

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

**Modulación del Fracaso Multiorgánico mediante
depleción macrofágica en un modelo de
politraumatismo experimental.**

**Tesis presentada por la doctorando Eva M^a García Torralbo para
optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía bajo la dirección de los
Doctores Jose Manuel Sánchez Ortega y Salvador Navarro Soto.**

Barcelona, Marzo de 2005

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ÍNDICE	3
FUNDAMENTOS	9
TRAUMATISMO	10
FRACASO MULTIORGÁNICO	13
1- INTRODUCCIÓN	13
2- REVISIÓN HISTÓRICA	13
3- DEFINICIONES	17
4- HIPÓTESIS SOBRE LAS CAUSAS DEL MODS	21
4.1- <i>MODELOS INFECCIOSOS</i>	21
4.2- <i>MODELOS INFLAMATORIOS</i>	23
4.3- <i>RESPUESTA “HIPERACTIVA” A LA AGRESIÓN</i>	26
4.3.1- <i>HIPÓTESIS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN</i>	27
4.3.2- <i>HIPÓTESIS DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS: CITOQUINAS</i>	31
4.3.3- <i>HIPÓTESIS DEL INTESTINO: TRANSLOCACIÓN BACTERIANA</i>	34
4.3.3.1- <i>Translocación bacteriana: perspectiva histórica</i>	34
4.3.3.2- <i>La teoría del intestino</i>	35
4.3.3.3- <i>La barrera intestinal</i>	37
4.3.3.4- <i>Mecanismos de translocación</i>	39
4.4- <i>TENDENCIAS ACTUALES</i>	46
DEPLECIÓN DE MACRÓFAGOS	49
1- MACRÓFAGOS	49
2- MACRÓFAGOS Y MODS	50
3- DEPLECIÓN DE MACRÓFAGOS	51

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54
HIPÓTESIS	55
HIPÓTESIS DE TRABAJO	56
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	58
MATERIAL	59
1- APARATO GENERADOR DE POLITRAUMATISMO (AGP)	59
2- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	63
3- ANESTESIA	64
4-DICLOROMETILENO-DIFOSFONATO (CL₂MDP) CONTENIDO EN LIPOSOMAS	64
5- TEST DE MOVILIDAD	66
6- DETERMINACIÓN DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA	67
MÉTODOS	69
1- ADMINISTRACIÓN DE LA ANESTESIA	69
2- INYECCIÓN ENDOVENOSA	69
3- GENERACIÓN DEL TRAUMATISMO	70
4- INTRODUCCIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA	71
5- DISEÑO DEL ESTUDIO	72
<i>EXPERIMENTO 1</i>	73
<i>EXPERIMENTO 2</i>	75
RESULTADOS	80
EXPERIMENTO 1	81
1- DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS	81
2- TRANSLOCACIÓN BACTERIANA	83
3- TOXICIDAD SISTÉMICA	87
3.1- SIGNOS TÓXICOS	87
3.2- MOVILIDAD	88

EXPERIMENTO 2	90
1- <i>DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS</i>	90
2- <i>MORTALIDAD</i>	90
3- <i>TOXICIDAD SISTÉMICA</i>	92
3.1- <i>PÉRDIDA DE PESO</i>	92
3.2- <i>MOVILIDAD</i>	94
3.3- <i>SIGNOS TÓXICOS</i>	95
DISCUSIÓN	96
1- EL MODELO EXPERIMENTAL	97
2- TRANSLOCACIÓN BACTERIANA	100
3- DEPLECIÓN MACROFÁGICA	103
3.1- <i>DEPLECIÓN MACROFÁGICA Y TOXICIDAD SISTÉMICA</i>	105
3.1.1- <i>SIGNOS DE TOXICIDAD SISTÉMICA</i>	106
3.1.2- <i>MOVILIDAD</i>	109
3.1.3- <i>PÉRDIDA DE PESO</i>	111
3.2- <i>DEPLECIÓN MACROFÁGICA Y MORTALIDAD</i>	113
3.3- <i>APLICABILIDAD CLÍNICA DEL CLODRONATO</i>	114
CONCLUSIONES	117
RESUMEN	119
BIBLIOGRAFÍA	125

FUNDAMENTOS

TRAUMATISMO

El traumatismo es uno de los mayores problemas sanitarios de la sociedad industrializada, siendo la principal causa de muerte entre el año y los 44 años de edad, y la tercera para todas las edades después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. El traumatismo afecta sobretodo a personas jóvenes que están en pleno rendimiento de su vida productiva, por lo que conlleva elevados costes económicos en asistencia médica, indemnizaciones y absentismo laboral⁽¹⁾.

Se define como politraumatismo a la coexistencia de lesiones traumáticas múltiples producidas por un mismo accidente, comportando, aunque sólo sea una de ellas, riesgo vital para el paciente.

A nivel mundial, cada año mueren por traumatismo más de 5 millones de personas. De los fallecidos por traumatismo en el año 2002, aproximadamente 1,8 millones fueron como consecuencia de accidentes de tráfico (datos de la OMS: Abril 2004).

Los accidentes de tráfico constituyen en España la primera causa de mortalidad en personas que aún no han cumplido los 35 años. Los años probables de vida perdidos son un indicador de gran utilidad que señala a los accidentes de tráfico como la primera causa de mortalidad prematura en nuestro país. Si los daños relativos a la mortalidad son importantes, los de las secuelas sufridas por los implicados que logran sobrevivir al accidente, no lo son menos. Éstos son los responsables de casi el 40% de las minusvalías registradas (datos de la Dirección General de Tráfico 1998).

En Cataluña, en 1999, se perdieron 210.791 años de vida entre la población de 1 a 70 años por muertes prematuras. De éstos, el 71,4% correspondían a hombres y el 28,6% a mujeres. Las causas que provocan una pérdida global mayor de años potenciales de vida

(según la agrupación D-73 de causas de mortalidad) son, para los hombres: los accidentes de vehículos de motor en primer lugar, seguidos por tumores de tráquea, bronquios y pulmón, y en tercer lugar de las enfermedades cardíacas isquémicas. Para las mujeres, la principal causa es el tumor de mama, seguido de los accidentes de tráfico y de las enfermedades vasculares cerebrales⁽²⁾.

La mortalidad en el politraumatismo se caracteriza por seguir una distribución trimodal, de forma que las causas de muerte en estos pacientes varían según el tiempo desde que se produce la lesión⁽³⁾.

En una Primera Etapa (segundos o minutos después del traumatismo) se produce el 40% de los casos de muerte debido a lesiones cerebrales, de la médula espinal, cardíaca, de los grandes vasos o de la aorta.

En una Segunda Etapa (primeras horas después del traumatismo) se produce un 40% de la mortalidad total causado por hematomas subdurales o epidurales, hemo neumotórax, lesiones hepáticas o esplénicas, fracturas de pelvis o lesiones con hemorragia severa.

Así, en las primeras 6 horas (Primera y Segunda Etapas), y en el 80% de los casos, las lesiones del Sistema Nervioso Central y las hemorragias son las principales responsables de la mortalidad de estos pacientes.

En el 20% restante de los casos (Tercera Etapa), días o semanas después del traumatismo, las complicaciones sépticas y el Síndrome de Disfunción Multiorgánica (MODS), serán las principales causas de mortalidad.

El tratamiento del traumatismo grave ha seguido una serie de etapas. Hasta la década de los 60, la mayoría de los fallecimientos se producían por alteraciones hemodinámicas. A partir de entonces, comenzó a generalizarse la reposición agresiva de la volemia, lo que

permitió recuperar a muchos enfermos que hasta entonces fallecían por insuficiencia circulatoria. A pesar de esto, se observó que muchos de los supervivientes desarrollaban fracaso renal. Estudios experimentales sobre la fisiopatología de la insuficiencia renal postraumática⁽⁴⁾, llevaron a prevenir esta complicación mediante la administración de cristaloides junto con la transfusión sanguínea para mantener un volumen intravascular efectivo y así asegurar una perfusión renal adecuada. A partir de los años 70, el mejor control hemodinámico en las unidades de cuidados críticos, así como la estrategia de transporte y evacuación rápida de los accidentes, experimentados con éxito en las Guerras de Corea y Vietnam, permitió un nuevo descenso de la mortalidad de estos pacientes. Sin embargo, empezó a ser frecuente entre los supervivientes el desarrollo de insuficiencia respiratoria, que inicialmente se denominó “pulmón de shock”, y que actualmente incluimos dentro del denominado síndrome del distrés respiratorio del adulto (SDRA)⁽⁵⁾. Con la aparición del soporte ventilatorio y la introducción de la presión positiva espiratoria final (PEEP), la mayor parte de las veces se conseguía controlar la hipoxia, pero la mortalidad de los politraumatizados que desarrollaban SDRA persistía elevada como consecuencia de la asociación de fracaso de otros órganos, apareciendo un nuevo síndrome que se identificó como fracaso multiorgánico (FMO) o multisistémico⁽⁶⁾.

Así pues, desde la aparición de las unidades de cuidados intensivos, las técnicas de tratamiento del enfermo traumatizado crítico han progresado de forma espectacular; muchos pacientes que antes morían rápidamente, en la actualidad sobreviven a la crisis inicial; pero a pesar del tratamiento, el resultado final no ha mejorado en un porcentaje determinado de los mismos ya que mueren por complicaciones sépticas y FMO semanas o meses después del traumatismo⁽⁷⁾.

