



11210  
8

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"**



**INMUNOESTIMULACIÓN EN  
GASTROYEYUNOANASTOMOSIS,  
UNA NUEVA OPCIÓN TERAPÉUTICA,  
ESTUDIO EXPERIMENTAL**

**TESIS DE POSTGRADO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD DE**

**CIRUJANO PEDIATRA**

**PRESENTA:**

**DR. JOSÉ ALBERTO CIBRIÁN CRUZ.**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO:  
DR JAIME A. ZALDIVAR CERVERA**

**ASESOR DE TESIS  
DR. HÉCTOR PÉREZ LORENZANA**

**MEXICO, D.F.**

**2002**

**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 esta 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.

# INMUNOESTIMULACION EN GASTROYEYUNOANASTOMOSIS, UNA NUEVA OPCION TERAPEUTICA, TRABAJO EXPERIMENTAL.

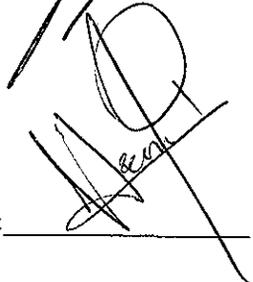
## PRESENTA:

DR JOSE ALBERTO CIBRIAN CRUZ  
MEDICO RESIDENTE DE CIRUGIA PEDIATRICA  
MATRICULA:10822623  
HOSPITAL GENERAL DR GAUDENCIO GONZALEZ GARZA  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

FIRMA: 

## TUTOR DEL TRABAJO:

DR HECTOR PEREZ LORENZANA  
MEDICO ADSCRITO CIRUJANO PEDIATRA  
MATRICULA: 10678093  
HOSPITAL GENERAL DR GAUDENCIO GONZALEZ GARZA  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

FIRMA: 

## PROFESOR TITULAR DEL CURSO:

DR. JAIME ANTONIO ZALDIVAR CERVERA  
CIRUJANO PED. Y PROFR. TITULAR DEL CURSO DE CIRUGIA PEDIATRICA.  
DIRECTOR DEL HOSPITAL GENERAL DR GAUDENCIO GONZALEZ GARZA  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

FIRMA: 

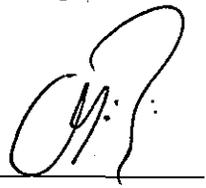
## JEFE DE EDUCACION E INVESTIGACION MEDICA

DR JOSE LUIS MATAMOROS TAPIA  
JEFE DE EDUCACION E INVESTIGACION MEDICA  
HOSPITAL GENERAL DR GAUDENCIO GONZALEZ GARZA  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

FIRMA: 

## JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGIA PEDIATRICA

DR. JOSE REFUGIO MORA FOL  
JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGIA PEDIATRICA  
HOSPITAL GENERAL DR GAUDENCIO GONZALEZ GARZA  
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

FIRMA: 

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DEDICACION:

- A Dios, por guiar mis pasos para lograr cada una de las metas que tengo trazadas en mi proyecto de vida y darme todo lo que ahora tengo y soy.

- A mis Padres Mario Cibrián Luna y Guadalupe Cruz Virgen, que siempre me han apoyado en todas mis decisiones, en mis triunfos y en mis fracasos, Dios los Bendiga por sembrar en mi la semilla de la superación.

- A mi Esposa Edna Zoraida Rojas C., gracias cielo, tenerte a mi lado es una bendición, has motivado desde tu llegada aún más, mi razón de ser cada día mejor, gracias amor.

- A mis hermanos Mario y Fabiola Gisela, por el gran cariño y admiración que les tengo, y porque gracias a su incondicional ayuda, alcanzo ahora este logro profesional, Dios los bendiga a ustedes, a sus parejas respectivamente Alejandra y Osvaldo y mis sobrinos Osvaldo Vitto y Mauricio Binech.

***- Muy especialmente a todos los niños y niñas que a lo largo de estos años de mi formación, me han permitido aprender de ellos todos los conocimientos que ahora poseo; MI AGRADECIMIENTO ETERNO.***

## AGRADECIMIENTOS:

- A mis maestros, compañeros residentes y a la Escuela Mexicana de Cirugía Pediátrica "La Raza", que sabiamente han hecho de mí, un Cirujano Pediatra íntegro, Capaz, Resolutivo, Humano y Comprometido con su Servicio y sus Pacientes, **LES ESTARÉ POR SIEMPRE AGRADECIDO.**

- Al Dr en C. Héctor Zepeda López, a M. En C. Ana Lilia Sandoval Sánchez, al Tesista de maestría en C. QBP Ronal Moreno González del Instituto Politécnico Nacional por todas los días y noches que trabajaron junto conmigo y por la asesoría microbiológica para la realización de este Trabajo experimental. **MIL GRACIAS.**

3-A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE:

RESUMEN	5
INTRODUCCION	6
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	15
DISCUSION	17
CONCLUSIONES	19
PERSPECTIVAS	20
ANEXOS	21
BIBLIOGRAFIA	32

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN:

**INTRODUCCION:** La colonización bacteriana del asa aferente es uno de los problemas que se presentan en gastroyeyunoanastomosis, se ha demostrado que la gastroyeyunoanastomosis de Roux en Y es la que menos colonización presenta, sin embargo este problema existe incluso en presencia de profilaxis antimicrobiana, jugando un papel muy importante para el pronóstico de sobrevida en los niños sometidos a portoenteroanastomosis o hepaticoyeyunoanastomosis debido a que la mas frecuente y temprana complicación es la colangitis ascendente, precisamente por traslocación bacteriana en el asa ascendida para el procedimiento de Kasai o en hepaticoyeyunoanastomosis entre otras entidades.

**MATERIAL Y METODOS:** En septiembre del 2002, se realizó un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo, con 40 ratas de la raza Wistar, de 250 a 300 gr de peso cada una, se formaron 4 grupos (A-B-C-D), todas sometidas a gastroyeyunoanastomosis de Roux en Y y exclusión duodenal; El grupo A no recibieron medicamento alguno, el grupo B recibieron trimetoprim sulfametoxazol, el grupo C un inmunoestimulante oral OM-89 y el grupo D recibió trimetoprim sulfametoxazol y OM-89; los grupos B-C-D recibieron el medicamento cada 24 hrs , 48 hrs antes de la cirugía vía oral, e inmediatamente después de la cirugía; durante el procedimiento quirúrgico a todas se les inoculó 100 UFC/ml de *Escherichia coli* enteropatógena E2348/69 (EPEC), en el duodeno (asa aferente); 24 hrs después en habitación con luz ultravioleta y bajo campana de flujo laminar fueron reintervenidas, se aspiró 1 ml de bilis, y se tomó 1 gr de tejido en los siguientes sitios: en sitio de inoculación, a 5, 10 y 20 cm de la unión gastroduodenal , y en el sitio de toma de 5 cm se tomó además biopsia de 1 gramo de duodeno para estudio histopatológico. Se realizaron cultivos en placas de agar Mac Conkey, la biopsia se incluyó en bloque de parafina, cortes con microtomo y tinción de hematoxilina eosina, se sembró la muestra en agar soya tripticaseina y se observó la presencia de aglutinación para detección de IgA secretora contra EPEC, realizándose también ensayos de adherencia a células HEp-2, así como ensayos de Inhibición de la adherencia a células HEp-2 para detectar la lesión en la pared intestinal de "Attaching and Effacing" con la técnica de FAS (Fluorescent-Actin Staining), mediante microscopía de luz y microscopía electrónica.

**RESULTADOS:** No se observaron complicaciones quirúrgicas en los cuatro grupos, en el grupo A incrementó de 100 UFC/ml hasta  $2.8 \times 10^7$ , grupo B de  $7.9 \times 10^5$  UFC/ml, grupo C disminuyó la cuenta bacteriana a  $8 \times 10^4$  UFC/ml y en el grupo D se observó una disminución notable a  $2 \times 10^2$  UFC/ml, el mayor daño histopatológico se observó en el grupo A y en menor grado en el grupo C, y con la técnica de FAS se observó que el mayor daño a la pared celular "Attaching and Effacing" se presentó en los grupos A y B; en el grupo C menor cantidad de bacterias adheridas y menor daño a la pared celular que en A-B-D, y en el grupo D se observó menor cantidad de UFC/ml y menor adherencia a la pared intestinal que los grupos A y B, pero mayor que el grupo C. La reacción a la aglutinación para detección de IgA fue negativa en los grupos A y B. Encontramos inhibición en la adherencia a células HEp-2 con la bilis de los grupos C y D.

**CONCLUSIONES:** En conclusión la utilización de la inmunoestimulación evitará la colonización del asa aferente de la gastroyeyunoanastomosis o de cualquiera de las variantes de la Y de Roux, al inhibir los mecanismos de adherencia y borramiento (attaching and effacing) ahora descritos. La colonización del asa aferente ocurre por el mecanismo microbiológico de attaching and effacing, en el cual no solo hay colonización, sino que además es destruido el enterocito.

