

Desarrollo y comprobación de un modelo experimental accesible y reproducible de gastrectomía en manga en ratas

Franco Signorini (1,2), María Micaela Rossi (1,2), Tomás Castillo(2), Federico Moser (1), María del Carmen Baez (2), Mónica Moya (2)

(1) Hospital Privado Universitario de Córdoba, Córdoba, Argentina.

(2) Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

E-mail: fransign@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.53435/funj.00798>

Recepción (primera versión): 29-Septiembre-2021

Aceptación: Abril-2022

Publicación online: N° Abril 2022

Resumen:

A partir los resultados de la cirugía bariátrica sobre el síndrome metabólico (MS) que no se asocian exclusivamente a la pérdida de peso, resulta pertinente analizar las modificaciones de indicadores de MS, biomarcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en un modelo experimental. Los modelos experimentales para tal fin hasta ahora descriptos resultan de compleja reproducción y costosos.

Se realizó un estudio analítico experimental utilizando ratas Wistar macho. Los animales se dividieron en 6 grupos de 12 ratas cada uno: control (C), inducción de la afectación metabólica (MS), gastrectomía en manga (SG), MS + SG durante 6 (SG6), 12 (SG12) y 24 (SG24) semanas. Se evaluaron variables oxidativas, metabólicas, pérdida de peso e ingesta alimentaria. MS fue inducido por administración de fructosa al 10% diluida en agua de bebida durante 6 semanas.

De las 72 ratas iniciales, 4 (5%) murieron después de la cirugía. Las variables oxidativas y metabólicas mostraron diferencias significativas al comparar el grupo MS con el resto de los grupos y una mejoría progresiva en los grupos intervenidos por SG.

El modelo demostró ser seguro y reproducible. La afectación metabólica generada y los resultados obtenidos a partir de la SG tendieron a emular aquellos observados en humanos.

Palabras clave:

- Cirugía experimental
- Cirugía Bariátrica
- Estrés oxidativo
- Gastrectomía en manga
- Ratas Wistar

Development and testing of an accessible and reproducible experimental model of sleeve gastrectomy in rats

Abstract:

Based on the results of bariatric surgery on metabolic syndrome (MS) that are not exclusively associated with weight loss, it is pertinent to analyze the modifications of MS blood variables, inflammatory biomarkers, and oxidative stress in an experimental model. The experimental models for this purpose described so far are complex, expensive, and difficult to reproduce.

An experimental analytical study was carried out using male Wistar rats. The animals were divided into 6 groups of 12 rats each: control (C), metabolic injury (MS), sleeve gastrectomy (SG), MS + SG for 6 (SG6), 12 (SG12), and 24 (SG24) weeks. Oxidative and metabolic variables, weight loss, and food intake were evaluated. MS was induced by administration of 10% fructose diluted in drinking water for 6 weeks.

Of the initial 72 rats, 4 (5%) died after surgery. The oxidative and metabolic variables showed significant differences when comparing the MS group with the rest of the groups with a progressive improvement in the groups operated on for SG.

The model proved to be safe and reproducible. The metabolic injury generated and the results obtained from SG tended to emulate those observed in humans.

Keywords:

- Experimental Surgery
- Bariatric Surgery
- Oxidative Stress
- Sleeve Gastrectomy
- Wistar Rats

Introducción

El conocimiento de la fisiopatología de la obesidad y los mecanismos beneficiosos que desencadena la cirugía bariátrica son una necesidad para permitir el desarrollo de terapias eficaces. En este contexto, los modelos animales podrían ser una herramienta esencial para comprender la regulación del peso corporal y las variaciones en las vías metabólicas después de las intervenciones bariátricas(1). A pesar de esto, los protocolos basados en modelos animales no han sido estandarizados y suelen ser difíciles de reproducir, lo que da lugar a resultados contradictorios(2), (3).

El objetivo de este informe es proponer un modelo animal simplificado y fácilmente reproducible de afectación metabólica y gastrectomía en manga y analizar el comportamiento de los parámetros oxidativos y metabólicos fin de comprobar el efecto de las intervenciones aplicadas.