FRACASO MULTIORGÁNICO

1- INTRODUCCIÓN

El fracaso multiorgánico (FMO) se ha reconocido como una entidad clínica diferenciada desde hace apenas tres décadas. Desde que fue descrito, se ha mantenido como la principal causa de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos quirúrgicos, con una tasa de mortalidad que oscila alrededor del 70%. Ésta, no se ha logrado disminuir a pesar de los enormes esfuerzos en investigación para intentar determinar la fisiopatología del FMO y de los grandes avances en el manejo de pacientes críticos en los últimos años^(8,9).

2- REVISIÓN HISTÓRICA

En 1973, Tilney describe por primera vez el fracaso secuencial de múltiples órganos después de la reparación quirúrgica de aneurismas de la aorta abdominal⁽¹⁰⁾.

En 1975, Baue⁽¹¹⁾ reconoce este síndrome en pacientes con situaciones clínicas muy dispares como pancreatitis, peritonitis por perforación intestinal, y shock prolongado tras recambio valvular cardíaco.

En 1976 y 1977, respectivamente, Border⁽¹²⁾ y Eiseman⁽¹³⁾ publican su serie de pacientes en los que identifican este síndrome.

La aparición de este nuevo síndrome fue paradójicamente facilitada por el entonces reciente desarrollo de sistemas de soporte órgano-específico como diálisis renal,

ventilación asistida, monitorización hemodinámica y soporte inotrópico en el fallo cardíaco. Estas terapias mejoraron la evolución de pacientes con fracaso de un solo órgano que en otras condiciones hubieran fallecido. Otros pacientes, no sólo no mejoraron con soporte órgano-específico, sino que desarrollaron fracaso de otros sistemas; a estos pacientes se les incluyó dentro de un nuevo síndrome denominado Síndrome de Fracaso Multiorgánico o Multisistémico. Dos características comunes se observaron en este grupo de pacientes. En primer lugar, el fracaso de órganos era generalmente secuencial, no sincrónico. Inicialmente el paciente desarrollaba un fracaso pulmonar durante los tres primeros días, seguido de una disfunción hepática e intestinal, y finalmente un fracaso renal aproximadamente diez días después del insulto original. En segundo lugar, la tasa de mortalidad se correlacionaba con el número de órganos afectados, siendo letal el fracaso de cuatro órganos o más^(14, 15).

Es en 1980 cuando Fry⁽¹⁶⁾ identifica el cuadro de sepsis por Gram-negativos como el precursor más común del FMO.

Desde 1980 hasta 1985, la comunidad clínica responde inicialmente tratando a todos los pacientes con FMO como si tuvieran una infección probada, y posteriormente con tratamiento empírico cubriendo un foco de infección oculto. Aparece la laparotomía exploradora como intervención precoz para identificar y drenar abscesos abdominales, aunque el índice de sospecha fuera bajo. En 1985 Norton demuestra que estas estrategias fracasan para revertir el síndrome una vez que está establecido. La infección puede ser suficiente para iniciar el proceso aunque innecesaria para mantener el síndrome una vez instaurado⁽¹⁷⁾.

A mediados de los años 80, la disponibilidad de técnicas diagnósticas no invasivas como la tomografía computerizada, puso de manifiesto la ausencia de focos infecciosos ocultos en una no despreciable cantidad de pacientes con FMO. En 1985, Goris⁽¹⁸⁾

publica en un estudio retrospectivo de 55 pacientes traumáticos con FMO, que sólo un tercio de ellos presenta un foco de sepsis identificado con cultivos positivos en sangre. Introduce por primera vez la teoría de una inflamación generalizada como la causa del FMO.

A pesar de que el papel de la infección como causante del FMO estaba siendo cuestionado, en 1988, Marshall destacó la importancia del reservorio bacteriano del intestino como fuente de infección, considerando al intestino como el “motor” del fracaso multiorgánico⁽¹⁹⁾. Se iniciaron tratamientos antibióticos destinados a reducir el inóculo bacteriano patógeno en el intestino, aunque la descontaminación intestinal selectiva no demostró que previniera el desarrollo de FMO en pacientes de riesgo⁽²⁰⁾.

A mediados de los años 80, se identifica la molécula causante de la caquexia y necrosis tumoral, el actualmente conocido factor de necrosis tumoral (TNF_{α}), glicoproteína elaborada por las células mononucleares tras su exposición al lipopolisacárico⁽²¹⁾. Aproximadamente al mismo tiempo se identifica la Interleuquina 1 (IL_1) o pirógeno endógeno⁽²²⁾. A medida que avanzan los estudios sobre TNF e IL_1 , se confirma la presencia de concentraciones elevadas de estos mediadores en el plasma de pacientes críticos, especialmente en aquellos con cuadros sépticos⁽²³⁾. De estas observaciones surge la hipótesis de que el FMO es consecuencia de una respuesta biológica alterada, mediada por una inapropiada y excesiva secreción de mediadores inflamatorios endógenos a la circulación sistémica⁽²⁴⁾.

A mediados de los años 90 destacan dos observaciones clínicas de gran relevancia. En primer lugar, el FMO puede ocurrir después de una gran variedad de agresiones, incluyendo el traumatismo, quemaduras, sepsis, resección hepática, pancreatitis y shock. En segundo lugar, el tratamiento de lo que parece ser la causa desencadenante del FMO no necesariamente previene su desarrollo o revierte el proceso una vez iniciado⁽²⁵⁾. A la

luz de estas observaciones, y como resultado de intensos esfuerzos de investigación, se reconoce que el sistema inmune-inflamatorio juega un papel principal en la fisiopatología del FMO, y que son factores endógenos del propio huésped los que contribuyen al fallo orgánico más que factores puramente exógenos.

El papel innegable de la respuesta inflamatoria en la evolución del FMO lleva a definir un nuevo concepto, el **Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)** que identifica a la población de riesgo de desarrollar un FMO⁽²⁶⁾.

Esta hipótesis de la inflamación como causa del FMO propició el desarrollo de las terapias antimedidores. Los primeros estudios clínicos emplearon anticuerpos policlonales y posteriormente anticuerpos monoclonales dirigidos contra endotoxinas. A pesar de las expectativas optimistas preliminares^(27, 28), ninguno de los estudios clínicos que evalúan la neutralización de endotoxinas mediante anticuerpos monoclonales ha demostrado inequívocamente un beneficio^(29, 30), y al menos uno⁽³¹⁾ sugiere que este tratamiento puede ser perjudicial. Posteriormente, la atención se dirigió hacia la inmunomodulación mediante terapéuticas contra citoquinas específicas. El uso de anticuerpos antiTNF⁽³²⁻³⁴⁾ o de antagonistas del receptor de la IL₁⁽³⁵⁾ tampoco ha demostrado el esperado aumento de la supervivencia en pacientes críticos^(36, 37).

El fracaso de las terapias antimedidores ha llevado a replantearse la hipótesis sobre los mecanismos patogenéticos del FMO⁽³⁸⁾. Surge una nueva hipótesis que sostiene que la progresión del SIRS al FMO radica en la alteración en la interrelación entre órganos y la irreversibilidad que se produce tras estos cambios. La recuperación de la función de un órgano individual es necesaria, pero insuficiente para regular los mecanismos fisiológicos que mantienen la homeostasis del sistema. La estabilidad del sistema depende del número y tipo de interconexiones entre los constituyentes del mismo; la

alteración de uno de estos constituyentes puede producir resultados inesperados e incluso paradójicos⁽³⁸⁾.

Esta nueva tendencia se identifica dentro de la Teoría de los sistemas complejos no lineales⁽³⁹⁾, que se desarrolla más adelante dentro del capítulo de nuevas tendencias.

3- DEFINICIONES

Ante la disparidad de definiciones utilizadas para describir los términos sepsis, infección, SIRS y FMO, surgió la necesidad de estandarizar y simplificar la terminología; para ello, se convocó la “1991 Conference Consensus” en la que participaron expertos de la ACCP (American College of Chest Physicians) y de la SCCM (Society of Critical Care Medicine). El objetivo fue establecer unas definiciones que permitieran en la práctica clínica una mejor y más fácil identificación de la enfermedad, y una estandarización de los protocolos de investigación⁽²⁶⁾.

Hasta la “1991 Conference Consensus” el **Fracaso Multiorgánico** era descrito como un proceso estático, que estaba presente o ausente en una serie de pacientes en estado crítico ingresados en unidades de cuidados intensivos. Posteriormente se enfatiza en la naturaleza dinámica del proceso, en su cambio continuo en el tiempo⁽²⁶⁾.

El FMO describe un proceso activo de progresiva disfunción de varios órganos interdependientes; existe una compleja interrelación entre órganos individuales, de modo que la alteración de la función de un órgano implica un daño a otro órgano o sistema.

Como disfunción entendemos al fenómeno en que la función de un órgano no es capaz de mantener la homeostasis⁽⁴⁰⁾.

Se recomienda sustituir las diferentes nomenclaturas utilizadas para nombrar al FMO, por el acrónimo **MODS (Síndrome de Disfunción Multiorgánica)** que identifica la disfunción de varios órganos como un síndrome^(26, 41). Se enfatiza en la gradación de la disfunción del órgano en lugar de la irreversibilidad del fallo orgánico. Se entiende por MODS, al estado de desequilibrio fisiológico en el que las funciones de los órganos no son capaces de mantener la homeostasis.

