

Disminución del fenómeno de angiogénesis con el uso de espironolactona y captopril y su efecto en las adherencias intraperitoneales

Decrease of angiogenesis with spironolactone and captopril and the effect on intraperitoneal adherences

Jorge Vázquez Carpizo, Marcos Ortiz Moreno, José Rogelio Sánchez García, Julianna Reynoso Vargas, Isidro Gutiérrez Álvarez, César Gutiérrez Samperio

Resumen

Objetivo: Comprobar y estudiar el efecto inhibitorio del fenómeno de angiogénesis de la espironolactona vs captopril y su efecto resultante sobre la formación de adherencias peritoneales postquirúrgicas en un modelo experimental en rata.

Sede: Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Diseño: Estudio experimental, prospectivo, longitudinal y analítico; el análisis estadístico empleado fue prueba de ANOVA de una vía y *post hoc* de "T" de Bonferroni.

Material y métodos: Se utilizaron 24 ratas machos Wistar distribuidas en tres grupos: grupo control, grupo con espironolactona y grupo con captopril. Se realizó el modelo experimental para formación de adherencias descrito por Biggati, con sacrificio a los 12 días del postoperatorio. Posteriormente se realizó el análisis de la formación de adherencias mediante escala modificada de Diamond, y de la neoformación vascular.

Conclusión: Las adherencias se presentaron en el 100% de los casos. No existió diferencia estadística en los grupos en cuanto a las características de las adherencias presentadas. La inhibición del fenómeno de angiogénesis no modificó la formación de adherencias.

Palabras clave: Adherencias intraperitoneales, angiogénesis, captopril, espironolactona.

Cir Gen 2007;29:265-268

Abstract

Objective: To assess the inhibitory effect of angiogenesis exerted by spironolactone vs captopril and their resulting effect on the formation of post-surgical peritoneal adherences in an experimental rat model.

Setting: Animal facility of the School of Medicine, Autonomous University of Queretaro.

Design: Experimental, prospective, longitudinal, analytical study. Statistical analysis was performed with a one-way ANOVA test and Bonferroni's *post hoc* T test.

Material and methods: Twenty-four male Wistar rats were used, distributed in three groups: control group, spironolactone group, and captopril group. The experimental model to create adherences described by Biggati was used; animals were killed 12 days after surgery. Analysis of adherence formation was performed by means of the Diamond's modified scale and assessing vascular neoformation.

Conclusion: Adherences were present in all cases. No statistically significant differences existed among groups regarding the presented adherences. Inhibition of the angiogenesis phenomenon did not modify the formation of adherences.

Key words: Intraperitoneal post-surgical adherences, angiogenesis, captopril, spironolactone.

Cir Gen 2007;29:265-268

Introducción

En las últimas dos décadas, los estudios clínicos han confirmado y estimado que entre 60 y 100% de los pacientes sometidos a cirugía abdomino-pélvica desarrollan adherencias peritoneales. Del 30 al 35% de todas las readmisiones hospitalarias se han asociado con complicaciones potenciales de las adherencias peritoneales, las cuales están directamente relacionadas con el 4.5 a 5.1% de los casos.¹⁻⁴ Cerca del 40% de todos los casos de obstrucción intestinal son provocados por adherencias intraperitoneales. Se ha encontrado además una relación entre las adherencias peritoneales y el dolor pélvico en el 40% de las mujeres afectadas, de las cuales 80% tienen disminución del dolor con la adhesiolisis. La causa más frecuente de adherencias peritoneales es un acto quirúrgico previo.

