

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

HOSPITAL GENERAL C.M. LA RAZA IMSS
INMUNOESTIMULACIÓN EN GASTROEYUNOANATOMOSIS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALIDAD EN CIRUGIA PEDIÁTRICA

PRESENTA :
DRA. EDNA ZONaida BOJAS CUIEL

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11210
11



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

**PAGINACION
DISCONTINUA**

11210
11



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION**

**SUBDIVISION DE ESPECIALIZACIONES
MEDICAS**

OFICIO FMED/SEM/1377/2003

ASUNTO: Autorización del trabajo de investigación de la Dra. Edna Zoraida Rojas Curiel.

**DR. ISIDRO AVILA MARTINEZ
SECRETARIO DE SERVICIOS ESCOLARES
DE LA FACULTAD DE MEDICINA
Presente.**

Estimado Dr. Avila Martínez:

Me permito informar a usted que la **Dra. Edna Zoraida Rojas Curiel**, alumno del curso de especialización en **Cirugía Pediátrica** en el **Hospital General C.M. "La Raza"**, **I.M.S.S.**, presenta el trabajo de investigación intitulado **"Inmunestimulación en gastroyeyunoanatomosis. Una nueva opción terapéutica. Estudio experimental."**

De conformidad con el artículo 21 capítulo 5º. de las Normas Operativas del Plan Unico de Especializaciones Médicas (PUEM) se considera que cumple con los requisitos para validarlo como el trabajo formal de Investigación que le otorga el derecho de la diplomación como especialista.

Sin otro particular de momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F. a 12 de agosto de 2003**

JEFE DE LA SUBDIVISION

DR. LEOBARDO C. RUIZ PEREZ

LRP*ajr.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo de investigación.

NOMBRE: Edna Zoraida Rojas Curiel
FECHA: Oct 02 03
FIRMA:

**TESIS CON
DE URGEN**

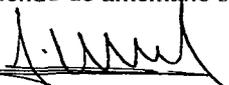
9

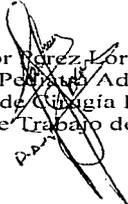
México, D.F. 12 de Agosto de 2003.

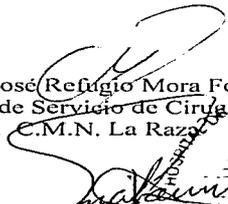
Dr. Hugo Aréchiga Urtuzuátegui
Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación.

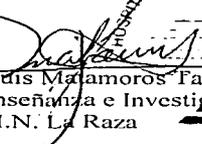
Por medio del presente, le informamos que la Dra. Edna Zoraida Rojas Curiel Residente del Sexto año de la Especialidad de Cirugía Pediátrica del H.G. C.M.N. "La Raza", tiene autorización para Titulación con el artículo de investigación: **Inmunoestimulación en gastrovuvonoanatomosis. Una nueva opción terapéutica. Estudio experimental**, el cual fue publicado en la Revista Mexicana de CIRUGIA PEDIATRICA Vol. 10, No 1 Enero – Marzo de 2003.

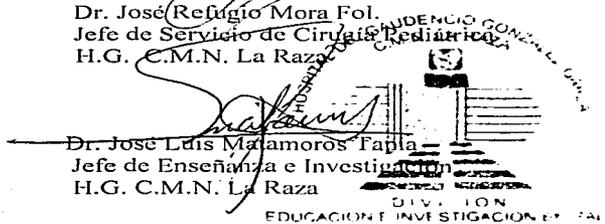
Agradeciendo de antemano su atención le enviamos un cordial saludo.


Dr. Jaime Zaldivar Cervera.
Profesor Titular del Curso
Director del H.G. C.M.N. La Raza.


Dr. Héctor Pérez Lorenzana
Cirujano Pediatra Adscrito al
Servicio de Cirugía Pediátrica
Asesor de Trabajo de Investigación.