La importancia de este nuevo concepto reside en que permite una visión más global del proceso y con ello, un reconocimiento precoz de anomalías orgánicas que permitan iniciar un tratamiento en estadios iniciales del síndrome. Así mismo, los cambios en la función del órgano son un elemento pronóstico importante; la aplicación de los diferentes “Scores” de severidad de la enfermedad sólo da una visión puntual en el tiempo de este proceso dinámico. Deberían desarrollarse sistemas capaces de cuantificar de forma continuada la disfunción de cada órgano individualmente para un mejor control evolutivo de la enfermedad⁽⁴⁰⁾.

Por otra parte, Marshall⁽⁴²⁾ destaca en una amplia revisión sobre la patogénesis del MODS, la dificultad para identificar alteraciones que son agudas y potencialmente reversibles, de aquellas que son crónicas e irreversibles, ya que muchos de los pacientes admitidos en servicios de UCI presentan enfermedades de base con algún grado de disfunción orgánica. Además, muchas de las enfermedades que propician el ingreso en UCI incluyen desórdenes que causan daño tisular directo como por ejemplo neumonías o traumatismos que provocan una lesión pulmonar aguda. Por estos motivos, y porque aún no está claro si el MODS es un único proceso patológico con expresión clínica muy variable o únicamente la expresión fenotípica de un gran número de procesos patológicos diferentes, resulta difícil identificar los pacientes que presentan un síndrome de disfunción multiorgánica^(42, 43).

El término **SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica)** describe la situación clínica resultante de la activación sistémica de la respuesta inmunitaria innata, independientemente de la causa que la provoque⁽²⁶⁾. Se manifiesta por dos o más de las siguientes condiciones, en ausencia de otras causas conocidas:

- 1- Temperatura axilar mayor de 38°C o menor de 36°C.
- 2- Frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto.
- 3- Frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto, o Presión parcial de dióxido de carbono (Pa CO₂) menor de 32 mmHg.
- 4- Leucocitosis mayor de 12000 células por mm³ o leucopenia menor de 4000 células por mm³, o más de un 10% de formas inmaduras.

Una reacción inflamatoria localizada es una respuesta fisiológica protectora que es controlada por el organismo en el lugar de la agresión. En su control participan mecanismos humorales y celulares. Las citoquinas son los mensajeros fisiológicos; y los polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales son las células efectoras de la respuesta inflamatoria. La pérdida del control local o una desmesurada activación de esta respuesta, da lugar a una exagerada respuesta sistémica identificada clínicamente como SIRS. Ante esta situación se activan unos mecanismos compensadores y el resultado final (resolución, MODS o muerte), depende del balance entre el SIRS y sus mecanismos compensadores⁽⁴⁴⁾.

Bone⁽⁴⁵⁾ propone que hay tres estadios en el desarrollo del SIRS. En el Estadio I, en respuesta al insulto inicial, se produce una respuesta inflamatoria local con activación de la triada compuesta por macrófagos, células endoteliales y producción de citoquinas. En el Estadio II, pequeñas cantidades de citoquinas llegan a la circulación para intensificar la respuesta local. La respuesta de fase aguda está simultáneamente controlada por un descenso de los mediadores pro-inflamatorios y liberación de

antagonistas endógenos. Esto continúa hasta que se consigue la reparación de las lesiones, resolución de la infección y restitución de la homeostasis. En algunas ocasiones, la homeostasis no se restablece y se desarrolla el Estadio III, que se caracteriza por una reacción sistémica masiva o SIRS. La liberación incontrolada de los mediadores inflamatorios produce la activación de diferentes fenómenos que resultan en una vasodilatación periférica generalizada, excesiva permeabilidad microvascular y formación de microtrombos, que originan cambios importantes en la fisiopatología de diferentes órganos hasta desembocar en una disfunción multiorgánica.

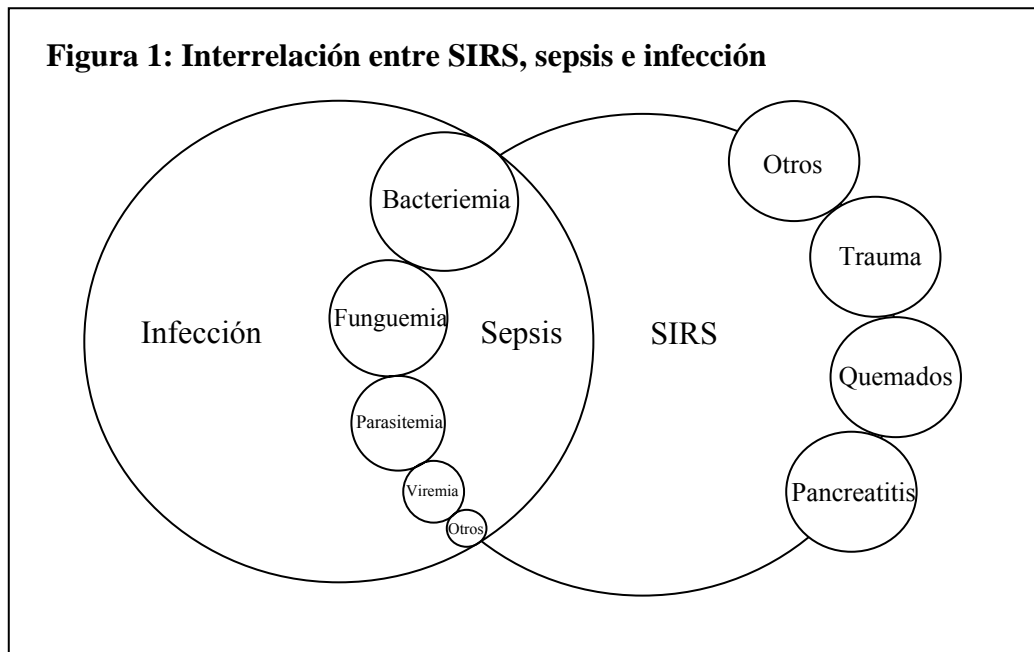
En resumen, el SIRS es una exagerada respuesta del huésped que se caracteriza por una activación generalizada de la respuesta inflamatoria en órganos remotos al insulto original. Una complicación frecuente del SIRS es el desarrollo de disfunción de diferentes órganos. Por lo tanto, el SIRS se considera un factor de riesgo para desarrollar un MODS. Dado que el SIRS es un proceso continuo, el MODS se puede entender como el final más grave de una variedad de enfermedades que se caracterizan por presentar un SIRS^(26, 46).

Se define como **infección** al fenómeno microbiológico caracterizado por la invasión de microorganismos o sus toxinas de tejidos normalmente estériles.

Se reserva el término “**sepsis**” para situaciones en que existe SIRS en presencia de un proceso infeccioso confirmado (Figura 1).

Diez años después de la “1991 Conference Consensus”, en la “2001 International Sepsis Definitions Conference”, se realiza una revisión de las definiciones, confirmándose los conceptos aprobados previamente. Se espera que en el futuro será el uso de criterios bioquímicos y/o inmunológicos (como niveles circulantes de interleuquina 6 (IL₆) o

proteína C reactiva (PCR), entre otros), los que permitan identificar la respuesta inflamatoria, en lugar de los actuales criterios clínicos⁽⁴⁰⁾.



4- HIPÓTESIS SOBRE LAS CAUSAS DEL MODS

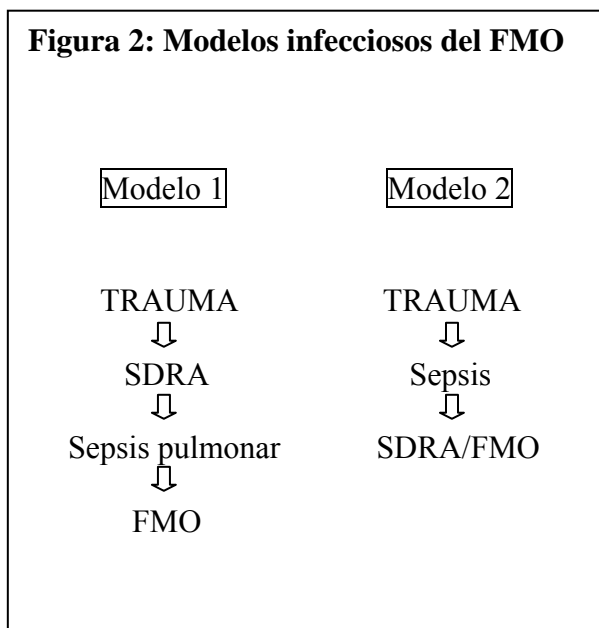
Desde que fue descrito, se han propuesto numerosas hipótesis sobre la patogénesis del MODS que han sido englobadas dentro de dos modelos principales: los modelos infecciosos y los modelos inflamatorios.

4.1- MODELOS INFECCIOSOS

Inicialmente se definió un modelo infeccioso en el que el FMO estaría causado por un foco infeccioso no tratado o tratado inadecuadamente⁽¹³⁾.

Desde finales de los 70 hasta mediados de los 80, la teoría predominante afirmaba que la infección con sepsis sistémica era la vía habitual que desencadenaba el síndrome del

distress respiratorio del adulto (SDRA) y el posterior fallo multiorgánico. Se proponían dos modelos “infecciosos” para describir cómo una variedad de agresiones traumáticas acababan desarrollando sepsis y el SDRA/FMO (Figura 2). Los primeros estudios epidemiológicos sugerían que el segundo modelo era el más común.



