



25
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TRANSLOCALIZACION BACTERIANA EN RATONES
CD1 CON EL SINDROME DE DESGASTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JOSE ALBERTO CASALES LEON

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO	TITULO	PAGINA
	INTRODUCCION.	2
1.	ANTECEDENTES.	
1.1.	EL SINDROME DEL DESGASTE.	8
1.2.	ALTERACIONES ASOCIADAS AL DESGASTE.	14
1.3.	INMUNOPATOLOGIA DEL SINDROME DEL DESGASTE.	21
1.4.	EFECTO DE LOS PRODUCTOS BACTERIANOS SOBRE LA INMUNIDAD.	22
1.5.	TRANSLocalIZACION BACTERIANA.	25
2.	PARTE EXPERIMENTAL.	
2.1.	MATERIAL.	35
2.1.1.	Animales.	35
2.1.2.	Bacterias.	35
2.1.3.	Antibióticos.	35
2.2.	DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS.	36
2.2.1.	Inducción del síndrome del desgaste.	36
2.2.2.	Administración de los antibióticos.	36
2.2.3.	Estudio de la translocalización bacteriana.	37
2.2.4.	Estudio de la respuesta de anticuerpos.	37
2.3.	MÉTODOS.	39
2.3.1.	Preparación de la suspensión de estafilococos.	39
2.3.2.	Preparación de las suspensiones de antibióticos.	39
2.3.3.	Inducción del síndrome del desgaste.	39
2.3.4.	Cultivo de las bacterias translocalizadas.	41
2.3.5.	Inmunización y respuesta de anticuerpos.	43
2.3.6.	Análisis estadístico.	44
3.	RESULTADOS.	
3.1.	CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS RATONES.	45
3.2.	CULTIVO DE BACTERIAS PRESENTES EN TEJIDOS.	51
3.3.	RESPUESTA DE ANTICUERPOS.	53
4.	DISCUSION.	57
5.	RESUMEN.	77
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	79
7.	BIBLIOGRAFIA.	81

INTRODUCCION

En este trabajo experimental se investiga si un grupo de ratones, a los cuales se les ha inducido un síndrome desgastante, pueden o no presentar una diseminación de los microorganismos Gram-negativos autóctonos del tracto gastrointestinal hacia ganglios mesentéricos, hígado y bazo.

Estos dos fenómenos biológicos, el desgaste físico y la translocalización de las bacterias, se han estudiado extensamente en el curso de los últimos años. Sin embargo, no es frecuente encontrar trabajos en donde los autores relacionen ambos fenómenos entre sí. Esto se debe a los diferentes intereses que estimulan las investigaciones dirigidas a conocer las causas y las principales características del desgaste y la translocalización.

El término "desgaste" se comenzó a utilizar con relativa frecuencia desde hace aproximadamente 30 años. En esa época se descubrió que el deterioro inmunológico provocado experimentalmente podía provocar anorexia, pérdida de peso, debilidad general, inanición, caquexia y muerte. Todo este conjunto de síntomas asociados a las lesiones del sistema inmunológico, se denominó desgaste. Más adelante se pudo comprobar que las mismas manifestaciones podían ser producidas por

diferentes factores. Todos ellos tenían el común denominador de provocar lesiones inmunológicas, algunas de ellas transitorias y otras definitivas. De este modo la enfermedad experimental se convirtió en un síndrome. Finalmente, el fenómeno del desgaste físico e inmunológico de los animales de laboratorio se comparó con la condición en la cual se encontraban algunas personas con infecciones crónicas o cáncer en su etapa terminal.

Sin embargo, en los años siguientes comenzó a disminuir el número de estudios experimentales que se publicaban sobre el síndrome del desgaste y sobre la etiopatogenia del mismo. De este modo, no pasó mucho tiempo antes de que el tema dejara de ser objeto de estudio por parte de los inmunólogos. Es probable que esta falta de interés hacia los modelos biológicos que se ha observado en las últimas décadas, resulte una consecuencia natural del desarrollo de la inmunología molecular, de la aparición de novedosas técnicas y equipos de laboratorio y de una larga serie de descubrimientos básicos importantes que se han multiplicado rápidamente.

No obstante, con la aparición del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con el desarrollo exponencial de esta epidemia y con la confirmación del mal pronóstico que tiene toda persona infectada con el VIH, en los últimos años se ha observado una polarización del interés de los inmunólogos hacia diferentes aspectos de este nuevo síndrome. En las personas con SIDA han llamado la atención el deterioro progresivo del sistema inmunitario, las infecciones por oportunistas que inevitablemente se vuelven recurrentes y el desgaste físico que se instala en las

etapas terminales de la enfermedad. Estos hechos devolvieron el interés por las enfermedades experimentales conocidas como síndromes desgastantes. Actualmente se puede observar un aumento significativo de las investigaciones que se publican cada año sobre personas y animales que presentan las manifestaciones clínicas y el compromiso inmunológico característicos del desgaste.

La "translocalización de bacterias" es el otro fenómeno biológico al cual se ha hecho referencia y que también tiene relación con los objetivos de esta tesis. El término se ha acuñado recientemente y se refiere a la diseminación de algunos microorganismos que se desplazan desde el tracto gastrointestinal hasta los ganglios linfáticos mesentéricos y otros órganos localizados en la cavidad abdominal. Aunque hace relativamente poco tiempo que este fenómeno se estudia con el nombre de translocalización, la diseminación de bacterias Gram-negativas en hospederos inmunocomprometidos ha interesado a los investigadores desde hace muchos años. Poco tiempo después de la descripción de las primeras enfermedades desgastantes que se habían inducido experimentalmente en ratones recién nacidos timectomizados (1) o transplantados con linfocitos alogénicos (2), las primeras discusiones sobre la etiología de estos síndromes sirvieron para proponer que la flora de bacterias comensales era la responsable del deterioro físico e inmunológico de los animales desgastados (3). Varios años más tarde, cuando Jutila (4) analizó la etiología del síndrome, se propuso la probable participación de los microorganismos oportunistas. En ese momento se observó que las manifestaciones del desgaste no se

presentaban en animales tratados con antibióticos (5) o en aquellos que se encontraban en condiciones axénicas (6).

El término translocalización bacteriana solo se comenzó a utilizar ampliamente hasta la década de los años 80. Este nuevo interés por las infecciones causadas por bacterias oportunistas ya no estuvo dirigido a explicar las manifestaciones clínicas de las enfermedades desgastantes, sino más bien a controlar los problemas infecciosos de las personas que habían sido intervenidas quirúrgicamente (7), que tenían quemaduras extensas (8), que estaban gravemente desnutridos (9) o que se encontraban en la etapa terminal de algunas enfermedades neoplásicas (10) y recibían alguna clase de quimioterapia (11) o antibióticoterapia (12).

En el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología de la Facultad de Química, desde hace más de dos años se realizan estudios experimentales sobre las alteraciones inmunológicas de ratones a los cuales se les induce la aparición del síndrome del desgaste mediante la inyección intraperitoneal de estafilococos muertos. Además del interés por caracterizar las principales alteraciones inmunológicas de la enfermedad, los inmunólogos de este grupo de investigadores han dirigido su atención hacia la probable participación de los microorganismos Gram-negativos como agentes responsables del desgaste más que como elementos oportunistas que aprovecharían secundariamente el deterioro inmunológico que caracteriza el síndrome. Los resultados de los primeros trabajos de este grupo demostraron que la inmunosupresión experimental provocada mediante la administración de una sola dosis de ciclofosfamida estaba asociada

a un aumento significativo de la concentración de un antígeno común de las enterobacterias (ECA) en el hígado y el bazo. Los animales con este aumento de antígenos bacterianos en los tejidos también tenían una serie de manifestaciones desgastantes como anorexia, pérdida de peso, inanición, etc (13). Más adelante, utilizando el mismo hapteno (ECA) que se había purificado a partir del lipopolisacárido crudo de una cepa de Escherichia coli, se pudo comprobar que las inyecciones intraperitoneales de ese producto bacteriano en ratones recién nacidos también podían provocar la aparición de una inmunosupresión moderada, sin que los animales llegaran a expresar el cuadro clínico completo de la enfermedad desgastante (14).

Con la parte experimental de la presente tesis, se ha tratado de continuar las investigaciones mencionadas en el párrafo anterior. El primer objetivo del presente trabajo es demostrar que las enterobacterias sí pueden translocalizarse desde el intestino hacia los ganglios linfáticos mesentéricos de un grupo de ratones a los cuales se les ha inducido la aparición del síndrome del desgaste. El segundo objetivo consiste en establecer una relación entre la deficiencia que tienen los animales desgastados para producir anticuerpos y la extensión de la translocalización de las enterobacterias, para lo cual se llevarán a cabo cultivos de los ganglios mesentéricos, el hígado y el bazo, así como una medida de la respuesta de anticuerpos anti-eritrocitos en los diferentes grupos de ratones desgastados y en sus correspondientes controles. El tercer objetivo del trabajo consiste en valorar la utilidad de los antibióticos ampicilina y estreptomycin, como un recurso profiláctico que

pudiera servir para limitar la extensión o reducir la incidencia del desgaste y de sus complicaciones.

En las páginas siguientes, después de presentar los antecedentes y los resultados del trabajo, se discute ampliamente la probable participación del deterioro inmunológico como la causa de la translocalización bacteriana y de la presentación de las principales manifestaciones clínicas del desgaste físico de los animales.

CAPITULO 1 ANTECEDENTES

En el presente trabajo experimental se estudia la relación entre el desgaste inmunológico de un grupo de ratones y la translocalización de bacterias desde el intestino de los animales hasta sus ganglios mesentéricos, bazo e hígado. A continuación se presenta un panorama general del conocimiento que se tiene hoy en día sobre la translocalización bacteriana, el desgaste provocado experimentalmente y las condiciones inmunológicas que facilitan la aparición de estos dos fenómenos.

1.1. EL SÍNDROME DEL DESGASTE

Las primeras observaciones experimentales sobre esta enfermedad se realizaron en animales a los cuales se les había inducido una reacción injerto-contra-huésped (GVH). En estos casos, las células inmunocompetentes transferidas a los animales receptores, que son incapaces de rechazarlas, producen daños graves en el sistema linfóide del receptor con lesiones que pueden destruir el sistema inmunitario del animal y provocarle la muerte. La medida de las lesiones provocadas se ha tomado como una prueba de la competencia inmunitaria de las células transplantadas (15).

Existen varios modelos experimentales que pueden inducir la enfermedad GVH :

a. Síndrome del desgaste. En este caso, un animal inmunológicamente inmaduro recibe un trasplante de células linfoides alogénicas y competentes. Las células injertadas reaccionan contra los antígenos de histocompatibilidad de las células del receptor, el cual, a causa de su inmadurez, no puede rechazar el trasplante.

b. Enfermedad secundaria, que se observa en animales adultos previamente irradiados, cuya médula ósea se reconstituye mediante un trasplante de células germinales hematopoyéticas de un donador alogénico.

c. Intoxicación parabiótica, que se presenta en aquellos modelos de dos animales, inmunológicamente competentes pero antígenicamente diferentes, cuya sangre periférica se mezcla en una forma continua.

d. La enfermedad del híbrido F1, que se induce inyectando linfocitos inmunocompetentes de uno de los progenitores a los animales F1 y obteniendo de nuevo un modelo en donde el animal receptor no rechaza el injerto, mientras que los linfocitos transplantados sí rechazan o reconocen los antígenos de histocompatibilidad del receptor (16).

Billinghan y Brent describieron en 1957 (17) el primero de los cuatro modelos que se acaban de enumerar. Inyectaron intraperitonealmente células linfoides alogénicas de un donador adulto a ratones recién nacidos. Poco tiempo después, los

raiones receptores presentaban un retardo del crecimiento, anorexia, pérdida de peso, diarrea y diversos grados de hipoplasia de los principales órganos primarios y secundarios del sistema inmunitario. Además, 20 a 30 días después, los animales desarrollaron lesiones en la piel y necrosis focal del tejido hepático. Todas estas manifestaciones integraron el cuadro clínico que inicialmente se conoció como enfermedad del encanijamiento ("runtng disease") o desgaste ("wasting").

Estudios posteriores revelaron que la aparición de todas estas manifestaciones desgastantes estaba condicionada por una serie de requisitos que se enuñeran a continuación :

a) El injerto debe contener células linfoides inmunocompetentes; b) el animal receptor del transplante debe poseer antígenos de histocompatibilidad de la Clase I que no están presentes en las células del donador; c) el animal receptor debe ser incapaz de iniciar una respuesta inmunitaria efectiva contra los antígenos de histocompatibilidad de las células injertadas, por lo menos el tiempo necesario para que éstas manifiesten su respuesta contra el huésped (17).

Por todo lo anterior, se pudo constatar que los linfocitos inmunocompetentes eran las responsables de las enfermedades desgastantes que aparecían como una consecuencia de las reacciones GVH. Esto lo propuso inicialmente Gowans en 1962 (16). Varios estudios posteriores analizaron el origen de los linfocitos responsables, la subpoblación que estaba involucrada en el rechazo y los tejidos que participaban en el desarrollo de la enfermedad (17). Así por ejemplo, la mortalidad de los animales receptores

de los injertos se pudo reducir después de la extirpación del bazo. Además, la administración de varios fármacos inmunosupresores como la aminopterina y de un suero anti-linfocítico también han sido medidas efectivas para prevenir la aparición del síndrome (18).

Existen varios otros procedimientos por los cuales es posible inducir una enfermedad desgastante que tenga manifestaciones clínicas iguales o parecidas a las del cuadro clínico clásico que describió inicialmente Billingham. Estos otros métodos son efectivos siempre y cuando el agente inductor se administre por vía endovenosa o intraperitoneal (18) y las enfermedades resultantes sehan denominado síndromes similares al desgaste ("runt disease-like"). Las siguientes son algunas de las formas alternativas por las cuales se pueden inducir estas enfermedades :

a) las inyecciones de acetato de cortisol, testosterona o estrógenos; b) la timectomía neonatal; c) las infecciones neonatales con ciertos virus como el del poliovirus o el de la linfocorionemeningitis; d) la administración de un suero heterólogo anti-linfocitos; e) la inyección intraperitoneal de suspensiones de estafilococos o estreptococos (19 y 20).

En cualesquiera de los casos mencionados anteriormente, la aparición de los síntomas de estos síndromes similares al desgaste ha podido ser mitigada o anulada cuando se utilizan animales que han recibido un tratamiento con antibióticos (5) o que se encuentran en condiciones libres de microorganismos (6). No obstante, Ekstedt y colaboradores (20) no encontraron diferencias

entre el desgaste inducido en animales que recibían tetraciclina y los que no se habían tratado con este antibiótico. Sin embargo, existen otros trabajos que muestran cómo la administración de ciertos antibióticos disminuye la gravedad de los principales síntomas que caracterizan el síndrome del desgaste (21).

Para la inducción de un síndrome similar al desgaste resulta sumamente importante la edad que tienen los animales en el momento de iniciar la inoculación de los productos bacterianos. La mayoría (80%) de los animales que reciben la primera inoculación dentro de las dos horas siguientes al nacimiento, presentan todos los síntomas de la enfermedad experimental, independientemente del sexo del receptor. Sin embargo, la incidencia de las manifestaciones disminuye cuando la primera inyección de estafilococos se aplica después de que los animales tienen más de dos horas de nacidos (20).