## INTRODUCCION:

Se describen en la literatura diversas técnicas de derivaciones digestivas y biliodigestivas, siendo entre ellas la gastroyeyuno-anastomosis, consistiendo estas en una anastomosis entre el estómago y el yeyuno proximal, poco se ha escrito acerca de este tipo de cirugías en pacientes pediátricos, siendo descritas principalmente en lesiones a nivel del duodeno, causadas por trauma abdominal, así como en complicaciones asociadas al tratamiento quirúrgico de malformaciones congénitas duodenales (1,2)

Las gastroyeyunostomías mas frecuentemente utilizadas son la simple, la de Wolfler, la técnica de Braun y la Y de Roux (3), esta última es la mas frecuentemente utilizada en cirugía pediátrica sobre todo en procedimientos de derivaciones biliodigestivas y malformaciones congénitas duodenales como previamente ha sido mencionado.

En 1897, César Roux introdujo la técnica de anastomosis en Y, originalmente creada para evitar los vómitos sin respuesta a tratamiento que se presentaban después de la realización de alguna de las gastroenterostomías antes mencionadas; la anastomosis en Y de Roux puede ser utilizada en la reconstrucción de vías biliares, derivaciones pancreáticas y gastrointestinales en caso de lesiones obstructivas o ablativas; la mas frecuente complicación descrita después de una derivación en Y de Roux se caracteriza por dolor abdominal crónico, sensación de plenitud temprana, náusea, vómito principalmente postprandial inmediato, lo cual ha sugerido una obstrucción funcional a nivel del segmento de Roux en Y, produciendo los síntomas antes descritos en el 30 % de los casos, al actuar como una obstrucción funcional.(4,5,6)

Flores y cols. en un estudio experimental comparando tres técnicas de gastroyeyunoanastomosis demostraron que la Técnica de gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux , presenta menor morbilidad así como menor desarrollo bacteriano, , menor dilatación duodenal y menor daño a la mucosa duodenal, mencionándose en dicho estudio a *Escherichia coli* como la bacteria mas frecuentemente encontrada (7,8); no obstante, la colonización del asa aferente en la Y de Roux y sus variantes es un problema latente en todos los paciente sometidos a este tipo de procedimientos, ocurriendo esta colonización hasta ahora descrita como ascendente en forma arbitraria, sin estar establecido aún el mecanismo microbiológico por el cual ocurre esta colonización, justificándose el término de ascendente por la cercanía de las bacterias al sitio de derivación y por localizarse posteriormente en sitios mas proximales del asa aferente.

La Técnica en Y de Roux también se utiliza en pacientes con malformaciones biliares en la edad pediátrica, principalmente en atresia de vías biliares y quiste del colédoco, siendo la mas seria complicación la colangitis ascendente en el caso de la atresia de vías biliares, debida a reflujo de contenido intestinal del asa anastomosada al porta hepatis (asa aferente) con una incidencia del 50 al 100% (9,10), entre otros factores predisponentes para dar una explicación a lo anterior, se han descrito como situaciones diferentes la edad del paciente, estasis a nivel del asa aferente por cambios peristálticos que se presentan en el asa aferente después de realizada la derivación; hasta el momento en los últimos cincuenta años la preocupación por evitar la colonización del asa aferente ha promovido la creación de mecanismos de válvula antirreflujo en esta asa sin haberse

obtenido éxito en ninguno de estos procedimientos, así como tratamientos antimicrobianos profilácticos en igual forma sin obtener éxito.

La colangitis en el caso de las derivaciones biliodigestivas principalmente realizadas con la Técnica de Kasai que emplea una derivación en Y de Roux, es una infección del tracto biliar, generalmente ha sido asociada con obstrucción del conducto hepático biliar común; muchas de estas infecciones son causadas principalmente por bacterias entéricas tipo Gram negativo, siendo la principal *Escherichia coli*; esta infección puede presentarse desde una forma transitoria, a una sépsis letal, sin embargo los factores que condicionan la severidad son poco conocidos, de acuerdo a estudios bacteriológicos en pacientes postoperados de hepaticoyeyunoanastomosis y portoenteroanastomosis, manifestándose con fiebre, disminución del flujo biliar, incremento de las bilirrubinas séricas y en los casos de colangitis postoperatoria temprana dentro los primeros tres meses, es seguida de cese del flujo biliar y progresivo deterioro de la función hepática; se ha descrito a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) como la bacteria propia del menor de seis meses de edad, no existiendo en el tracto digestivo ninguno de los otros tipos de *Escherichia coli* antes de esta edad (11,12,13).

Estudios previos de experimentación han revelado que la administración inyección de cepas muertas de *E coli* a ratas en las placas de Péyer desencadenan una respuesta de liberación de Inmunoglobulina A biliar (14,15), sin embargo no se conoce la respuesta a la administración por vía oral de liofilizado de *Escherichia coli* en derivaciones en Y de Roux a nivel del asa aferente, sobre todo para prevenir la colonización de esta asa, tomando en cuenta en pediatría que prácticamente este tipo de derivaciones son mas frecuentemente realizadas de tipo biliodigestivas, dado que el trauma duodenal, úlceras del antro pilórico o patología oncológica gástrica son poco frecuentes a esta edad, por lo que tomando en cuenta la relevancia para el pediatra y el cirujano pediatra de evitar la colonización del asa aferente en pacientes sometidos a este tipo de procedimientos, es necesaria la creación de una nueva forma de prevención al haber fracasado hasta ahora todos los intentos quirúrgicos y farmacológicos ya comentados; por todo lo anterior, al no ser éticamente posible la observación de lo que ocurriría en el paciente porque se requeriría reintervenirlo quirúrgicamente para tomas de cultivos y biopsias a nivel del asa aferente, propusimos un modelo animal experimental creando un asa aferente mediante la exclusión del duodeno como se hace en las cirugías de trauma duodenal, asociándolo a gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux, quedando el duodeno excluido como asa aferente por ser el asa que solo transporta contenido biliar y pancreático como se describe el concepto de asa aferente en cirugía. Es importante mencionar que propusimos la gastroyeyunoanastomosis por ser técnicamente mas factible de realizar en modelo animal, sobre todo por la disposición anatómica biliar en las ratas y además porque el principal problema a resolver fué evitar la colonización del asa aferente y en específico por *Escherichia coli* enteropatógena por ser en los menores de seis meses de edad en los que mas derivaciones en Y de Roux realiza el cirujano pediatra y por ser en el 90 a 100% de las veces, la bacteria involucrada. En nuestro medio actualmente el antimicrobiano mas utilizado en forma profiláctica es el trimetoprim sulfametoxazol también sin lograrse una prevención satisfactoria por lo que en el modelo experimental propuesto, se comparó la respuesta a la inmunoestimulación, al antimicrobiano de elección en nuestro medio y la asociación de ambos, dejando un grupo mas sin estos medicamentos para tener un grupo control con lo que formamos un grupo control y tres experimentales (16).

El asa aferente correspondió al segmento entre el cierre del duodeno y la anastomosis, mientras que el asa eferente corresponde al yeyuno de la gastroyeyunoanastomosis (17).

La gastroyeyunoanastomosis es un procedimiento que frecuentemente se realiza en cirugía del tubo digestivo en adultos, principalmente en cirugías de trauma duodenal, estudios previos han observado mayor éxito con la técnica en Y de Roux, esta técnica se utiliza además en pediatría en portoenteroanastomosis en el caso de las atresias de vías biliares principalmente y hepáticoyeyunoanastomosis cuando se trata de quiste del colédoco, la primer patología mas frecuente; el mayor inconveniente que se presenta en todos estos procedimientos antes descritos es el síndrome de asa aferente y colonización bacteriana de la misma, principalmente causada por *Escherichia coli* enteropatógena conocida como EPEC que es propia del menor de 6 meses de edad, se han atribuido como las causas disminución de la peristalsis del asa aferente, respuesta inflamatoria al material de sutura en los sitios de anastomosis, y actuación de la Y de Roux como una obstrucción funcional, siendo la proliferación de *Escherichia coli* enteropatógena el principal problema causando en el caso de las derivaciones biliodigestivas colangitis por colonización de los colangioloos hepáticos y obstrucción al flujo de la bilis, empobreciendo el pronóstico de los pacientes a pesar de estar recibiendo estos tratamiento antimicrobiano preventivo con Trimetoprim sulfametoxazol principalmente. Por todo lo anterior, realizamos el presente estudio experimental con ratas de la raza Wistar, con una técnica de gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux y exclusión duodenal para crear las condiciones quirúrgicas mas cercanas a las dos principales patologías biliodigestivas mas frecuentes en la edad pediátrica.