De las primeras observaciones realizadas durante los años 70 y principio de los 80, se llegaron a una serie de conclusiones: 1- Los factores de riesgo relacionados con el traumatismo para que se inicie tanto el SDRA como el FMO son los mismos: un traumatismo grave y la presencia de shock. 2- El SDRA puede ser causado por la agresión inicial o por una sepsis posterior, mientras que el FMO está invariablemente asociado a la sepsis. 3- Si los pacientes con un SDRA aislado empeoran clínicamente, éstos fallecerán por un FMO asociado a sepsis de inicio retardado. 4- El SDRA es un hecho inicial en el FMO y está claramente separado en el tiempo del inicio del fallo de otros órganos⁽⁴⁷⁾.

Se ha investigado en modelos animales el mecanismo mediante el cual una infección distante produce el SDRA. Entre los modelos utilizados destaca la infusión de bacterias vivas o endotoxinas, la infusión de mediadores de sepsis (Factor de necrosis tumoral), o provocando una infección local mediante ligadura cecal y posterior punción⁽⁴⁷⁾. Se ha demostrado que la hipertensión pulmonar y el aumento de la permeabilidad pulmonar con edema intersticial rico en proteínas, en ausencia de alteración en la presión de la aurícula izquierda es la clave para el desarrollo del SDRA precoz^(48, 49). El edema rico en proteínas que se detecta en el pulmón no es exclusivo de este órgano, se trata de un cuadro generalizado que se constata en las primeras horas después del traumatismo y que tiene como traducción clínica un balance positivo de líquidos, un descenso de las concentraciones séricas de proteínas y un aumento en el peso de los órganos⁽⁵⁰⁾.

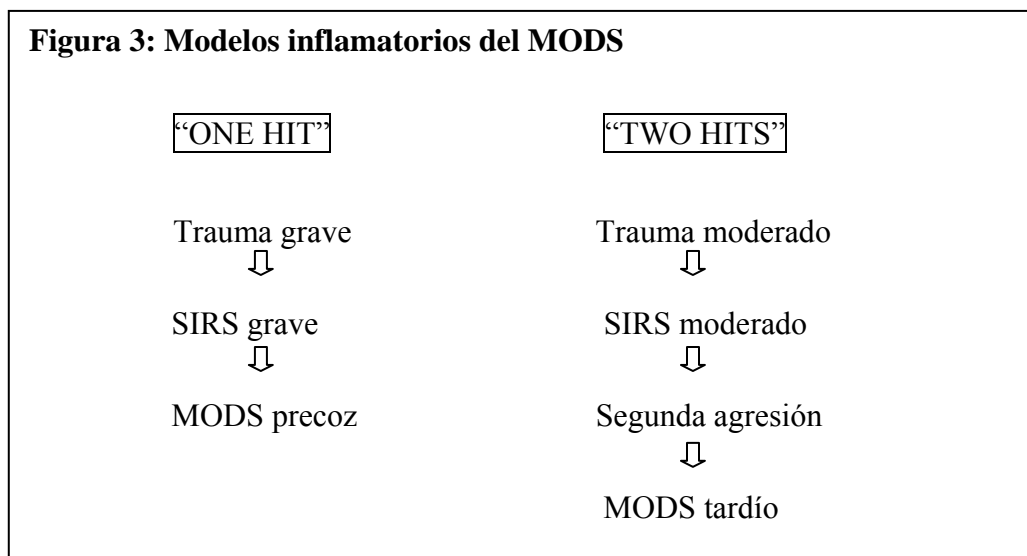
4.2- MODELOS INFLAMATORIOS

A mediados de los años 80 quedó patente que no todos los pacientes con FMO presentaban un foco infeccioso no tratado o mal tratado; en 1985 Norton publica un trabajo en el que demuestra que el drenaje de abscesos intraabdominales revierte el FMO en una proporción descorazonadoramente baja de pacientes⁽¹⁷⁾.

En los últimos años las investigaciones se han centrado en los modelos “inflamatorios” intentando averiguar cómo una agresión establece un ambiente inflamatorio que, independientemente de la infección, acaba desencadenando un MODS. En estos modelos, una gran variedad de agresiones no infecciosas precipitan un Síndrome de Respuesta Inmunitaria Sistémica (SIRS) que desencadena una disfunción de varios órganos y puede acabar provocando un MODS.

Se han postulado dos patrones distintos de aparición de MODS; el primero o “one hit” postula que una lesión masiva de tejidos y el shock, producen una intensa reacción

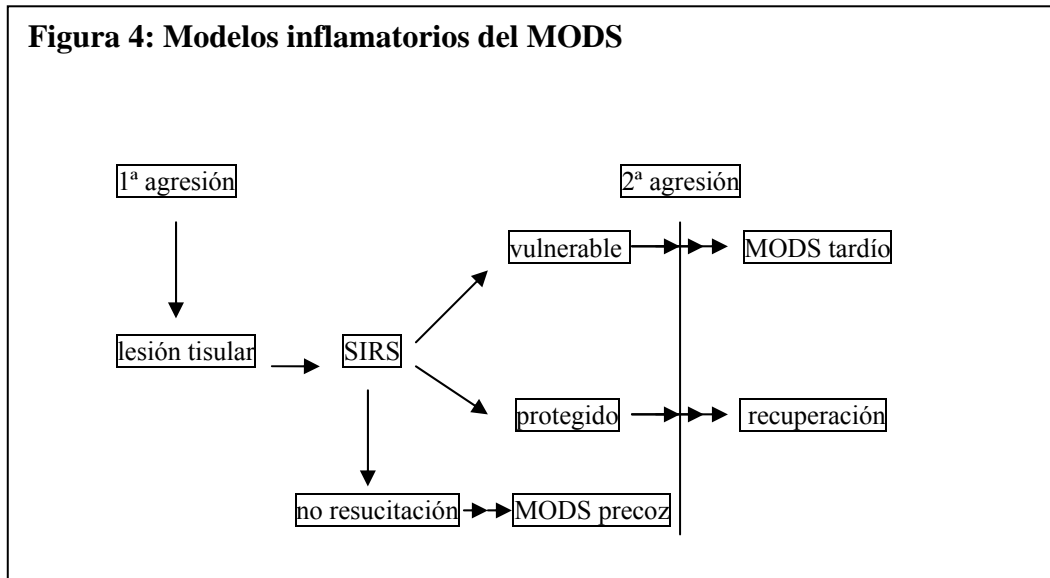
inflamatoria sistémica que desemboca en un MODS precoz. El modelo “two hits” involucra múltiples agresiones secuenciales, un paciente con un traumatismo moderado entra en un síndrome de respuesta inmunitaria sistémica (SIRS) leve pero será más vulnerable a que una segunda agresión inflamatoria magnifique el SIRS y precipite un MODS tardío (Figura 3).



Se sabe que el MODS postraumático sigue un patrón bifásico, con un fracaso orgánico precoz (no séptico) y un MODS tardío (séptico). Se cree que el MODS precoz está causado por la respuesta inflamatoria postraumática inicial (teoría del “one hit”) mientras que el MODS tardío sería precipitado por un insulto posterior (teoría del “two hits”)⁽⁵¹⁾.

Se ha demostrado que intervenciones quirúrgicas mayores realizadas en pacientes politraumáticos (a pesar de presentar estabilidad hemodinámica) pueden actuar como una segunda agresión y precipitar el síndrome de disfunción orgánica si se efectúan en pacientes con un nivel de inflamación elevado (estado vulnerable) después del primer traumatismo⁽⁵²⁾. Concretamente, la primera agresión activa la respuesta inflamatoria

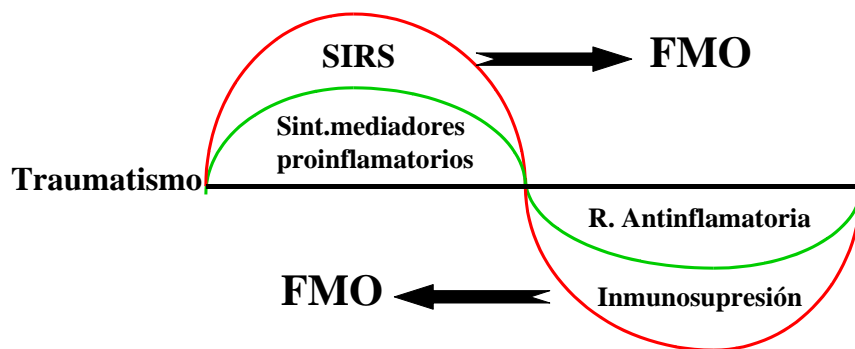
hasta que un segundo estímulo, que podría ser inocuo en otras circunstancias, inicia la respuesta exagerada a la agresión. Los indicadores de la respuesta inflamatoria (Proteína C Reactiva, elastasa de los neutrófilos y recuento plaquetar) podrían ayudar a identificar a los pacientes de riesgo de desarrollar disfunción multiorgánica. La Figura 4 esquematiza los modelos inflamatorios del MODS (teoría del “one hit” y “two hits”).



Recientemente se ha matizado la hipótesis anterior^(45, 53). El insulto original, por ejemplo un traumatismo, provoca inicialmente la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (TNF e IL₁); al llegar a un determinado nivel crítico de mediadores localmente, se produce una diseminación sistémica. Ante esto, se genera una respuesta compensadora anti-inflamatoria en un intento de regular la reacción pro-inflamatoria, y reestablecer la homeostasis. En algunos pacientes, la excesiva reacción pro-inflamatoria desencadenará una respuesta autodestructiva (SIRS) que conducirá al MODS. En otros, la exagerada respuesta anti-inflamatoria dejará al paciente en un estado de inmunosupresión, conocido también como inmunoparálisis o síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria (CARS), que conducirá también a una disfunción multiorgánica⁽⁴⁵⁾.