Posterior a la administración intraperitoneal de los productos bacterianos, las alteraciones inmunológicas más importantes que caracterizan al desgaste, consisten en una atrofia del timo, de la médula ósea, de los ganglios linfáticos periféricos y del bazo. En la sangre periférica se observa una disminución del número de linfocitos circulantes, asociada a un aumento del número de polimorfonucleares. Se ha encontrado además un aumento de la concentración de las Ig M (16). Sin embargo, la capacidad de los animales desgastados para sintetizar anticuerpos anti-eritrocitos de carnero se encuentra significativamente deprimida (22). En el Departamento de Biología también se ha encontrado que esta depresión es transitoria y que, diez días

después de terminar la inducción del síndrome experimental, los animales comienzan su recuperación física y presentan un rebote de la respuesta de anticuerpos anti-GRC que se eleva significativamente sobre la respuesta de los controles sanos (23). Aparentemente, la respuesta inmunitaria humoral es la más comprometida, porque otros estudios han mostrado que no se modifica el tiempo de rechazo de aloinjertos (19) ni la capacidad de los linfocitos esplénicos del animal desgastado para inducir una reacción local GVH (19). La exploración de la capacidad de los ratones desgastados para hacerse tolerantes ha revelado que, después de las inyecciones intraperitoneales de estafilococos muertos, los animales pierden la tolerancia inmunológica contra antígenos administrados por vía oral (24).

Un síndrome similar al del desgaste clásico puede ser producido en las cepas de ratones CF-1 e ICR, inyectando los animales con bacterias Gram positivas. Entre las más utilizadas está Staphylococcus aureus, así como extractos de la pared celular de esta bacteria, que se separan con sulfato de amonio y una preparación que contenga el sistema Staphylococcus aureus más los anticuerpos específicos contra sus antígenos. Las manifestaciones del desgaste también se han inducido mediante la inyección de Streptococcus sp. así como polisacáridos de esta bacteria de los grupos A,B,G y F (4) y Bacillus subtilis. Otros estudios revelan que una enfermedad similar se puede producir cuando se inyectan bacterias Gram-negativas como Escherichia coli y micobacterias como Mycobacterium tuberculosis.

En el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología donde se realizó esta tesis también se ha provocado la aparición del síndrome del desgaste en varias cepas de ratones inyectados intraperitonealmente con Staphylococcus aureus muertos por calor (25). Los resultados obtenidos han revelado, además, que tanto los animales de la cepa CD1, como los ratones Balb/c y C3HeB/FeJ pueden presentar el cuadro clínico completo y las principales manifestaciones inmunológicas (25). Sin embargo, los animales de la cepa C3HeB/FeJ resultaron más sensibles que los de las otras dos. Esta mayor susceptibilidad se expresó por una elevada tasa de mortalidad y por una persistencia de la depresión en la síntesis de anticuerpos que se prolongó más allá de tres semanas después de haber terminado la inducción del síndrome (24), cuando los ratones CD1 desgastados ya tenían una respuesta humoral superior a la normal diez días después de terminar el período inductivo.

1.2. ALTERACIONES ASOCIADAS AL DESGASTE

El síndrome del desgaste es una enfermedad experimental que tiene tres manifestaciones principales : 1) retraso en el crecimiento y desarrollo de los animales, 2) depresión de la respuesta de anticuerpos y 3) susceptibilidad a infecciones por microorganismos oportunistas. Todo esto puede provocarse en el laboratorio utilizando diferentes procedimientos (26) y, según la técnica seleccionada, la enfermedad puede ser de carácter transitorio o definitivo.

A continuación se presenta un resumen de los principales síntomas y alteraciones patológicas que se han descrito en los animales con el síndrome del desgaste (27) :

1) Daños corporales :

- inhibición y disminución progresiva del crecimiento,
- postura encorvada
- adelgazamiento de la piel,
- disminución de la grasa subcutánea,
- alargamiento de las orejas y la cola,
- y pelo ralo,

2) Daños en el tejido linfoide :

- atrofia de médula ósea, con necrosis focales
- atrofia del timo,
- atrofia de ganglios linfáticos,
- aumento de tamaño del bazo, con necrosis focales,
- linfopenia en sangre periférica,

3) Alteraciones glandulares :

- atrofia de tiroides,
- desarrollo incompleto de las glándulas salivales,
- lesiones en la corteza de las suprarrenales,
- degranulación de las células acidófilas (hipófisis),

4) Alteraciones sexuales :

- ausencia de caracteres sexuales secundarios en los animales de sexo masculino,
- espermatogénesis incompleta,
- esterilidad en los dos sexos,

5) Otras alteraciones :

- focos de necrosis en el hígado,
- reducción del número y el tamaño de los hepatocitos,
- osteoporosis,
- desarrollo incompleto de los riñones,
- anemia microcítica,
- diarreas hemorrágicas.

La frecuencia con la cual se presentan estas alteraciones varía según el procedimiento utilizado para inducir el síndrome, la edad del animal, especie, cepa, sexo, etc (28).

El síndrome del desgaste es una inmunodeficiencia secundaria que puede provocarse experimentalmente mediante la administración intraperitoneal de varios productos bacterianos. Los estudios realizados hasta ahora en los laboratorios de investigación del Departamento de Biología de la Facultad de Química han confirmado que, a pesar de la gravedad de las lesiones macroscópicas en el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, los animales desgastados solo tienen deprimida su respuesta de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes (22) y no pueden volverse tolerantes a los antígenos administrados por vía oral (24). El episodio se ha considerado transitorio porque, dos semanas después de haber terminado la inducción del síndrome, los animales desgastados recuperan la imagen histológica y el peso normal del timo (29) y, aparentemente, continúan su vida en una forma indistinguible a la de los ratones sanos. No se han estudiado la evolución y el pronóstico de la pérdida de la tolerancia oral.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar las diferentes manifestaciones del síndrome. Las investigaciones realizadas al respecto presentan resultados sugestivos de que la inmunodeficiencia de los animales desgastados aparece como una consecuencia de varios eventos sucesivos que parecen tener una relación causa-efecto.

Probablemente, lo primero que sucede después de la inoculación de los productos bacterianos en el peritoneo es la estimulación de las células fagocíticas, como los macrófagos y los monocitos. Después de esta estimulación, las células liberan al exterior una cantidad exagerada de ciertas citocinas que alteran los sistemas inmunomoduladores de los animales. No parece probable que las exotoxinas de los estafilococos puedan tener alguna relación con la aparición de las principales alteraciones inmunológicas del desgaste ya que la suspensión de las bacterias se calienta a 120^o C antes de inyectarse. La principal alteración inmunológica de los animales inyectados con estafilococos muertos consiste en una depresión de la síntesis de anticuerpos. Es razonable suponer que algunas otras actividades de las células linfoides inmunocompetentes también pueden estar alteradas. Como una consecuencia de este trastorno inmunológico pasajero, las bacterias comensales encuentran una oportunidad para diseminarse hacia diferentes tejidos utilizando diversas vías (vena porta, capilares linfáticos) y, una vez más, nuevos productos bacterianos como las endotoxinas van a estimular a las células fagocíticas para que continúen sintetizando y liberando citocinas. Todos estos mediadores se reconocen como los

responsables del estado "tóxico" del individuo infectado (30). Existe evidencia experimental que prueba cómo algunas de las citocinas liberadas por los macrófagos pueden alterar las funciones de los linfocitos T (31) y B (32). La administración experimental de estas citocinas en animales sanos puede provocarles un desgaste físico que termina en caquexia (33). Es probable que, durante el curso de las enfermedades desgastantes, también se alteren las concentraciones tisulares de algunos elementos traza, como el zinc. Existe literatura (34) que refiere cómo la privación de este elemento en la dieta, puede provocar la aparición de un desgaste físico e inmunológico similar al que se estudia.

De todos modos, después que terminan de aplicarse las inyecciones intraperitoneales de bacterias muertas, aparentemente los animales desgastados vuelven a tener el mismo apetito de los animales control, mejoran su alimentación y pueden presentar un síndrome de recuperación similar al que se observaría en un individuo convaleciente de una infección grave. La única diferencia consistiría en que, en el modelo experimental, el animal se desgasta como si estuviera infectado, cuando en realidad sólo se ha inyectado con una suspensión estéril de bacterias muertas.

Las hipótesis en favor de que la diseminación de las enterobacterias comensales es el evento crucial al cual se le pueden atribuir las principales manifestaciones del desgaste, se encuentran apoyadas en los resultados de varios experimentos que se han realizado en animales libres de microorganismos o que

están sometidos a un tratamiento con antibióticos. El síndrome del desgaste no se ha podido reproducir en ratones que, además de las inyecciones intraperitoneales de estafilococos, reciben ciertas dosis de terramicina (35 y 21) o neomicina (5) por vía oral. Así mismo, el esquema de las inyecciones intraperitoneales propuesto por Ekstedt (19) tampoco puede provocar el desgaste de los animales cuando estos se encuentran en condiciones libres de microorganismos (4). Al aplicar otros procedimientos diferentes para la inducción del mismo síndrome, por ejemplo la timectomía, también se ha observado que los animales en condiciones axénicas no presentan el cuadro clínico característico de la enfermedad (5).

Todos estos resultados se obtuvieron en la década de los años 1960-1970. Sin embargo, recientemente ha resurgido un interés por estudiar el comportamiento de la flora de enterobacterias comensales en personas y animales que están sometidos al efecto inmunosupresor de varios factores. La mayoría de los trabajos publicados sobre estos aspectos de la inmunidad han mostrado claramente que al disminuir la inmunocompetencia aumentan las posibilidades de que se presente una translocalización de enterobacterias (36). En los animales inmunosuprimidos se ha podido demostrar que las bacterias localizadas normalmente en el intestino se translocalizan hacia los ganglios mesentéricos (37). Los mecanismos mediante los cuales ocurre esta diseminación de enterobacterias se han estudiado ampliamente (38). Así mismo, se ha encontrado que la depresión de la respuesta inmunitaria parece ser la principal

causa (aunque no la única) de translocalizaciones de la flora de bacterias comensales (39). Todos estos trabajos se han recibido con mucho interés porque las bacterias Gram-negativas son las responsables de una buena parte de las infecciones que complican la evolución de los pacientes inmunosuprimidos, particularmente los cancerosos (40) y los desnutridos (9).

El modelo estudiado tiene la particularidad de que utiliza el procedimiento más natural (los productos bacterianos) para inducir la inmunodeficiencia o el desgaste inmunológico. Por esta razón, este modelo estudiado permite medir en una forma más fiel las alteraciones que ocurren en las relaciones del hospedador con su flora de bacterias comensales. Por otra parte, los animales desgastados no se pueden considerar como ejemplos de infecciones provocadas experimentalmente, ya que los inóculos intraperitoneales son estériles. Aunque están inmunosuprimidos sistémicamente, los animales desgastados no están en las mismas condiciones que aquellos otros que reciben radiaciones o quimioterapia. Estos últimos han sido los procedimientos físico-químicos más agresivos que se utilizan con mayor frecuencia para provocar tanto el desgaste de los animales como la translocalización de las bacterias (11).

Todos los comentarios anteriores, más la elevada frecuencia que tienen las infecciones en las personas inmunodeficientes o inmunosuprimidas, avalan la importancia del modelo experimental que se estudia. Inicialmente se comprobó que los animales desgastados presentaban una depresión importante de la síntesis de anticuerpos (41). Este hallazgo y la observación del timo

atrófico sirvieron para la caracterización inmunológica del síndrome y para proponer que, posiblemente, los animales desgastados eran extraordinariamente susceptibles a las infecciones. Otros resultados (24) sugieren que la patología inmunológica puede ser más amplia y que probablemente incluye alteraciones de la inmunidad que depende del tejido linfoide asociado al tubo digestivo.

1.3. INMUNOPATOLOGIA DEL SINDROME DEL DESGASTE

Las lesiones más importantes se han encontrado en la médula ósea, los órganos linfoides primarios o secundarios y en varias glándulas del sistema endócrino (27). Cuando el síndrome del desgaste fue provocado mediante la inducción de una reacción GVH, algunos investigadores (42) observaron que los animales presentaban lesiones importantes en la mucosa del tubo digestivo, las cuales se consideraron como un daño indirecto o accidental de la reacción. Pero algunos trabajos más recientes (43) han demostrado que en el curso de las reacciones GVH aumenta la producción de un factor caquectizante o TNF, particularmente cuando los animales se exponen a las endotoxinas y, además, que la caquectina (factor necrosante de tumores) administrada experimentalmente puede provocar una necrosis intestinal en animales de laboratorio (44). Las lesiones del intestino causadas por la liberación de caquectina parecen estar mediadas por la activación del sistema complemento y están potencializadas por la interacción del TNF con las endotoxinas de las bacterias Gram-negativas. Todas estas observaciones apoyan la idea de que el animal desgastado presenta una profunda alteración de su control inmunológico sobre la flora de bacterias comensales que se

localizan en el tubo digestivo. Los resultados de estas alteraciones inmunológicas y las bases moleculares de las lesiones que dependen de ellas apenas se comienzan a estudiar (45).

Según algunos autores que se han ocupado extensamente de estudiar las alteraciones del sistema endócrino en los animales desgastados (27), el síndrome consiste en la expresión de una alteración en las interrelaciones que normalmente existen entre los sistemas inmunitario y neuro-endócrino. Según ellos, por esta razón ha sido tan amplia la patología encontrada. Se ha considerado que el síndrome del desgaste viene a ser un modelo de las anomalías que se pueden presentar en las interacciones que normalmente ocurren entre el timo y las diferentes glándulas del sistema endócrino. El ataque a la integridad anatómica del timo, a su crecimiento, diferenciación de sus células y expresión de sus actividades biológicas, constituyen un prerrequisito básico para que aparezcan las principales manifestaciones del desgaste.

2.4. EFECTO DE LOS PRODUCTOS BACTERIANOS SOBRE LA INMUNIDAD.

El lípido A contenido en todas las endotoxinas puede provocar la mayoría de los efectos que anteriormente se atribuían a estas sustancias (46). Sin embargo, actualmente se sabe que los LPS de las bacterias Gram-negativas son realmente productos atóxicos, incapaces de dañar *in vitro* las células de varios cultivos. Las manifestaciones "tóxicas" que se presentan después de una inyección de LPS se deben a la interacción de estas sustancias con receptores de membrana de células fagocíticas, particularmente macrófagos, con la consiguiente liberación al

espacio extracelular de una serie de citocinas (47). El uso de anticuerpos monoclonales para bloquear estas sustancias inhibe la aparición de las principales manifestaciones del choque inducido por endotoxinas (48). Entre las citocinas responsables de las principales manifestaciones del choque endotóxico, la más estudiada ha sido la caquectina que también se conoce con el nombre de factor necrosante de tumores. Una inyección de endotoxinas o de caquectina puede causar un grave daño celular del endotelio, fiebre, activación de la cascada de la coagulación, activación del sistema del complemento, hipotensión, hipoglucemia, granulocitopenia, trombocitopenia, espasmo arterial, anoxia, acidosis láctica, edemas, degranulación de células cebadas, activación de la vía hexosa monofosfato, inhibición de la quimiotaxis, generación y liberación de radicales del ión superóxido, liberación de enzimas hidrolíticas, activación de la cascada del ácido araquidónico con producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos; coagulación intravascular diseminada, agregación de plaquetas, contracción de músculo liso, necrosis de piel, sangrado intestinal, choque y muerte (33). Entre estos efectos se incluye, además, la hipoplasia de la glándula timo (49), linfopenia y grados variables de una inmunosupresión que se puede complicar con infecciones sobreagregadas. En este último caso, la condición clínica se agrava a causa de que cada episodio infeccioso representa la diseminación en el organismo de una nueva carga de productos de origen bacterianos que vuelven a estimular a los macrófagos.

Las endotoxinas de los Gram-negativos no son los únicos productos bacterianos que tienen una actividad biológica deletérea

para los organismos vertebrados. Así por ejemplo, se ha observado que algunos componentes de las bacterias Gram-positivas pueden provocar trastornos inmunológicos similares a los causados por los LPS (50).

El peptidoglicano o mureína es un componente común en la pared celular de todas las eubacterias, principalmente las Gram-positivas. La mureína inyectada experimentalmente en animales de laboratorio interactúa con el sistema complemento y lo activa induciendo algunos de los principales síntomas de la enfermedad bacteriana (51). La mureína es también un activador policonal de los linfocitos T y B (52), así como un potente inmunógeno. Sus subunidades (muramil dipéptido, pentapéptido, pentaglicinas) son sustancias pirogénicas, producen lesiones inflamatorias en la piel, inhiben la liberación de cininas y la quimiotaxis de PMN, así como activación de macrófagos (53).