Dr. José Refugio Mora Fol.
Jefe de Servicio de Cirugía Pediátrica
H.G. C.M.N. La Raza


Dr. José Luis Matamoros Tapia
Jefe de Enseñanza e Investigación
H.G. C.M.N. La Raza


DIVISION
EDUCACION E INVESTIGACION EN PA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Inmunoestimulación en gastroyeyunoanastomosis. Una nueva opción terapéutica. Estudio experimental

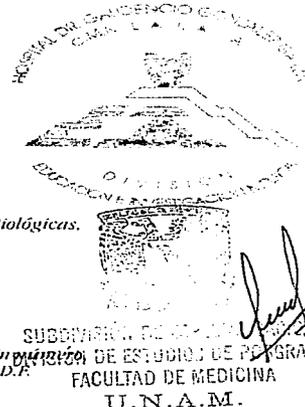
Héctor Pérez-Lorenzana¹, José Alberto Cibrian-Cruz², Juan Ronal Moreno-Gonzalez³, Héctor Zepeda-López⁴, Ana Lilia Sandoval-Sanchez⁵, Néstor Martínez-Hernández Magro¹, Edna Zoraida Rojas-Curiel⁶, Jaime Zaldivar-Cervera⁷

¹Cirujano pediatra
²Residente del sexto año de Cirugía pediátrica
³Q.B.P. Tesista de Maestría en Ciencias
⁴Profesor investigador
⁵Maestra en Ciencias
⁶Residente del quinto año de Cirugía pediátrica

^{5,4,5}Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

^{1,6,7}Hospital General Centro Médico Nacional La Raza, Departamento de Cirugía Pediátrica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

Solicitud de sobresitos: Dr. José Alberto Cibrian Cruz, Av. Jacarandas sin número, Colonia La Raza, Delegación Azcapotzalco, CP 02990, México, D.F.



Inmunoestimulación en gastroyeyunoanastomosis. Una nueva opción terapéutica. Estudio experimental

RESUMEN. Introducción: La colonización bacteriana en gastroyeyunostomías es frecuente en asa aferente; la Y de Roux también presenta colonización, siendo necesario evitarlo especialmente en portoenterostomías. **Material y métodos:** 40 ratas Wistar, cuatro grupos con gastroyeyunostomía de Roux en Y y exclusión duodenal; El grupo A sin medicamento, el B trimetropín sulfametoxazol, el C inmunoestimulante oral y el D trimetropín sulfametoxazol y OM-89; inoculándose *Escherichia coli* enteropatógena en asa aferente; 24 horas después se toman bilis, biopsia y cultivos y prueba de FAS. **Resultados:** No complicaciones quirúrgicas, grupo A mayor incremento de 100 UFC/ml a 2.8X10⁷. B a 7.9X10⁵ UFC/ml, C disminuyó a 8X10⁴ UFC/ml y D disminuyó a 2X10² UFC/ml, menor adherencia en C y menor daño que A-B-D. IgA negativa en A y B.

inhibición de adherencia grupos C y D. **Conclusiones:** La colonización y daño en el asa aferente es menor con inmunoestimulación, que con antimicrobiano.

Palabras clave: Asa aferente; Attaching and effacing; Colonización bacteriana; *Escherichia coli* enteropatógena; Gastroyeyunostomía; Inmunoestimulación; Roux-en-Y.

Inmunoestimulation in Gastrojejunum anastomosis. A new therapeutic option. An experimental study

ABSTRACT. Introduction: The bacterial colonization in gastrojejunostomy is frequent in afferent handle; the Roux-en-Y it also presents colonization, being necessary to avoid it especially in portoenterostomy. **Material and methods:** 40 rats Wistar, four

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

groups with gastrojejunostomy of Roux en Y and duodenal exclusion; Group A: without medication, B trimethoprim sulfamethoxazole, C oral OM-89; and D trimethoprim sulfamethoxazole and OM-89; being inoculated *Escherichia coli* enteropathogen in afferent loop; 24 hours later they take bile, biopsy and cultivations and test of FAS A/E. **Results:** Not surgical complications, group A increased from 100 UFC/ml to 2.8X10⁷, B to 7.9X10⁵ UFC/ml, C diminished to 8X10⁴ UFC/ml and D it diminished to 2X10² UFC/ml, smaller adherence in C and smaller damage that A-B-D. IgA negative in A and B. Inhibition of adherence groups C and D. **Conclusions:** The colonization and damage in the afferent loop are smaller with immunoestimulant than with antibiotic.