Material y Métodos

Se realizó un estudio analítico experimental utilizando ratas Wistar macho que se mantuvieron en la sala de animales de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba en Córdoba, Argentina. Se siguieron las normas manejo y estabulación de los animales de acuerdo con el CICUAL (Comité Institucional para el Manejo y Cuidado de los Animales de Laboratorio) (n. 49/17).

Se analizaron un total de 72 ratas divididas en 6 grupos. La afectación metabólica se indujo por la administración de fructuosa al 10% diluida en agua bebida durante 60 días.

Cada grupo estuvo compuesto por 12 animales que fueron estudiados secuencialmente en diferentes situaciones experimentales:

I) Control (n=12). "C"

II) Dieta hídrica suplementada con un 10% de fructosa por 60 días (n=12). "MS"

III) Gastrectomía en Manga (n=12). "SG"

IV) Dieta hídrica suplementada con un 10% de fructosa en el agua por 60 días. + Gastrectomía en Manga con 6 semanas de post operatorio (n=12). "SG6"

V) Dieta hídrica suplementada con un 10% de fructosa en el agua por 60 días. + Gastrectomía en Manga con 12 semanas de post operatorio (n=12). "SG12"

VI) Dieta hídrica suplementada con un 10% de fructosa en el agua por 60 días. + Gastrectomía en Manga con 24 semanas de post operatorio (n=12). "SG24"

No se realizó ayuno preoperatorio. Las ratas seleccionadas se anestesiaron con ketamina 0,8ml intraperitoneal mediante punción en punto de Mc Burney izquierdo.

Se realizó una incisión de 1 cm en la línea media. Se traccionó el estómago a partir del epiplón mayor hacia la incisión y se extrajo a través la misma. Se utilizó un clamp vascular y se seccionó el estómago evitando así contaminación y sangrado. Se realizó una sutura con polipropileno 5-0 y se soltó el clamp. Se realizó luego una nueva sutura asegurando una restricción gástrica de al menos 80%. Se controló hemostasia y se reintrodujo el estómago a cavidad. Se cerró la pared abdominal en un plano con y síntesis cutánea. Las ratas permanecieron en un ambiente cálido hasta despertar bajo observación estricta. Comenzaron con agua enriquecida con fructosa 10% ad libitum en el post operatorio inmediato. Se reinició la dieta a demanda.

La sangre se obtuvo por punción de vena cava de los animales previamente anestesiados con ketamina (0.8ml intraperitoneal). Se midieron los valores de fibrinógeno plasmático, óxido nítrico (NO), superóxido dismutasa (SOD), mieloperoxidasa (MPO), glucemias en ayunas, perfil lipídico (TG, LDL, HDL, Colesterol total) e índice TG/HDL-c).

Se observó y registró el peso corporal todos los días durante las primeras 2 semanas después de las operaciones y luego una vez cada 2 semanas hasta la muerte.

Para analizar los resultados de las variables continuas se utilizaron las comparaciones múltiples mediante test "t" de Student. Se estableció un nivel de significación de $p < 0.05$ para todos los casos.

Resultados

El tiempo del procedimiento desde la anestesia fue de 48 ± 13 minutos. De las 72 ratas iniciales, 4 (5%) murieron después de la cirugía. En todos los casos, la muerte ocurrió en los primeros tres días. A todos los animales muertos se les realizó necropsias: 2 fallecieron por sangrado, 1 por fístula y en 1 caso no hubo alteraciones en el abdomen y se supuso que la intolerancia oral y deshidratación fueron la causa de muerte.

Los resultados de las variables plasmáticas oxidativas: fibrinógeno, NO, SOD y MPO se resumen en la figura 1. El grupo de MS mostró valores desmejorados que alcanzaron diferencia estadística en todas las variables analizadas. Por otra parte, los grupos intervenidos por SG mostraron una mejoría progresiva de los valores analizados hasta alcanzar diferencias estadísticamente significativas al compararlos con MS y perdiendo diferencias estadísticas al compararlos con C.