La bacteria Gram-positiva Staphylococcus aureus contiene, además del peptidoglicano, otras sustancias que también tienen actividades biológicas sumamente importantes. Entre ellas se pueden mencionar los ácidos teicoicos, la proteína A, varias enzimas extracelulares y otras tantas exotoxinas. Los ácidos teicoicos son activadores policonales de los linfocitos T y B. Además, pueden aumentar la quimiotaxis de los PMN que regularmente depende de la activación del sistema complemento (54). La Proteína A también es un mitógeno inespecífico de los linfocitos T y B (55) que, además, puede activar el sistema complemento y aumentar la quimiotaxis de los PMN (56), aunque otros autores han informado que también interfiere con la

fagocitosis y la opsonización, lo mismo que las capsulas polisacarídicas (57).

Existen varios inmunestimulantes más de origen bacteriano, tales como el PPD, las lipoproteínas de los Gram-negativos, la proteína asociada al lípido A, un mitógeno de la pared celular de Listeria, un mitógeno aislado de Nocardia y varios más (57).

1.5. TRANSLOCALIZACIÓN BACTERIANA.

El sistema inmunitario asociado al tubo digestivo funciona como una barrera defensiva que normalmente impide la salida de las enterobacterias a través de la mucosa intestinal. Existe una gran cantidad de trabajos que demuestran cómo la inmunidad intestinal no permite la diseminación de las enterobacterias y limita la consiguiente colonización de la sangre y de los órganos localizados en la cavidad abdominal (12, 36, 37, 58, 59, 60, 61). Sin embargo, se ha demostrado que, bajo ciertas condiciones, las enterobacterias comensales del tracto gastrointestinal pueden evadir la respuesta inmunitaria de secreción a nivel de las mucosas, atravesar el epitelio intestinal, llegar a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y, desde allí, diseminarse hasta colonizar varios órganos de la cavidad abdominal. Este cambio de hábitat que pueden presentar las bacterias comensales del tubo digestivo se ha denominado Translocalización Bacteriana (12, 36, 37, 58, 59, 60, 61).

La translocalización de las enterobacterias puede ser provocada por una gran cantidad de factores. Entre los más estudiados se encuentran el rompimiento del balance que normalmente existe entre los diferentes miembros de la flora

habitual del intestino, la ruptura física, por trauma o endotoxemia que estimula la producción de TNF, de la barrera anatómica que forma la mucosa intestinal y, finalmente, el compromiso, deficiencia o supresión inmunológica del hospedero (58).

Numerosos trabajos realizados sobre pacientes y animales de laboratorio han confirmado que las deficiencias del sistema inmunitario asociado al tubo digestivo se acompañan de una pérdida de la barrera inmunológica, la cual detiene la diseminación de las bacterias comensales. Se ha observado que en los individuos sometidos a cirugía, cancerosos, traumatizados o con quemaduras, las defensas inmunológicas disminuyen en la misma medida que aumenta la translocalización bacteriana (58). Esta situación se encuentra agravada cuando existe una desnutrición asociada (9).

Las bacterias intestinales translocalizadas generalmente se escapan por vía linfática y utilizan los ELM como una primera estación después de haber cruzado la barrera de la mucosa (59). En realidad, más que una estación, los ganglios mesentéricos representan barreras inmunológicas secundarias, tanto o más efectivas que el tejido linfóide de las mucosas. Los ganglios linfáticos del mesenterio son órganos secundarios del sistema inmunitario y contienen tanto macrófagos fijos como linfocitos T y B. En los ganglios mesentéricos, las bacterias se pueden quedar, estacionadas o detenidas, durante un cierto tiempo o puedan continuar su escape hasta diseminarse hacia otros órganos de la cavidad abdominal o, incluso, llegar a la circulación. El grado de competencia de las células de los ganglios va a resultar

un factor crítico en la evolución que van a tener las enterobacterias que acaban de abandonar la luz intestinal.

Numerosos investigadores han realizado una gran cantidad de estudios experimentales con el objetivo de encontrar el o los mecanismos inmunológicos que, al deteriorarse, facilitan la translocalización de las enterobacterias. Lamentablemente, no existe uniformidad en los resultados a causa de que los modelos animales no han sido similares (37, 58, 60). Una parte de los autores destacan la importancia de las lesiones o la extirpación del timo como las causas más evidentes de la translocalización (36). Algunos de estos trabajos se han realizado utilizando ratones mutantes desnudos (nu/nu) congénitamente atímicos (62). Otros autores han encontrado que las enterobacterias pueden utilizar los macrófagos móviles como vehículos para desplazarse por vía linfática (36). Esta observación sugiere que, de ser así la forma de diseminación, estas células fagocíticas deben tener un grave trastorno en sus actividades bactericidas. Finalmente, existe otro grupo de autores que han encontrado una franca relación entre la translocalización bacteriana y los defectos de la respuesta de anticuerpos, particularmente las de secreción (61). Algunos de los resultados mencionados tienen una gran importancia para el presente trabajo de tesis experimental, porque los animales desgastados a causa de las inyecciones de estafilococos muertos tienen una atrofia tímica, un profundo compromiso en su capacidad para sintetizar anticuerpos y un trastorno del tejido linfoide asociado al tubo digestivo (36). Esta última alteración se ha demostrado al comprobar que el desgaste se acompaña de una pérdida de la capacidad para inducir

un estado de tolerancia contra antígenos administrados por vía oral (24).

Otra parte importante de los trabajos sobre las causas de la translocalización bacteriana se han orientado a estudiar diferentes aspectos microbiológicos que parecen influir en el inicio y la evolución del evento. Los estudios bacteriológicos han sido muy importantes porque la translocalización bacteriana es el origen de diversas infecciones que ponen en peligro la vida de las personas (60, 63). Generalmente, las infecciones por enterobacterias que se translocalizan se han encontrado en pacientes inmunocomprometidos, tales como cancerosos o leucémicos, especialmente durante la quimioterapia que les puede causar graves granulocitopenias (11, 60). Así mismo, la translocalización de enterobacterias cobra numerosas vidas en los pacientes que han sufrido quemaduras graves y extensas, ya que el estrés físico provoca un debilitamiento del sistema inmunitario. Deitch y colaboradores (58, 60, 63) opinan que las infecciones de estos pacientes y la posibilidad de que se conviertan en septicemias dependen, en un alto grado, de la virulencia que pueda expresar una bacteria translocalizada. Jarret (64) también opina que la translocalización bacteriana aumenta su gravedad en la medida que la microflora autóctona intestinal se ve quebrantada o reducida. Existe una abundante evidencia clínica en favor de que el intestino es el principal reservorio de los microorganismos causantes de las infecciones sistémicas (63). Entre las diferentes bacterias Gram-negativas del intestino, Escherichia coli parece ser la más importante (63, 65). Varios estudios realizados en humanos a quienes se les tomaron muestras de los

ganglios linfáticos mesentéricos, en el curso de laparotomías exploratorias a causa de obstrucciones intestinales, revelan que Escherichia coli es la bacteria que, en estos casos, se translocaliza más frecuentemente (63).

Wells y colaboradores (65) han propuesto que las bacterias intestinales tienen una tendencia a translocalizarse desde el tracto gastrointestinal hacia los ganglios mesentéricos y que esto lo hacen como una especie de mecanismo defensivo en aquellos casos en que existan condiciones adversas en su habitat natural. Tal sería el caso de Escherichia coli sensible a la estreptomycin. En ratones sanos que reciben un tratamiento oral con este antibiótico se ha encontrado Escherichia coli en los cultivos de ganglios mesentéricos, mientras que los ganglios de los animales de la misma cepa que no recibieron el mismo antibiótico no dieron cultivos positivos (65). En base a estos resultados se ha propuesto que Escherichia coli autóctona sensible a la estreptomycin, es una bacteria que se translocaliza como un mecanismo defensivo para escapar de la acción del antibiótico que se administra por vía oral. En este mismo experimento se pudieron obtener cultivos positivos en los cuales crecían cepas de Escherichia coli que eran resistentes a la estreptomycin (65).

Otros autores han propuesto un punto de vista diferente relacionado más bien con la resistencia y no con la sensibilidad a un antibiótico determinado. Sus experimentos han permitido afirmar que, después de la administración oral de un antibiótico, resultan eliminadas ciertas cepas de bacterias autóctonas que no pueden resistir el ataque antimicrobiano (61). En estos casos

se puede observar un sobrecrecimiento de las bacterias que no son atacadas por el antibiótico, con lo cual se puede generar un desequilibrio en las proporciones habituales de la flora comensal con la consiguiente alteración de la mucosa y el escape o translocalización de las bacterias que predominan (61).

Otros hallazgos experimentales parecen indicar que la translocalización es un evento multifactorial. Así por ejemplo, cuando se diseñan experimentos en los cuales actúan dos o más factores que facilitan la translocalización, se ha podido observar que aumenta la diseminación de las enterobacterias desde el intestino hacia los ganglios mesentéricos (58, 61). Este es el caso de los ratones desnutridos, que tienen deprimida su competencia inmunológica pero que, sin embargo, solamente van a presentar una translocalización bacteriana cuando son inyectados intraperitonealmente con Escherichia coli o con endotoxinas y cuando se les provocan quemaduras en la piel (58). Los autores opinan que probablemente cada uno de estos tratamientos, por sí solos, no pueden promover la translocalización de las enterobacterias. Sin embargo, cuando se combinan varios de ellos entonces sí resultan positivos los cultivos de los ganglios mesentéricos (58, 61). No obstante todos estos experimentos y opiniones, parece prudente considerar la posibilidad de que todavía no se han aclarado completamente los principales mecanismos responsables de la translocalización (61).

Los resultados de algunos experimentos sugieren que la translocalización bacteriana obedece a diversos mecanismos y que no todos ellos pueden ser tan evidentes como el compromiso

inmunológico de una persona cancerosa o con quemaduras extensas. Así por ejemplo, Garlington y Berg (37) han encontrado que cuando un grupo de ratones libres de microorganismos se inoculan intraperitonealmente con Escherichia coli, en ellos se pueden encontrar bacterias translocalizadas hasta 112 días después de las inyecciones. Aparentemente, en los ratones libres de microorganismos o gnotobióticos, se encuentran reducidos algunos mecanismos activos que normalmente inhiben la translocalización de bacterias desde el intestino hacia los ganglios mesentéricos. Los estudios realizados sobre el tejido linfóide del tubo digestivo de los ratones parecen confirmar este punto de vista (37). Se ha podido encontrar que en los ratones gnotobióticos existe una disminución del número de linfocitos y células plasmáticas que normalmente deben existir en la mucosa intestinal. El tejido linfóide es muy abundante en los ratones sanos que tienen la flora bacteriana intestinal convencional. Probablemente por esta razón, mientras se mantienen normales, pueden impedir radicalmente cualquier intento de diseminación de las bacterias desde el intestino hacia los ganglios. Estos resultados apoyan la importancia que tiene la conservación de la flora de bacterias comensales como una fuente continua de estímulos antigénicos que mantienen el desarrollo y la competencia del sistema inmunitario asociado al tubo digestivo.

Los estudios que se realizaron posteriormente, demostraron sin ningún lugar a dudas, que al administrar antibióticos por vía oral se alteraban las proporciones de las bacterias comensales y se favorecían los fenómenos de translocalización de microorganismos. Berg (12) informó que si un grupo de ratones

sanos se inoculaban intraperitonealmente con Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae o Pseudomonas aeruginosa y enseguida recibían un tratamiento con bacitracina y estreptomina, se podía comprobar la translocalización de estas bacterias hacia los ganglios mesentéricos. Según este autor, la flora de bacterias habituales del tubo digestivo establece un antagonismo que impide la proliferación y la translocalización de otras bacterias como las que se inyectaron a los ratones (12). Al administrar un tratamiento con antibióticos se rompe el equilibrio ecológico del intestino y entonces ocurre una sobrepoblación con ciertas bacterias resistentes (65). Aparentemente, el predominio de estas bacterias que antes de administrar los antibióticos podían tener restringidas sus tasas de crecimiento, es un factor sumamente importante en el inicio de la diseminación de microorganismos hacia los ganglios mesentéricos. Según la especificidad de los antibióticos que se administraron a los ratones, es posible observar un incremento o una disminución de la translocalización de ciertas bacterias (12).

Se han realizado otros experimentos importantes en animales a los cuales se les induce experimentalmente la formación de abscesos intraabdominales. Tales abscesos se forman como una consecuencia de fenómenos de translocalización bacteriana (66). Al estudiar los microorganismos contenidos en los abscesos se pudo observar que era una mezcla de especies anaerobias y facultativas. Cada absceso contenía un promedio de 4 a 5 especies de bacterias diferentes, todas ellas procedentes del tubo digestivo. Probablemente esto se debía a que la perforación intestinal no es

un prerrequisito indispensable para que las bacterias inicien la formación o colonizen un absceso abdominal (59). Los resultados anteriores confirman observaciones previas obtenidas de los cultivos practicados a pacientes con enfermedades crónicas.

A pesar de que el intestino de los roedores contiene cientos de especies de microorganismos, las bacterias aisladas en los abscesos intraperitoneales son similares a las que se han demostrado durante la inducción de fenómenos de translocalización en ratones de laboratorio (66). En un orden decreciente de frecuencias, las bacterias que más se translocalizan han sido los "enterococos", Escherichia coli, Staphylococcus spp, Streptococcus spp, lactobacilos y Proteus spp.

Owens y colaboradores (36) han estudiado las lesiones provocadas por los abscesos intraperitoneales y han destacado la importancia que puede tener el denso infiltrado de células PMN como un mecanismo que no solamente es defensivo, sino también facilitador del transporte de microorganismos desde el tubo digestivo hacia el sitio donde se encuentra el absceso. Después de un desequilibrio en las proporciones de las bacterias intestinales, las células PMN podrían haber fagocitado las bacterias predominantes y, posteriormente, transportarlas hacia la cavidad intraperitoneal (38). Al ocurrir la muerte de los leucocitos PMN, las bacterias que aún continuaban vivas serían liberadas e iniciarían su multiplicación fuera del intestino de un animal que no puede defenderse adecuadamente, porque tiene comprometida la respuesta del sistema inmunitario (36).

Las razones por las cuales es tan limitado el número de bacterias translocalizadas, es otro aspecto que también lo han estudiado diversos grupos de investigadores (59). Opinan que este fenómeno puede depender a varias causas : 1) existen algunas bacterias que se transfieren fuera del intestino más fácilmente que otras; 2) generalmente, las bacterias que se transfieren son parásitos intracelulares facultativos; 3) la cantidad de bacterias translocalizadas tiene una relación directamente proporcional con el grado de compromiso inmunológico del animal y, por lo general, comienza a ser evidente 24 horas después de provocar un daño en el sistema inmunitario.

CAPITULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL

2.1.1. ANIMALES.

Se utilizaron 213 ratones CD1, recién nacidos, proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Química. Los animales estuvieron con sus madres hasta el momento del destete, cuando cumplieron 21 días de edad se alimentaron en la forma convencional, con Purina y agua ad libitum.

2.1.2. BACTERIAS.

Para inducir la enfermedad del desgaste se utilizó la cepa de Staphylococcus aureus ATCC 6538, que fue proporcionada por el Cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química y se cultivó en medio BHI.