Index words: Afferent loop; Attaching and effacing; *Escherichia coli* enteropathogenic; Gastrojejunostomy; Immunoestimulation; Roux-en-Y.

INTRODUCCION

Se describen en la literatura diversas técnicas de derivaciones mediante gastroeyunooanastomosis, 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}

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 complicación más frecuente 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.^{1,6}

Otra complicación es la colangitis que 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 hepatoyunooanastomosis y portoenteroanastomosis, manifestándose con fiebre, disminución del flujo biliar, in-

cremento 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.^{11,13}

Estudios previos de experimentación han revelado que la administración en forma de inyección de cepas muertas de *E. coli* en las placas de Péyer de ratas, desencadenan una respuesta de liberación de inmunoglobulina A biliar.^{11,12}

OM 89 es un liofilizado immunoestimulante 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,¹⁴ 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 immunoestimulante.

En estudios de farmacocinética, las formas inmuno génicas del liofilizado se han detectado en sangre una hora después de la administración oral, su vida media es mayor de 24 horas, encontrándose la marca de IM 89 ligada a isótopo carbono 14 en hígado, bazo y placas de Scller.¹⁵

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

El Trimetoprim sulfametoxazol combinación conocida como sulfas potenciadas, presentan un amplio espectro de actividad, comportándose como bactericidas, con una excelente distribución tisular y buenas propiedades farmacocinéticas y 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), y *Campylobacter* spp.^{26,27}

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio experimental, comparativo, prospectivo, longitudinal; en el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional (I.P.N.) México, D.F. y el Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital General, Centro Médico Nacional La Raza, en el periodo comprendido de enero a abril del 2002.

Población de estudio.

Cuarenta ratas de la raza Wistar, sanas, con peso de 250 a 300 gr. dividiéndose en cuatro grupos de diez ratas cada uno.

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 horas antes de la cirugía Trimetoprim-sulfametoxazol cada 24 horas por vía oral a dosis de cinco mg/kg/dosis mediante sonda orogástrica de alimentación 5 fr, y previo ayuno de 12 horas, se les realizó gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux y exclusión

duodenal, inoculación de bacterias y una dosis mas del medicamento al término de la cirugía.

El grupo C recibió 48 horas antes de la cirugía cada 24 horas seis miligramos de OM-89 mediante sonda orogástrica de 5 fr, se le realizó el procedimiento quirúrgico y se le inocularon las bacterias, se le administró al término de la cirugía seis miligramos de OM-89 mediante sonda orogástrica. Al día siguiente se les tomaron las muestras descritas y luego sacrificadas.

El grupo D recibió 48 horas antes de la cirugía ambos medicamentos, trimetoprim-sulfametoxazol y OM-89 a las mismas dosis antes mencionadas mediante sonda orogástrica 5 fr; posteriormente fueron sometidas a la cirugía e inoculación de bacterias; se les administra posterior a la cirugía una dosis mas de ambos medicamentos y sacrificadas al siguiente día previa toma de muestras.

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).



Figura 1. Gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux y exclusión duodenal