OM 89 es un liofilizado inmunoestimulante el cual ha tenido uso en el tratamiento y prevención de infección de vías urinarias, básicamente se encuentra formado por extractos de *Escherichia coli* no específica para algún tipo de estas, su mecanismo de acción es inespecífico, estimulando el sistema inmunitario asociado a mucosas (SIAM) de los animales de experimentación y seres humanos (18), logrando una estimulación por igual en el sistema fagocítico mononuclear y el sistema mononuclear fagocítico; al aplicar un antígeno en una superficie de mucosa se han observado agentes mediadores de la inmunidad en sitios distantes al sitio de aplicación sin haber tenido contacto directo con el inmunoestimulante. En estudios de farmacocinética, las formas inmunogénicas del liofilizado se han detectado en sangre una hora después de la administración oral, la vida media es mayor de 24 hrs, encontrándose la marca de OM 89 ligada a isótopo carbono 14 en hígado, bazo y placas de Peyer (19). En estudios realizados en ratones la administración del liofilizado de *Escherichia coli* por vía oral o por vía parenteral induce la formación de anticuerpos séricos e IgA secretora en contra de los antígenos específicos de *Escherichia coli* (20,21). Tiene la propiedad de inducir la proliferación de linfocitos B de bazo de ratón en cultivo, así como de linfocitos de sangre periférica de humanos en cultivo, sin importar su especificidad, produciéndose en estos cultivos IgA (22)

Trimetoprim sulfametoxazol es antimicrobiano no sulfamídico, con fórmula molecular y estructural 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-diaminopirimidina, su acción

farmacológica con base a las diaminopirimidinas que son agentes antimicrobianos y antiprotozoarios que actúan por inhibición competitiva de la dihidrofolato reductasa, fundamental en las células con gran tasa de desarrollo. Las diaminopirimidinas usadas como antibacterianos muestran una gran selectividad y afinidad por las enzimas microbianas no afectando los sistemas enzimáticos de los animales superiores. Este mecanismo de acción, con interferencia en el metabolismo del ácido fólico en un paso distinto al que actúan las sulfonamidas, hace ideales a las diaminopirimidinas para su combinación con las primeras. No se usa sino en combinación con las sulfonamidas, esta combinación conocida como sulfas potenciadas, presentan un amplio espectro de actividad, comportándose como bactericidas, una excelente distribución tisular y buenas propiedades farmacocinéticas, espectro de acción contra *Actinomyces* spp., *Actinobacillus* spp., *Aeromonas* spp., *Bordetella* spp., *Brucella* spp., *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Fusiformis* spp., *Klebsiella* spp., *Lysteria Monocytogenes* spp., *Moraxella Bovis*, *Mycobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., (incluyendo cepas penicilasa +), *Streptococcus* spp., (incluyendo enterococos y diplococos), *Campylobacter* spp. (26, 27).

## OBJETIVOS:

1.1.-Evitar la colonización del asa aferente mediante inmunoestimulación por vía oral contra *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

1.2.-Realizar cuenta viable a nivel del sitio de inoculación que será en tercera porción del duodeno y a 5 cm de la unión duodenogástrica.

1.3.-Obtener en habitación con luz ultravioleta y bajo campana de flujo laminar muestras de tejido a nivel del asa aferente a 5, 10, y 20 cm de la unión duodenogástrica para evaluar la adherencia bacteriana al enterocito y el daño que sufre por el fenómeno de adherencia y borramiento, llamado "attaching and effacing" al ser afectados los enterocitos por *Escherichia coli* enteropatógena, realizando observaciones con microscopía de luz y electrónica con tinciones de hematoxilina-eosina y técnica de FAS (Fluorescent-Actin Staining).

1.4.- Realizar in vitro, ensayo de adherencia a células HEp-2 y ensayos de inhibición a la adherencia a células HEp-2.

1.5.- Realizar in vitro pruebas de aglutinación confrontando bilis obtenida del asa aferente con la Bacteria *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

## MATERIAL Y METODOS:

Se realizó un estudio experimental, comparativo, prospectivo; en el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional en la ciudad de México, D.F. y el Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital General, Centro Médico Nacional "La Raza", en el mes de septiembre del 2002. Siendo incluidas en el estudio 40 ratas de la raza Wistar, sanas, con peso de 250 a 300 gr, dividiéndose en 4 grupos de 10 ratas cada uno.

### Material biológico

Modelo Animal: Ratas Adultas Wistar de 0.25 a 0.3 Kg

Cepa Bacteriana: *Escherichia coli* enteropatógena E2348/69 cepa tipo de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Línea Celular HEP-2: Células epiteloma de faringe humano.

Inmunoestimulador OM89: Liofilizado de *Escherichia coli*.

Antibiótico: Trimetoprim Sulfametoxazol suspensión oral.

### Técnica Quirúrgica:

Con ayuno de 12 hrs y bajo anestesia general con midazolam a 1 mg/kg/dosis y Ketamina a 50 mg/kg/dosis intramuscular, se aplicó crema depiladora y se retiró el pelo del abdomen, asepsia con isodine espuma y antisepsia con isodine solución, se incidió en línea media 5cm aprox, abordando por planos hasta cavidad peritoneal, se identificó estómago, duodeno, ligamento de Treitz, se midieron 15 cm a partir del Treitz y se seccionó el yeyuno a través de una zona avascular, se midieron 30 cm de intestino, realizándose en este sitio la anastomosis en Y de Roux en un plano con prolene 6-0 corroborándose la permeabilidad de esta, en forma transmesocólica se subió el yeyuno proximal y se realizó gastroyeyunoanastomosis latero-lateral con prolene 6-0 con puntos de gambee, cerrando la boca terminal del intestino ascendido con prolene 6-0 invaginando la mucosa, se corroboró la permeabilidad y ausencia de fuga tanto en la gastroyeyunoanastomosis como en la Y de Roux, a continuación se realizó exclusión duodenal a nivel de unión gastroduodenal con puntos simples con prolene 6-0; se cerró el defecto del mesocolon (figura No. 1); se realizó la inoculación bacteriana a nivel de la 2ª porción del duodeno (figura No. 2); se cerró el peritoneo con daxon 5-0, cierre de aponeurosis con daxon 3-0 puntos simples y cierre de piel con dermalón 5-0, se administró analgésico metamizol intramuscular a 10mg/kg/dosis al término de la cirugía; se mantuvieron en ayuno 12 hrs iniciándoles la vía oral posteriormente con solución glucosada al 5%; a los 3 grupos que recibieron medicamento se les administró este directo al estómago mediante sonda de alimentación de 5 fr cada 24 hrs, iniciando 48 hrs antes de la cirugía y una dosis mas posterior a la cirugía e inoculación de la bacteria; todas las ratas fueron nuevamente anestesiadas al día siguiente de la cirugía e inoculación de la bacteria en sala con luz ultravioleta y campana de flujo laminar, tomando primero una muestra del hilio hepático para cultivo, 1 ml de bilis a nivel de la tercera porción del duodeno mediante aspiración con jeringa y aguja para detección de Inmunoglobulina A secretora específica para *Escherichia coli* enteropatógena; se tomó biopsia a nivel de duodeno 1 gr en el sitio de inoculación bacteriana y a 5 cm de unión duodenogástrica para cuenta viable de bacterias, y

tres mas a 5, 10 y 20 cm 1 gr de cada una para evaluar la adherencia bacteriana y daño al enterocito (attaching and effacing). Posteriormente se sacrificaron las ratas con administración de Tiopental a dosis letales por vía intracardiaca.

Los grupos se dividieron de la siguiente manera:

El grupo A, no recibió medicamento alguno, solo fueron sometidas a la cirugía e inoculación bacteriana, el grupo B recibió 48 hrs antes de la cirugía Trimetoprim-sulfametoxazol cada 24 hrs por vía oral a dosis de 5 mg/kg/dosis mediante sonda orogástrica de alimentación 5 fr, previo ayuno de 12 hrs, se le realizó gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux y exclusión duodenal con la técnica antes descrita, inoculación de bacterias y una dosis mas del mismo medicamento al término de la cirugía; el grupo C recibió 48 hrs antes de la cirugía cada 24 hrs 6 mg de OM-89 mediante sonda orogástrica de 5 fr, se le realizó el procedimiento quirúrgico y se le inocularon las bacterias en la forma descrita, se le administró al término de la cirugía 6 mg de OM-89 mediante sonda orogástrica de 5 fr, al día siguiente se les tomaron las muestras descritas y luego fueron sacrificadas; el grupo D recibió 48 hrs antes de la cirugía ambos medicamentos trimetoprim – sulfametoxazol a dosis de 5 mg/kg dosis cada 24 hrs y OM-89 6 mg cada 24 hrs de igual forma mediante sonda orogástrica 5 fr, posteriormente fueron sometidas a la cirugía mencionada e inoculación de bacterias de igual forma que los otros grupos, una dosis mas de ambos medicamentos posterior a la cirugía les fueron administrados y se les sacrificó al día siguiente previa toma de muestras.