2.1.3. ANTIBIOTICOS.

Se utilizaron dos antibióticos. La estreptomycinina fue proporcionada por los Laboratorios LAKESIDE, en viales que contenían 1 gr y se preparó solubilizándola en agua de la llave a una concentración de 1 g/L. Este antibiótico se administró por vía oral a los ratones de varios subgrupos experimentales durante los primeros 15 días de la inducción del desgaste. La ampicilina fue proporcionada por los laboratorios BRISTOL, en viales que contenían 5 gr y se preparó solubilizándola en agua de la llave a

una concentración de 500 mg/L. Este segundo antibiótico también se administró por vía oral, durante los siguientes 15 días hasta el final de la inducción del desgaste, a los ratones de los mismos grupos experimentales que habían recibido la estreptomicina.

2.2. DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

2.2.1. INDUCCIÓN DEL SÍNDROME DEL DESGASTE.

Los ratones recién nacidos se separaron en tres grandes grupos. Los 99 ratones del grupo I recibieron las inyecciones intraperitoneales cada tercer día de estafilococos suspendidos en solución salina, desde el momento de su nacimiento hasta las cuatro semanas de edad. Los 60 ratones del grupo II sólo recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina y los 54 animales del grupo III no se inyectaron. Todos se pesaron diariamente.

2.2.2. ADMINISTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO.

Desde el momento de su nacimiento, los animales que se habían incluido en cada uno de los tres grupos mencionados se separaron en dos subgrupos (A Y B). De este modo, los 213 animales del experimento quedaron divididos en 6 subgrupos. La identificación de cada subgrupo se llevó a cabo utilizando las siglas correspondientes. Así por ejemplo, subgrupos I-A y I-B, II-A y II-B, III-A y III-B. Los ratones de los tres subgrupos A se colocaron con sus respectivas madres en cajas a las cuales se les adaptaron botellas que contenían el agua de beber más el antibiótico seleccionado (estreptomicina durante los primeros 15 días y ampicilina durante los 15 días restantes). En cambio, los

ratones de los tres subgrupos B se colocaron con sus madres en cajas cuyas botellas solamente contenían el agua de beber sin antibióticos. Tanto en las cajas que contenían los animales de los subgrupos A como en las de los subgrupos B, las madres se retiraron cuando los ratones tenían 21 días de edad.

2.2.3. ESTUDIO DE LA TRANSLOCALIZACIÓN BACTERIANA.

Una vez que los ratones cumplieron el mes de edad, se separaron nuevamente al azar, ahora en dos sub-subgrupos ("c" e "i"). Los ratones de los sub-subgrupos "c" se sacrificaron cinco días más tarde y se utilizaron para obtener, bajo condiciones de asepsia, el hígado, el bazo y los ganglios mesentéricos. Se cultivó un macerado de estos órganos durante 24 horas a 37°C en Caldo de Tripticosa Soya. Posteriormente se practicó una resiembra a tres medios de cultivo diferentes (gelosa-sangre, EMB y S110) y nuevamente los medios se incubaron durante 48 horas a 37°C.

2.2.4. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS

Los ratones restantes, que formaban parte de los seis sub-subgrupos "i", se utilizaron para estudiar la respuesta de anticuerpos contra un inmunógeno convencional. Con este fin, 3 a 5 días después de cumplir los 30 días de edad, todos se inmunizaron intraperitonealmente con una sola dosis de 0.1 ml de una suspensión de GRC al 15% en solución de Hank. Los ratones permanecieron en sus respectivas cajas 5 días más hasta el momento de su sacrificio para obtener el bazo y llevar a cabo una cuenta de células formadoras de anticuerpos anti-GRC, de acuerdo a la técnica descrita por Cunningham (67).

SUBGRUPO	INYECCION IP	ANTIBIÓTICO POR VIA ORAL	CULTIVO DE ÓRGANOS MACERADOS	INMUNIZACION CON GRC
I-A c	<u>S. aureus</u>	+	+	-
I-A i	<u>S. aureus</u>	+	-	+
I-B c	<u>S. aureus</u>	-	+	-
I-B i	<u>S. aureus</u>	-	-	+
II-A c	SSI	+	+	-
II-A i	SSI	+	-	+
II-B c	SSI	-	+	-
II-B i	SSI	-	-	+
III-A c	-	+	+	-
III-A i	-	+	-	+
III-B c	-	-	+	-
III-B i	-	-	-	+

TABLA I. Explicación de las condiciones experimentales a las que fueron sometidos los ratones de los 12 diferentes subgrupos.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESTAFILOCOCCOS.

Los Staphylococcus aureus se cosecharon y se lavaron tres veces con solución salina estéril, centrifugando a 2,500 rpm durante 30 minutos. La suspensión se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, la suspensión de bacterias se ajustó nefelométricamente a 5×10^9 células/ml y se repartió en alícuotas de 100 ml que se conservaron a 4°C en viales previamente esterilizados. En el momento de utilizar las suspensiones de bacterias muertas se realizaron varias pruebas de esterilidad mediante cultivos en medios de tioglicolato y Sabouraud.

2.3.2. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE ANTIBIOTICOS

La estreptomomicina se solubilizó en agua de la llave a una concentración de 1 gramo por litro y con esta solución se llenaron las botellas correspondientes a las jaulas de los subgrupos de ratones que iban a recibir un tratamiento con antibióticos por vía oral durante los primeros 15 días del experimento. La ampicilina se solubilizó en agua de la llave a una concentración de 500 mg por litro y se administró a los mismos subgrupos de ratones, durante los 15 días siguientes. Las dos soluciones se preparaban cada tercer día.

2.3.3. INDUCCIÓN DEL SÍNDROME DEL DESGASTE

Este estudio se realizó utilizando 213 ratones CDI recién nacidos. Desde el momento de su nacimiento, todos los animales

se separaron en tres grupos que, a su vez, se dividieron en dos subgrupos cada uno para completar un total de seis subgrupos.

Los 99 animales del grupo I se inyectaron intraperitonealmente con 0.1 ml de la suspensión de estafilococos muertos, que se ajustó previamente a 5×10^9 células/ml, en solución salina isotónica estéril. La primera dosis se administró dentro de las dos horas siguientes al nacimiento y las inyecciones siguientes se aplicaron cada tercer día (tres veces a la semana) durante cuatro semanas según procedimiento que Esktedt (19) había estandarizado para inducir la aparición del síndrome del desgaste.

Los 60 animales del grupo II se inyectaron intraperitonealmente con 0.1 ml de solución salina isotónica estéril. La primera dosis se administró dentro de las dos primeras horas siguientes al nacimiento y, posteriormente, la misma dosis se aplicó cada tercer día (tres veces a la semana) durante los 28 días siguientes.

También formaron parte del experimento 54 ratones CDI sanos del grupo III que no recibieron ninguna inyección intraperitoneal.

Los ratones de cada uno de estos tres grupos se separaron desde su nacimiento en dos subgrupos, A y B, según se añadieran o no antibióticos al agua de beber. De este modo, los 213 ratones quedaron separados de la siguiente forma en los seis subgrupos siguientes :

1. Subgrupo I-A : 65 ratones,
2. Subgrupo I-B : 34 ratones,
3. Subgrupo II-A : 30 ratones,
4. Subgrupo II-B : 30 ratones,
5. Subgrupo III-A : 27 ratones,
6. Subgrupo III-B : 27 ratones.

213 ratones

Como ya se explicó al describir el diseño del experimento, cuando los ratones de estos seis subgrupos tenían aproximadamente 28 días de edad y había terminado la serie de inyecciones intraperitoneales, se procedió a separarlos nuevamente en dos sub-subgrupos ("c" e "i") para estudiar las dos variables que se habían propuesto en el protocolo, tanto en los animales que habían presentado el síndrome del desgaste como en sus respectivos controles, tratados o no con antibióticos. Una parte de los animales utilizó para estudiar si el desgaste provocado por los estafilococos facilitaba o no la translocalización de bacterias Gram-negativas desde el intestino hacia los ganglios mesentéricos, bazo e hígado. La otra parte sirvió para evaluar la competencia del sistema inmunitario y confirmar que la enfermedad del desgaste, inducida experimentalmente, disminuía la capacidad de los ratones para producir anticuerpos anti-GRC.

2.3.4. CULTIVO DE LAS BACTERIAS TRANSLOCALIZADAS

Cinco días después de haber terminado las series de inyecciones intraperitoneales, los ratones de los seis sub-subgrupos "c" se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente, bajo condiciones de estricta esterilidad, se

abrió la cavidad abdominal y se procedió a la extracción de los ganglios mesentéricos, el bazo y el hígado.

Los órganos se pesaron y disgregaron con equipo estéril de disección. Una cantidad constante de tejido de cada órgano se depositó en Caldo de Trypticasa Soya el cual se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, cada cultivo se resebró en Gelosa Sangre, EMB y S110, utilizando el método de la placa vertida (68), por 48 horas a 37°C.

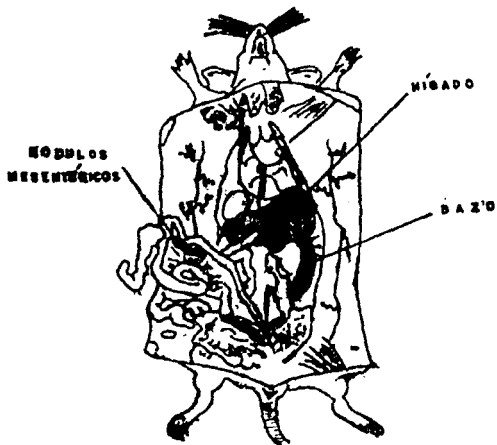


FIGURA 1. Dibujo que esquematiza la localización de los ganglios mesentéricos, el hígado y el bazo en la cavidad abdominal, abierta, de un ratón.

2.3.5. INMUNIZACIÓN Y RESPUESTA DE ANTICUERPOS

Cuatro o cinco días después de terminar las inyecciones intraperitoneales de estafilococos en los ratones a los que se provocó el desgaste y en sus respectivos controles que solo recibieron SSI o no fueron inyectados, se procedió a inmunizar a 91 animales de los sub-subgrupos "i" utilizando una sola dosis de 0.25 ml, aplicada intraperitonealmente, de una suspensión de GRC al 20% en solución de Hank. Cinco días después de la inmunización los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Inmediatamente se procedió a abrir la cavidad abdominal de cada animal para extraer el bazo y registrar su peso; el tejido esplénico se disgregó y las células libres se separaron, lavaron y contaron en una cámara de Neubauer utilizando un colorante supravital de azul tripano diluido al 1% en PBS.

La suspensión de linfocitos viables se ajustó a 1×10^7 /ml en solución de Hank. Según la modificación de Cunningham (67) a la técnica de Jerne (69), se mezclaron 200 μ l de la suspensión de células de bazo, más 100 μ l de una suspensión de GRC al 8% en solución de Hank, más 200 μ l de suero fresco de cobayo, diluido 1:10 en la misma solución, como fuente de complemento. Cada cámara se llenó con 200 μ l de la mezcla anterior, se selló con parafina fundida y finalmente se incubó a 37°C durante 30-45 minutos. La cuenta del número de halos de hemólisis se realizó por observación al microscopio y se expresó como el número de células formadoras de anticuerpos (CFA) por cada millón de células esplénicas viables

2.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

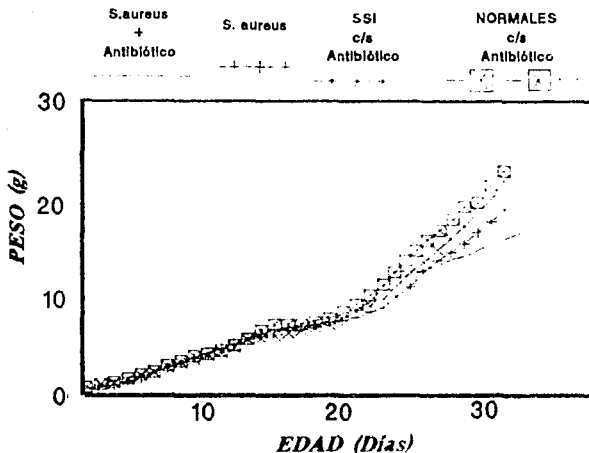
Como medida de tendencia central se utilizó la media aritmética y su correspondiente desviación estándar. Se utilizó una prueba de varianza para calcular el grado de significancia estadística de las diferencias encontradas entre los diferentes subgrupos experimentales. Los valores de P iguales o menores a 0.05 se consideraron significativos.

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS RATONES.

Los animales inyectados intraperitonealmente con la suspensión de Staphylococcus aureus muertos por calor, presentaron un considerable retardo en su crecimiento y, al final del experimento, habían perdido aproximadamente un 30% de su peso en relación a los ratones de los grupos control que solamente se inyectaron con SSI o no recibieron ningún tratamiento. La pérdida de peso fue mayor en los ratones desgastados cuya agua de beber contenía antibióticos. Como se puede observar en la Tabla 2 y en la Gráfica 1, esta reducción del peso corporal llegó a ser aproximadamente del 20% en relación al grupo de ratones que se habían desgastado en la forma convencional y que no recibieron antibióticos por vía oral. En ese subgrupo (I-A) de animales se observaron, además, las tasas de mortalidad más elevadas, lo cual se presenta en la Tabla 3. Para obtener este subgrupo de 22 animales fue necesario utilizar 65 ratones CDI, de los cuales murieron 43 durante el curso del experimento. Los animales muertos no se utilizaron para los estudios microbiológicos e inmunológicos. El peso de los ratones control no desgastados, que no se inyectaron y que, además, recibieron o no antibióticos con el agua de beber, resultó ligeramente superior al peso de los ratones control no desgastados que solo se inyectaron intraperitonealmente con SSI.

Además de la pérdida de peso, los ratones que presentaron el síndrome del desgaste inducido mediante las inyecciones intraperitoneales de estafilococos muertos, también mostraron la mayoría de los síntomas y signos de la enfermedad. En ellos fue evidente la debilidad muscular generalizada, el pelo ralo y erizado, la postura encorvada y el andar "de puntitas", así como la somnolencia, la irritabilidad y las diarreas frecuentes.



GRAFICA 1. Representación gráfica del progreso en peso promedio de los ratones incluidos en los diferentes grupos experimentales. Se puede apreciar que todos los ratones conservaron una tasa de desarrollo corporal similar hasta aproximadamente las tres semanas de edad. A partir de este momento, los ratones inyectados con estafilococos y que, además, bebían agua con antibióticos (-,-) mostraron un progreso en peso más lento que el de los ratones de los demás grupos. Se puede apreciar que los ratones simplemente desgastados, sin antibióticoterapia, (-,+) también presentan una tasa de crecimiento más lento que el de los controles. Los animales inyectados intraperitonealmente con SSI, que bebían agua con o sin antibióticos, mostraron unas tasas de crecimiento similar y por lo mismo se representan por una sola curva (-,-). Una situación similar se observó en el caso de los ratones sanos que recibían o no antibióticos con el agua de beber, de modo que también sus tasas de progreso en peso quedaron representadas por una sola línea (-o-).