ASEPSIS CON
FALLA DE CARGEN

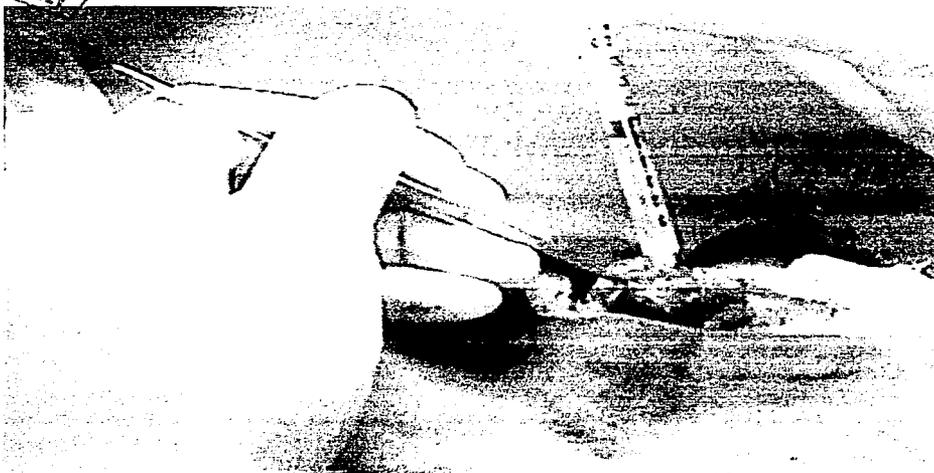


Figura 2. Inoculación bacteriana

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

Immunoestimulador OM89: Liofilizado de Escherichia coli. Antibiótico: Trimetoprim Sulfametoxazol suspensión oral.

Técnica Quirúrgica

Con ayuno de doce horas y bajo anestesia general con midazolam a un 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 la línea media, cinco centímetros aproximadamente, abordando por planos hasta cavidad peritoneal, se identificó estómago, duodeno, ligamento de Treitz, se midieron 15 cm a partir del ligamento de Treitz y se secciona el yeyuno a través de una zona avascular; se midieron 30 cm de intestino, realizando 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 asciende el yeyuno proximal y se realiza gastroyeyunoanastomosis latero-lateral con prolene 6-0 con puntos de gambee, cerrando la boca terminal del intestino ascendido invaginando la

mucosa con prolene 6-0; se corroboró la permeabilidad y ausencia de fuga tanto en la Y de Roux, y a continuación se realiza exclusión duodenal a nivel de unión gastroduodenal con puntos simples con prolene 6-0.

Se cierra el defecto del mesocolon (Fig. 1) y se realiza la inoculación bacteriana a nivel de la 2ª porción del duodeno (Fig. 2); se cierra el peritoneo con dexion 5-0, cierre de aponeurosis con dexion 3-0 y cierre de piel con dermalón



Figura 3. Aglutinación a IgA secretora. Positiva al exponer bits del grupo C a Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

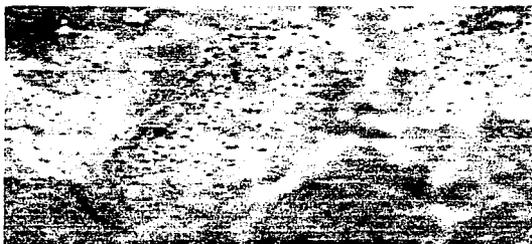


Figura 4. Aglutinación franca a la microscopía de luz, nótese alrededor del enterocito



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

5-0; se administra analgésico metamizol intramuscular a 10mg/kg/dosis y se mantiene en ayuno 12 horas iniciando la vía oral posteriormente con solución glucosada al 5%.

Todas las ratas fueron nuevamente anestesiadas al siguiente día de la cirugía e inoculadas con la bacteria en sala, con luz ultravioleta y campana de flujo laminar, tomando primero una muestra del hilio hepático para cultivo y un mililitro de bilis a nivel de la tercera porción del duodeno mediante aspiración con jeringa y aguja para detección de Inmunoglobulina A secretora específica para E. coli enteropatogena.

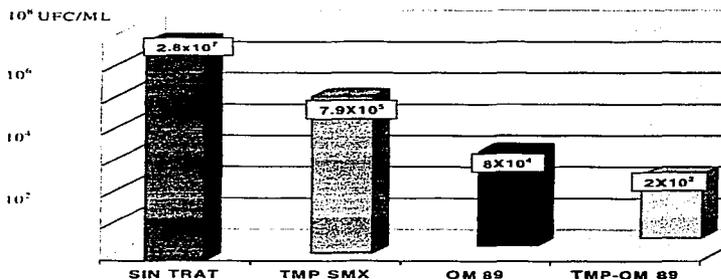
Se tomó una biopsia de un gramo en el sitio de inoculación bacteriana en el duodeno, dos muestras de un gramo cada una para cultivo y estudio histopatológico a una

distancia de cinco centímetros y dos mas a diez y 20 centímetros de un gramo cada una para cuenta viable de bacterias.

Posteriormente se sacrificaron las ratas con administración de Tiopental a dosis letales intracardiaco.