### **Cultivo Bacteriano**

Se inoculó la cepa de EPEC E2348/69 en caldo soya tripticaseína y se incubó a 37° C durante 18 a 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación el cultivo se ajustó a 100 UFC/ml y se inoculó 1ml en el asa aferente de la gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux, realizada en las ratas, a nivel de la tercera porción del duodeno.

### **Cuenta viable**

Se extrajo un segmento de 1g de intestino en el sitio de inoculación y a 5 cm. de la unión duodeno gástrica y se colocó en un tubo que contenía 9 ml de agua destilada esto con la finalidad de realizar una dilución 1:10, se agitó en vortex vigorosamente. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta obtener diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$ . De cada dilución se tomaron 100  $\mu$ l y se sembraron por espatulado en placas de agar Mac Conkey que fueron incubadas a 37° C durante 24 horas. Este ensayo de cuenta viable se realizó por duplicado. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a contar el número de colonias con la morfología característica de *Escherichia coli*. Se procedió a registrar los resultados obtenidos y se ordenaron según las variantes del estudio y se analizaron los resultados.

### **Procesamiento de órganos**

El procesamiento de los órganos obtenidos constó de varios pasos:

Fijación: los órganos se colocaron inmediatamente en una solución fijadora de formol al 10% por un tiempo de 72 horas. Al cabo de este tiempo los tejidos se enjuagaron con agua corriente durante 25 minutos aproximadamente, para quitar el exceso de formol.

Deshidratación y transparentación: la deshidratación consistió en colocar las piezas

histológicas en diferentes concentraciones de alcohol etílico de acuerdo con el siguiente esquema: alcohol 50° por 30 min, alcohol 70° I por 30 min, alcohol 70° II por 30 min, alcohol 80° I por 30 min, alcohol 96° I por 30 min, alcohol 96° II por 30 min, alcohol 96° III por 30 min, alcohol absoluto I por 30 min, alcohol absoluto II por 30 min, alcohol absoluto III por 30 min, absoluto-tolueno (v/v) por 30 min. Después de este paso se continuó con el proceso de transparentación empleando tolueno y el tiempo de exposición del tejido a ese solvente dependió directamente del tejido mismo, el esquema que se sigue es el siguiente: Tolueno, tolueno-parafina a 55°C de 5 a 15 minutos, parafina 51-53°C por 60 min, parafina de inclusión (57°- 60° C) por 60 min. Inclusión definitiva: Se realizaron los bloques de parafina en donde; el tejido se incluyó en la última parafina en moldes. Los bloques se dejaron enfriar para hacer los cortes en el microtomo. Corte: el bloque de parafina se colocó sobre la platina del microtomo y se ajustó a 5 micras. La película de parafina que salió se colocó en un baño de flotación con gelatina que se mantuvo a 60°C y se colectaron en portaobjetos debidamente rotulados. Después se colocaron en la estufa con el fin de desparafinar la muestra y adherirla al portaobjetos para proseguir con la técnica de tinción de hematoxilina-eosina. Desparafinación e hidratación: consistió en colocar el tejido en xilol por 10 min, luego en una solución de alcohol absoluto-xilol durante 5 minutos. Posteriormente en diferentes concentraciones de alcohol como alcohol absoluto por 3 min, alcohol de 96° 3 min y alcohol de 70° 3 min y finalmente las muestras se colocaron en agua destilada 5 minutos. Tinción hematoxilina-eosina: consistió en la coloración del tejido con hematoxilina durante 15 min, se lavó con agua de la llave hasta eliminar el exceso del colorante; se diferencia en alcohol ácido, se lavó con agua de la llave nuevamente; se viró en agua amoniacal y se lavó en agua destilada. En ese momento se procedió a teñir con eosina durante 30 segundos, luego se eliminó el exceso de colorante lavando la muestra con alcohol de 96°, se inició el proceso de deshidratación mediante la introducción de las muestras en alcohol absoluto 3 min, absoluto-xilol por 5 min y xilol 10 min y finalmente las preparaciones se montaron en resina sintética para su observación al microscopio.

### **Reacción de aglutinación**

La cepa de *Escherichia coli* E2348/69 se sembró en agar soya tripticaseína por estría abierta y se incubó a 37° C durante 24 horas, una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar una suspensión bacteriana con solución salina isotónica (0.85%). Posteriormente en un portaobjetos se colocaron 500µl de esta suspensión y 500µl de bilis de las ratas en estudio se mezclaron y se observó si se llevó a cabo un reacción de aglutinación. Como testigo negativo se colocarán 500 µl de solución salina y 500 µl de bilis.

### **Preparación de Cultivo Celular**

En este trabajo se utilizó línea celular HEp-2 (células de Epitelioma de Faringe Humana) que creció con Mínimo Esencial de Eagle (MEM), suplementando con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, bicarbonato de sodio al 4.4%, una solución de penicilina-estreptomicina (PES) a una concentración de 100 U y 100 microgramos por mililitro respectivamente.

Las células fueron propagadas en botellas de plástico de 25 cm<sup>2</sup> con el medio MEM y fueron incubadas a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, hasta que se obtuvo una confluencia del 100%.

Una vez obtenida la monocapa de células en las botellas, se procedió a lavarlas con una solución de verseno al 0.5% después de retirar dicha solución se le agregó 1ml de tripsina al 0.025 % con la finalidad de desprender las células de la botella, una vez desprendidas las células fueron resuspendidas en MEM según fuera el caso. A continuación se colocaron 500 microlitros de dicha suspensión en cada uno de los pozos de una microplaca de 24 pozos que contenía un cubreobjetos redondo estéril de 13mm de diámetro, enseguida se incubó a 37° C con una tensión de CO<sub>2</sub> del 5% hasta alcanzar una confluencia del 70 al 90%.

### **Ensayos de adherencia a células HEp-2**

Una vez que se obtuvo la confluencia antes especificada se retiró el medio y se colocó MEM-SFB y 100 microlitros de D-manosa al 1% en PBS, por último se adicionó una gota del cultivo de bacterias (Cravioto et al. 1979 y Zepeda et al. 1995)(23,24). Las microplacas se incubaron a 37° C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 ó 6 horas, dependiendo del ensayo. Al término de este tiempo se desechó el medio de cultivo de cada pozo, se lavó tres veces con PBSIX y se adicionó una gota de metanol absoluto frío para fijar las bacterias a la preparación. La tinción de las laminillas se realizó con Giemsa y se montaron en portaobjetos sobre resina sintética. Como testigos negativos se utilizaron: 1) laminillas de células sin inocular, 2) laminillas de células con cepas no adherentes (NA), *Escherichia coli* K12C600.

### **Ensayos de Inhibición de la adherencia a células HEp-2**

Se realizó el ensayo de adherencia como se describió anteriormente, sin embargo antes de colocar a la bacteria se colocó bilis y después se siguió el ensayo como se indicó previamente, esto con la finalidad de saber si en la bilis existía IgA secretora que pudiera inhibir la adherencia de las bacterias.

### **Detección de la lesión de "Attaching and Effacing" con la técnica de FAS (Fluorescent-Actin Staining)**

Se realizó la técnica de FAS descrita por Knutton y col. en la cual los segmentos de intestino extraídos a 5, 10 y 20 cm y las laminillas del cultivo celular se fijaron en formaldehído al 3% durante 20 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 5 minutos. Al término de este tiempo se lavaron tres veces con PBS y se procedió a teñir con un conjugado de falotoxina-FITC por 20 minutos. Las preparaciones se lavaron tres veces con PBS y por último se adicionó PBS-glicerol como conservador. Las preparaciones se observaron con luz ultravioleta en un microscopio de epifluorescencia en los aumentos 40X y 100X (Knutton et. al. 1989) (25) y microscopía electrónica a 10,000, 25,000 y 35,000 X.

## RESULTADOS:

Los cuatro grupos de ratas sobrevivieron a la cirugía y a la inoculación bacteriana, no presentándose dehiscencia de las anastomosis gastroyeyunales ni en la Y de Roux. Se observaron las asas con buena coloración y permeabilidad presente. Como ha sido descrito por Flores y cols. Se observó dilatación leve del asa aferente en este caso del duodeno excluido, lo cual facilita la translocación bacteriana en la evolución natural de los pacientes sometidos a este procedimiento.

Al realizar la cuenta viable promedio se obtuvieron los siguientes resultados: en el grupo A obtuvo la mayor cantidad de UFC/ml ya que se observó un incremento de 100 UFC/ml hasta  $2.8 \times 10^7$ , en el grupo B se encontró desarrollo bacteriano de  $7.9 \times 10^5$  UFC/ml, en el grupo C disminuyó la cuenta bacteriana a  $8 \times 10^4$  UFC/ml y en el grupo D se observó una disminución notable del desarrollo bacteriano a sólo  $2 \times 10^2$  UFC/ml, en todos los casos se corroboró que las colonias correspondieran a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Ver la gráfica No. 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cortes histológicos se observó en el grupo A una mayor colonización y daño a las células epiteliales del intestino en comparación con los demás grupos. Sin embargo en el grupo D encontramos una menor colonización bacteriana y menor daño en las células epiteliales. Ver la gráfica No. 2.