. PESO PROMEDIO DE LOS RATONES EN LOS SEIS SUBGRUPOS

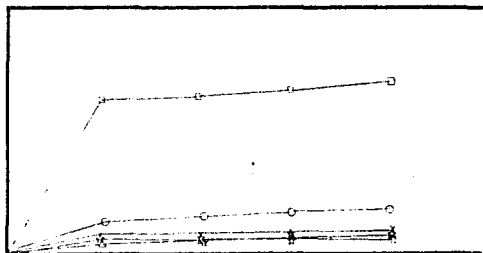
EDAD días	I-A	I-B	II-A	II-B	III-A	III-B
	gramos					
1	1.5	1.6	1.5	1.5	1.7	1.6
2	1.9	1.7	1.7	1.7	2.0	1.8
3	2.3	1.9	2.0	2.0	2.2	2.1
4	2.5	2.2	2.3	2.4	2.5	2.5
5	2.8	2.6	2.6	2.8	2.9	2.9
6	3.2	3.1	3.1	3.3	3.3	3.4
7	3.5	3.6	3.6	3.9	3.8	3.9
8	4.1	4.1	4.0	4.4	4.2	4.4
9	4.5	4.5	4.4	4.7	4.7	4.9
10	4.9	4.9	4.7	4.8	4.9	5.5
11	5.3	5.4	5.0	5.8	5.2	6.1
12	5.7	5.8	5.5	6.4	5.7	6.5
13	6.0	6.3	6.2	6.6	6.3	6.9
14	6.4	6.8	6.4	6.8	7.1	7.1
15	6.8	7.2	6.6	7.2	7.7	7.3
16	7.2	7.4	6.9	7.6	7.7	7.5
17	7.5	7.5	7.2	7.9	7.7	7.7
18	7.8	7.6	7.4	8.1	7.9	8.0
19	8.1	7.9	7.7	8.3	8.2	8.3
20	8.6	8.1	8.3	8.7	8.9	8.8
21	9.2	8.4	9.0	9.3	9.6	9.3
22	10.6	8.9	9.5	10.0	10.5	10.1
23	12.0	9.3	10.1	10.8	11.5	10.8
24	12.0	10.4	11.4	11.9	12.9	11.3
25	12.1	11.3	12.8	13.0	14.0	12.8
26	12.6	12.7	13.6	13.9	15.7	13.1
27	13.1	13.8	14.8	14.8	16.7	14.8
28	13.4	14.6	15.9	15.9	17.5	15.8
29	14.0	15.4	17.1	17.1	18.9	16.9
30	14.5	16.5	18.4	18.5	19.3	17.9
31	15.0	17.5	19.6	19.2	20.9	19.6
32	15.5	18.7	21.4	21.1	22.3	22.3

TABLA 2. Pesos promedio diarios de los ratones incluidos en los seis grupos experimentales. En los grupos I-A y I-B se encuentran los ratones inyectados intraperitonealmente con estafilococos, separados según si el agua de beber tuviera o no antibióticos. En los grupos II-A y II-B están los ratones que solo se inyectaron con SSI, separados también según tomaran o no los antibióticos. En los grupos III-A y III-B están los ratones que no se inyectaron, separados en la misma forma que los anteriores.

SUBGRUPO	SEMANA DEL EXPERIMENTO				TOTAL	TOTAL
	1	2	3	4	RATONES MUERTOS	RATONES UTILIZADOS
I-A	37	2	1	3	43 (66%)	65
I-B	9	2	1	-	12 (35%)	34
II-A	2	3	-	1	6 (20%)	30
II-B	4	2	-	-	6 (20%)	30
III-A	3	-	-	-	3 (11%)	27
III-B	3	2	-	-	5 (18%)	27
					75 (35%)	213

TABLA 3. Cantidades semanales y totales de ratones que murieron por complicaciones durante las cuatro primeras semanas del experimento. Se puede apreciar que murió el 35% de todos los animales utilizados. Sin embargo, esta tasa de mortalidad general resultó elevada a expensas de los ratones inyectados con estafilococos muertos, particularmente los del subgrupo I-A que recibieron simultáneamente antibióticos por vía oral. En este subgrupo murió el 66% de los animales.

MUERTE (No. de ratones)



□ Antibiótico ○ Normal (Antibiótico) △ Normal (Agua corriente) × Normal (Agua de beber) ☆ Antibiótico (Agua corriente) X Normal (Agua corriente)

Fig. 42

EDAD (Semanas)

GRAFICA 2. Tasas de mortalidad observadas en los ratones de los seis grupos experimentales, desde el comienzo de las inyecciones intraperitoneales hasta el momento del sacrificio. Se puede apreciar que la mortalidad registrada durante la primera semana de vida casi no se modificó en los 21 días restantes. Las tasas más elevadas corresponden a los animales desgastados que recibieron antibióticos con el agua de beber y, en un grado mucho menor, a los animales desgastados que bebieron agua corriente. Los grupos restantes presentaron una mortalidad similar.

3.2. CULTIVO DE BACTERIAS PRESENTES EN TEJIDOS.

Los cultivos de bacterias solamente resultaron positivos en las muestras de ganglios mesentéricos. Los cultivos de tejido hepático y esplénico fueron negativos sistemáticamente en todos los grupos de ratones estudiados.

Los ratones CDI que se inyectaron con estafilococos muertos y desarrollaron el síndrome del desgaste, tuvieron 8 cultivos positivos de 11 que se realizaron con los ganglios mesentéricos. Por el contrario, los ratones CDI desgastados que durante todo el experimento bebieron agua conteniendo antibióticos, solamente dieron positivo 1 de 13 cultivos de ganglios mesentéricos. Todos los cultivos se practicaron cinco días después de haber terminado el ciclo de las inyecciones intraperitoneales de estafilococos y la administración de antibióticos al agua de beber.

De todos los cultivos que fueron positivos en el Caldo de Tripticasa Soya, cuando se resembraron en Gelosa Sangre, EMB y 5110, las bacterias solamente crecieron en el primero de esos tres medios. Cuando se aplicó la tinción de Gram a las bacterias que solamente habían crecido en el medio Gelosa Sangre se pudo comprobar que todos ellos eran Gram-negativos.

En todos los ratones normales o inyectados exclusivamente con SSI por vía intraperitoneal no se pudo demostrar crecimiento bacteriano en ganglios mesentéricos, hígado ó bazo.

CULTIVOS DE BACTERIAS TRANSLOCALIZADAS

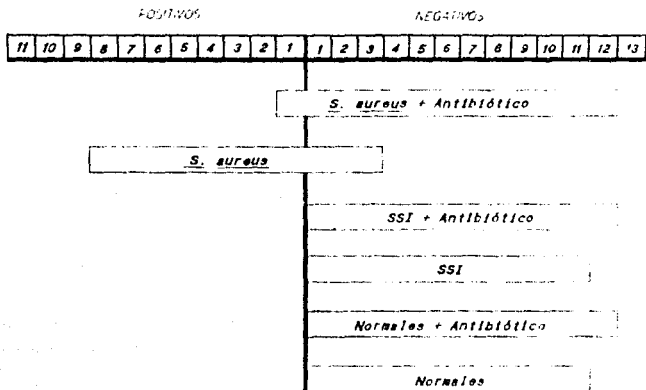


FIGURA 2. Representación de las cantidades de cultivos positivos y negativos cuando se estudiaron los ganglios linfáticos mesentéricos de los ratones incluidos en los seis grupos experimentales. Los cultivos se realizaron cinco días después de terminar el tratamiento con estafilococos y la administración de antibióticos con el agua de beber. Solamente fueron positivos algunos cultivos de ganglios mesentéricos de los animales desgastados.

3.3. RESPUESTA DE ANTICUERPOS

Los ratones CDI que se inyectaron con la suspensión de estafilococos muertos por calor disminuyeron significativamente su producción de anticuerpos anti-GRC. El mismo fenómeno se observó tanto en los ratones desgastados que recibieron antibióticos como en los ratones desgastados que solamente bebieron agua sin estreptomocina ni ampicilina. Los valores promedio encontrados en estos dos grupos (23.17 y 43.99 de Células formadoras de Anticuerpos (CFA)/10⁶) difieren significativamente ($p < 0.05$) de los valores que se obtuvieron al estudiar los grupos control que solo recibieron SSI intraperitoneal (347.46 y 459.76 CFA/10⁶) o que no se inyectaron (333.18 y 459.99 CFA/10⁶). Estos resultados se presentan numéricamente en la Tabla 4 y gráficamente en la Gráfica 3.

La administración de antibióticos en el agua de beber no permitió detener el deterioro inmunológico de los ratones desgastados por las inyecciones de estafilococos. Aunque los animales desgastados que recibieron antibióticos (subgrupo I-A) casi duplicaron las cuentas de CFA observadas en el otro grupo de ratones desgastados (I-B), de todos modos las diferencias entre ellos no fueron significativas a causa de la amplitud de las desviaciones estándar. Esta última observación probablemente está más en relación con la naturaleza abierta de la cepa CDI que con cualquier supuesto error en el manejo de los animales o en la cuenta de las placas hemolíticas.

Una observación parecida a la anterior puede hacerse en el caso de las cuentas de CFA encontradas en los ratones de los grupos control. Tanto en el caso de los animales control que se inyectaron con SSI como en el de los que no se inyectaron, el tratamiento con antibióticos provocó una elevación de las cuentas de placas hemolíticas, pero con desviaciones estándar demasiado elevadas que no permitieron demostrar diferencias significativas entre los grupos.

SUBGRUPO	TRATAMIENTO	N (*)	\bar{x}	DE
I-Ai	estafilococos + antibióticos	10	43.99	24.04
I-Bi	estafilococos	11	23.17	32.17
II-Ai	SSI + antibiótico	12	459.76	163.04
II-Bi	SSI	13	347.46	104.27
III-Ai	antibiótico	12	459.99	135.37
III-Bi (-)	Ningun Tratamiento	11	333.18	91.39

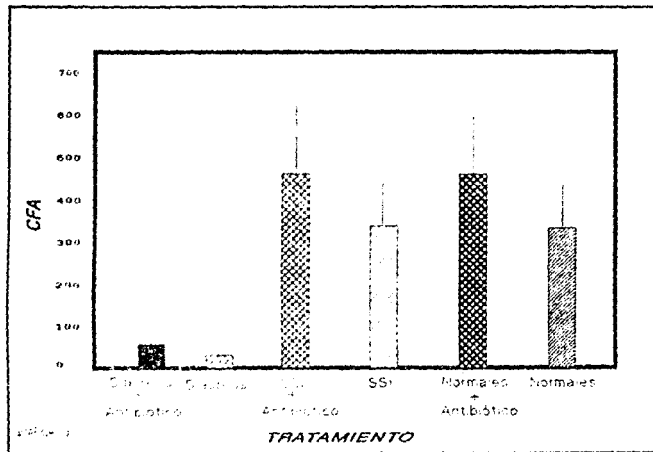
TABLA 4. Cantidades de CFA por cada millón de células esplénicas en los ratones de seis grupos sometidos a diferentes condiciones experimentales. El valor de N (*) corresponde al número de animales que sobrevivieron al final del experimento.

En los ratones inmunizados con GRC que se sacrificaron con el propósito de contar sus cantidades de linfocitos esplénicos formadores de placas hemolíticas, se procedió a pesar cada bazo antes de practicar la homogenización del tejido. Los resultados se presentan en la Tabla 5. Se puede observar que, en los

animales inyectados IP con la suspensión de estafilococos o con SSI, el tejido esplénico pesaba menos que en los ratones control normales que no se habían inoculado IP. Por el contrario, en los tres subgrupos de ratones que recibieron antibióticos por vía oral (I-A, II-A y III-A), los bazo tenían un peso superior al que se había encontrado en los ratones de los subgrupos correspondientes que no recibieron antibióticos. Sin embargo, de todos los ratones que bebieron el agua con antibióticos, los que tenían el bazo más pequeño fueron los que, simultáneamente, también habían recibido las inyecciones IP con estafilococos muertos.

SUBGRUPO	N	PESO DEL BAZO		
		\bar{x}	\pm	D.E.
I-A	11	0.22		0.04
I-B	10	0.18		0.04
II-A	9	0.27		0.09
II-B	11	0.16		0.04
III-A	11	0.27		0.07
III-B	11	0.24		0.06

TABLA 5. Peso del bazo en los animales de los seis subgrupos, en el momento de sacrificarse para contar sus cantidades de células formadoras de placas.



GRAFICA 3. Representación gráfica de las cantidades de CFA que se encontraron en los ratones CDI de los seis subgrupos experimentales. Las dos primeras barras corresponden a las cuentas obtenidas en los animales desgastados, con y sin antibióticos en el agua de beber. Las dos barras siguientes corresponden a las cuentas obtenidas con los animales control que se inyectaron IP con SSI. Las cantidades de CFA obtenidas en los ratones normales, con y sin antibióticos en el agua, se representan por las últimas dos barras.

CAPITULO 4. DISCUSION

Los adelantos científicos y tecnológicos de las últimas décadas han modificado radicalmente el panorama de las enfermedades infecciosas más comunes en la población humana. Este cambio se debe, en buena parte, a que se ha reducido considerablemente el riesgo de adquirir ciertas enfermedades infectocontagiosas de la infancia y, además, a que ha aumentado significativamente la frecuencia de individuos que tienen comprometida la competencia de sus principales mecanismos defensivos.

La eliminación de numerosas infecciones "clásicas" se debe a varios factores. El descubrimiento de las vacunas ha permitido controlar la patogenicidad de muchos microorganismos que eran responsables de antiguas epidemias con una mortalidad muy alta. La producción industrial de grandes cantidades de antibióticos ha modificado la evolución natural de otras enfermedades y ha reducido las complicaciones y las tasas de mortalidad de muchas más. El énfasis en el saneamiento ambiental, característico de las comunidades con los mayores recursos económicos, también ha sido útil para eliminar varias infecciones epidémicas que ahora solo se presentan esporádicamente en ciertas poblaciones. Hoy en día, las camas de los hospitales generalmente están ocupadas por

pacientes que tienen infecciones con una etiología y un pronóstico completamente diferentes a las del siglo pasado.

Todos estos cambios se han presentado en una forma paulatina. Sin embargo, si se toma en cuenta el tiempo durante el cual la humanidad ha combatido las infecciones, los cambios más importantes han ocurrido durante un lapso sumamente corto. Todos ellos han sido el resultado de numerosos descubrimientos bioquímicos y biomédicos que han aumentado nuestro conocimiento sobre las causas de las enfermedades infecciosas y sobre los mecanismos por los cuales los microorganismos lesionan los tejidos.

Al final del siglo pasado, Pfeiffer había observado que la administración de extractos de algunas bacterias provocaba una serie de efectos adversos en el cuerpo de los animales de laboratorio. Él mismo propuso el término de "endotoxinas" para referirse a las sustancias tóxicas que aparentemente estaban contenidas en el interior del citoplasma de esas bacterias. Sin embargo, no pasaron muchos años para que se pudiera afirmar que "endotoxina" era un término equivocado (70). Desafortunadamente, en ese momento ya la palabra había sido acuñada por el uso y no se pudo evitar que se quedara para siempre en la literatura microbiológica. En la actualidad se conoce que los productos bacterianos no son "tóxicos" en el estricto sentido de esta palabra. Los efectos que se observan después de la administración de endotoxinas los causan varios mediadores que liberan las células del hospedero. Por otra parte, las moléculas que se llamaron "endotoxinas" no tienen una localización

intracitoplasmática sino que se encuentran sobre la superficie de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y tienen diferentes efectos benéficos como los deletéreos.

En 1974, Lewis Thomas (71) escribió algunos comentarios que anunciaban la próxima introducción de nuevos conceptos respecto a los mecanismos responsables del cuadro clínico de las enfermedades infecciosas. "Todos los microorganismos nos pueden invadir, pero va a ser nuestra respuesta a su presencia lo que configura la enfermedad. Cuando nuestro organismo detecta los LPS de las bacterias Gram-negativas se activan todas nuestras defensas y comienza un bombardeo que destruye los tejidos sanos cercanos a ellas..... A veces nos matamos a nosotros mismos a causa de esa super-respuesta del sistema inmunológico a la que somos extremadamente vulnerables".

No transcurrió mucho tiempo desde que Pfeiffer propuso el término "endotoxinas", más adelante, Thomas opinó que estas sustancias no eran tan tóxicas como las liberadas por el sistema inmunitario. En este lapso se ha modificado substancialmente el ordenamiento etiológico de las infecciones más frecuentes. Se han descubierto nuevos microorganismos patógenos y otros han desaparecido o, simplemente, han sido erradicados (72). Algunas bacterias han desarrollado curiosos mecanismos de evasión y otras han adquirido resistencia a los antibióticos casi tan rápidamente como las investigaciones permiten la producción de nuevos agentes antimicrobianos. Pero lo más extraordinario ha sido que, en esta lucha por eliminar los microorganismos responsables de las principales infecciones, algunas bacterias comensales se han

vuelto oportunistas. Cada vez con mayor frecuencia, ahora éstas aparecen como las responsables de enfermedades que son tan graves y tan difíciles de curar como las causadas por los antiguos patógenos. Actualmente, las infecciones por Gram-negativos son complicaciones que representan un riesgo elevado durante el periodo postoperatorio de cierto tipo de pacientes (73), en el curso de la quimioterapia y durante las etapas terminales de las enfermedades malignas (74), en personas de edad avanzada (75), en niños gravemente desnutridos (76) y en pacientes con diferentes clases de inmunodeficiencias congénitas o adquiridas (77).