En este planteamiento, una cascada incontrolada de mediadores inmunes e inflamatorios inicialmente desencadenados por un agente agresor, van lo suficientemente lejos como para desencadenar una respuesta autodestructiva (Figura 5).

Figura 5: Respuesta inflamatoria disfuncional



4.3- RESPUESTA “HIPERACTIVA” A LA AGRESIÓN

La respuesta “hiperactiva” a la agresión es el centro de las tres hipótesis actuales del MODS: la hipótesis de la isquemia-reperfusión, la hipótesis de los mediadores y la hipótesis del intestino. Que sean tres hipótesis diferenciadas o tres aspectos de la misma situación es algo sobre lo que actualmente se están desarrollando las investigaciones sobre el MODS⁽⁵⁴⁾.

4.3.1- HIPÓTESIS DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

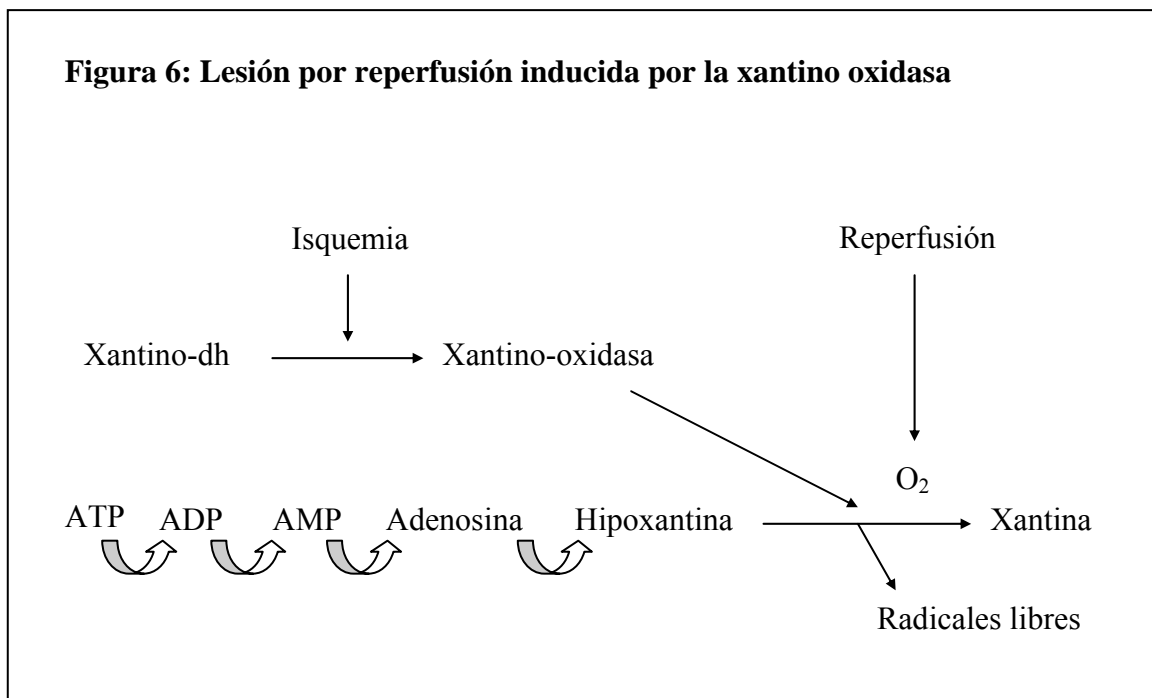
Periodos extensos de isquemia provocan muerte celular con empeoramiento de la función del órgano afecto; además, una vez restaurado el flujo sanguíneo, los tejidos lesionados inducen una respuesta inflamatoria.

Estados de bajo flujo generalizado (shock hemorrágico e hipovolémico) y otras agresiones que con frecuencia se acompañan de hipovolemia (traumatismos y grandes quemados) pueden causar directamente lesiones por isquemia-reperfusión en diferentes órganos como resultado de la hipoperfusión y posterior reperfusión de los órganos tras la resucitación^(13, 55, 56).

Durante el metabolismo oxidativo mitocondrial normal, el oxígeno molecular es reducido a agua en una sola reacción que implica a cuatro electrones. Sin embargo, el oxígeno molecular puede ser reducido en cuatro reacciones de un solo electrón cada una por una variedad de enzimas extra-mitocondriales, lo que produce tres metabolitos intermedios llamados **radicales libres**. Estos tres metabolitos son el ión radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Hay suficientes evidencias que demuestran que estos tres radicales están implicados en la lesión mucosa secundaria al shock, trauma o sepsis⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Los radicales libres se generan en reacciones catalizadas por dos enzimas llamados xantina oxidasa y NADPH oxidasa.

Se sabe que los tejidos isquémicos son vulnerables a la lesión por reperfusión mediada por la xantina oxidasa; ésta se halla presente en grandes cantidades en el endotelio capilar de numerosos tejidos como el hígado, corazón, músculo esquelético, pulmón, intestino y riñones, así como en el epitelio intestinal⁽⁶⁰⁾. En células normales esta enzima está presente en su forma deshidrogenada (xantino deshidrogenasa) y tras la isquemia, se convierte en xantina oxidasa mediante una vía proteolítica irreversible⁽⁵⁷⁾. Debido a la isquemia, los depósitos energéticos celulares están vacíos, por lo que la capacidad

para regenerar el adenosin 5-trifosfato (ATP) está reducida generando un aumento del nivel de metabolitos de la purina (adenosina e hipoxantina). Con la reperfusión, el oxígeno vuelve a estar disponible, y la oxidación de la hipoxantina a xantina dependiente de la xantino oxidasa genera una enorme cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno (peróxido de hidrógeno e ión radical superóxido), causantes de lesiones tisulares (Figura 6).



La NADPH oxidasa se halla en gránulos específicos de los neutrófilos; la reacción catalizada por esta enzima produce ión superóxido. Los neutrófilos también poseen mieloperoxidasa, que cataliza la formación de ácido hipocloroso desde el peróxido de hidrógeno y anión cloro. El ácido hipocloroso es un potente agente oxidante y clorante, que puede reaccionar con aminas primarias para formar N-cloraminas, también potentes oxidantes⁽⁶¹⁾.

Los radicales libres y los agentes oxidantes relacionados pueden lesionar las células por muchas vías diferentes, como la oxidación de grupos sulfhidrilos de las proteínas, hecho

que desencadena la inactivación de enzimas o proteínas de transporte de membrana, “cortes” del ADN, y cloración de bases purinas del ADN⁽⁶²⁾. La síntesis de ATP disminuye en células sometidas a un estrés oxidante, un fenómeno que sugiere un mecanismo constituido por dos lesiones subletales (daños producidos por radicales libres precedido o seguido de hipoxia intracelular) que actúan de manera sinérgica para dañar irreversiblemente la célula⁽⁶³⁾.

Dado que las células están continuamente expuestas a bajos niveles de agentes oxidantes, los tejidos poseen una amplia gama de defensas consistentes en enzimas que degradan los radicales libres y derivados. La superóxido dismutasa cataliza la conversión del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (O₂). La catalasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno a agua (H₂O) y O₂. Finalmente, la glutatión peroxidasa cataliza la oxidación del glutatión reducido a glutatión oxidado usando peróxido de hidrógeno, el cual transforma en agua. Se supone que el daño de los radicales libres a la célula se inicia cuando estos sistemas son sobrepasados por una excesiva producción de agentes oxidantes.

Actualmente se está estudiando el papel de los polimorfonucleares (PMN) en este proceso, puesto que se ha demostrado que la isquemia-reperfusión activa la fosfolipasa A₂ independientemente de la xantina oxidasa, y ésta a su vez, libera factor activador plaquetar y otros eicosanoides que actúan como factores de quimiotaxis para los PMN⁽⁶⁴⁾. Los neutrófilos circulantes son atraídos, se adhieren y transmigran a través de las células endoteliales, tras este proceso los neutrófilos son activados para producir oxidantes, proteasas y citoquinas que son los responsables del daño tisular.

Recientemente se conoce que, si bien los oxidantes se derivan inicialmente del oxígeno mediante el proceso mediado por la xantina oxidasa, posteriormente son generados por los neutrófilos activados⁽⁵⁶⁾.

Los oxidantes pueden ocasionar un daño tisular directamente o bien, mediante la activación de las células endoteliales, inducir la liberación de los productos derivados de la activación de los neutrófilos (oxidantes, proteasas y citoquinas). La producción de citoquinas atrae a células mononucleares que son capaces de una producción adicional de citoquinas y activación de neutrófilos. El vertido de estas citoquinas producidas localmente y de los neutrófilos activados a la circulación sistémica debido al aumento de la permeabilidad microvascular, produce un daño tisular remoto (por exceso de citoquinas pro-inflamatorias, excesiva reacción anti-inflamatoria compensadora o imbalance entre ambas)⁽⁴⁵⁾.