La prueba de FAS reveló que tanto en el grupo A como en el grupo B se observó mayor número de bacterias adheridas provocando daño a la célula epitelial (Attaching and Effacing (A/E)). Mientras que en el grupo C se observó una disminución considerable de fluorescencia lo que nos indica que hay menos bacterias adheridas. En el caso del grupo D la adherencia bacteriana fue menor a la encontrada en los grupos A y B pero mayor a la encontrada en el grupo C, aunque prácticamente se encontró ausente la adherencia y borramiento en estos grupos C y D. Gráfica No. 2.

Los resultados obtenidos en las aglutinaciones al retar el líquido biliar de los diferentes grupos contra la bacteria fueron los siguientes: grupo A y B fueron negativas mientras que en los grupos C y D se encontró una aglutinación franca. Gráfica No. 3 y (Figuras 3 y 4).

En los ensayos de inhibición de la adherencia a células HEp-2 encontramos una inhibición en la adherencia con la bilis de los grupos C y D. En la adherencia que presentan los grupos A y B se realizó además la prueba de FAS encontrándose positivo. (Figuras 5 y 6).

Finalmente, los cortes del asa aferente nos muestran a la bacteria adherida al enterocito (Figuras 7 y 8) y el daño que esta bacteria provoca en el epitelio intestinal se muestra en la Figura 9 y 10, al demostrarnos la gran cantidad de actina F polimerizada a lo largo de todo el epitelio intestinal así como en el cultivo celular (figuras 11 y 12).

El análisis estadístico corroboró las observaciones antes comentadas, el análisis de varianza múltiple ANOVA, respecto al sexo en los diferentes grupos se obtuvo una  $F=0.72$  y  $P$  de una cola de  $0.50$  ( $P=0.50$ ) siendo no significativa esta variable para los resultados del estudio. En cuanto al peso reveló una  $F=0.77$  obteniéndose  $P$  de una cola con valor de  $0.51$  ( $P=0.51$ ) N.S. (no significativo), observándose que el peso no fue significativo para modificar los resultados del estudio;

La colonización en el sitio de inoculación al ser analizada por análisis de Varianza múltiple se obtuvo una  $F=24015.23$ , con  $P$  de una cola menor a  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ), la colonización a 5 cm de unión duodenogástrica mediante la prueba de ANOVA mostró una  $F=24014.23$  con una  $P$  menor de  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ); ambas variables antes mencionadas traducen que para este estudio la colonización y desarrollo de bacterias fue significativo respecto a cada grupo.

Mediante la Prueba exacta de Fisher evaluamos el daño celular al enterocito attaching and effacing, comparando los resultados obtenidos por microscopía entre los grupos A y B con los grupos C y D, obteniéndose una  $P$  menor a  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ) traduciéndose que la presencia de inmunoglobulina A secretora en la bilis de los grupos que recibieron el inmunoestimulador OM-89 juega un papel importante para evitar el daño celular, el cual no pudo ser evitado en el grupo B que recibió solo trimetoprim sulfametoxazol y que incluso como ya se mencionó, hubo menor daño en el grupo C que en el D con una  $P<0.0001$  estadísticamente significativa. Lo anterior pudo demostrarse en los estudios histopatológicos para observar la adherencia bacteriana a la pared intestinal, no observándose diferencia estadística significativa entre los grupos A y B ( $P=1$  No Significativa), mientras que al comparar estos grupos frente a los grupos C y D el valor de  $P$  por prueba exacta de Fisher fue menor a  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ), entre el grupo C y D el valor de  $P$  de dos colas por esta misma prueba fue de  $0.086$  ( $P=0.086$  N.S.) siendo no significativo al evitar la adherencia bacteriana a la pared intestinal en ambos grupos valiendo la pena mencionar que si se observó cierta adherencia en el grupo D, no así en el grupo C.

La reacción de aglutinación que se presentó positiva únicamente en los grupos C y D por efecto del inmunoestimulador oral OM 89 al retar la bilis obtenida de cada uno de los grupos contra la bacteria, el valor de  $P$  de A y B contra C y D fue menor de  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ) estadísticamente significativo y al comparar los grupos C y D el valor de  $P$  de dos colas fue de  $1$  ( $P=1$ ) no siendo estadísticamente significativo dado que en ambos grupos con esta prueba por que en ambos estaba presente la IgA secretora contra E coli por efecto del liofilizado previamente administrado.

Se evaluó la adherencia a células HEp-2 que al existir IgA secretora el resultado obtenido, fue inhibición a la adherencia a estas células mediante la Prueba exacta de Fisher se obtuvo una  $P$  de dos colas menor a  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ) al comparar los grupos A y B contra los grupos C y D, dado que en la bilis de los grupos A y B no había IgA secretora se observó una adherencia del 100%; en la prueba in vitro de Inhibición a adherencia a Células HEp-2, la adherencia fue inhibida en los grupos C y D al existir IgA secretora en la Bilis de estos dos grupos con una  $P$  de dos colas menor a  $0.0001$  ( $P<0.0001$ ).

## DISCUSION:

En la gráfica No. 1 nos muestra que el aislamiento de bacterias del asa aferente que fue inoculada con  $1 \times 10^2$  UFC/ml. En el grupo A encontramos  $2 \times 10^7$  UFC/ml, lo que nos indica que en 24 horas de incubación fueron suficientes para que se colonizara el asa aferente llegando bacterias inclusive a el hígado. Estos resultados demuestran la capacidad de la bacteria para realizar una colonización ascendente, siendo este el principal problema cuando se realizan cirugías de este tipo.

El grupo B también resultó ser colonizado por la bacteria inoculada y el número de bacterias encontrado indica que también existió reproducción bacteriana pero por la presencia del antibiótico no llegó a los niveles del grupo A, ni tampoco llegó a infectar el hígado. Esto representa un buena alternativa en los casos de esta cirugía, pero existe el inconveniente que el número de bacterias presente representa un potencial de contaminación hacia el hígado, de manera que es posible que en caso de suspender el antibiótico o de presentarse bacterias resistentes a el antibiótico se presenten recaídas solamente por el factor tiempo.

En el grupo C disminuyó notablemente la cantidad de bacterias y el hígado no fue infectado, pero el hecho más importante es que la bacteria se encontraba en forma transitoria ya que no estaba adherida al enterocito y no le causó daño (FAS negativo). Este dato es muy importante ya que al encontrar inhibición de la adherencia las bacterias presentes en el asa aferente irremediamente se van a eliminar.

La afirmación anterior no es aventurada ya que encontramos que la bilis aglutina a esta bacteria, lo que nos confirma la presencia de anticuerpos en ella (IgAs). Además de que en la prueba de cultivos celulares HEp-2 la presencia de la bilis inhibió la adherencia bacteriana, Zepeda y colaboradores describieron por primera vez en un estudio experimental el modelo experimental de adherencia a células de Epitelioma faríngeo humano (células HEp-2) en específico a *Escherichia coli* por lo que la demostración de la colonización y adherencia a células HEp-2 en ausencia de la inmunoglobulina, así como la inhibición a la adherencia a células HEp-2 en presencia de la inmunoglobulina A biliar específica contra *Escherichia coli* enteropatógena in vitro demuestran la efectividad no solo en los cortes histológicos sino que en el modelo in vitro como se ha descrito se logró inhibir la adherencia solo por el efecto de la inmunoglobulina (24). En el grupo D encontramos una cantidad equivalente de bacterias al inóculo depositado en el asa aferente lo que nos indica que no hubo reproducción bacteriana quizás debida a una acción sinérgica entre el antibiótico (que se encargará de eliminar a la bacteria) y el inmunomodulador OM89 que inhibió la adherencia del microorganismo al enterocito y éste fenómeno puede impedir que la bacteria obtenga alimento.

Con los resultados obtenidos por observación directa y estadísticamente analizados consideramos el liofilizado de *Escherichia coli* una buena alternativa en aquellos pacientes sometidos a derivaciones en Y de Roux como las gastroyeyunoanastomosis, portoenteroanastomosis y hepáticoyeyunoanastomosis para evitar la colonización del asa aferente y al evitarse esto, se impide la colonización del portahepatis, siendo interesantes

los resultados obtenidos porque además se evita la adherencia bacteriana a la pared intestinal, lo cual no evitaría ningún antimicrobiano a dosis terapéuticas o profilácticas, esto por las observaciones obtenidas del grupo B en el que las bacterias se adhirieron a la pared intestinal, condicionando reinfección fácil, y persistencia del factor de adherencia de la bacteria al enterocito, esto es, que aún cuando el antibiótico destruya las bacterias, el factor de adherencia continuaría enviando la señal al enterocito de su presencia y este en defensa modifica su estructura formando mesetas por polimerización de la actina F, aplanándose las vellosidades, facilitándose el ascenso de la bacteria a través del asa aferente mediante el fenómeno de Attaching and Effacing; lo anterior nos ha detenido a pensar que algo importante de este estudio es que hemos encontrado la forma de evitar la colonización del asa aferente, siendo aplicable también para evitar la colangitis ascendente en pacientes con portoenteroanastomosis secundario a síndrome de asa aferente y atresia de vías biliares, que ocurre por proliferación bacteriana, principalmente por *Escherichia coli* enteropatógena en los primeros 6 meses de vida, sin embargo como ya se ha mencionado, este trabajo da lugar a la realización de nuevas líneas de investigación experimental, con un liofilizado más específico para *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), evitando daño a la flora bacteriana intestinal normal.

