital Central de la PNP
Av. Brasil s/n. Jesús María, Lima - Perú
E-mail: bibmed@sanfer.unmsm.edu.pe

INTRODUCCIÓN

La enterocolitis necrotizante es la emergencia quirúrgica más común en recién nacidos y es además la mayor causa de muerte entre neonatos que fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos. Actualmente la enterocolitis necrotizante sigue siendo la enfermedad gastrointestinal más frecuente y grave en el período neonatal y en la que, a pesar de las investigaciones orientadas al conocimiento detallado de la histología y fisiopatología intestinal, aún no se ha podido definir con exactitud su patogenia y por lo tanto tampoco las medidas adecuadas para su prevención (1).

El espectro clínico de la enfermedad varía desde una distensión abdominal leve hasta cuadros fulminantes de sepsis y shock por necrosis intestinal extensa.

El manejo de esta entidad es dado por un equipo médico-quirúrgico, pero lo que no se encuentra totalmente definido es el momento indicado para la intervención quirúrgica, salvo ante la evidencia de neumoperitoneo. Algunos autores creen que ésta es la única indicación para la intervención quirúrgica. Otros, al reconocer que hasta el 50% de los lactantes que tienen una perforación pueden no presentar neumoperitoneo, también incluyen la gangrena intestinal como indicación para la cirugía. En relación con esta decisión figuran en la literatura trabajos que proponen decidir la intervención basándose en parámetros aislados, como el deterioro clínico, presencia de acidosis metabólica persistente, paracentesis positiva, hemorragia digestiva profusa, presencia de masa abdominal localizada y/o dilatación fija de asa intestinal. Se decide de esta forma una actitud quirúrgica muchas veces sobre criterios subjetivos (clínicos y de imagenología), realizándose una intervención demasiado precoz o demasiado tardía, hecho que duplica la mortalidad quirúrgica. También se hace uso de protocolos que determinan el momento quirúrgico a través de la valoración conjunta de parámetros clínicos, radiológicos, hematológicos y bacteriológicos en los recién nacidos afectados de enterocolitis necrotizante.

De otro lado, el incremento de la permeabilidad de la membrana celular después de producida la isquemia intestinal, permite que los marcadores bioquímicos intracelulares se liberen pasando a la circulación general así como a la cavidad peritoneal. Entre estos marcadores bioquímicos que se incrementan en forma precoz ante procesos isquémicos intestinales hallamos a

la creatina quinasa, ácido láctico, xantina oxidasa y fósforo inorgánico. Algunos investigadores creen que la creatina quinasa y las isoenzimas señaladas ayudan a estimar la severidad del daño isquémico intestinal (2,3). Sin embargo, existen opiniones opuestas acerca del valor diagnóstico de estos marcadores bioquímicos.

Se ha demostrado experimentalmente, usando modelos animales como las ratas, que la creatina quinasa se incrementa en procesos isquémicos de causa obstructiva intestinal, y se libera a la sangre cuando el flujo mesentérico es restaurado (3).

Conocedores de la existencia de estos marcadores bioquímicos o indicadores que sirven de ayuda para el diagnóstico temprano de isquemia intestinal, además de haberse reportado que particularmente la creatina quinasa es un indicador sensitivo en el diagnóstico temprano de isquemia intestinal (4) y siendo implicada la isquemia selectiva en la patogénesis de la enterocolitis necrotizante tanto en humanos como en algunos modelos animales de experimentación (5), buscamos hallar una correlación de ésta con la creatina quinasa, observando las variaciones del nivel enzimático sanguíneo en un modelo experimental de enterocolitis necrotizante en ratas albinas, ya que es posible que el nivel total de la enzima en mención se encuentre elevado por el incremento sérico de su fracción MM, que provendrían de las capas seromusculares del intestino.

De otro lado, existen numerosos datos experimentales que indican que la hipoxia o hipotermia producen lesiones isquémicas en varios segmentos del tracto gastrointestinal, principalmente a nivel del íleon distal. Asimismo, la lesión de la enterocolitis necrotizante en humanos predomina en la región ileocecal; estos datos sugieren que el íleon distal es el área más predispuesta a isquemia en comparación con otras partes del tracto gastrointestinal (5).