Las lesiones intestinales por isquemia-reperfusión pueden producir lesiones a órganos distantes⁽⁶⁵⁾. El pulmón parece ser un órgano especialmente sensible para que un proceso inflamatorio iniciado en otro órgano, básicamente el intestino que sufre una exagerada vasoconstricción esplácnica tras un traumatismo, actúe como “iniciador” de una respuesta inflamatoria que lo alcanzará posteriormente⁽⁴⁷⁾. Se ha desarrollado un modelo experimental para comprobar esta hipótesis basado en la oclusión de la arteria mesentérica superior durante 45 min; a partir de este modelo se ha llegado a las siguientes conclusiones: 1) La actividad de la fosfolipasa A₂ del intestino está aumentada produciendo liberación de factores de quimiotaxis para los PMN. 2) Los PMN circulantes están activados con importante liberación de radicales libres. 3) Los PMN están secuestrados en el pulmón. 4) Existe una permeabilidad microvascular pulmonar aumentada⁽⁵⁹⁾.

El secuestro de PMN en órganos vitales es la causa principal de liberación de mediadores de la inflamación, este secuestro tiene lugar en la primera hora tras el traumatismo⁽⁵⁸⁾. Esta “leucostasis” en el pulmón es el principal hallazgo morfológico que puede encontrarse en la fase inicial del shock. Relacionado con este secuestro puede observarse una grave alteración de las células endoteliales asociado a la hipoxia, a la lesión por reperfusión o al daño directo que causan los PMN a través de la liberación de mediadores como radicales libres de oxígeno y proteasas (elastasa, colagenasa...)⁽⁶⁶⁾.

4.3.2- HIPÓTESIS DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS: CITOQUINAS.

La falta de pruebas concluyentes de la infección como exclusiva causa de desarrollo de MODS, unido a los avances en biología molecular y a la mejor comprensión de las bases biológicas de la agresión e inflamación, condujo a la hipótesis de la participación de los macrófagos en el inicio y mantenimiento del MODS. En esta hipótesis, la lesión orgánica y el MODS se deben a una producción y liberación incontrolada de **citoquinas** y otros productos de los macrófagos activados⁽⁶⁷⁾.

Las **citoquinas** son sustancias que actúan como señales intercelulares no específicas y mediante las cuales, células activas pueden “reclutar” a otras células e incluso en algunas situaciones, controlar procesos fisiológicos mayores. Se distinguen de otros mediadores inmunes mayores (como las inmunoglobulinas) en que operan a concentraciones extremadamente bajas y en su falta de especificidad para antígenos. Suelen actuar localmente o en la vecindad de las células del interior de un tejido, sintetizándose de “novo” ante una estimulación⁽⁶⁸⁾.

Existe un grupo de citoquinas producidas principalmente por los macrófagos activados que son pro-inflamatorias, este grupo incluye la interleuquina 1 (IL₁), interleuquina 6 (IL₆), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón alfa (IF_α) y beta (IF_β), así como la interleuquina 8 (IL₈).

Las citoquinas se caracterizan por: la interdependencia, la pleiotropía (tienen múltiples efectos), y la redundancia (existen múltiples citoquinas con el mismo efecto)⁽³⁹⁾. Los efectos de unas citoquinas pueden inhibir o amplificar los efectos de otras, por ejemplo, el TNF_α y la IL₁ tienen acción sinérgica, mientras que la IL₁₀ disminuye los niveles séricos de TNF_α e IL₁⁽⁶⁹⁾. Además, los efectos de las citoquinas pueden variar según sus concentraciones, por ejemplo, TNF_α causa neutrofilia a dosis bajas y neutropenia a altas dosis en humanos sanos⁽⁷⁰⁾.

En condiciones normales, ante una agresión, se inicia una respuesta inflamatoria no específica contra los tejidos desvitalizados y las bacterias contaminantes hasta que las respuestas inmunes específicas tienen lugar. Los productos antigénicos derivados de microorganismos patógenos o procedentes de la destrucción tisular activan los mecanismos de defensa del huésped, éstos incluyen factores solubles en plasma (cascadas del complemento y de la coagulación) y componentes celulares inmunocompetentes (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales). Estas células activadas son las que producen mediadores potencialmente tóxicos (TNF e IL₁) y otras sustancias químicas como quininas, eicosanoides, factor de activación plaquetar (PAF) y óxido nítrico. La presencia de pequeñas cantidades de citoquinas en la circulación sistémica es normal y beneficiosa, forma parte de la respuesta del huésped a la agresión⁽⁴⁵⁾. Se han documentado concentraciones séricas bajas de citoquinas en voluntarios sanos⁽⁷¹⁾, así como en una variedad de enfermedades crónicas y otras

condiciones que no condicionan una disfunción multiorgánica como alcoholismo, diabetes insulino dependiente, edad avanzada y ovulación entre otros⁽⁴⁵⁾. Tal y como ya se ha descrito anteriormente, la liberación masiva e incontrolada de estos mediadores producirá una respuesta inflamatoria sistémica desmesurada que desencadenará una disfunción multiorgánica y la muerte.

Es sabido que las citoquinas pro-inflamatorias juegan un papel primordial en la regulación de la respuesta inflamatoria, demostrado por el hecho de que la administración de TNF e IL₁ reproducen un síndrome indistinguible de la respuesta sistémica a una infección grave. Estudios de cohortes en pacientes críticos demostraron que niveles circulantes altos de citoquinas como TNF e IL₆^(72, 73) o marcadores de elevada liberación de TNF en respuesta al estímulo inflamatorio^(74, 75) están asociados a disfunción orgánica y a riesgo incrementado de muerte.

La complejidad de las interacciones entre citoquinas hace difícil establecer protocolos de tratamiento dirigidos al bloqueo de esta respuesta sistémica descontrolada que se produce tras un traumatismo o una sepsis⁽⁷⁶⁾. No se ha podido demostrar el efecto beneficioso de la terapia anticitoquina, sobre todo si ésta se administra una vez iniciada la cascada pro-inflamatoria. Los resultados de una revisión de más de 24 estudios utilizando terapias antimedidores han sido decepcionantes, no sólo no han obtenido beneficios, sino que en algunos casos se han relacionado con efectos adversos⁽⁷⁷⁾.

La hipótesis de las citoquinas como mediadores del MODS tiene aspectos muy atractivos, ya que clarifica la paradoja clínica de no encontrar foco infeccioso en un porcentaje relativamente alto de pacientes aparentemente sépticos con MODS. El concepto de una respuesta inflamatoria incontrolada como inductora del fallo

multiorgánico, permite explicar el mecanismo por el cual este síndrome es desencadenado por causas no infecciosas como la pancreatitis grave, la lesión por quemaduras y el politraumatismo⁽⁶⁷⁾.

4.3.3- HIPÓTESIS DEL INTESTINO: TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

4.3.3.1- TRANSLOCACIÓN BACTERIANA: PERSPECTIVA HISTÓRICA

Hacia finales del siglo XIX y principios del XX, se publicaron trabajos que sugerían cuadros de peritonitis resultantes de la invasión de la cavidad peritoneal por gérmenes procedentes de órganos adyacentes al peritoneo o cubiertos por el mismo, sin una perforación intestinal previa. En 1891 se demostró “in vivo” que bacterias viables podían atravesar una pared intestinal intacta⁽⁷⁸⁾. En 1895 se publica que cocos grampositivos atraviesan la mucosa intestinal intacta⁽⁷⁹⁾. Mientras que la mayoría de los investigadores de principios de siglo pensaban que la translocación era un proceso patológico, en 1926 se sugiere la posibilidad de que sea un hecho normal que sólo ocasionalmente se convierte en patológico⁽⁸⁰⁾. Hacia la misma época se propone también la malnutrición como un factor causante de la translocación⁽⁸¹⁾. La primera migración de bacterias gramnegativas se describe en un modelo experimental de 1928⁽⁸²⁾. Más de 20 años más tarde se demuestra que la viabilidad de las bacterias no es un requisito indispensable para su translocación⁽⁸³⁾.

Jacob⁽⁸⁴⁾ y Fine⁽⁸⁵⁾ son los primeros autores que, en la década de los 50-60, investigaron extensamente la aparente relación entre la mortalidad por shock traumático y la endotoxemia sistémica de origen intestinal. En su modelo de shock, el intestino fue considerado como el origen de endotoxinas y de bacterias gramnegativas invasivas. Se

postuló que un fallo en el sistema reticuloendotelial para eliminar las endotoxinas entéricas, asociado a una caída de los sistemas de defensa antibacterianos eran la causa de la irreversibilidad del shock hemorrágico⁽⁸³⁻⁸⁶⁾. Sin embargo, esta teoría fue desacreditada y permaneció en el olvido durante casi 20 años.

En 1979, Berg y Garlington⁽⁸⁷⁾ publican el trabajo que servirá de punto de partida a la extensa investigación clínica y de laboratorio desarrollada en los últimos 20 años. Definieron la translocación bacteriana como el paso de bacterias viables a través del epitelio mucoso hacia la lámina propia y posteriormente hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, y posiblemente hacia otros órganos a distancia. Posteriormente se modificaría la definición, entendiendo como translocación bacteriana el paso de bacterias viables o no y de sus productos, como endotoxinas, a través de una barrera intestinal anatómicamente intacta⁽⁸⁸⁾.