Cultivo Bacteriano

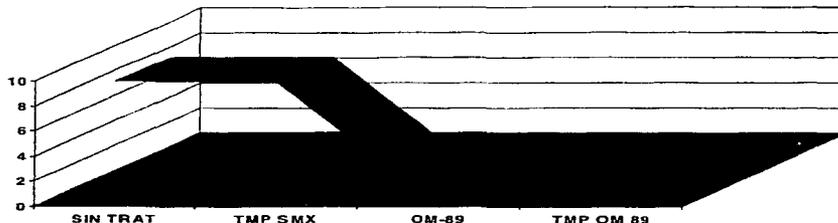
Se inoculó la cepa de EPEC E2348/69 en caldo soya tripticaseína y se incubó a 37° C durante 18 a 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación el cultivo se ajustó a 100 UFC/ml y se inoculó un mililitro en el asa aferente de la gastroyeyunoanastomosis en Y de Roux realizada en las ratas.



Gráfica 1

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

ATTACHING AND EFFACING



Gráfica 2

Cuenta viable

Se extrae un gramo de mucosa intestinal a cinco centímetros de la unión duodeno gástrica que se coloca en un tubo que contenía nueve mililitros de agua destilada, esto con la finalidad de realizar una dilución 1:10; se agita 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 µl 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.

Procesamiento de órganos

El procesamiento de los órganos obtenidos por necropsia consta de varios pasos:

- a. Fijación
- b. Deshidratación y transparentación
- c. Inclusión definitiva
- d. Desparafinación e hidratación
- e. Tinción hematoxilina-eosina

Después de estos procesos 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

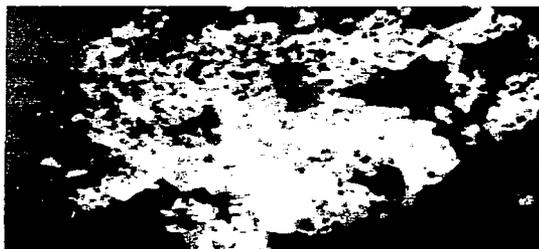
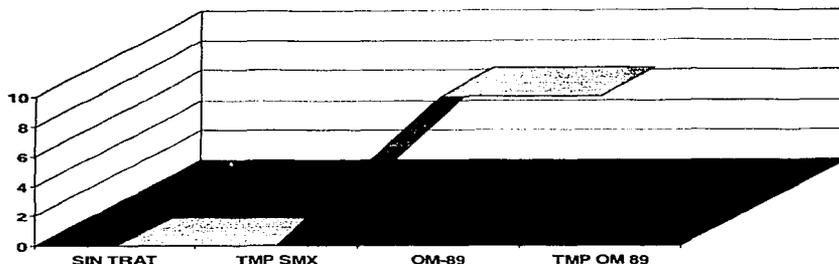


Figura 6. Adherencia positiva a células HEp-2 en la prueba de FAS. Nótese en los puntos brillantes



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

PRESENCIA DE Iga SECRETORA



Grafica 3

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 llevaba a cabo una reacción de aglutinación. Como testigo negativo se colocaron 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 fue crecida con Mínimo Esencial de Eagle (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutanina, bicarbonato de sodio al 4.4%, una solución de penicilina-

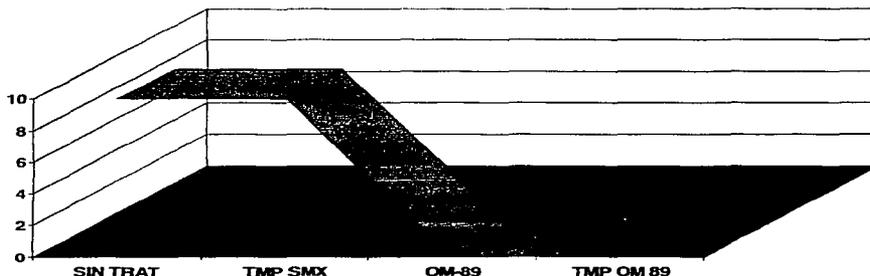
estreptomicina (PES) a una concentración de 100 U y 100 g por mililitro respectivamente.