Por ello, se indujo en un modelo experimental lesiones isquémicas a nivel del íleon distal, empleando el modelo descrito por Sibbons, Spitz y Veizen, quienes produjeron enterocolitis necrotizante en cerdos recién nacidos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad del nivel de la creatina quinasa sérica en la necrosis intestinal y su valoración con el tiempo, así como establecer un grado de correlación entre esta enzima y la lesión tisular en un modelo experimental de

enterocolitis necrotizante, estudio no descrito previamente en la literatura revisada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Espécimen

El estudio incluyó a 16 ratas albinas raza Wistar de la Unidad de Cirugía Experimental del Instituto de Salud del Niño, de 16 semanas de vida y con un peso promedio de 300 g (± 50 g), todas sanas y evaluadas por un médico veterinario, elegidas al azar, hembras o machos, sin haber sido sometidas anteriormente a estudios o experimentos, ni habiendo recibido medicación previa alguna.

Se excluyó los espécimen gestantes y aquellos que no cumplieron con los requisitos antes señalados, así como aquellos que no sobrevivieron al procedimiento.

Anestesia

Todo el procedimiento quirúrgico fue realizado bajo anestesia general subcutánea, administrada por un médico veterinario y bajo monitoreo constante. Se administró diazepam a dosis de 0,4 mg en bolo, atropina 0,25 mg en bolo y ketamina 10 mg/kg/dosis, todo bajo la estricta vigilancia y cuidado del médico veterinario del Instituto, garantizando de esta manera el no sufrimiento del animal.

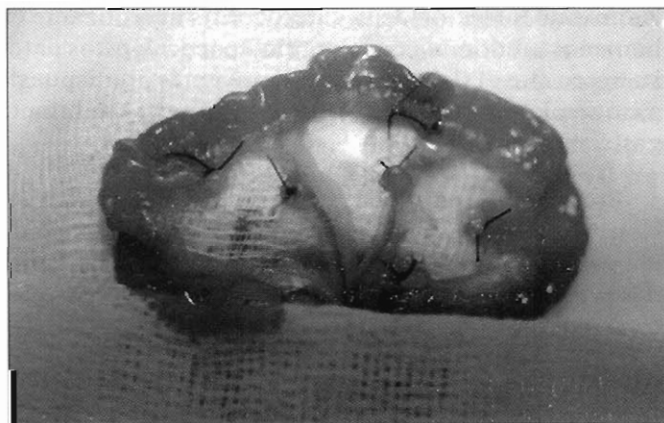


Fig. N° 1.- Segmento ileal con ligadura y sección de la arcada mesentérica en forma intercalada.

Procedimiento quirúrgico

Éste se realizó en forma estéril y en sala de operaciones, con el animal previamente anestesiado y afeitado en la región umbilical.

Se practicó una laparotomía a través de una incisión mediana longitudinal de aproximadamente 1,5 centímetros, llegando a cavidad abdominal e identificando la válvula ileocecal, procediendo a la exteriorización del íleon a más o menos 25 cm de la válvula ileocecal. Se realizó entonces ligadura y sección de las arcadas mesentéricas en forma intercalada, ligándose con ácido poliglactin 4/0 la arteria, vena y linfáticos en un segmento de intestino de aproximadamente 10 centímetros de longitud (Figura N° 1).

Una vez realizado el procedimiento, se retornó el intestino a la cavidad abdominal, cerrando la pared en un solo plano con uno o dos puntos totales y simples de ácido poliglactin 4/0. El tiempo operatorio fue de 5 minutos aproximadamente por espécimen.

Toma de muestra sanguínea

Se tomó las muestras sanguíneas a todos los espécimen en estudio, con un tubo capilar heparinizado de una vena periférica del miembro inferior, previa limpieza de la zona, antes del procedimiento quirúrgico y a las 2, 4 y 6 horas luego de realizado éste. Las muestras fueron procesadas inmediatamente para hallar el nivel de creatina quinasa en el laboratorio del Instituto.

Procedimiento analítico

Para el dosaje de creatina quinasa (CK) se utilizó un método enzimático de alta sensibilidad (Wiener Lab). Se procedió con la microtécnica recomendada por el fabricante: En una cubeta mantenida a 37°C se colocó 50 μ l de sustrato reconstituido, se preincubó 3-4 minutos y luego se agregó 10 μ l de la muestra, se mezcló inmediatamente y se esperó 3 minutos.

La absorbancia se reajustó a una lectura de referencia disparando simultáneamente el cronómetro. Se registró la absorbancia luego de 1, 2 y 3 minutos después de la primera lectura. Posteriormente, se determinó la diferencia promedio de absorbancia 1 min. restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Se utilizó este promedio para los cálculos.

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un fotocolorímetro BTR- 811, con filtro de 340 nm (de 334 a 336).

Se prefirió utilizar el método a 37°C por recomendación del Comité de Enzimas de la SSCC por considerarse que a mayor temperatura se obtiene mayor sensibilidad aunque menor rango de linealidad, y porque la actividad enzimática *in vivo* es a 37°C.