4.3.3.2- LA TEORÍA DEL INTESTINO

Con el reconocimiento de que el MODS es un proceso sistémico con alteraciones fisiológicas similares a la sepsis, se ha propuesto la idea de que el MODS es el resultado y la expresión de un foco séptico oculto^(16, 89). Sin embargo, en un 30% de los casos de pacientes que fallecen por MODS, y que presentan cultivos positivos en sangre, no se encuentra el origen de la sepsis⁽⁹⁰⁾. Estas observaciones clínicas y un gran número de estudios experimentales realizados indican que el intestino puede ser el reservorio de la bacteriemia sistémica y/o endotoxemia que se evidencian en enfermos críticos, y es lo que ha motivado a algunos autores a llamar al intestino el “motor” del MODS⁽⁹¹⁾. El intestino actúa como un “absceso no drenado”⁽⁹²⁾, responsable del inicio de la cadena de eventos inflamatorios que culminan en un estado séptico y la muerte.

La teoría del intestino como “motor” del MODS se basa en la idea de que las endotoxinas y bacterias translocadas llegan a los macrófagos hepáticos y esplénicos activándolos e iniciando así la liberación de mediadores que pueden desencadenar o perpetuar la respuesta hipermetabólica y pro-inflamatoria⁽⁹³⁾.

Un considerable número de trabajos experimentales han sido desarrollados para investigar si el traumatismo^(94, 95), el shock hipovolémico⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾ y las quemaduras⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ se acompañan de translocación bacteriana; la mayoría de ellos demuestran translocación a los ganglios mesentéricos. Sin embargo, la presencia de bacterias en los ganglios mesentéricos puede reflejar tan sólo un normal funcionamiento fisiológico del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), que está básicamente compuesto por Inmunoglobulina A intestinal (que inhibe la interacción de la bacteria con el epitelio mucoso reduciendo la penetración bacteriana) y por macrófagos y células T (que proporciona una segunda línea de defensa), situados en la lámina propia intestinal y en los ganglios mesentéricos. En la mayoría de estos estudios experimentales las bacterias son raramente aisladas en sangre periférica, una posible explicación es que el hígado posee un mecanismo de defensa a través de los macrófagos portales, capaz de destruir los microorganismos. Se ha propuesto, pero aún no está probado, que la eliminación de los microorganismos por el tejido macrofágico hepático puede ser un arma de doble filo, ya que los macrófagos activados por los gérmenes responderán con la producción de citoquinas, que como se ha mencionado anteriormente contribuirá a la génesis del MODS⁽⁹³⁾.

Para entender el concepto de translocación bacteriana y su papel en la génesis del fracaso orgánico es indispensable, en primer lugar, entender la fisiología del intestino y cómo puede perderse la función natural de barrera que posee.

4.3.3.3- LA BARRERA INTESTINAL

El tracto intestinal normal contiene en condiciones normales unas 10^{12} bacterias, de las cuales 10^9 son gramnegativos entéricos potencialmente patógenos, así como endotoxina suficiente para matar al huésped varias veces⁽¹⁰²⁾. Es una función fisiológica normal mantener las bacterias y endotoxinas dentro de la luz intestinal mientras se absorben los nutrientes. En la barrera intestinal participan cuatro componentes: la flora comensal normal, factores mecánicos, un sistema inmunitario intacto y el eje entero-hepático⁽²⁵⁾.

Flora comensal normal: Las bacterias anaerobias intestinales superan en una proporción de 1/100 a 1/1000 a las gramnegativas⁽¹⁰²⁾ y están colocadas más cerca del epitelio intestinal, limitando la posibilidad de adherencia al epitelio de los gérmenes gramnegativos potencialmente patógenos así como su sobrecrecimiento. Alterando la flora normal mediante antibióticos de amplio espectro, a los a que los anaerobios son extremadamente sensibles, esta acción beneficiosa se pierde, facilitándose la adherencia de las bacterias al epitelio, y por ende, su translocación⁽¹⁰³⁾.

Factores mecánicos: La capa mucosa, cuyo componente principal es la mucina (glicoproteína de alto peso molecular) y la inmunoglobulina secretoria IgA, provee un ambiente óptimo para el crecimiento y fijación de los anaerobios. Las alteraciones en esta capa propiciarán un sobrecrecimiento y una mayor adhesividad de las bacterias patógenas⁽²⁵⁾.

El peristaltismo normal es otro importante factor mecánico de defensa. El íleo paralítico, al producir estasis del contenido intestinal, incrementa el porcentaje de bacterias capaces de penetrar la capa mucosa y adherirse al epitelio intestinal. Se ha demostrado que un peristaltismo disminuido, como el que se produce en las oclusiones intestinales, se asocia a translocación bacteriana⁽¹⁰⁴⁾.

La barrera celular del intestino delgado está constituida por una capa de células en forma de epitelio columnar simple (enterocitos), entre las cuales se hallan células especializadas como las células caliciliares, linfocitos y células de Paneth. Los enterocitos se unen entre sí mediante desmosomas y "tight junctions", que permiten el paso de pequeñas moléculas pero no el de grandes moléculas o bacterias⁽¹⁰⁵⁾.

Este epitelio es muy sensible a estímulos agresores entre los cuales cabe destacar la isquemia-reperfusión. En condiciones normales el intestino recibe el 20% del gasto cardíaco, y está regulado por el sistema nervioso y sustancias circulantes como la vasopresina, angiotensina II, óxido nítrico y otros⁽¹⁰⁶⁾. Durante episodios de shock hipovolémico o cardiogénico, la sangre es derivada hacia órganos vitales como el corazón o cerebro a expensas de la circulación esplácnica; al estar disminuida la disponibilidad de oxígeno, se desencadena un complejo proceso que desemboca en una lesión histológica proporcional a la duración e intensidad del episodio isquémico⁽²⁵⁾. La lesión y alteración de la barrera intestinal propicia la translocación de bacterias y endotoxinas al torrente circulatorio.

Sistema inmunitario (GALT): El sistema inmunitario asociado al intestino está compuesto por linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia, folículos linfoides, placa de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos e IgA. Del correcto funcionamiento de todos ellos y de su interrelación depende que no se produzca translocación bacteriana⁽¹⁰⁷⁾. La secreción de IgA en la pared intestinal permite que establezca uniones con receptores de la pared bacteriana, impidiendo así la unión de las bacterias al enterocito⁽²⁵⁾.

Eje Entero-hepático: Las sales biliares se unen a las endotoxinas a nivel endoluminal formando complejos poco absorbibles que limitan la translocación. Este proceso no es efectivo al 100% y de hecho, algunos estudios han demostrado que pequeñas cantidades de endotoxinas pasan normalmente a la sangre portal manteniendo el sistema

reticuloendotelial activado⁽¹⁰⁸⁾. Además, se ha documentado experimentalmente que la ausencia de sales biliares en el interior del intestino promueve la translocación bacteriana así como la endotoxemia^(109, 110).

Se ha descrito alteración de cada uno de estos cuatro componentes de la barrera intestinal en pacientes críticos. Estos pacientes están a menudo inmunodeprimidos, y suelen recibir antibióticos de amplio espectro que alteran la flora intestinal. El íleo paralítico es frecuente, aumentando el crecimiento bacteriano intestinal. Además, las dietas hiperosmolares entéricas o la nutrición parenteral producen alteración de la ecología normal del intestino y empeoran las defensas de la barrera intestinal. Frecuentemente hay periodos de hipotensión o administración de drogas vasoactivas que disminuyen la perfusión esplácnica, producen isquemia mucosa y disrupción de la barrera. Existe en estos pacientes hipoalbuminemia, con síndrome de fuga capilar y edema intestinal que preceden al íleo paralítico y aumento de la permeabilidad intestinal. Finalmente, el fallo hepático empeora el “clearance” de endotoxinas, pasando éstas a la circulación sistémica. Todos y cada uno de estos factores contribuyen a la translocación bacteriana.

4.3.3.4- MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN

Un pequeño número de bacterias translocan normalmente desde el tracto gastrointestinal incluso en huéspedes inmunocompetentes⁽¹¹¹⁾. Estas bacterias translocadas son eliminadas “in situ” por los órganos linfoides del sistema retículo-endotelial, de forma que los órganos linfoides extraintestinales permanecen estériles. En estudios animales, la confirmación de translocación bacteriana se realiza mediante cultivo de bacterias en

los ganglios linfáticos mesentéricos, sangre portal o periférica o mediante detección de endotoxina de sangre portal o periférica.

Existen factores dependientes de los microorganismos y del propio huésped que influyen en la incidencia de translocación bacteriana. Se han identificado tres mecanismos que promueven la translocación de bacterias endógenas desde el tracto gastrointestinal que se describen a continuación:

Sobrecrecimiento bacteriano: La translocación bacteriana hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), el primer órgano en la ruta de la translocación desde la luz intestinal, está facilitada por un sobrecrecimiento bacteriano⁽¹¹²⁾. De hecho, el grado de translocación de ciertas especies de enterobacterias hacia los GLM está directamente relacionado con sus niveles en el intestino delgado y ciego⁽¹¹³⁾. No todas las especies de la flora indígena translocan con la misma eficacia⁽¹¹⁴⁾. Se ha observado que *Pseudomona Aeruginosa*, y enterobacterias como *Klebsiella Pneumoniae*, *E. Coli* y *Proteus Mirabilis* son los gérmenes con mayor facilidad para translocar y son los mismos que causan gran proporción de sepsis en pacientes debilitados. En cambio, las bacterias anaerobias estrictas como *B.Fragilis*, *B.Vulgatus* y *F. Rusii*, que colonizan el tracto gastrointestinal a altas concentraciones, son las menos eficientes en la translocación⁽¹¹¹⁾. Estas últimas juegan un papel preventivo evitando la colonización de potenciales bacterias patógenas (Gramnegativos aeróbicos facultativos).