En la literatura solo existe un estudio previo que pudiera en un momento dado semejarse al presente estudio solo en cuanto a inducción de la liberación de inmunoglobulina A, solo que en dicho estudio los autores utilizaron una cepa de *Escherichia coli* no patógena para el humano, inoculando las cepas en la pared intestinal de las ratas a nivel de las placas de Peyer mediante inyección directa y no en la luz intestinal, sin utilizar algún tipo de derivación intestinal, por lo que el presente estudio se puede considerar un estudio piloto, que abre nuevas líneas de investigación con posibilidades prometedoras para los niños con derivaciones en Y de Roux a nivel del asa aferente para mejorar sus posibilidades de supervivencia (14, 15).

## CONCLUSIONES:

En conclusión la utilización del inmunomodulador es muy importante para evitar la colonización bacteriana del asa aferente en la gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux o en cualquiera de las variantes en que se utiliza la Y de Roux tomando en cuenta las observaciones previamente comentadas.

El mecanismo de colonización ascendente ocurre no tan solo por estasis en el asa aferente, o por la proximidad de las bacterias a esta asa, sino que mas bien ocurre por un fenómeno microbiológico de colonización ascendente mediante adherencia y daño al enterocito llamado attaching and effacing

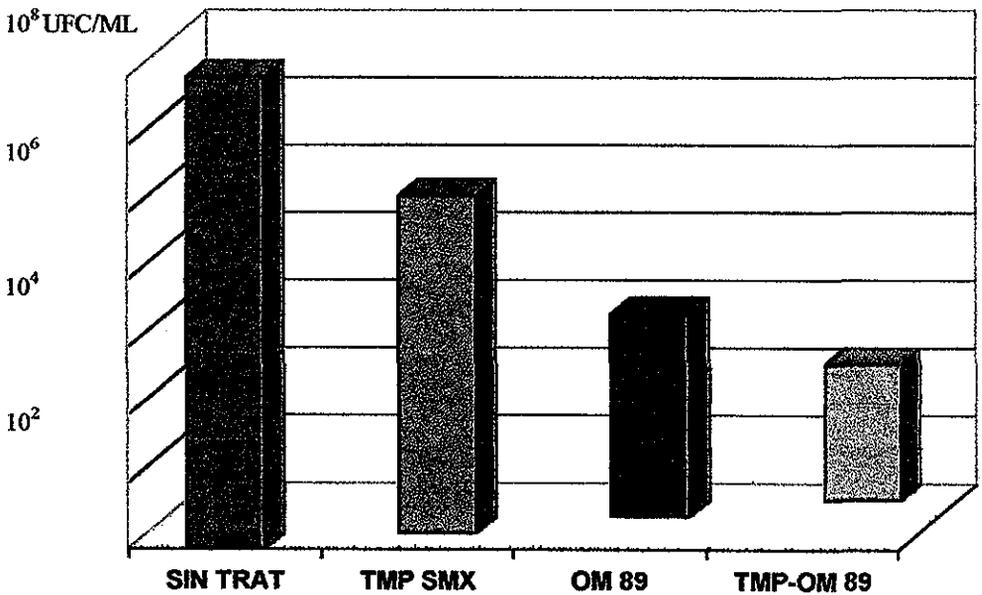
## PERSPECTIVAS:

El presente trabajo resultó satisfactorio porque inhibió la adherencia bacteriana pero existe la posibilidad de que la IgA de tipo secretor no solo inhiba la adherencia de un patógeno como EPEC y también pueda inhibir la adherencia de *Escherichia coli* componente de la microbiota normal presente en el intestino trayendo como consecuencia un daño posterior. Sería necesario la creación de un inmunomodulador específico para EPEC y así realizar el experimento en una situación más favorable hacia el paciente.

## ANEXOS:

**Gráfica No. 1.**

Cuenta viable del asa aferente de la gastroyeyunoanastomosis con respecto al tratamiento

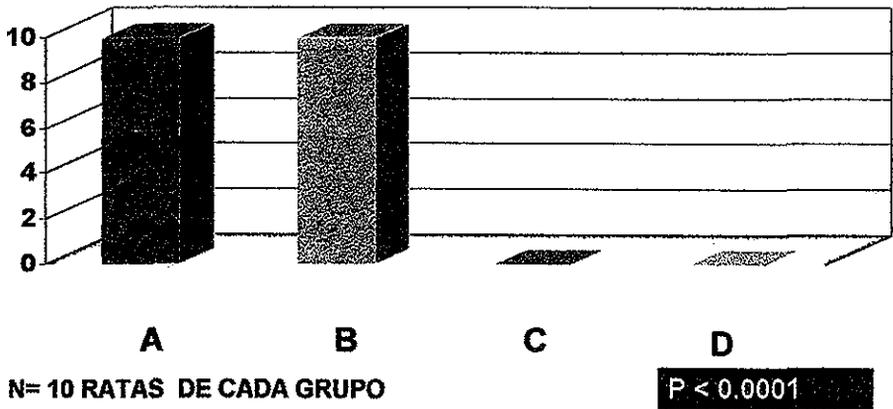


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gráfica No. 2.

## ADHERENCIA Y DAÑO AL ENTEROCITO (ATTACHING AND EFFACING)

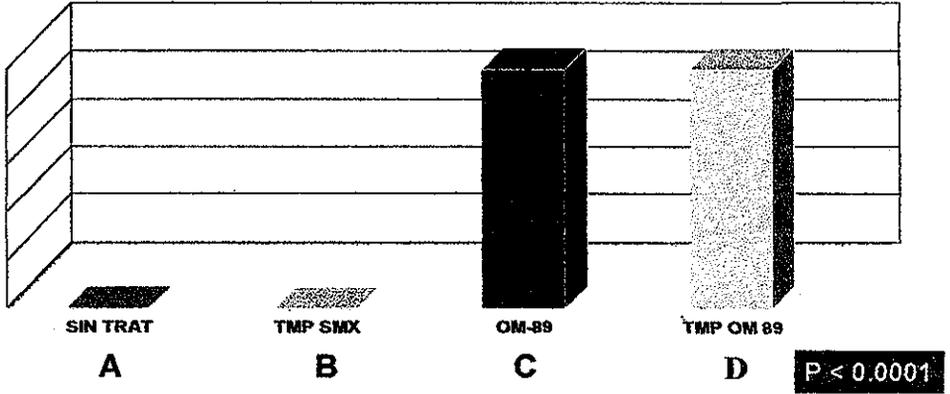
A 5,10,20 cm DE UNION DUODENOGASTRICA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

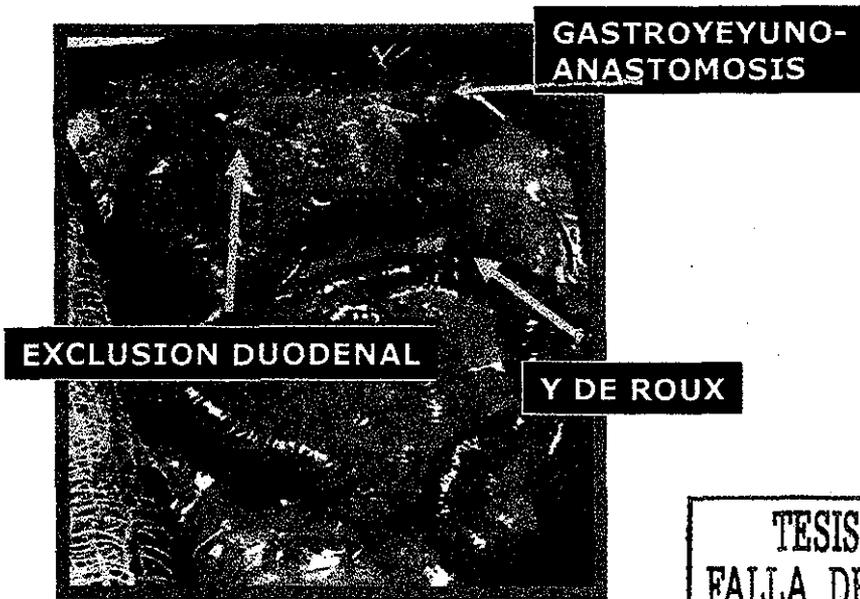
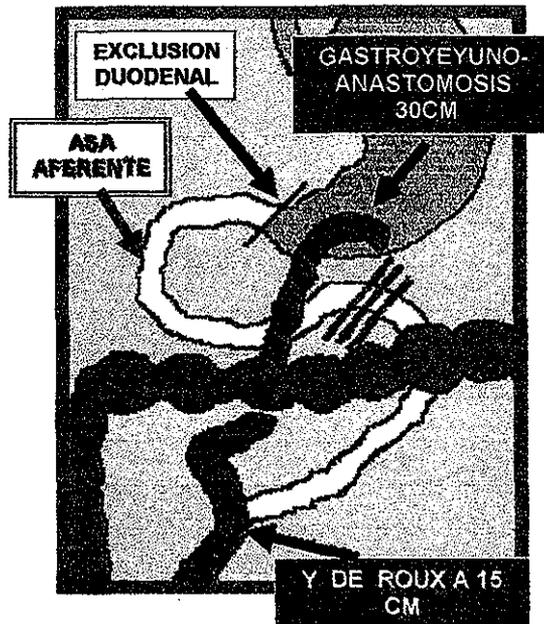
Gráfica No. 3

### PRESENCIA DE IgA SECRETORA EN BILIS



N= 10 RATAS DE CADA GRUPO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig 1.- Gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux y exclusión duodenal.