Cálculo de los resultados

$$CK \text{ U/L} = \text{delta A} / \text{min} \times \text{factor}$$

En cada muestra se empleó el factor de cálculo "8095" correspondiente a la temperatura de reacción seleccionada (37°C).

El control de calidad de la prueba se realizó usando el suero comercial standatrol S-E que tiene valores conocidos de creatina quinasa.

Sacrificio de los especímenes

La ratas fueron atendidas constantemente hasta cumplidas las 6 horas del posquirúrgico, siendo entonces sacrificadas para realizar la necropsia. Se reseco el segmento intestinal en estudio, enviándose éste sumergido en una solución de formol al 10% al departamento de anatomía patológica para el estudio microscópico, realizándose improntas de cortes histológicos de las muestras enviadas con coloración de HE y fijadas con bálsamo del Canadá.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados encontrados se llevó a cabo mediante la prueba F del análisis de varianza.

RESULTADOS

De las dieciséis ratas que fueron sometidas a este estudio, seis fueron retiradas del mismo por fallecimiento: tres fallecieron antes de cumplirse la primera hora de realizado el procedimiento quirúrgico, por paro cardiorrespiratorio; dos de ellas a la segunda y una a la cuarta hora posquirúrgica por broncoaspiración según necropsia realizada; sobrevivieron diez, las cuales fue-

ron sacrificadas a las seis horas de iniciado el procedimiento quirúrgico.

Al examen macroscópico, las lesiones varían en severidad desde pequeñas áreas hemorrágicas en aquellos especímenes que vivieron de una a dos horas, hasta extensas áreas congestivas, hemorrágicas y con lesiones necróticas en las que sobrevivieron hasta terminado el procedimiento.

Todas las piezas intestinales se estudiaron además microscópicamente, reconociendo daños tisulares desde erosiones mínimas en la mucosa con reacción inflamatoria hasta extensa ulceración, neumatosis y necrosis, éstas últimas halladas en aquellos que sobrevivieron al estudio.

El 80% de los especímenes en estudio (8 ratas) desarrolló cambios histológicos compatibles con enterocolitis necrotizante humana tipo III, esto es: erosión muscular, disrupción submucosa, neumatosis y necrosis. En un caso hubo pérdida de la pieza anatómica y en el otro los hallazgos no fueron significativos de enterocolitis necrotizante tipo III. La Tabla Nº 1 muestra un resumen de los hallazgos histológicos encontrados.

Tabla Nº 1.- Hallazgos histológicos a 6 horas de la oclusión vascular mesentérica.

| Especímen | Hallazgo Anatomopatológico |
|-----------|--|
| Rata 1 | Hemorragia, isquemia y necrosis. |
| Rata 2 | Hemorragia en el corion, edema y áreas de necrosis. |
| Rata 3 | Áreas de atrofia de vellosidades y células epiteliales con necrosis. |
| Rata 4 | Pieza anatómica perdida. |
| Rata 5 | Neumatosis intestinal, con áreas de necrosis. |
| Rata 6 | Neumatosis intestinal, con áreas de necrosis. |
| Rata 7 | Hemorragia en toda la pared con necrosis vascular. |
| Rata 8 | Hemorragia y hialinización de las paredes vasculares. |
| Rata 9 | Isquemia, hemorragia y extensas zonas de necrosis. |
| Rata 10 | Hialinización con áreas de necrosis. |

Tabla N° 2.- Cambios de la creatina quinasa sérica en 6 horas de isquemia.