El estudio de los mecanismos a través de los cuales los microorganismos se pueden diseminar y ejercer su patogenicidad y, simultáneamente, el desarrollo de nuevas estrategias para prevenir o curar las infecciones, representan dos áreas del conocimiento científico que actualmente se encuentran en constante renovación. El presente trabajo sobre la "translocalización" de enterobacterias en animales "desgastados", es un buen ejemplo de esta situación. Los dos fenómenos que se estudian y se interrelacionan (translocalización y desgaste), no hubieran interesado ni preocupado a muchas personas hace 40 años. Hoy en día sucede todo lo contrario.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelaron que los animales inyectados intraperitonealmente con estafilococos muertos presentaron una translocalización de bacterias Gram-negativas hacia ganglios mesentéricos, un considerable retraso en su desarrollo pondoestatural y, además, una supresión de la capacidad para producir anticuerpos anti-eritrocitos de

carnero. Esta condición clínica e inmunológica de los animales que se desgastaron experimentalmente, se ha comparado con la de las las personas que tienen una desnutrición grave (24). Las similitudes y las diferencias entre la competencia inmunológica de los animales desgastados mediante inyecciones de estafilococos (22) y la de los animales que pierden peso solamente porque se alimentan con una dieta hipoproteica (78), también sehan comentado y discutido (23). Aunque los resultados del presente trabajo demuestran que la mayoría de los ratones desgastados presentan una translocalización de bacterias Gram-negativas desde el intestino hacia los ganglios, de todos modos esta observación no prueba que la diseminación de las enterobacterias es la causa del desgaste físico e inmunológico.

Los resultados también mostraron que los animales de experimentación que fueron sujetos del presente estudio tenían una tasa de mortalidad significativamente elevada, la cual no sehabía informado en los trabajos anteriores. Como la única variable nueva que se introdujo en el presente estudio fue la administración de antibióticos por vía oral, se pueda proponer que éstos fueron la causa del aumento en la mortalidad de los animales. El análisis de los resultados confirma esta proposición. Más del 65% de los ratones incluidos en el subgrupo I-A, que recibieron inyecciones intraperitoneales de estafilococos y antibióticos con el agua de la llave, murieron antes de que terminara el estudio. Sus órganos abdominales no se estudiaron porque este no era el objetivo del trabajo. Pero en el caso de los ratones desgastados de ese mismo grupo I-A que sí lograron sobrevivir hasta el final del experimento, los cultivos

de ganglios mesentéricos, hígado y bazo resultaron negativos. Este resultado no se pudo explicar satisfactoriamente cuando se consultó la literatura disponible sobre el tema.

En algunos trabajos previos, varios autores habían informado que la administración de antibióticos promovía la aparición de la translocalización bacteriana (12). Sin embargo, también existe bibliografía en donde los autores (21) manifiestan haber encontrado que el tratamiento con antibióticos tenía un efecto benéfico sobre los animales desgastados ya que, aparentemente, detenía la diseminación de bacterias Gram-negativas que se habían considerado el principal factor etiológico de la enfermedad (3, 4). Una revisión de toda esta información parece indicar que el uso de antibióticos sí detiene la translocalización bacteriana, pero que este efecto solamente se obtiene cuando se administran fármacos, como la neomicina, que no se absorbe y que ejercen su acción en una forma localizada (5). Generalmente, el empleo de antibióticos que se distribuyen en una forma sistémica tiene consecuencias negativas y aumenta las tasas de mortalidad. Es muy probable que este último efecto se haya desarrollado e incrementado en las últimas décadas a causa de la aparición de cepas de microorganismos resistentes que se multiplican exageradamente después de la administración del antibiótico para substituir la flora sensible que resulta eliminada (65). Se puede suponer que la resistencia a los fármacos era un fenómeno poco frecuente cuando Ekstedt (19) y Duhig (35) administraron oxitetraciclina a un grupo de ratones desgastados e informaron que este antibiótico tenía un efecto benéfico porque impedía la

aparición de las manifestaciones clásicas de la enfermedad.

A pesar de todas estas consideraciones, no tenemos todavía una explicación clara para la negatividad de los cultivos de ganglios mesentéricos en los ratones desgastados que recibieron estreptomycina y ampicilina por vía oral (subgrupo I-A). Como los animales de este subgrupo presentaron la mortalidad más alta y, sin embargo, solamente dieron positivos 1/13 de los cultivos, representan un problema de interpretación de los resultados. Para solucionar esta aparente incongruencia se proponen las siguientes explicaciones.

En primer lugar, se debe insistir en que las manifestaciones del desgaste que se presentan después de las inyecciones intraperitoneales de estafilococos, tienen una distribución de frecuencias normal, tal como ya había señalado Ekstedt (19). Esto quiere decir que aunque la mayoría de los animales tratados con estafilococos muestra las manifestaciones graves del desgaste, siempre existe otro pequeño grupo de ratones más resistentes que no pierden tanto peso y se recuperan más fácilmente. Es probable que la administración de antibióticos haya provocado la muerte de la mayoría de los ratones con el síndrome "clásico" del desgaste. Los ratones sobrevivientes podrían ser los más resistentes al tratamiento con estafilococos. De acuerdo a esta interpretación de los resultados, se puede proponer que el estudio de la translocalización bacteriana en los ratones sobrevivientes (34% del total), no proporcionó resultados comparables a la condición que debían tener los ratones muertos (66% del total). Como la translocalización bacteriana es un fenómeno multifactorial, es

posible que en los animales de este subgrupo I-A que murieron antes de terminar el experimento, hayan intervenido varias circunstancias añadidas que no fueron objeto de estudio. Probablemente facilitaron la diseminación de las bacterias o permitieron el desarrollo de otras complicaciones que no tuvieron relación con la translocalización de microorganismos. Entre estos otros factores no estudiados se puede mencionar la influencia que tiene el aumento de la concentración de glucocorticosteroides en la sangre circulante sobre la translocalización bacteriana (79). Otro aspecto que también debe mencionarse es la edad a la cual murieron la mayoría de los ratones del subgrupo I-A. La Figura 3 muestra que casi todos ellos fallecieron durante primera semana de vida, cuando todavía eran inmaduros desde un punto de vista inmunológico y cuando la leche materna era la única fuente de los líquidos y los antibióticos que ellos recibieron. El estudio de la madre como un factor crítico en el desarrollo del desgaste en el hijo lactante, es un capítulo sumamente importante que no se incluyó en los objetivos de la presente tesis pero que, sin embargo, también deberá investigarse más adelante.

Los ratones que formaron el material del presente trabajo se sacrificaron cinco días después de terminar la serie de inyecciones intraperitoneales de estafilococos y la administración de antibióticos con el agua de beber. Por esta razón no parece probable que la negatividad de la mayoría de los cultivos pudiera ser una consecuencia del contenido de antibióticos en los tejidos. La explicación que se propuso en el párrafo anterior puede ayudar a comprender porqué fueron negativos los cultivos, pero, sin

embargo, no contesta todas las preguntas que se pueden formular sobre los resultados. Así por ejemplo, llama la atención que los animales sobrevivientes del subgrupo I-A presentaran un deterioro inmunológico similar al de los ratones del subgrupo I-B y que entre sus cantidades de CFA no existieran diferencias significativas. Sin embargo, aunque desde un punto de vista teórico debían tener una inmunocompetencia superior a la de los animales muertos del subgrupo I-A, no por eso necesitarían formar una mayor cantidad de anticuerpos que los ratones control, también sobrevivientes, del subgrupo I-B. No obstante, como la positividad de los cultivos fue completamente diferente entre los ratones de los subgrupos I-A y I-B (1/13 vs 8/11), es probable que la medida de la respuesta de anticuerpos contra un solo antígeno sea un reflejo fiel del grado de competencia inmunológica global de los ratones de estos dos grupos.

Este intento por encontrar explicaciones para todos los resultados se puede terminar con un comentario general. El presente trabajo representa solamente uno entre varios experimentos realizados (y otros más que se llevarán a cabo más adelante) sobre la competencia inmunológica de ratones desgastados. Consiguientemente, los resultados de la presente tesis serán de utilidad en la medida que se integren con los obtenidos en otros experimentos. Las preguntas que no se pueden contestar también son útiles porque van a permitir diseñar nuevos experimentos. La falta de conocimientos para comprender todos los mecanismos responsables del desgaste constituye la mejor justificación del presente estudio.

Los trabajos publicados en los últimos años coinciden con Keast (5) en la utilidad de los antibióticos de acción local para controlar la diseminación de las enterobacterias y la incidencia de septicemias, tanto en pacientes como en animales de experimentación. La neomicina y la polimixina se han utilizado con relativa frecuencia. Klastersky (80) ha estudiado la incidencia de infecciones por Gram-negativos en pacientes con neutropenia y sus resultados revelan que los tratamientos con trimetoprim-sulfametoxazol han sido sumamente útiles para reducir la frecuencia de sepsis en estas inmunodeficiencias adquiridas. Así mismo, se han obtenido resultados efectivos después de administrar quinolonas por vía oral. Este último grupo de antibióticos es bien tolerado por los enfermos neutropénicos y resulta sumamente efectivo para controlar la translocalización de la mayoría de las cepas de la familia Enterobacteriaceae. Sin embargo, sus observaciones también indican que la reducción de la translocalización de bacterias Gram-negativas, mediante el uso de quinolonas, se acompaña de un aumento en la frecuencia de infecciones por bacterias Gram-positivas. De todos modos, el riesgo de mortalidad a causa de éstas últimas resulta significativamente inferior que el riesgo provocado por las primeras.

Cuando se utilizan antibióticos de amplio espectro y distribución sistémica, los resultados varían radicalmente. Así por ejemplo, Wells y colaboradores (65) han observado que Escherichia coli resistente a estreptomycinina se translocaliza fácilmente hacia los ganglios mesentéricos después de administrar

este antibiótico a un grupo de ratones sanos. Jones y colaboradores (81) han realizado experimentos con grupos de ratas a las cuales les provocan quemaduras en un 30% de la superficie corporal. Estos autores informan que el tratamiento con ampicilina por vía oral (50 mg por kilo de peso corporal) no modifica las tasas de translocalización bacteriana, pero sí disminuye el tiempo de sobrevivida después de las quemaduras de los animales, en relación a los grupos de ratas control que tienen lesiones similares y que no reciben antibióticos en forma profiláctica. De acuerdo a estos resultados, los autores mencionados consideran que, en el modelo experimental utilizado por ellos, las tasas de mortalidad son independientes de la extensión de la translocalización.

Los resultados obtenidos por estos dos grupos de investigadores, en animales a los cuales les administraron estreptomocina y ampicilina, respectivamente, pueden ser útiles en el momento de analizar la evolución que tuvieron los ratones desgastados utilizados en el presente trabajo, ya que ellos también recibieron esos dos antibióticos. Es probable que, si los ratones desgastados del subgrupo I-A hubieran recibido antibióticos de acción local, como la neomicina y la polimixina, no habrían presentado unas cifras de mortalidad tan elevadas como las que se obtuvieron después de añadir estreptomocina y ampicilina al agua de la llave. Probablemente la misma mejoría se habría obtenido después de administrar quinolonas. De todos modos, nosotros justificamos la administración de ampicilina y estreptomocina en los animales del presente estudio, porque hasta ahora no había una explicación clara para los resultados

favorables obtenidos por Ekstedt (19) y Duhig (35) cuando trataron los animales desgastados con antibióticos de amplio espectro.

Ahora, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por los autores que han estudiado el efecto desfavorable que tiene la administración de antibióticos de amplio espectro sobre el fenómeno de la translocalización bacteriana en personas o animales de laboratorio. Así por ejemplo, Deitch y colaboradores (82) han presentado resultados en favor de que el uso de antibióticos de acción local, administrados por vía oral, reduce significativamente las tasas de translocalización bacteriana y de mortalidad por sepsis, aún cuando los animales presenten lesiones en el intestino y tengan aumentada la permeabilidad de la mucosa después de un choque hemorrágico inducido con endotoxinas. Para ellos (82), la presencia de bacterias en el intestino es un factor más crítico que el aumento de la permeabilidad de la mucosa. Probablemente, hace ya varios años cuando se publicaron los primeros informes sobre la atenuación del desgaste mediante tratamientos con diferentes antibióticos (5, 19, 21), todos estos autores sí lograron obtener una reducción significativa de la flora de enterobacterias comensales. Sin embargo, actualmente algunos de los antibióticos que resultaron efectivos hace varios años ya no tienen la misma eficiencia sobre los microorganismos gram-negativos, a causa de la instalación progresiva de mecanismos de resistencia a múltiples fármacos.

Por otra parte, es importante volver a insistir en que la desnutrición puede influir sobre la intensidad del fenómeno de la diseminación de las bacterias desde el intestino hacia otros

tejidos. Los ratones utilizados en nuestro experimento presentaron una pérdida de peso notable después de recibir las inyecciones intraperitoneales de estafilococos. Consiguientemente, tenían un mayor grado de susceptibilidad y pudieron expresar la translocalización bacteriana más fácilmente que los ratones control, aunque todos ellos hubieran estado sometidos a la acción de los mismos factores inductores. Los ratones desgastados no solamente tienen aumentada la permeabilidad intestinal a causa de la mala nutrición, sino que además presentan un deterioro inmunológico que les impide efectuar una adecuada defensa específica contra las infecciones. En este sentido se pueden mencionar los trabajos de Specian y colaboradores (83). Estos autores han señalado recientemente que la desnutrición aumenta el riesgo de contraer infecciones intrahospitalarias por Gram-negativos. Los estudios que realizaron con ratones desnutridos que recibían una dieta hipoproteica durante varios días, revelan que el intestino de los animales presenta una atrofia en la región del íleo (83). En el trabajo se comenta que la desnutrición por sí sola no induce una translocalización bacteriana. Sin embargo, cuando esos mismos ratones se inyectaron con endotoxinas, entonces sí fue posible encontrar que los mal alimentados eran más susceptibles y presentaban translocalizaciones bacterianas más extensas que las de sus controles. Parece probable que, en los ratones desnutridos, la fagocitosis y la bacteriolisis lisosomal se llevaron a cabo en una forma menos eficiente. Por esta razón, los animales desnutridos tenían un riesgo mayor de presentar infecciones por bacterias Gram-negativas.

Cuando se han estudiado los efectos de los agentes inductores de la translocalización bacteriana, se han obtenido otros resultados que confirman la importancia de un buen estado de nutrición para limitar la diseminación de los microorganismos contenidos en el intestino. Deitch y colaboradores (84) han encontrado que la administración intraperitoneal de zymosan, a una dosis de 0.1 mg por gramo de peso corporal, puede inducir una translocalización bacteriana tanto en ratones desnutridos como en sus controles sanos y bien alimentados. Sin embargo, las bacterias solamente se diseminan hasta los ganglios linfáticos mesentéricos en los ratones bien nutridos, mientras que, en el grupo de animales desnutridos, se puede observar una translocalización de bacterias desde el intestino hasta el hígado, el bazo y la sangre periférica. La mortalidad de los ratones desnutridos también resultó muy elevada (80%), en relación al grupo de animales control, de los cuales no falleció ninguno después de la administración intraperitoneal del zymosan.