Fig 2.- Inoculación bacteriana.

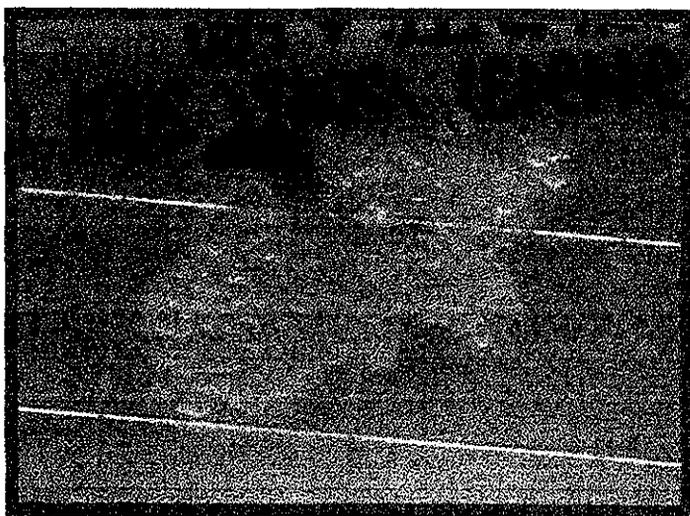


Fig. 3.- Aglutinación a IgA secretora Positiva al exponer bilis del grupo C a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

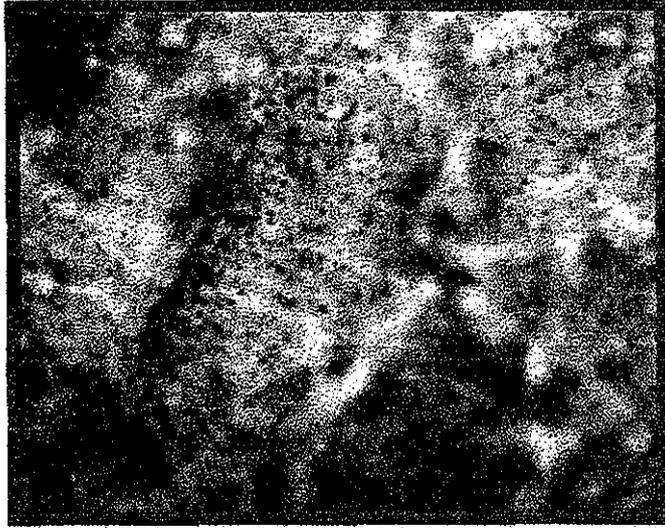


Fig 4.- Aglutinación franca a la microscopia de luz, nótese alrededor del enterocito.

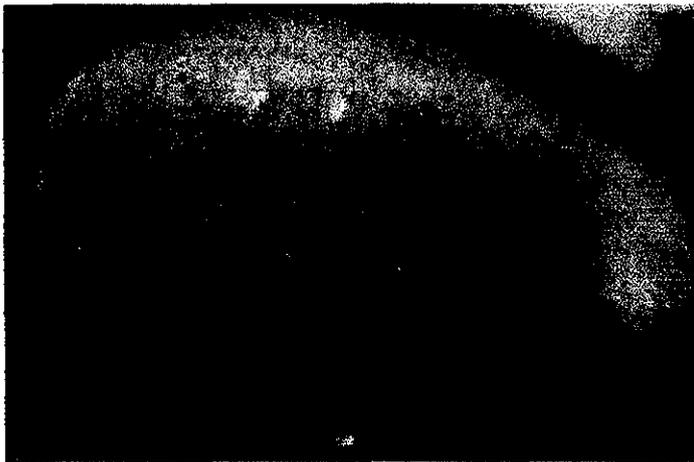
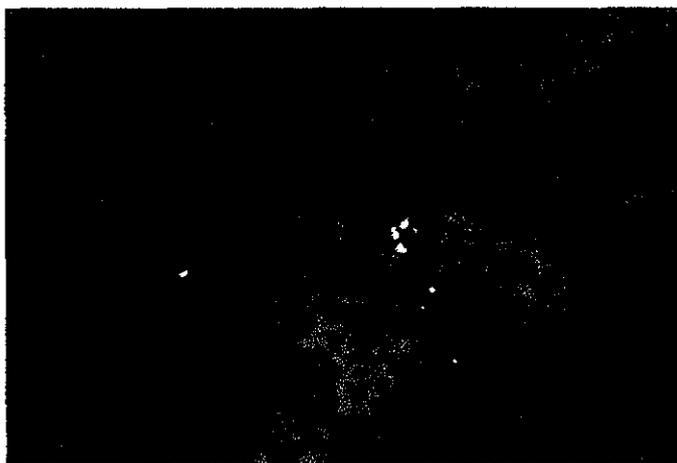


Fig. 5.-Inhibición a la adherencia a células HEp-2 en los grupos C y D, que demuestra ausencia de adherencia al enterocito.

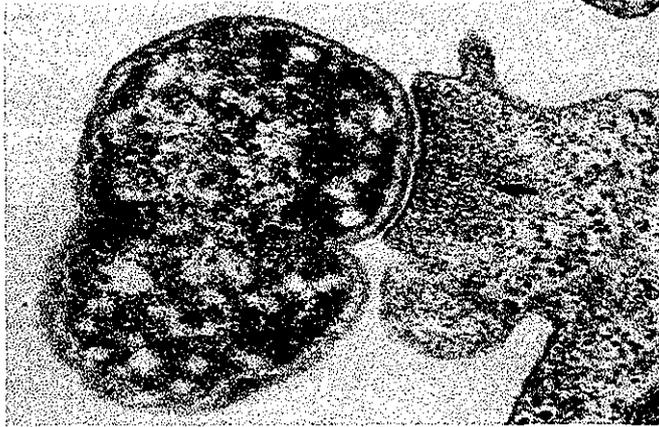


**Fig 6.- Adherencia positiva a células HE-p2 en la prueba de FAS  
Nótese en los puntos brillosos.**

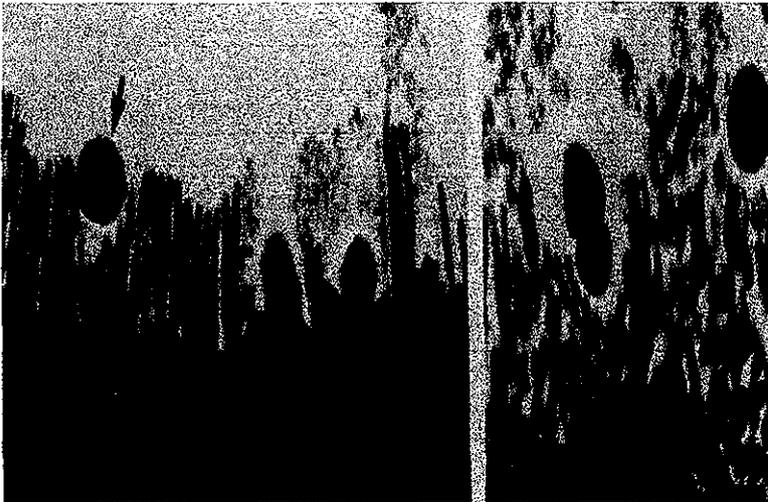


**Fig. 7.- Nótese la adherencia de la bacteria al enterocito y este  
como mecanismo de protección pierde las vellosidades y forma  
una especie de meseta.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 8.-** La flecha señala la pérdida total de la constitución normal de las vellosidades intestinales , aplanándose, persistiendo la bacteria adherida al enterocito.