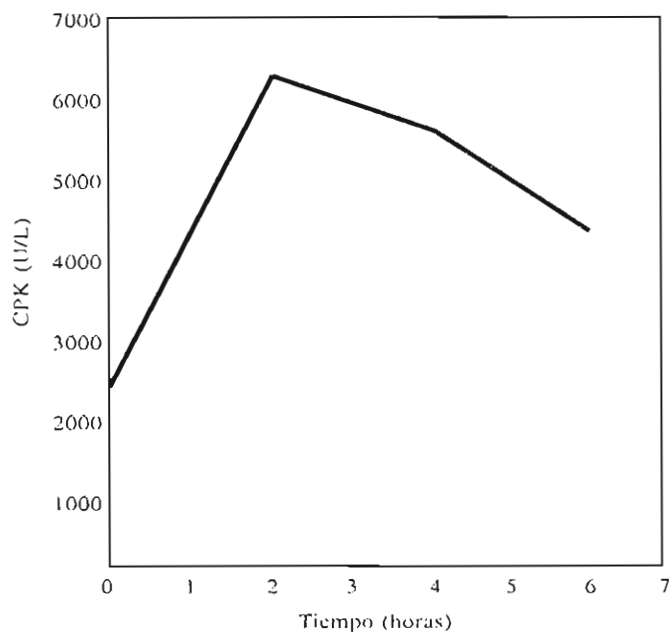
| Espécimen | Basal | 2 horas | 4 horas | 6 horas |
|-----------|-------|---------|---------|---------|
| Rata 1 | 2709 | 3658 | 5558 | 5700 |
| Rata 2 | 1579 | 11570 | 25100 | 6930 |
| Rata 3 | 5040 | 3572 | 1311 | 5240 |
| Rata 4 | 2914 | 9600 | 5601 | 2514 |
| Rata 5 | 961 | 2833 | 1346 | 1160 |
| Rata 6 | 3729 | 9980 | 6810 | 1424 |
| Rata 7 | 3216 | 4473 | 2277 | 4328 |
| Rata 8 | 1279 | 1343 | 1144 | 6280 |
| Rata 9 | 8041 | 9584 | 5304 | 4338 |
| Rata 10 | 3578 | 6724 | 3211 | 4927 |
| Media | 3304 | 6333 | 5766 | 4284 |

Los dosajes de creatina quinasa sérica basal, a las 2 horas, 4 horas y 6 horas de realizada la oclusión vascular selectiva del mesenterio a nivel ileal, así como la media de las mismas, se muestran en la Tabla N° 2. En ella se observa un incremento del valor sérico de esta enzima a las 2 horas de producida la isquemia en un 191.6 %. Sin embargo, estos valores tienden a descender a partir de las 4 horas sin llegar a ser inferiores al valor basal, siendo esta variación no estadísticamente significativa, pues se obtuvo un valor para F en el análisis de varianza de 2.27 para un valor de F de 2,84 al nivel de confianza de 0,05, no procediéndose por lo tanto a realizar la Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey.

La Figura N° 2 ilustra el comportamiento de esta enzima seromuscular a lo largo de las seis horas de producida la isquemia, observándose una curva que asciende durante las primeras 2 horas para luego ir descendiendo paulatinamente en las siguientes.

DISCUSIÓN

Se han realizado múltiples estudios experimentales para producir diferentes grados de lesión intestinal, desde la ligadura de la arteria cólica, mesentérica,

**Fig. N° 2.-** Comportamiento de la media de la creatina quinasa sérica.

marginales, etc., en perros adultos produciendo en la mucosa y submucosa colónica cambios que semejan a los encontrados en colitis isquémica en humanos, hasta la oclusión de vasos pequeños en el íleon y colon, demostrando que ello induce a lesiones semejantes a enterocolitis isquémica en perros adultos. También se ha usado ratones maduros en modelos experimentales de enterocolitis necrotizante, en estos estudios la arteria mesentérica superior fue temporalmente ocluida por varios períodos de tiempo, produciéndose lesiones semejantes a la enterocolitis necrotizante a los 10, 15 y 20 min posocclusión, incrementándose el daño severamente al prolongar el tiempo de oclusión.

En un estudio realizado con cerdos neonatos se reporta que éstos no desarrollan lesiones después de la oclusión de vasos mesentéricos por 30 min.

Mitsudo y Brand (6), en un estudio publicado en 1992, sugieren que la isquemia transitoria a lo largo de 6 a 8 horas produce daño intestinal reversible. Sin embargo, Liao Xian-Ping y col. en un estudio publicado en el año 1995 sugiere que la injuria intestinal después de un período de isquemia de 4 horas probablemente sea reversible, considerando que 4 horas de isquemia es el punto crítico para producir daño intestinal reversible/irreversible (3).

En el presente estudio, las arcadas que suplen el íleon distal fueron seleccionadas para producir isquemia intestinal al ser ligadas, basadas en las observaciones clínicas que demuestran que el íleon distal y el colon proximal son áreas donde ocurren lesiones isquémicas con mayor frecuencia. El período de oclusión vascular fue 6 horas, encontrándose en el estudio histológico que la capa muscular fue completamente destruida (necrosis) después de 6 horas de isquemia.