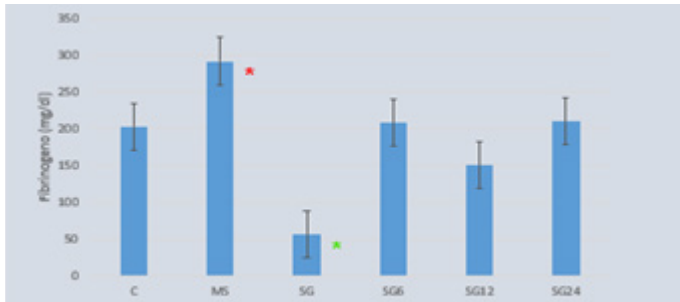


Figura 1.a: Fibrinógeno plasmático. *MS vs C, SG, SG6, SG12, SG24: p<0,001. *SG vs C, MS, SG6, SG12, SG24: p<0,001

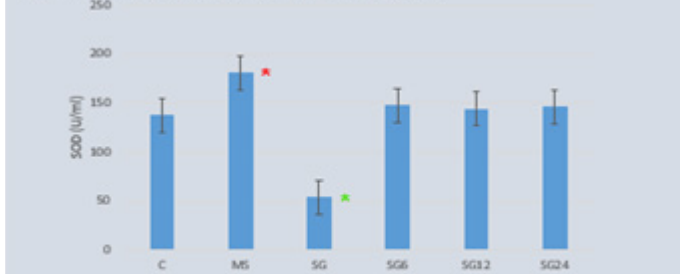


Figura 1.c: Comparación de los valores de SOD. *MS vs C, SG6, SG12, SG24: p<0,001. *SG vs C, MS, SG6, SG12, SG24: p<0,001.

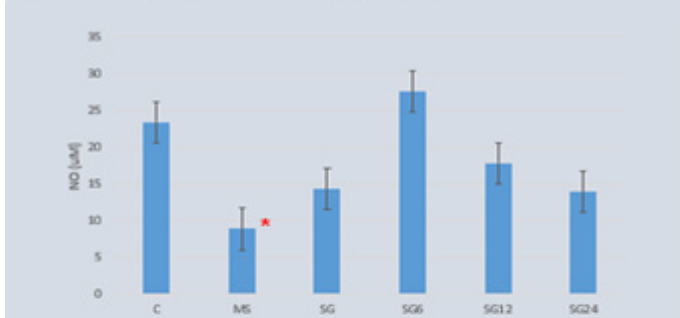


Figura 1.b: Variaciones en el óxido nítrico. *MS vs C, SG, SG6, SG12, SG24: p<0,001.

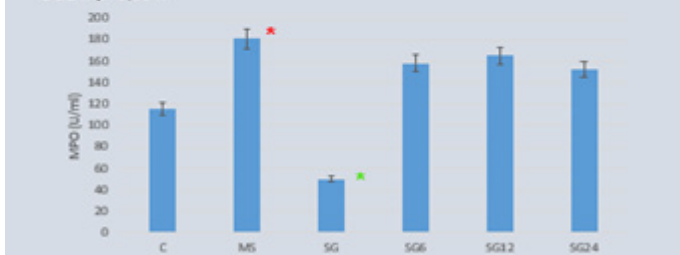


Figura 1.d: Cambios en las concentraciones de MPO. *MS vs C, SG, SG6, SG12, SG24: p<0,001. *SG vs C, MS, SG6, SG12, SG24: p<0,001.

Figura 1. Evolución de las variables oxidativas: a.fibrinógeno, b. NO, c. SOD, d. MPO

La glucemia fue máxima en el grupo MS ($235 \pm 10,7$) y mostró diferencias estadísticas respecto al resto de los grupos ($p < 0,001$ en todos los casos). No se encontraron diferencias al comparar C ($126 \pm 2,4$) con SG ($116,25 \pm 19$), SG12 ($147,71 \pm 12$) y SG24 ($131,83 \pm 10,4$) o estos grupos entre sí. SG6 ($174,6 \pm 14,2$) mostró niveles significativamente más altos de glucosa que C, SG12 y SG24 (Fig. 5). El mismo patrón fue observado al estudiar el comportamiento de triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL.