El evento más importante que inicia la formación de adherencias es la unión de dos superficies peritoneales lesionadas.^{5,6} Dicha formación comienza con la liberación de diversas citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos.⁷⁻¹⁰ Por otra parte también, la disminución de la fibrinólisis aumenta la posibilidad de formación de adherencias intraperitoneales.^{5,10}

Aunque el proceso de cicatrización intraperitoneal se desarrolla en tiempo variable, es bien aceptado que el periodo crítico de formación son las primeras dos semanas, y sobre todo los primeros cinco a siete días.^{5,11,12}

Son distintas las estrategias que se han utilizado para la prevención de la formación de adherencias, pero podemos agruparlas en dos grandes grupos: técnica quirúrgica y factores adyuvantes.¹³

Con respecto a una técnica quirúrgica adecuada, los aspectos quirúrgicos esenciales como el tipo de incisión,¹⁴ abordaje, manejo de tejidos, entre otros, influyen en la incidencia de adherencias.

El uso de factores adyuvantes se puede dividir en dos tipos, las barreras y los fármacos. Y son numerosos los trabajos escritos al respecto.¹⁵⁻¹⁹ Los fármacos utilizados actúan en distintas etapas del proceso de formación de adherencias. Existen efectos antiangiogénicos de fármacos que tienen otra utilidad clínica, como son la espironolactona cuyo efecto antiangiogénico está mediado por la disolución de la membrana basal, inhibiendo, de esta forma, al activador del plasminógeno tisular²⁰ y el captoril que actúa directa y específicamente en las células endoteliales, inhibiendo la fase de migración²¹ y, por lo tanto, no consolidándose la formación del nuevo vaso.

Ante el problema de adherencias postquirúrgicas y la incapacidad de los distintos fármacos utilizados para inhibir de manera efectiva su formación es fundamental seguir buscando opciones terapéuticas que limiten su formación y sus consecuencias clínicas. Dos fármacos de uso común en la clínica médica (espironolactona y captoril) han demostrado ya su capacidad antiangiogénica. Su uso en otras áreas del tratamiento médico-quirúrgico abriría una nueva opción y esperanza para resolver un problema muy complejo como son las adherencias intraperitoneales.

Materiales y método

La hipótesis de trabajo de nuestro estudio fue demostrar que la inhibición del fenómeno de angiogénesis con el uso de la espironolactona y el captoril disminuye la formación de las adherencias peritoneales en un modelo experimental en rata.

Se trató de un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y analítico. El cálculo de tamaño de muestra se generó del cálculo del tamaño de población para una prueba de diferencia de medias, asignando en forma arbitraria una potencia de 80% y un α de 0.05. Usando el paquete estadístico de software "STATGRAPHIC" se realizó ANOVA y prueba *post hoc* "T" de Bonferroni.

Se utilizaron 24 ratas Wistar machos para eliminar el sesgo ya reconocido de hormonas en la hembra, con peso de 250-300 g, sin cirugía abdominal previa. Se excluyeron aquellas ratas que mostraban evidencia de patología abdominal previa y se eliminaron aquellas que no ingirieran el medicamento, con cuadro diarreico, o bien con proceso infeccioso durante su postoperatorio.

Se dividieron en tres grupos de ocho ratas cada una: Grupo I: control, grupo II: espironolactona, grupo III: captoril.

Técnica quirúrgica

Se utilizó el modelo creado por Bigatti.²² Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* y observadas diariamente, registrando el peso, tolerancia a dieta, así como excretas. Al grupo de captoril se le administró el medicamento a dosis de 50 mg/kg por día disuelto en agua inyectable a razón de 0.4 mg/ml; mientras que al grupo de espironolactona se le administró el medicamento diluido en agua a razón de 100 mg/kg.

La medicación fue administrada desde tres días previos a la cirugía, para tener niveles séricos adecuados hasta el postoperatorio inmediato.^{20,21} Las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de barbitúrico (tiopental sódico) en el día 12 del postoperatorio. Se abrió nuevamente la cavidad abdominal para exploración. De manera ciega, otro investigador que desconocía a qué grupo pertenecía cada sujeto experimental, analizó el grado de adherencias utilizando la escala modificada de Diamond. Se tomó en bloque el fragmento de pared peritoneal, con el silastic y las adherencias peritoneales. De manera cegada, otro investigador colocó las muestras obtenidas en un microscopio de luz y se cuantificó el número de vasos existentes en todo el perímetro del fragmento de silastic que se dirigían desde el peritoneo vecino hacia su centro.