Los resultados obtenidos por Deitch (84) pueden ser tomados como evidencias en favor de nuestros puntos de vista. Creemos que el animal desgastado por las inyecciones de estafilococos muertos puede tener su inmunidad comprometida por dos factores que actúan simultáneamente. Uno de ellos serían las inoculaciones intraperitoneales de bacterias muertas. El otro, que a nuestro juicio no puede ser eliminado, sería el avanzado grado de desnutrición que tienen los animales al finalizar la parte inductiva del experimento. Los resultados obtenidos hasta ahora no permiten separar el daño inmunológico causado por uno y otro factor.

Como los ratones CDI incluidos en los subgrupos A perdieron aproximadamente el 20% de su peso corporal, debían tener las alteraciones características de la desnutrición. Probablemente también tenían aumentada la susceptibilidad a la translocalización de microorganismos, tal como lo refiere Specian (83). En el subgrupo I-B de ratones desgastados que no recibieron antibióticos, 8/11 cultivos de ganglios mesentéricos fueron positivos, mientras que en el subgrupo I-A de ratones desgastados que sí recibieron antibióticos solamente fueron positivos 1/13 cultivos de los mismos ganglios. Todas las bacterias aisladas fueron Gram-negativas. Todos los ratones se sacrificaron 5 días después de haber terminado la serie de inyecciones intraperitoneales con estafilococos muertos. De acuerdo a estos resultados, los animales desgastados mediante inyecciones intraperitoneales de estafilococos muertos parecen tener un índice de translocalización relativamente bajo y restringido a los ganglios linfáticos mesentéricos. En ellos, ninguno de los cultivos de tejido hepático y esplénico revelaron crecimiento bacteriano. Sin embargo, es posible que las bacterias Gram-negativas se hayan extendido mucho más (particularmente en el caso de los animales que murieron) y que su presencia en otros tejidos o en la sangre solamente hubiera podido demostrarse si se hubiera investigado más tempranamente. Nosotros sostenemos este punto de vista porque cuando los ratones se sacrificaron ya tenían cinco días de no recibir las inyecciones de estafilococos y ya comenzaban a presentar síntomas de recuperación.

De todos modos, conviene tener presente que la cepa CDI, sobre la cual se llevó a cabo el presente estudio, se ha considerado relativamente resistente al daño de la mucosa intestinal que es mediado, al menos en parte, por radicales libres de oxígeno y xantina-oxidasa generados en el curso de la inducción. Los resultados que presentan algunos autores (85) indican que los ratones CDI no tienen lesiones intestinales ni desarrollan una translocalización bacteriana después de recibir las mismas quemaduras que sí promueven la diseminación de enterobacterias en otras cepas como Balb/c y C57/bl. Hasta este momento no es posible valorar adecuadamente la posibilidad de que esta susceptibilidad genética tenga relación con la capacidad de los animales para sintetizar el péptido criptidina/defensina que se va acumulando después del período neonatal en las criptas del epitelio intestinal, hasta alcanzar concentraciones elevadas en los animales jóvenes y adultos (86). Las lesiones intestinales, inducidas por las endotoxinas (87) o la caquectina liberada por los macrófagos estimulados con endotoxinas (44) continúan siendo un mecanismo de escape de considerable importancia que, en algunos casos, explican rápidamente la diseminación de las enterobacterias contenidas en el intestino. Lo mismo puede decirse de las reacciones enzimáticas que están involucradas en el inicio de las lesiones. En este último sentido son interesantes las observaciones (87) sobre como, después de la administración de endotoxinas, se puede impedir la ruptura de la mucosa administrando inhibidores o inactivadores de la actividad de la xantina oxidasa. En cambio, el daño de la mucosa no se ha podido impedir con los antagonistas del factor activador de las plaquetas

(PAF) que se ha considerado responsable del daño intestinal inducido por la caquectina (44).

Existe una abundante literatura sobre las alteraciones inmunológicas de las personas y animales desnutridos (88). Desde hace años se ha mantenido el concepto de que el mayor número de infecciones del desnutrido y sus elevadas tasas de mortalidad, son una consecuencia de su incapacidad para controlar la invasividad de varios microorganismos (89). En el caso del síndrome desgastante que aparece como una consecuencia de las inyecciones intraperitoneales de estafilococos muertos, se ha propuesto que, además de la desnutrición, probablemente también las alteraciones del sistema inmunológico asociado al tubo digestivo pueden contribuir para facilitar la salida de enterobacterias desde el intestino y permitir su diseminación hacia los ganglios mesentéricos (24). En el presente trabajo solamente se realizó la medida de un parámetro de la respuesta inmunitaria de los animales desgastados. El estudio de la síntesis de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero confirmó las observaciones anteriores y mostró una depresión casi absoluta de las cantidades de células formadoras de placas hemolíticas. Es indudable que hace falta estudiar otros aspectos de la inmunidad, particularmente aquellos relacionados con el mantenimiento de una barrera para la gran cantidad de microorganismos comensales que tienen su habitat en el lumen del intestino. Pero ese no fue el objetivo de este trabajo.

Hasta ahora, la discusión de los resultados obtenidos se ha enfocado sobre la translocalización bacteriana. La hipótesis que se presentó en el protocolo de tesis sostuvo que los animales desgastados debían tener facilitada la diseminación de microorganismos Gram-negativos desde el intestino hacia los ganglios mesentéricos. Los resultados permitieron confirmar la hipótesis del trabajo. Al discutir los factores involucrados en este fenómeno, hasta ahora se han comentado tres variables experimentales: los animales desgastados recibieron antibióticos por vía oral, estaban desnutridos y, además, tenían deprimida su capacidad para formar anticuerpos. Sin embargo, existen varios factores más que seguramente también intervinieron en la translocalización de las enterobacterias. Aunque ninguno de ellos se estudió experimentalmente, de todos modos conviene mencionarlos brevemente, porque pueden ayudar a definir algunas perspectivas que podrían darle continuidad a la presente investigación.

En los últimos años se ha publicado una gran cantidad de trabajos que enfatizan la importancia de una serie de factores inespecíficos que son indispensables para mantener la integridad de la mucosa intestinal. Estos factores impiden la translocalización bacteriana. Aunque las infecciones por Gram-negativos representan un riesgo que complica la evolución de numerosas enfermedades, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el interés hacia los microorganismos oportunistas que, concretamente, infectan dos clases de pacientes. Una de ellas está compuesta por los enfermos con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La otra

clase lo representan los enfermos intervenidos quirúrgicamente que cursan un postoperatorio de alto riesgo. Los estudios realizados sobre estos últimos han revelado que la translocalización bacteriana puede modificarse por el contenido de la dieta y tales resultados han conducido a una serie de estudios que seguramente van a contribuir a reducir el riesgo de infecciones en las personas que adquieren cierto grado de desgaste físico e inmunológico como una consecuencia del estrés quirúrgico.

Barber y colaboradores (90) refieren que, después de la administración experimental de endotoxinas a un grupo de ratas, las lesiones intestinales y la consiguiente translocalización de enterobacterias se pueden reducir significativamente cuando la dieta habitual de los animales se suplementa con glutamina al 2% y fibra. Sin embargo, cuando este suplemento se añade a una dieta sintética especial, preparada en el laboratorio y sin glutamina ni fibra, se puede observar que, no obstante el suplemento dietético añadido, los animales presentan una sobremultiplicación de su flora bacteriana intestinal, una pérdida de la arquitectura de la mucosa yeyunal y una diseminación de microorganismos Gram-negativos desde el intestino hacia los ganglios mesentéricos.

Spaeth y colaboradores (91) han obtenido resultados similares añadiendo celulosa a la dieta de varios grupos de ratas alimentadas con fórmulas de laboratorio similares a las que se utilizan para mejorar la nutrición durante el postoperatorio. Otros trabajos experimentales (92) confirman la importancia del contenido en fibra y glutamina de la dieta porque disminuyen la translocalización de enterobacterias. Particularmente

interesantes han sido los resultados obtenidos al administrar la glutamina por vía parenteral (93). Los mismos beneficios se han obtenido al añadir glutamina a la dieta ingerida por animales (94) a los que se han inducido las lesiones intestinales y la translocalización bacteriana por radiaciones (1000 rad) abdominales (95).

En ausencia de resultados sobre el estado de la arquitectura de la mucosa intestinal en los animales desgastados, se puede inferir que probablemente ésta se encuentre alterada. La suposición anterior se puede apoyar en el conocimiento de que la desnutrición provoca una hipoplasia de la mucosa del íleo (83) y en la observación de que los animales desgastados tienen evacuaciones diarreicas frecuentes (19). Por consiguiente, el estudio de los mecanismos bioquímicos que mantienen la integridad de la mucosa intestinal y el desarrollo de estrategias terapéuticas que ayuden a preservarla, también representan líneas de investigación que complementan las investigaciones inmunológicas y bacteriológicas sobre la translocalización bacteriana. Desde el momento que este fenómeno resulta multifactorial, las expectativas para controlarlo y/o prevenirlo pueden estimular numerosos estudios multidisciplinarios. En este sentido, los resultados del presente trabajo pueden ser el punto de partida de varias investigaciones, sumamente interesantes, que ayudarían a contestar algunas de las preguntas a las cuales no se les pudo dar una respuesta, dados los resultados obtenidos en el presente trabajo.

CAPITULO 5. RESUMEN

En el presente trabajo, se estableció una posible relación entre el síndrome de desgaste provocado a un grupo de ratones CD_1 y la Translocalización Bacteriana que estos animales puedan presentar, así como probar un método profiláctico para la disminución de los efectos del síndrome.

Para tal objetivo a un grupo de ratones desgastados con inyecciones IP de S aureus, muertos, se les practicó cultivo de hígado, bazo y nódulos mesentéricos para provar la translocalización de enterobacterias. Para demostrar la inmunodeficiencia provocada por el desgaste se realizó la prueba de Cunningham para observar como se encontraba la respuesta de anticuerpos del animal en estudio.

Así mismo se incluyeron dos grupos de controles en los cuales uno recibió inyecciones IP de SSI y el otro no recibió ningún inóculo.

Después de realizar las diferentes pruebas, se encontró que los animales desgastados con estafilococos muertos por calor presentaron ocho cultivos positivos de bacterias Gram negativos de once que se practicaron, así mismo la evaluación de su respuesta de anticuerpos presentó cuentas muy bajas o casi nulas de CFA,

que por el contrario en los grupos controles fueron muy altas (460 CFA/ 1×10^6 linfocitos esplénicos), presentando en estos casos cultivos negativos.

El método profiláctico que se practicó fue la administración de antibióticos (ampicilina y estreptomina) a los tres grupos de ratones, observando que los antibióticos no disminuyeron el síndrome del desgaste sino por el contrario aumentaron la tasa de mortalidad de los animales, aunque los cultivos de los órganos de este grupo de animales, sólo presentó un cultivo positivo de los trece practicados, sin olvidar que éste fue de los animales que sobrevivieron y que no se les practicó cultivo de órganos. Con tal objetivo quedaría por estudiar si la translocalización bacteriana es una causa o una consecuencia del síndrome del desgaste.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. Cinco días después de finalizar la serie de inyecciones intraperitoneales con estafilococos muertos, la mayoría de los ratones desgastados tenían bacterias Gram-negativas en sus ganglios linfáticos mesentéricos. Este hallazgo se consideró sugestivo de que la translocalización de enterobacterias sí estuvo presente en los animales desgastados.

2. La administración de ampicilina y estreptomycinina con el agua de beber agravó las principales manifestaciones clínicas del desgaste y aumentó significativamente la tasa de mortalidad de los animales inyectados con estafilococos. Esta observación, se consideró sugestiva de que la administración oral de antibióticos de amplio espectro que se pueden absorber por el tubo digestivo no impidió la sobremultiplicación y la translocalización de una flora de bacterias Gram-negativas resistentes. La negatividad de los cultivos practicados en los animales sobrevivientes no descarta la posibilidad de que los ratones desgastados que murieron hayan tenido enterobacterias en sus ganglios mesentéricos y otros órganos de la cavidad abdominal.

3. Los resultados del presente trabajo no permiten aclarar si la translocalización bacteriana fue la causa o la consecuencia del desgaste físico e inmunológico de los animales estudiados. Queda por estudiar el estado de la mucosa intestinal del animal

desgastado para conocer si existen o no las lesiones necróticas que produce la caquectina y que podrían facilitar la translocalización de enterobacterias.

4. Los resultados obtenidos representan una evidencia más en favor de nuestra hipótesis que señala a los estafilococos inyectados y a las endotoxinas de las bacterias translocalizadas, como los principales estimulantes de la producción de caquectina por los macrófagos del animal desgastado. Se mantiene la proposición de que esta citocina es la responsable de las principales manifestaciones del desgaste físico e inmunológico. Hace falta ahora (1) demostrar si la adición in vitro de estafilococos muertos a un cultivo de macrófagos peritoneales, puede o no estimular la síntesis de caquectina, (2) cuantificar la producción de este mediador, (3) calcular si las cantidades liberadas al medio pueden o no corresponder a las que reproducen, in vivo, el cuadro clínico e inmunológico del desgaste y (4) encontrar los procedimientos más adecuados para atenuar la translocalización de enterobacterias y la muerte de los animales.

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA

- 1) MILLER, J.F.A.P.; HOWARD, J.G. :
Some similarities between neonatal thymectomy syndrome and GVH diseases.
J. Reticuloend. Soc., 1964, 1 : 369.
- 2) BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L.; MEDAWARD, B. :
Actively acquired tolerance of foreign cells.
Nature, 1953, 172 : 603.
- 3) PATERSON, P.Y. :
Discussion on mechanisms of tissue damage in runtina and homograft rejection. : Mechanisms of cell and tissue damage produced by immune reactions. Ed. Grabar, P. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers. Basilea, 1962, Pag. 241.
- 4) JUTILA, J.W. :
Etiology of the wasting diseases.
J. Infect. Dis., 1973, 128 (supl.) : s99.
- 5) KEAST, D.; WALTERS, M.N. :
The pathology of murine runtina and its modification by neomicyn sulphate gavages.
Immunology, 1968, 15 : 247.
- 6) WILSON, R.; SJODIN, K.; BEALMAR, M. :
The absence of wasting in thymectomized germfree (axenic) mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 117 : 237.
- 7) MANSHIP, L.; McMILLIN, R.D.; BROWN, J.J. :
The influence of sepsis and multisystem organ failure on mortality in the surgical intensive care unit.
Am. Surg., 1984, 50 : 94.
- 8) MAEJIMA, K.; DEITCH, E.A.; BERG, R. :
Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice.
Arch. Surg., 1984, 119 : 166.
- 9) DEITCH, E.A.; WINTERTON, J.; BERG, R.D. :
Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation.
Arch. Surg., 1987, 122 : 1019.

10. RUBIU, M.F.; AVILES, A.; GONZALEZ-LLAVEN, J. :
Utilidad de la vigilancia microbiológica en pacientes con leucemia aguda.
Rev. Méd. IMSS (Méx), 1988, 26 : 113.
11. BERG, R.D. :
Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents.
Curr. Microbiol., 1983, 8 : 285.
12. BERG, R.D. :
Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tract of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole.
Infect. Immun., 1980, 22 : 461.
13. NOSTI-PALACIOS, R.; OCAMPO-LUJANO, A.; GARCIA-TAMAYO, F. :
Aumento del contenido tisular de antígenos de enterobacterias en los tejidos de ratones inmunosuprimidos.
Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C., Oaxaca, México, noviembre 1988, Pag. 99.
14. GRACIA NÚÑEZ, R :
Actividad biológica del antígeno común de las enterobacterias en ratones recién nacidos.
Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Q.F.B., Facultad de Química, UNAM, México, marzo 1991.
15. ROLSTAD, B. :
The popliteal lymph node GVH reaction in the rat : a useful model for studying cell interactions in the immune response.
Immunol. Rev., 1985, 88 : 153.
16. GREBE, S.C.; STREILEIN, J.W. :
Graft versus host reactions : a review. : Advances in Immunology, ed. Dixon, F.J. y Kunkel, H.G. Academic Press, New York, 1976. Volumen 22, Pag. 119.
17. BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L. :
A simple method for inducing tolerance of skin homografts in mice.
Transplant. Bull., 1957, 4 : 67.
18. BILLINGHAM, R.E.; SILVERS, M. :
Graft versus host reactions. : The immunobiology of transplantation, ed. Grabar, P. y Miescher, P. Prentice Hall, Inc. New York, 1976. Pag. 149.
19. EKSTEDT, R.D.; HAYES, L.L. :
Runt disease induced by non-living bacterial antigens.
J. Immunol., 1967, 98 : 110.
20. EKSTEDT, R.D.; NISHIMURA, E.T. :
Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines.
J. Exp. Med., 1964, 120 : 795.