Finalmente, se comparó el índice TG / HDL entre grupos. El índice en MS ($6,2 \pm 1,8$) fue el más alto y se reportaron diferencias estadísticas al compararlo con el resto de los grupos ($p < 0,001$ en todos los casos). (Fig. 2)

Los resultados de las variables plasmáticas oxidativas: fibrinógeno, NO, SOD y MPO se resumen en la figura 1. El grupo de MS mostró valores desmejorados que alcanzaron diferencia estadística en todas las variables analizadas. Por otra parte, los grupos intervenidos por SG mostraron una mejoría progresiva de los valores analizados hasta alcanzar diferencias estadísticamente significativas al compararlos con MS y perdiendo diferencias estadísticas al compararlos con C.

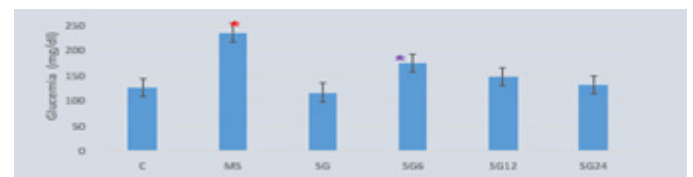


Figura 2.a: Valores de glucemia en todos los grupos estudiados. *MS vs C, SG, SG6, SG12, SG24: p<0,001. *SG6 vs C, SG12, SG24: p<0,001

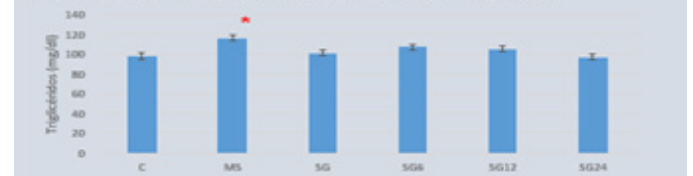


Figura 2.b: Variación de la concentración de triglicéridos. *MS vs C, SG, SG6, SG12, SG24: p<0,03

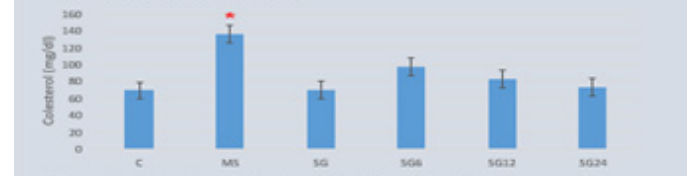


Figura 2.c: Cambios en el colesterol. *MS vs C: p<0,001

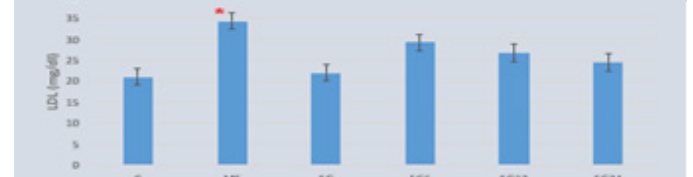


Figura 2.d: Modificaciones en las concentraciones de LDL. *MS vs C: p<0,001

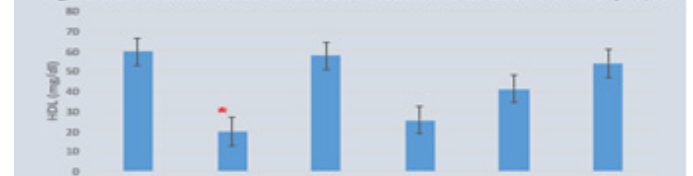


Figura 2.e: Variaciones en las concentraciones de HDL. *MS vs C: p<0,001.

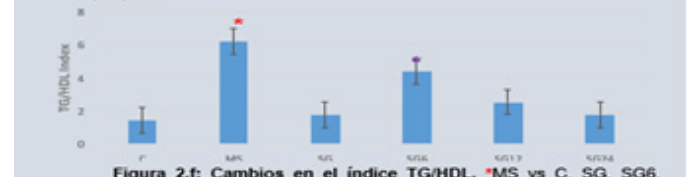


Figura 2.f: Cambios en el índice TG/HDL. *MS vs C, SG, SG6, SG12, SG24: p<0,001. *SG6 vs C, SG12, SG24: p<0,001

Figura 2. Evolución de las variables metabólicas: a.glucemia, b. triglicéridos, c. colesterol total, d.LDL, e. HDL, f. Índice TG/HDL

No se observaron diferencias en el peso corporal al comparar los grupos el primer día de la experiencia. En el momento de la cirugía, luego de 6 semanas de fructosa al 10% P / V en agua potable, los grupos MS, SG6, SG12 y SG24 mostraron una ganancia de peso significativa en comparación con C y SG

(p = 0,001). No se obtuvieron diferencias al comparar C con SG ni tampoco al comparar MS, SG6, SG12 y SG24 entre sí. En este punto, se sacrificó el grupo de MS para la evaluación metabólica.