Las células fueron propagadas en botellas de plástico de 25 cm² con el medio MEM y fueron incubadas a 37° C en una atmósfera de CO₂, 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 un mililitro 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 sea 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

ADHERENCIA A LA PARED INTESTINAL



Grafica 4

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

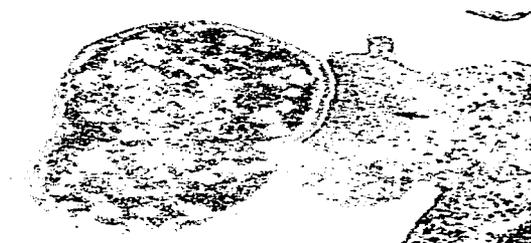


Figura 8. La flecha señala la pérdida total de la constitución normal de las vellosidades intestinales, aplanándose, persistiendo la bacteria adherida al enterocito

13mm de diámetro, enseguida se incubó a 37° C con una tensión de CO₂ del 5% hasta alcanzar una confluencia del 70 al 90%.

Ensayos de adherencia a células HEP-2

Una vez que se obtiene 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 CO₂ durante tres ó seis horas, dependiendo del ensayo. Al término de este tiempo se desechó el medio de cultivo de cada pozo, se lavó tres veces con PBS 1X y se adicionó una gota de metanol absoluto frío para fijar las bacterias al a preparación.

La tinción de las laminillas se realizó con Giemsa y se montaron en portaobjetos sobre resina sintética. Como tes-

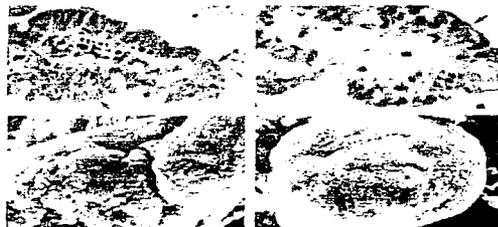


Figura 10. En las imágenes superiores obsérvese el daño del epitelio intestinal y en las imágenes inferiores la destrucción total celular a la Microscopía electrónica



Figura 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

tigos 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 existe IgA secretora que pueda 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 el segmento de intestino extraído y las laminillas del cultivo celular se fijaron en formaldehído al 3% durante



Figura 11. Actina F polimerizada en el epitelio intestinal



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

20 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante cinco minutos. Al término de este tiempo se lavó 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

Análisis estadístico

Mediante Análisis de ANOVA se analizaron el sexo, peso, la colonización en el sitio de inoculación y la colonización bacteriana observada a cinco centímetros del sitio de inoculación.

Se aplicó la Prueba exacta de Fisher para evaluar la colonización del hilio hepático, attaching and effacing (A/E) en la pared intestinal, reacción de aglutinación en presencia de E coli y bilis conteniendo IgA secretora contra Escherichia coli enteropatógena, adherencia bacteriana a la pared intestinales y además en un segundo análisis para ANOVA se realizó, adherencia a células Hep-2, e inhibición a adherencia a células HE-p2. Se consideró significativa cuando p es menor a 0.0001 ($P < 0.0001$)

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.

El análisis de ANOVA, respecto al sexo y el peso no fueron significativos (p.50 y p.51 respectivamente). El sitio de

inoculación y la colonización a cinco centímetros fueron significativas ($p > .0001$).

Al realizar la cuenta viable promedio se obtuvo que el grupo A obtuvo la mayor cantidad de UFC/ml ya que se observó un incremento de 100 UFC/ml hasta 2.8×10^7 (Gráfica 1).

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, siendo el grupo D el de menor colonización bacteriana y menor daño en las células epiteliales.

La prueba de FAS reveló que tanto en el grupo A y B se observó un mayor número de bacterias adheridas provocando daño a la célula epitelial de manera significativa. (A/E). ($p > .0001$).

En el grupo D la adherencia bacteriana fue menor que en los grupos A y B pero mayor a la encontrada en el C. Con una $p > .0001$. (Gráfica 2)

En las aglutinaciones al retar el líquido biliar contra la bacteria, en el grupo A y B fueron negativas mientras que en los grupos C y D (p NS) se encontró positiva (Fig. 3 y 4). Al comparar A y B contra C y D se obtiene significancia ($p > 0.0001$). (Gráfica 3)

En los ensayos de inhibición de la adherencia a células HEp-2 encontramos una inhibición con la bilis de los grupos C y D.