El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UAQ. Todo el procedimiento se realizó respetando los lineamientos éticos nacionales e internacionales para el manejo de animales de experimentación.

Resultados

El tiempo promedio de cirugía en las ratas de todos los grupos fue de 10 minutos, y aproximadamente 20 minutos de anestesia. Ninguno de los animales presentó complicaciones durante el procedimiento.

Todos los sujetos experimentales fueron seguidos hasta el final del estudio, sin eliminarse ninguna rata en los grupos. Clínicamente se valoraba el estado general del animal, no midiendo frecuencia cardíaca, respiratoria ni temperatura. Las adherencias se presentaron en el 100% de los casos, en todos los grupos, formándose básicamente de epiplón y tejido microscópicamente fibroso. La fijación a la pared era sobre el fragmento de silastic (**Figura 1**). No existió diferencia estadística en los grupos en cuanto a las características de las adherencias presentadas de acuerdo a la escala utilizada (grado de fijación y tipo).

El número de vasos cuantificados desde el peritoneo parietal y que se dirigían al silastic fue significativamente menor en el grupo de espironolactona comparado con el grupo control ($p = 0.0378$) y no significativa con el grupo de captopril (**Figura 2**).

Conclusión

En la práctica clínica, al reoperar a un paciente se puede observar que el tejido fibroso formado con anterioridad contiene numerosos vasos sanguíneos. Esto nos permite plantear la posibilidad de que estos vasos san-

guíneos funcionarán como “injertos comunicantes” entre los tejidos sanos e isquémicos para reestablecer el flujo sanguíneo. Es el epiplón una de las principales fuentes de factores angiogénicos, y las adherencias formadas llevan, además de vasos sanguíneos y tejido fibroso, haces nerviosos, lo que explicaría la relación de las adherencias con el dolor pélvico en algunas mujeres.²³

El modelo para estudio de angiogénesis en las adherencias intra-peritoneales, descrito previamente,²² es reproducible y efectivo para producir adherencias en la rata. Bigatti provocó adherencias en el 80% de los animales, mientras que en este estudio se presentaron en el 100% de los casos.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman el efecto antiangiogénico de la espironolactona y del captopril.^{20,21} Sin embargo, en el caso del captopril la disminución en el número de vasos comparado con el grupo control no tuvo diferencia estadística.

Lo que pudimos observar es que, pese a disminuir el fenómeno de neovascularización, esta inhibición no repercute en la formación de las adherencias y en las características de las mismas. Sin embargo, existen estudios recientes que demuestran que la inhibición de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), sí modifica la formación de adherencias intra-abdominales en un modelo experimental en ratones.²⁴ Hay otros fármacos, como la estreptoquinasa utilizada en roedo-