**Fig 9.-** Mecanismo de Attaching and Effacing (A/E), una vez destruido el enterocito y sus vellosidades, la bacteria avanza en forma ascendente Implantándose en el enterocito siguiente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

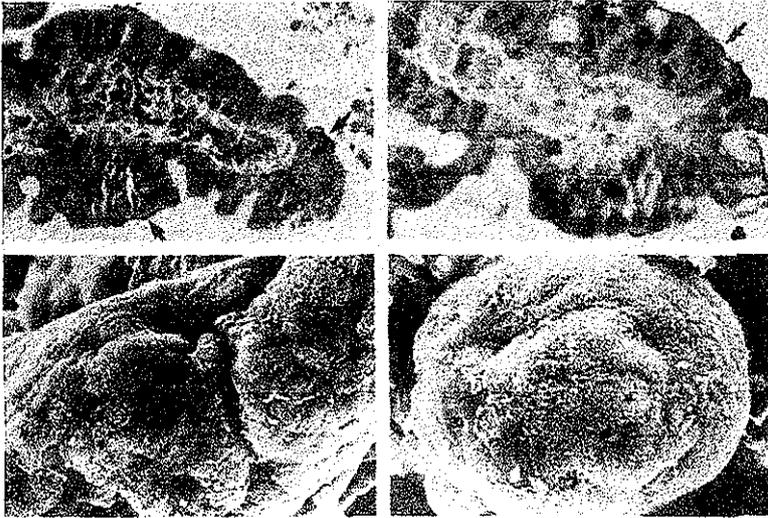


Fig 10.- En las imágenes superiores obsérvese el daño del epitelio intestinal y en las imágenes inferiores la destrucción total celular a la Microscopía electrónica

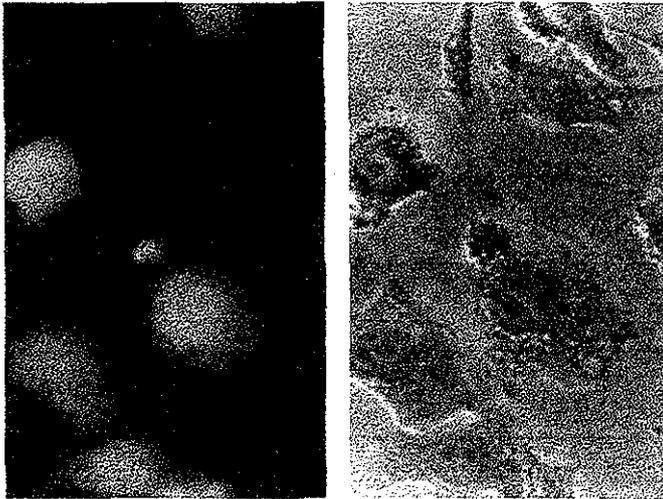


Fig. 11.- Actina F polimerizada en el epitelio intestinal.

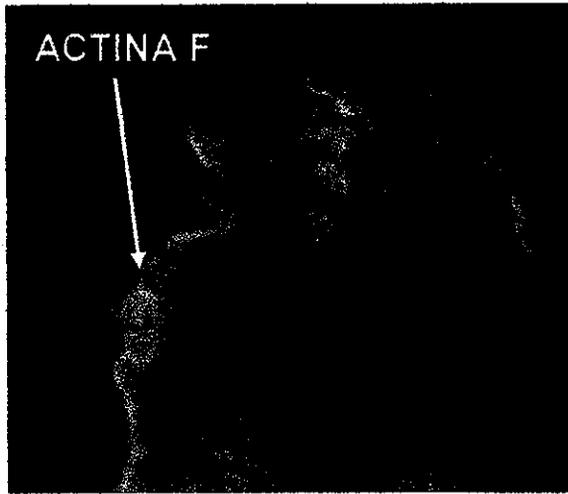


Fig 12.-Gran cantidad de Actina F polimerizada a lo largo de todo el Epitelio celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Degiannis E, Velamos GC, Levy RD, Souter I. Pyloric Exclusion in Severe Penetrating Injuries of the Duodenum. *World J Surg* 1993;17:751-4.
- 2) Shilyansky J, Kreller M, Sena L. Diagnosis and Management of duodenal Injuries in Children. *J Pediatr Surg* 1997;32:880-6.
- 3) Ginzburg E, Carrillo EH, Sosa LJ, Hertz J, Martin CL, et al. Pylori Exclusion in the Management of duodenal Trauma: Is concomitant Gastrojejunostomy necessary? *Am Surg* 1997;63:964-6.
- 4) Ito T., Nagaya M., Ando H., Ninomi Y., Iyomasa Y.: Modified hepatic porta enterostomy for biliary atresia. *Z. Kinderchir.* 39:242-245. 1984.
- 5) Miedema B, Kelly K. The Roux Stasis Syndrome. *Arch Surg* 1992;127:295-300.
- 6) Schirmer B. Gastric atony and the Roux Syndrome. *Gastroenterology Clinics of North America* 1994;2:327-43.
- 7) Flores ME, Licona IC; Efecto en la flora duodenal y cambios histopatológicos en gastroyeunoanastomosis: Modelo Experimental. Congreso Nacional de Cirugía Pediátrica, Manzanillo, Col. (MÉXICO), Septiembre 2001.
- 8) Miedema B, Nelly J. Human Gastric and jejunal Transit and Motility alter Roux Gastrojejunostomy. *Gastroenterology* 1992;103:1133-43.
- 9) Jiin-haur Chuang, Wei-Jen Chen, Shin-Yi Lee, Nyuk- Kong Chang. Prompt Colonization of the Hepaticojejunostomy and translocation of Bacteria to Liver After Bile Duct Reconstruction. *J Pediatr Surg*, 33 (8), 1215-1218, 1998.
- 10) Hirsig J, Kara O, Rickham PP: Experimental investigations into the etiology of cholangitis following operation for biliary atresia. *J Pediatr Surg* 13:55-57, 1978.
- 11) Ecoffey C, Rothman E, Bernard O, et al: Bacterial Cholangitis after surgery for biliary atresia. *J Pediatr* 111:824-829, 1987.
- 12) Grosfeld JL, Fitzgerald JF, Predaina R, et al: The efficacy of hepatoportoenterostomy in biliary atresia. *Surgery* 106:692-701, 1989.
- 13) Sartorelli KH, Holland RM, Lilly JR: The Intussusception antireflux valve is ineffective in preventing cholangitis in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 31:403-406, 1996.
- 14) Brown WR, Kloppel TM. The Liver and IgA: Immunological, cell biological and clinical implications. *Hepatology* 1989; 9:763-84.

- 15) Manning RJ, Walker PG, Carter L, Barrington PJ, Jackson GDF. Studies on the origins of biliary immunoglobulins in rats. *Gastroenterology* 1984; 87:173-9.
- 16) Aagaard BDL; Heyworth MF; Oesterle AL, Way LW; Intestinal immunization with *Escherichia coli* protects rats against *Escherichia coli* induced cholangitis. *Gut* 39(1) 136-140, July 1996.
- 17) Gustavsson S, Michael E, Stevenson FR. Roux-Y Stasis Syndrome after Gastrectomy. *Am J. Surg* 1988; 155:490-94.
- 18) Berber A. Manejo y presentación de antígenos en el sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal. En *Inmunología de las mucosas*. Acosta-Altamirano G, Cruz-López M. Editores. Distribuidora y Editora Mexicana S.A. de C.V. 1992, México, D.F. Cap 9, pp 99-106.
- 19) Van Dijk A, Bauer J, Sedelmeier EA, Bessler WG. Absorption, kinetics, antibody-bound and free serum determination of a <sup>14</sup>C-labelled *Escherichia coli* extract after single oral administration in rats. *Arzneimittelforschung* 1997;47:329-334.
- 20) Sedelmeier EA, Bessler WG. Biological activity of bacterial cell-wall components: immunogenicity of the bacterial OM-89. *Immunopharmacology* 1995;29:29-36.
- 21) Bosch A, Benedi VJ, Pares R, Jofre J Intensificación de la respuesta inmunitaria humoral y la resistencia a la infección bacteriana en ratones tras la administración oral de inmunomodulador bacteriano (OM 89). *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1988; 10:333-343.
- 22) Baier W Sedelmeier EA, Bessler WG. Studies on the immunogenicity of an *Escherichia coli* extract after oral application in mice. *Arzneimittelforschung* 1997; 47:980-985.
- 23) Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz et al; Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 1991;337:262-264.
- 24) Zepeda López HM, González Lugo GM; *Escherichia coli* adherence to Hep-2 Cells with prefixed cells. *J Clin Microbiol*. May, 1995, 33 (5): 1414-1417.
- 25) Knutton, S., G.K. Collington, T.J., Baldwin, R.D. Haigh, et al.; Cellular responses to EPEC infection. *Rev. Microbiol. Sao Paulo* 1996, 27 (suppl 1):89-94.
- 26) Martindale, the extrapharmacopeia (edic, XXIX, 1989.) pag. 206.
- 27) The Merck index chemical, drugs and biologist, Ed XII, (1996) pag. 1654 num 9840.