Discusión

La utilización de un modelo experimental utilizando ratas alimentadas con fructosa ha demostrado desarrollar una afectación metabólica en los animales en cuyo perfil bioquímico se observan alteraciones comparables a la condición humana(4). Cabe destacar que una elevación significativa del índice TG/HDL se asocia con baja sensibilidad a la insulina y síndrome metabólico(5). Luego de SG, las diferencias tendieron a descender hacia valores más similares al grupo control. Esto podría corresponderse con una mejoría metabólica que otros autores han reportado. Cabe mencionar que esta variable podría resaltar la reproductibilidad del modelo ya que la medición de insulina en roedores es compleja, poco accesible y costosa debido a que el test de laboratorio a aplicar es específico de especie aumentando considerablemente los costos y disponibilidad. En años recientes se ha demostrado que la inflamación crónica subclínica podría ser un factor fisiopatológico

de relevancia en el desarrollo de insulino resistencia y consecuentemente MS(6). En nuestra experiencia, el descenso de NO conlleva la presencia de estrés oxidativo ya que el NO indirectamente cuantifica la concentración de especies reactivas del oxígeno, especialmente O₂⁻. En un ambiente oxidativo, NO se combina con el exceso de O₂- produciendo ONOO- que es un poderoso radical libre del oxígeno(7). Finalmente, la actividad de fibrinógeno, MPO y SOD aumentaron en el grupo MS. Estas variables son consideradas actualmente como biomarcadores oxidativos para diferentes procesos patológicos que conllevan un importante estado inflamatorio(8).

Diferentes modelos experimentales fueron propuestos para el estudio de la SG y su impacto en obesidad y síndrome metabólico en ratas. Lo novedoso de nuestro modelo es la inclusión de un protocolo de recuperación acelerada en animales. En nuestro diseño, se abolió el ayuno preoperatorio y tanto líquidos como sólidos fueron provistos luego de

AUTOR	ANIMALES (N)	SEGUIMIENTO	MUERTES	DIETA	AYUNO PRE-OP	ANESTESIA	CIERRE GÁSTRICO	DIETA LÍQUIDA	DIETA SOLIDA	INGESTA LUEGO DE GM	PESO	VALORACIÓN METABÓLICA
CASTELAN 2007 (9)	Wistar (8)	7 semanas	1*	Balancedo Standard	12 hs	keta- mina y xylaci- na IP	6-0 pro- pylene	Post qui- rúrgica	72 hs	-	Descen- so	-
LÓPEZ 2009 (10)	ZF (12)	14 días	No	Balancedo Standard	4-6 hs	Iso- fluora- no	3-0 seda	Post qui- rúrgica	48 hs	Descenso	Descen- so	Mejoría
CHAMBERS 2010 (3) PRE-TRATAMIENTO (KG/M2)	Long-Evans (52)	125 días	-	Alto en grasas	24 hs	Iso- fluora- no	Sutura Mecánica	Post qui- rúrgica	72 hs	Descenso	Descen- so	Mejoría
BRUINSMA 2015 (1)	Sprague-Dawley (10)	8 semanas	No	Alto en grasas	Noche preop	Iso- fluora- no	Sutura Mecánica	24 hs	Día 7	Descenso	Descen- so	Mejoría
BRINCKERHOFF 2011 (11)	Sprague-Dawley (18)	4 semanas	5 + 3 excluidas	Alto en grasas	7 días	Iso- fluora- no	Stapler + 5 0 PDS + omento	Post qui- rúrgica	Día 7	-	Descen- so	Mejoría
PEREFERER 2008 (12)	Sprague-Dawley/ ZF/ZDF	2 semanas	No	Alto en grasas y en hidratos	8 hs	Tiletamina + Zolaze- pam IM	5-0 popy- feno	Post qui- rúrgica	72 hs	Descenso (especialmente S-D)	Descen- so (especialmente S-D)	Mejoría (especialmente S-D)
SIGNORINI 2021	Wistar (72)	6-24 meses	4	Balancedo + FRUCTOSA 10% AGUA	NO	keta- mina IP	5-0 vycril, dos planos	Post qui- rúrgica	Post quirúrgica	Descenso	Descen- so	Mejoría

Tabla 1. Revisión bibliográfica de los principales modelos experimentales de SG en ratas reportados.