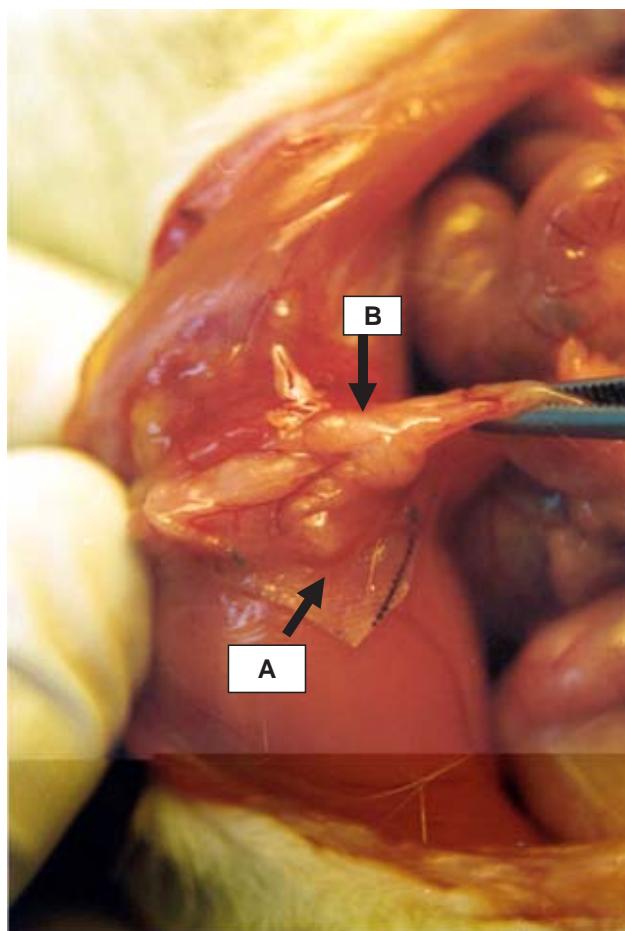


Fig. 1. Fotografía que muestra la pared abdominal invertida, con el fragmento de silastic (A) y una adherencia peritoneal (B)

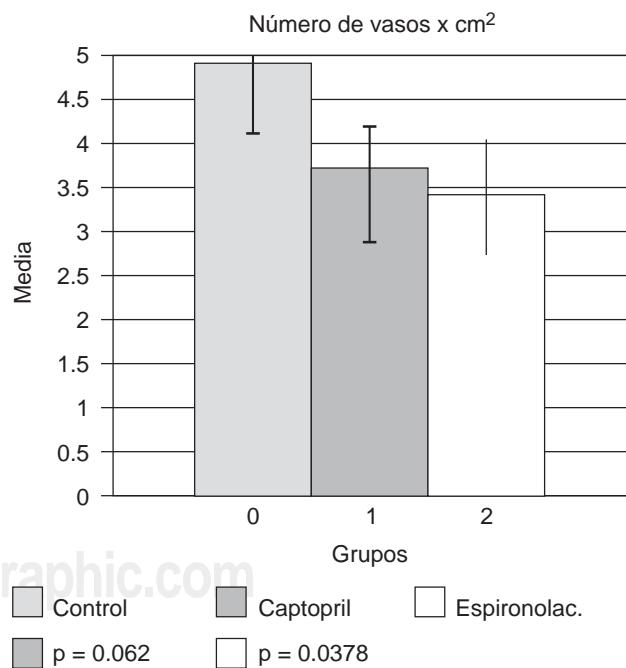


Fig. 2. Se muestran las diferencias en la media del número de vasos sanguíneos en los distintos grupos (24 ratas). Grupo 0 control; grupo 1 captopril; grupo 2 espironolactona. La disminución se muestra significativamente menor en el grupo de espironolactona comparado con el grupo control ($p = 0.0378$)

res y cerdos, que han tenido los mismos resultados que nosotros.^{25,26} Por otra parte, no podríamos descartar del todo que esta falta de impacto en la formación de adherencias no se deba a la dosis utilizada de los medicamentos. Pese a que las dosis utilizadas con los fármacos antihipertensivos han demostrado tener efecto antiangiogénico, es probable que estas dosis no sean suficientes para repercutir significativamente en la formación de las adherencias. Esto es especialmente importante en el caso del captopril, pues, como se ha publicado previamente,²¹ su efecto inhibitorio tiene una clara curva bifásica dosis-respuesta. Esto implica, entonces, continuar con nuestra investigación utilizando diversas concentraciones de los medicamentos y determinar la dosis-respuesta.

Como se ha mencionado previamente el proceso que se desencadena para la formación de una adherencia es muy complejo e implica mecanismos moleculares que apenas empiezan a ser mejor entendidos.²⁷ Es probable que además de la neoformación vascular, sea el daño del sistema fibrinolítico peritoneal uno de los factores que más influye en el desarrollo de este trastorno de la cicatrización.

El efecto antiangiogénico de la espironolactona pudo ser comprobado, no así el del captopril; sin embargo esta inhibición a las dosis utilizadas no parece repercutir en la formación de las adherencias. Por lo tanto, este estudio permite iniciar una nueva línea de investigación sobre el fenómeno de angiogénesis y sus implicaciones en la formación de adherencias.