21. AZAR, H.A. :
Bacterial infection and wasting in neonatally thymectomized rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 116 : 817.
22. GARCIA-TAMAYO, F.; AGUILAR, A.E.; RIVERA, R.; DE LEÓN, S.; PASTELIN, R.; LASTRA, M.D. :
Consecuencias de la interacción de productos bacterianos con el sistema inmunológico de ratones recién nacidos.
Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx., 1990, 47 : 173.
23. GARCIA-TAMAYO, F., FIERRO, L.; LASTRA, M.D. :
Inducción y recuperación del desgaste inmunológico.
Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx., 1991, 48 : (en prensa).
24. GARCIA-TAMAYO, F.; AGUILAR, A.E.; GRACIA, R.; FIERRO, L.; LASTRA, M.D. :
La inmunodeficiencia experimental del animal desgastado y/o desnutrido.
Acta Ped. Méx., 1990, 11 : 239.
25. MORENO-TOVAR, J.M.; AGUILAR, A.E.; GARCIA-TAMAYO, F. :
Factores genéticos en la evolución de una deficiencia inmunológica causada por inyecciones de Staphylococcus aureus.
Memorias del XV Congreso Internacional de Infectología, Puerto Vallarta, México, noviembre de 1990, Pag.
26. SCHLESSINGER, M.; MARX, R. :
Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate.
Science, 1964, 143 : 965.
27. PIERPAOLI, W.; SORKIN, E. :
Hormones, trypan and lymphocyte functions.
Experientia, 1972, 28 : 1385.
- 28) BROOKE, H.S. :
Experimental runt disease in mice caused by Salmonella typhimurium var. Copenhagen.
J. Exp. Med., 1964, 120 : 375.
- 29) KIND, P.; CAMPBELL, P.; ROWLANDS, D.T. :
Endotoxin-induced wasting disease in mice : a temporary condition explained by endotoxin tolerance.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 125 : 495.
- 30) BEUTLER, B.; CERAMI, A. :
The biology of cachectin / TNF. A primary mediator of the host response.
Ann. Rev. Immunol., 1989, 7 : 625.
- 31) SCHEURICH, P.; THOMA, B.; UCER, U.; PFIZENMAIER, K. :
Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- α : induction of TNF receptors on human T cells and TNF- α -mediated enhancement of T cell responses.
J. Immunol., 1987, 138 : 1786.

- 32) KASHIWA, H.; WRIGHT, S.C.; BONAVIDA, B. :
Regulation of B cell maturation and differentiation. I. Suppression of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by tumor necrosis factor (TNF).
 J. Immunol., 1987, 138 : 1383.
- 33) BEUTLER, B.; CERAMI, A. : The history, properties, and biological effects of cachectin.
 Biochemistry, 1988, 27 : 7575.
- 34) CHESTERS, J.K.; WILL, M. :
Some factors controlling food intake by zinc-deficient rats.
 Brit. J. Nutr., 1973, 30 : 555.
- 35) DUHIG, J.T. :
Beneficial effect of oxytetracycline in cortisone-induced wasting disease.
 Nature, 1965, 207 : 651.
- 36) OWENS, W.E.; BERG, R.D. :
Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice.
 Infect. Immun., 1980, 27 : 461.
- 37) BERG, R.D.; GARLINGTON, A.W. :
Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model.
 Infect. Immun., 1979, 23 : 403.
- 38) WELLS, C.L.; MADDAUS, M.A.; SIMMONS, R.L. :
Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria.
 Arch. Surg., 1987, 122 : 48.
- 39) MADDAUS, M.A.; WELLS, C.L.; PLATT, J.L.; CONDIE, R.M.; SIMMONS, R.L. :
Effect of I cell modulation on the translocation of bacteria from gut and mesenteric lymph nodes.
 Ann. Surg., 1988, 207 : 387.
- 40) TANCREDE, C.H.; ANDREMONT, A.D. :
Bacterial translocation and gram negative bacteremia in patients with hematological malignancies.
 J. Infect. Dis., 1985, 152 : 99.
- 41) WELLS, C.L.; MADDAUS, M.A.; SIMMONS, R.L. :
Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria.
 Rev. Infect. Dis., 1988, 10 : 958.
- 42) ELSON, C.O.; REILLY, R.W.; ROSEMBERG, H. :
Small intestine injury in the GvHR : an innocent bystander phenomenon.
 Gastroenterology, 1977, 72 : 886.

43. NESTEL, F.P.; SEEMAYER, T.A.; LAPP, W.S. : *
Cachectin production during acute graft vs host reaction.
FASEB J., 1988, 2 : A448 (abstract).
44. SUNG, X.; HSUEH, W. :
Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor.
J. Clin. Invest., 1988, 81 : 1328.
45. PEKALA, P.H.; PRICE, S.R.; HORN, C.H.; HOM, B.E.; MOSS, J.; CERAMI, A. :
Model for cachectin in chronic disease : secretory products of endotoxin-stimulated macrophages induce a catabolic state in 3T3-L adipocytes.
Trans. Assoc. Amer. Physicians, 1984, 97 : 251.
46. THOMAS, I. :
Physiological and pathological alterations produced by endotoxins of gram negative bacteria.
Arch. Int. Med., 1958, 101 : 452.
47. MATHISON, J.C.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R.J. :
Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits.
J. Clin. Invest., 1988, 81 : 1925.
48. TRACEY, K.J.; FONG, Y.; HESSE, D.G.; MANOGUE, K.R.; LEE, A.T.; KUD, G.C.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. :
Anti-cachectin/TNE monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
Nature, 1987, 330 : 662.
49. ROWLANDS, D.T.; CLAMAN, H.N.; KIND, P.D. :
The effect of endotoxin on the thymus of young mice.
Amer. J. Pathol., 1965, 146 : 165.
50. ESSER, R.E.; SCHWAB, J.H.; EISEMBERG, R.A. :
Immunology of peptidoglycan-polysaccharide polymers from cell walls of group A Streptococci. : Immunology of the Bacterial Cell Envelope, ed. Stewart-Tull, D.E.S. y Davies. M. 1985. John Wiley & Sons Ltd., New York, Pag. 91.
51. KAWASAKI, A. :
Activation of human complement system by bacterial cell walls, their water-soluble enzymatic digests and related synthetic compounds.
J. Osaka Univ. Dent. Soc., 1982, 27 : 46.
52. SUGIMOTO, M.; GERMAIN, P.N.; CHEDID, L.; BENACERRAF, B. :
Enhancement of carrier-specific helper I cell function by the synthetic adjuvant, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP).
J. Immunol., 1978, 120 : 980.

53. TAKADA, H.; KOTANI, S. :
Immunopharmacological activities of synthetic Muramyl-peptides. : Immunology of the Bacterial Cell Envelope, ed. Stewart-Tull, D.E.S. y Davies, M. 1985. John Wiley & Sons Ltd., New York, Pag. 119.
54. RASANEN, L.; MUSTIKAMAKI, U.P.; ARVILOMMI, H. :
Polyclonal response of human lymphocytes to bacterial cell walls, peptidoglycans and teichoic acids.
 Immunology, 1982, 46 : 481.
55. SHIBASAKI, M.; NEMOTO, H.; SUZUKI, S.; KUROUME, T. :
Induction of lymphocyte colony formation in vitro by Protein A.
 J. Immunol., 1978, 121 : 2278.
56. KAPLAN, M.H.; TENENBAUM, M.J. :
Staphylococcus aureus : cellular biology and clinical application.
 Am. J. Med., 1982, 72 : 248.
57. VERHOEF, J.; VERBRUGH, H.A. :
Host determinants in Staphylococcal disease.
 Ann. Rev. Med., 1981, 32 : 107.
58. DEITCH, E.A.; BERG, R.D.; WINTERTON, J.; MALI, M.D. :
The gut as a portal of entry for bacteremia.
 Ann. Surg., 1986, 121 : 681.
59. VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS DE VRIES, J.M.; LEKKERKERK-VAN DER WEEK, J.E.C. :
Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria into the lymphatic organs in mice.
 J. Hyg., 1972, 70 : 335.
60. DEITCH, E.A.; WINTERTON, J.; BERG, R.D. :
Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract in mouse with impaired I cell-mediated immunity.
 Arch. Surg., 1986, 121 : 97.
61. BERG, R.D.; WOMMACK, E.; DEITCH, E.A. :
Immunosuppression and bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation.
 Arch. Surg., 1988, 123 : 1359.
62. PANTELOURIS, E.M. :
Absence of thymus in mouse mutant.
 Nature, 1968, 217 : 370.
63. DEITCH, E.A. :
Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man.
 Arch. Surg., 1989, 124 : 699.

64. JARRET, F.; DALI, L.; MOTLAN, J.A. :
Clinical experience with prophylactic antibiotic bowel suppression in burn patients.
Surgery, 1978, 83 : 523.
65. WELLS, C.L.; MADDAUS, M.A.; JECHOREK, R.P., SIMMONS, R.L. :
Ability of intestinal Escherichia coli to survive within mesenteric lymph nodes.
Infect. Immun., 1987, 55 : 2834.
66. WELLS, C.L.; ROTSTEIN, O.D.; PRUETT, T.L.; SIMMONS, R.L. :
Intestinal bacteria translocate into experimental intra-abdominal abscesses.
Arch. Surg., 1986, 121 : 102.
67. CUNNINGHAM, A.J.; SZENBERG, A. :
Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells.
Immunology, 1968, 14 : 599.
68. Pelczar, M. ; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R.:
Microbiology.Mcgrawhill, U.S.A.; Fifth edition, 1986, pag: 123-124.
69. JERNE, N.K.; NORDIN, A.A. :
Plaque formation in agar by single antibody-producing cells.
Science, 1963, 140 : 405.
70. STETSON, CH. A. :
Endotoxins and bacterial allergy. : Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states, ed. Sherwood Lawrence, H. 1959. Paul B. Hoeber, Inc. New York, Pag. 442.
71. THOMAS, L. :
Las vidas de la célula. Emecó Editores,S.A., Buenos Aires, 1976. Pag. 113.
72. PEREZ TAMAYO, R. : Enfermedades viejas y enfermedades nuevas.
Siglo Veintiuno Editores, México, 1985. Pag. 11.
73. SAADIA, R.; SCHEIN, M.; MAC FARLANE, C.; BOFFARD, K.D. :
Gut barrier function and the surgeon.
Brit. J. Surg., 1990, 77 : 487.
74. BODEY, G.P. :
Antibiotic prophylaxis in cancer patients : regimens of oral, nonabsorbable antibiotics for prevention of infection during induction of remission.
Rev. Infect. Dis., 1981, 3 (Supl.) : s259.
75. MYLOTTE, J.M.; McDERMOTT, C. :
Recurrent gram-negative bacteremia.
Amer. J. Med., 1988, 85 : 159.

76. BRADLEY, S.F.; KAUFFMAN, C.A. : Effect of protein malnutrition on Salmonellosis and Fever. Infect. Immun., 1980, 56 : 1000.
77. CHERRY, J.D.; FEIGIN, R.D. : Infection in the compromised host. : Immunological disorders in infants and children, ed. Stiehm, E.R. 1989. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Pag. 745.
78. GARCIA-TAMAYO, F.; KUMATE, J. : Nutrición e inmunidad. II. Síntesis de anticuerpos contra la albumina bovina en ratas con diferentes grados de desnutrición. En : Los Perfiles de la Biología en México, editado por Mora, J.; Estrada, S.; Martuscelli, J. UNAM, México, 1974, Pag. 475.
79. JONES, W.G.; MINEI, J.P.; RICHARDSON, R.P.; FAHEY, T.J.; CALVANO, S.E.; ANTONACCI, A.C.; SHIRES, G.T. : Pathophysiologic glucocorticoid elevations promote bacterial translocations after thermal injury. Infect. Immun., 1990, 58 : 3257.
80. KLASTERSKY, J. : Chemoprophylaxis of gram negative infections in neutropenic patients. Eur. Urol., 1990, 17 (supl. 1) : 40.
81. JONES, W.G.; BARDER, A.E.; MINEI, J.P.; FAHEY, T.J.; SHIRES, G.T. : Antibiotic prophylaxis diminishes bacterial translocation but not mortality in experimental burn wound sepsis. J. Trauma, 1990, 30 : 737.
82. DEITCH, E.A.; MORRISON, J.; BERG, R.; SPECIAN, R.D. : Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. Crit. Care Med., 1990, 18 : 529.
83. LI, M.; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D.; DEITCH, E.A. : Effects of protein malnutrition and endotoxin on the intestinal mucosal barrier to the translocation of indigenous flora in mice. J. Parent. Enteral Nutr., 1989, 13 : 572.
84. DEITCH, E.A.; MA, W.J.; MA, L.; BERG, R.D.; SPECIAN, R.D. Protein malnutrition predisposes to inflammatory-induced gut-origin septic states. Ann. Surg., 1990, 211 : 560.
85. MA, L.; MA, J.W.; DEITCH, E.A.; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D. : Genetic susceptibility to mucosal damage leads to bacterial translocation in a murine burn model. J. Trauma, 1989, 29 : 1245.

86. QUELLETTE, A.J.; GRECO, R.M.; JAMES, M.; FREDERICH, D.; NAFTILAN, J.; FALLON, J.T. :
Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium.
J. Cell. Biol., 1989, 108 : 1687.
87. DEITCH, E.A.; MA, L.; MA, W.J.; GRISHAM, M.B.; GRANGER, D.N.; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D. :
Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice.
J. Clin. Invest., 1989, 84 : 36.
88. SUSKIND, R.M. : Malnutrition and the immune response. Raven Press Publishers, New York, 1979.
89. GARCIA-TAMAYO, F. :
La inmunidad del niño desnutrido.
Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx., 1982, 39 : 697.
90. BARBER, A.E.; JONES, W.G.; MINEI, J.P.; FAHEY, T.J.; MOLDAWER, L.L.; RAYBURN, J.L.; FISCHER, E.; KEOGH, C.V.; SHIRES, G.T., LOWRY, S.F. :
Glutamine or fiber supplementation of a defined formula diets : impact on bacterial translocation, tissue composition, and response to endotoxin.
J. Parent. Enteral Nutr., 1990, 14 : 335.
91. SPAETH, G.; BERG, R.D.; SPECIAN, R.D.; DEITCH, E.A. :
Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut.
Surgery, 1990, 108 : 240.
92. ALVERDY, J.C.; ADYS, E.; MOSS, G.S. :
Effect of commercially available chemically defined liquid diets on the intestinal microflora and bacterial translocation from the gut.
J. Parent. Enteral Nutr., 1990, 14 : 1.
93. BURKE, D.J.; ALVERDY, J.C.; ADYS, E.; MOSS, G.S. :
Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function.
Arch. Surg., 1989, 124 : 1396.
94. SOUBA, W.W.; KLIMBERG, V.S.; HAUTAMAKI, R.D.; MENDENHALL, W.H.; BOVG, F.C.; HOWARD, P.J.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M. :
Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation.
J. Surg. Res., 1990, 48 : 1.
95. GUZMAN-STEIN, G.; BONSACK, M.; LIBERTY, J.; DELANEY, J.P. :
Abdominal radiation causes bacterial translocation.
J. Surg. Res., 1989, 46 : 104.