*Informan estudio piloto con 8 muertes en 9 cirugías. ZF:

la cirugía ad libitum. Esto disminuyó la manipulación de los animales para proveer hidratación subcutánea en el post operatorio inmediato. Por otro lado, no se observó ni canibalismo ni conductas autolesivas temidas por muchos autores. Esto podría deberse a la incisión mínima realizada que a su vez reduce las posibilidades de contaminación peritoneal. La anestesia se realizó con ketamina que es una droga barata, accesible, fácil de utilizar y muy segura dado que no produce depresión respiratoria y no necesita equipos especiales para ser administrada. Los animales se despiertan rápidamente y de manera íntegra con buena analgesia, cuestión que también responde al pequeño tamaño de la incisión. Utilizamos una sutura continua 5-0 en dos planos, pero consideramos que cualquier material podría ser utilizado, aunque las suturas mecánicas agigantan costos (Tabla 1).

Las cirugías falsas y los grupos alimentados a la par no han demostrado diferencias estadísticas en ninguna de las experiencias publicadas en la literatura por lo que decidimos no utilizarlos para evitar sacrificios animales ya innecesarios, reducir costos y tiempos operativos y optimizar la logística.

Conclusiones

El modelo de gastrectomía en manga propuesto ha demostrado seguridad en sus resultados respecto a la sobrevida animal a la par de obtener los efectos deseados luego de la inducción de la afectación metabólica y la realización de la gastrectomía en manga. Este modelo podría aportar entonces una opción reproducible y accesible para cualquier grupo que busque desarrollar protocolos de investigación en la materia.

Bibliografía

1. Bruinsma BG, Uygun K, Yarmush ML, Saeidi N. *Surgical models of Roux-en-Y gastric bypass surgery and sleeve gastrectomy in rats and mice. Nat Protoc.* 2015; 10(3):495-507. doi: 10.1038/nprot.2015.027.
2. Saeidi N, Nestoridi E, Kucharczyk J, Uygun MK, Yarmush ML, Stylopoulos N. *Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass exhibit differential effects on food preferences, nutrient absorption and energy expenditure in obese rats. Int J Obes.* 2012; 36(11):1396-402. doi: 10.1038/ijo.2012.167.
3. Chambers AP, Stefater MA, Wilson-Perez HE, Jessen L, Sisley S, Ryan KK, et al. *Similar effects of roux-en-Y gastric bypass and vertical sleeve gastrectomy on glucose regulation in rats. Physiol Behav.* 2011; 105(1):120-3. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.026.

4. Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. *The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. Int J Nephrol.* 2011; 2011:934659. doi: 10.4061/2011/934659.

5. Baez-Duarte BG, Zamora-Gínez I, González-Duarte R, Torres-Rasgado E, Ruiz-Vivanco G, Pérez-Fuentes R, et al. *Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol (TG/HDL-C) index as a reference criterion of risk for metabolic syndrome (MetS) and low insulin sensitivity in apparently healthy subjects. Gac Med Mex.* 2017; 153(2):152-158.

6. Saltiel AR, Olefsky JM. *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. Journal of Clinical Investigation.* 2017. 127(1):1-4. doi: 10.1172/JCI92035.

7. Kumar S, Singh RK, Bhardwaj TR. *Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2017. 85:182-201. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.125.

8. Garagiola ML, Tarán M, Scribano MP, Balceda A, García E, Fonseca I, et al. *Myeloperoxidase as an indicator of oxidative stress in metabolic syndrome. Rev Argent Cardiol.* 2016; 84:538-542. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v84.i6.9946>