Referencias

- DeCherney AH, diZerega G. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 671-88.
- Stone K. Adhesions in gynecologic surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1993; 5: 322-27.
- Ellis H. The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *Eur J Surg Suppl* 1997: 5-9.
- Stovall TG, Elder RF, Ling FW. Predictors of pelvic adhesions. *J Reprod Med* 1989; 34: 345-48.
- Holmdahl L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg Suppl* 1997: 24-31.
- Chegini N. The role of growth factors in peritoneal healing: transforming growth factor beta (TGF-beta). *Eur J Surg Suppl* 1997: 17-23.
- Chegini N, Simms J, Williams S, Masterson B. Identification of epidermal growth factor, transforming growth factor-alfa and epidermal growth factor receptor in surgically induced pelvic adhesions in the rat and intraperitoneal adhesions in the human. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 321-28.
- Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Bio Med* 1995; 6: 230-47.
- Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston, Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-63.
- Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; 73: 333-46.
- Ellis H. The cause and prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Surg Gynecol Obst* 1971; 133: 497-511.
- Gomel V, Urman B, Gurgan T. Pathophysiology of adhesion formation and strategies for prevention. *J Reprod Med* 1996; 41: 35-41.
- Vipond MN, Whawell SA, Thompson JN, Dudley HA. Peritoneal fibrinolytic activity and intraabdominal adhesions. *Lancet* 1990; 335: 1120-22.
- Risberg B. Adhesions: preventive strategies. *Eur J Surg Suppl* 1997: 32-39.
- Moreno A, Aguayo JL, Zambudio G, Ramírez P, Canteras M, Parrilla P. Influence of abdominal incision on the formation of postoperative peritoneal adhesions: An experimental study in rats. *Eur J Surg* 1996; 162: 181-185.
- Dunn RC, Mohler M. Effect of varying days of tissue plasminogen activator therapy on the prevention of postsurgical adhesions in a rabbit model. *J Surg Res* 1993; 54: 242-45.
- Harris ES, Morgan RF, Rodeheaver GT. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. *Surgery* 1995; 117: 663-69.
- Costain DJ, Kennedy R, Ciona C, McAlister VC, Lee TD. Prevention of postsurgical adhesions with N,O-carboxymethyl chitosan: Examination of the most efficacious preparation and the effect of N,O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. *Surgery* 1997; 121: 314-19.
- Beck D. The role of Seprafilm bioresorbable membrane in adhesion prevention. *Eur J Surg Suppl* 1997: 49-55.
- Klauber N, Browne F, Anand-Apte B, D'Amato RJ. New activity of spironolactone. Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Circulation* 1996; 94: 2566-71.
- Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, et al. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest* 1996; 98: 671-79.
- Bigatti G, Boeckx L, Gruft L, Segers N, Brosens I. Experimental model for neoangiogenesis in adhesion formation. *Hum Reprod* 1995; 10: 2290-94.
- Herrick SE, Mutsaers SE, Ozua P, Sulaiman H, Omer A, Boulos P, et al. Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized. *J Pathol* 2000; 192: 67-72.
- Cahill RA, Wang JH, Soohkai S, Redmond HP. Mast cells facilitate local VEGF release as an early event in the pathogenesis of postoperative peritoneal adhesions. *Surgery* 2006; 140: 108-12.
- Elizondo-Hinojosa JL, López-Gutiérrez J, Jáuregui-Soto AJ, Luna Ortiz K, Poblano-Morales M, Yáñez-López J y cols. Estudio piloto experimental para la prevención de adherencias con estreptocinasa en roedores. *Cir Gen* 2004; 26: 93-96.
- Kutlay J, Ozer Y, Isik B, Kargici H. Comparative effectiveness of several agents for preventing postoperative adhesions. *World J Surg* 2004; 28: 662-5.
- Chegini N. Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. *Front Biosci* 2002; 7: e91-115.