En la adherencia que presentan los grupos A y B, la prueba de FAS es positiva. Al comparar los grupos A y B contra C y D se encontró significancia ($p > .0001$) (Fig. 5 y 6). (Gráfica 4)

Finalmente, los cortes del asa aferente nos muestran a la bacteria adherida al enterocito (Fig. 7 y 8) y el daño que está por la bacteria. (Fig. 9 y 10)

En los estudios histopatológicos para observar la adherencia bacteriana a la pared intestinal, no hubo significancia al comparar los grupos A y B (p 1.0), por un lado y C y D (p .0.86), mientras que al comparar los grupos C y D contra A y B si hubo significancia ($p > .0001$), valiendo la pena mencionar que si se observó cierta adherencia en el grupo D, no así en el grupo C.

DISCUSIÓN

Como ha sido descrito por Flores y cols., se observó dilatación leve del asa aferente en caso del duodeno excluido, lo cual facilita la translocación bacteriana en la evolución natural de los pacientes sometidos a este procedimiento.

Estos resultados demuestran la capacidad de la bacteria para realizar una colonización ascendente, sien-

do este el principal problema cuando se realizan cirugías de este tipo.

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

Los resultados obtenidos son interesantes 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 adherieron 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, aplanando 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, que ocurre por proliferación bacteriana, principalmente por *Escherichia coli* enteropatógena en los primeros seis 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 mas específico para *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), evitando daño a la flora bacteriana intestinal normal.

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.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo resultó satisfactorio porque inhibió la adherencia bacteriana, pero existe la posibilidad de que la

IgA de tipo secretor además de inhibir la adherencia de un patógeno como EPEC, también pueda inhibir la adherencia de *Escherichia coli* componente de la microbiota normal presente en el intestino, trayendo como consecuencia un daño posterior.

Sería necesaria la creación de un inmunomodulador específico para EPEC y así realizar el experimento en una situación más favorable hacia el paciente.

BIBLIOGRAFIA

1. Degiannis E, Velamos GC, Levy RD, Souter I. Pyloric Exclusion in Severe Penetrating Injuries of the Duodenum. *World J Surg* 1995; 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. Pyloric 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* 1984; 39: 242-5.
5. Miedema B, Kelly K. The Roux Stasis Síndrome. *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 gastroyeyunoanastomosis: 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. Jjin-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* 1998; 33(8): 1215-8.
10. Hirsig J, Kara O, Rickham PP. Experimental investigations into the etiology of cholangitis following operation for biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1978; 13: 55-7.
11. Ecoffey C, Rothman E, Bernard O, et al. Bacterial Cholangitis after surgery for biliary atresia. *J Pediatr* 1987; 111: 824-9.
12. Grosfeld JL, Fitzgerald JF, Predaina R, et al. The efficacy of hepatopuertoenterostomy in biliary atresia. *Surgery* 1989; 106: 692-701.
13. Sartorelli KH, Holland RM, Lilly JR. The Intussusception antireflux valve is ineffective in preventing cholangitis in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 403-6.
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* July 1996; 39(1): 136-40.
17. Gustavsson S, Michael E, Stevenson FR. Roux-Y Stasis Syndrome after Gastrectomy. *Am J. Surg* 1988; 155: 490-4.
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 ¹⁴C-labelled *Escherichia coli* extract after single oral administration in rats. *Arzneimittelforschung* 1997; 47: 329-34.
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: 333-43.
22. Baier W, Sedelmeier EA, Bessler WG. Studies on the immunogenicity of an *Escherichia coli* extract after oral application in mice. *Arzneimittelforschung* 1997; 47: 980-5.
23. Gravioto 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: 262-4.
24. Zepeda López HM, González Lugo GM. *Escherichia coli* adherence to Hep-2 Cells with prefixed cells. *J Clin Microbiol* May 1995; 33(5): 1414-7.
25. Knutton S, GK ColHington, TJ Baldwin, RD 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.