Por otro lado, es generalmente aceptado que la liberación de los marcadores bioquímicos de un intestino isquémico entran a la circulación sistémica fundamentalmente vía las venas, los linfáticos o la absorción de la membrana peritoneal, ya que los cambios que ocurren en la mucosa intestinal entre los 10-15 min de la injuria isquémica progresan gradualmente hasta llegar a necrosar la capa vellosa y muscular de la mucosa intestinal, que es la porción más sensible a la isquemia. Las enzimas que se ubican en esta capa como la creatina quinasa, enzima seromuscular, fugan de las células musculares cuando se incrementa la permeabilidad de la membrana debido al daño isquémico, ingresando directamente a la cavidad peritoneal, aumentando significativamente a nivel peritoneal después de una hora de producida la isquemia, llegando a convertirse en un parámetro de alto grado de sensibilidad para la isquemia intestinal^(3,7).

En este estudio se realizó dosajes de la creatina quinasa sérica total, la cual es factible de ser usada en forma ágil en casos de sospecha de necrosis intestinal, lo que no ocurre al intentar dosar esta enzima en el líquido peritoneal: no se dosan sus fracciones por carecer de estos reactivos en el laboratorio donde fue realizado el estudio y por representar un alto costo. La existencia de esta enzima en forma abundante en la capa de la pared intestinal se incrementa continuamente a lo largo de las seis horas del período de estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron contrarios a la expectativa del autor pues la actividad de la enzima en estudio no aumentó significativamente. Lo anterior puede relacionarse con la permeabilidad de la membrana peritoneal, la cual al tener una gran superficie de absorción permitiría el paso de pequeñas moléculas, pero brindaría una permeabilidad extremadamente baja para proteínas como las enzimas⁽⁸⁻¹¹⁾.

CONCLUSIONES

La ligadura de las arcadas mesentéricas a nivel del íleon distal por un periodo de seis horas, en ratas, pro-

dujo cambios histológicos semejantes a los hallados en cuadros de enterocolitis necrotizante humana. Sin embargo, la creatina quinasa sérica total no es un parámetro de utilidad para el diagnóstico de isquemia intestinal.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario More Flores, cirujano pediatra del Instituto de Salud del Niño, por su asesoramiento en la realización de este trabajo y a la Dra. Ada Rodríguez, Dra. Betty Velez y al veterinario Henry Hernandez por su valiosa colaboración en el procesamiento de los valores enzimáticos, el estudio histológico y procedimiento anestésicos brindados, respectivamente, gracias a los cuales fue posible la culminación del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Amoury RA. Enterocolitis necrotizante. En: Holder Thomas M, Ashcraft Keith W. Cirugía Pediátrica. Tomo I Segunda Edición Edit. Interamericana 1995: 350-67.
- 2) Graeber G, Cafferty PJ, Reardon MJ, Curley CP, Ackerman NB, Harmon JW. Changes in serum total creatine phosphokinase (CPK) and its isoenzymes caused by experimental ligation of the superior mesenteric artery. *Ann Surgery* 1981; Apr 193(4): 499-505.
- 3) Liao Xian-Ping, She Ya-Xiong, Shi Cheng-Ren, Li Min. Changes in body fluid markers in intestinal ischemia. *J Pediatr Surg* 1995; 30(10): 1412-5.
- 4) Thompson JS, Bragg LE, West WW. Serum enzyme levels during intestinal ischemia. *Ann Surgery* 1990; 211(3): 369-73.
- 5) Sibbons PD, Spitz L, Velzen D V. Necrotizing enterocolitis induced by local circulatory interruption in the ileum of neonatal piglets. *Pediatr Pathol* 1992; 12: 1-14.
- 6) Mitsudo S, Brandt JJ. Pathology of intestinal ischemia. *Surg Clin North Am* 1992; 72(1): 43-63.
- 7) Mukai M, Tamaki T, Noto T, Tajima T, Nakano S, Mitomi T. A new mechanism of serum creatine phosphokinase elevation in strangulated small bowel obstruction: An experimental rat model. *J Int Med Res* 1995; 23(3): 184-90.
- 8) Neu J. Enterocolitis necrotizante: Búsqueda de una teoría patogénica unificadora que permita su prevención. *Clin Pediatr NA* 1992; 2: 383-404.
- 9) Peña A, Martínez O. Enfermedad isquémica intestinal. En: Martínez O, Arizmendi J. Decisiones terapéuticas en el niño grave de Peña. Segunda Edición. México: Interamericana 1993. pág. 195-205.
- 10) Ricketts R. Necrotizing enterocolitis. En: Raffensperger Jorth G. Swenson's Pediatric Surgery. Fifth edition. Norwalk, Connecticut. Appleton Lange; 1990, pág. 627-36.
- 11) Stoll BJ, Kliegman R, eds. Enterocolitis necrotizante. Clínicas de Perinatología [Ed. en español]. Vol. 2. México. Nueva Editorial Interamericana SA. 1994.