Se ha observado que el mecanismo de translocación de las bacterias indígenas es intracelular, cruzando la mucosa a través del interior de las células epiteliales por un mecanismo de internalización diferente a la fagocitosis clásica (sin atravesar las placas de unión existentes entre los enterocitos o “tigh junctions”)⁽⁸⁸⁾. Una vez en la lámina propia, las bacterias translocadas viajan por vía linfática hacia los GLM. Si el epitelio intestinal o las “tigh junctions” están dañados, las bacterias atraviesan la barrera por las

zonas lesionadas, esta translocación se produce por vía sanguínea alcanzando el hígado y diseminándose sistémicamente⁽⁶¹⁾.

El sobrecrecimiento bacteriano puede ocurrir en pacientes que reciben antibióticos por vía oral, esto produce una alteración del equilibrio biológico intestinal que permite tanto el crecimiento de bacterias endógenas normalmente resistentes al tratamiento antibiótico, como la colonización por bacterias más patógenas no indígenas. En un modelo experimental, la administración por vía oral de penicilina, metronidazol o clindamicina a ratones, reduce la población cecal de anaerobios obligados mientras que permite el sobrecrecimiento de enterobacterias. Al finalizar la administración de antibióticos, las poblaciones de gérmenes cecales vuelven a sus niveles normales, cesando la translocación de enterobacterias hacia los 30 días de la suspensión del tratamiento⁽¹⁰³⁾.

Situaciones clínicas que también propician el sobrecrecimiento bacteriano son la administración de una dieta exclusivamente líquida o bien la nutrición parenteral⁽¹¹⁵⁾.

Deficiencia de las defensas inmunitarias del huésped: En prácticamente todos los modelos animales de translocación, las bacterias son detectadas en los GLM antes que en cualquier otra localización. Los macrófagos de los GLM están estratégicamente colocados para reducir la translocación desde el tracto intestinal. Es normal hallar bacterias en los ganglios linfáticos mesentéricos (función fisiológica del GALT), en cambio, es raro hallar cultivos positivos en sangre periférica. Esto es debido a que los macrófagos del hígado y pulmón son un mecanismo de defensa del huésped que elimina los microorganismos de la sangre portal y de la sangre venosa central. Los macrófagos localizados en el hígado además de eliminar microorganismos mediante fagocitosis, resultan activados por éstos, lo que origina la producción de citoquinas.

Todos los componentes del sistema inmunitario del huésped están involucrados en su defensa, incluyendo la inmunidad de la mucosa (inmunoglobulina secretoria IgA), inmunidad celular (macrófagos y células T) e inmunidad humoral (inmunoglobulinas séricas):

Se cree que la Ig A inhibe la interacción de la bacteria y el epitelio mucoso reduciendo así la penetración bacteriana⁽¹¹⁶⁾. Se ha demostrado que es capaz de unir y agregar bacterias, función denominada “exclusión inmune”, mecanismo a través del cual se postula que inhibe la translocación bacteriana⁽¹¹⁷⁾.

La inmunidad celular (macrófagos y células T) proporcionan una segunda línea de defensa localizada en la lámina propia y en los órganos linfoides (ganglios linfáticos mesentéricos). La administración de agentes inmunosupresores como ciclofosfamida o prednisona en ratones, promueve la translocación de bacterias hacia los GLM, bazo, hígado y riñones⁽¹¹⁸⁾. Así mismo, la timectomía en ratones neonatos también facilita la translocación⁽¹¹⁹⁾. El papel concreto de los linfocitos T se ha investigado a través de la administración de anticuerpos monoclonales contra estas células. La depleción completa de CD4 y/o CD8 en el epitelio intestinal, la lámina propia y los GLM se ha demostrado que promueve la translocación de E.Coli hacia los GLM⁽¹²⁰⁾. Sin embargo, los linfocitos T no son capaces de destruir las bacterias directamente, las células encargadas de ello son los macrófagos y/o polimorfonucleares mediante su función de fagocitosis.

Finalmente, las inmunoglobulinas plasmáticas actúan como opsoninas que incrementan la efectividad de la fagocitosis por macrófagos y polimorfonucleares y la subsiguiente eliminación de bacterias. Se ha demostrado que la administración endovenosa de IgG contra E.Coli reduce la diseminación del germen a órganos extraintestinales, aunque no reduce la translocación bacteriana desde el intestino hacia los ganglios linfáticos mesentéricos⁽¹²¹⁾.

Lesión de la mucosa intestinal: La función primaria de la mucosa es la digestión y absorción de nutrientes; sin embargo, la mucosa sirve también como un importante mecanismo de barrera que ayuda a prevenir la diseminación sistémica de los microorganismos que colonizan el intestino. Tanto en modelos experimentales como en humanos, la función de barrera del tracto gastrointestinal puede verse afectada por varias agresiones induciendo translocación bacteriana, entre las que se incluyen el shock hemorrágico^(96, 122), oclusión intestinal^(123, 124), inmunosupresión^(118, 125), lesiones por quemaduras^(100, 101), traumatismos^(94, 95), infecciones bacterianas⁽¹²⁶⁾, lesiones por radiación⁽¹²⁷⁾, modelos asépticos de inflamación^(128, 129), endotoxemia⁽¹³⁰⁾ y pancreatitis⁽¹³¹⁻¹³³⁾.

Existen diferentes factores que contribuyen a la lesión de la mucosa intestinal como la hipoxia intracelular de la mucosa; los radicales libres de oxígeno y productos de la activación de los neutrófilos; citoquinas y mediadores lipídicos; y la nutrición:

En situaciones de bajo gasto (shock hipovolémico o cardiogénico) la perfusión del territorio esplácnico decrece considerablemente produciéndose una situación de hipoperfusión en la mucosa intestinal (isquemia) que conlleva a un daño tisular y disfunción orgánica⁽¹³⁴⁾. Así mismo, en modelos experimentales se ha documentado un marcado descenso del flujo sanguíneo mesentérico durante el episodio de hipotensión que se produce en el shock séptico⁽¹³⁵⁾.

Numerosos trabajos han demostrado que los radicales libres están implicados en la lesión tisular asociada a la reperfusión de un intestino isquémico, así como en la lesión intestinal por sepsis y endotoxemia. De hecho, el intestino es uno de los órganos más afectados en los modelos experimentales de sepsis por gramnegativos y endotoxemia. La infusión en animales de experimentación de E.Coli viables o de lipopolisacáridos purificados provoca la aparición de lesiones histológicas en el intestino, que van desde

el edema de la submucosa con leve descamación epitelial en los extremos de los villis, hasta la franca ulceración y hemorragia^(130, 136-139). Aunque faltan datos sobre el papel de los radicales libres en la lesión intestinal por sepsis, se ha demostrado que la endotoxina incrementa la actividad de la xantina oxidasa a nivel ileal^(137, 138).

La lesión intestinal también está ocasionada por mediadores de la inflamación como las citoquinas. Entre otros, se ha implicado en la lesión tisular tras agresión al factor activador plaquetar, tromboxano A₂, leucotrienos y fosfolipasa A₂.

Existen diferentes investigaciones sobre la relación entre translocación bacteriana y nutrición; la cantidad, composición y vía del soporte nutricional tienen una profunda relación con la integridad de la barrera mucosa⁽¹⁴⁰⁾. La combinación de malnutrición proteica o un ayuno prolongado con otra agresión desencadena una translocación bacteriana; por sí solos, ni el ayuno de corta duración ni la malnutrición proteica estimulan la translocación, es preciso añadir otro estímulo agresor para que se produzca⁽¹⁴¹⁾.

Autores como Wilmore⁽¹⁴²⁾ y Souba⁽¹⁴³⁾ han realizado diversos estudios en los que se contempla el déficit de glutamina como uno de los factores causales más importantes de la atrofia y posible lesión funcional de la barrera mucosa intestinal. La glutamina es un aminoácido que es utilizado como fuente principal de energía por el epitelio intestinal, el mayor consumo de glutamina tiene lugar en el epitelio que tapiza las vellosidades intestinales. La glutaminasa intestinal hidroliza la glutamina a glutamato (que es utilizado como fuente de energía) y amoníaco. Se cree que el tejido linfoide intestinal participa en la elevada extracción circulatoria intestinal de glutamina. En el curso de procesos graves la disponibilidad de glutamina puede verse seriamente reducida. Por una parte, la glutamina no se encuentra como componente de las soluciones de nutrición parenteral por ser un aminoácido inestable que no tolera periodos prolongados de

almacenamiento en soluciones convencionales. Por otra, la extracción intestinal de glutamina está disminuida en la sepsis probablemente por influencia del glucagón y del cortisol. Por estos motivos, Herskowitz y Souba⁽¹⁴⁴⁾, en una amplia revisión publicada sobre el tema, sostienen que en paciente críticos tratados con nutrición parenteral, la mucosa intestinal, privada de un metabolito energético fundamental, se atrofia o se lesiona, favoreciéndose así el fallo de la barrera intestinal y la translocación de bacterias y endotoxinas.

No sólo la glutamina ha despertado el interés en relación a los problemas metabólicos de la mucosa intestinal en los pacientes graves. Los ácidos grasos de cadena corta, producidos en la luz colónica a partir de carbohidratos no digeribles, también son considerados como factor trófico y fuente energética importante para los enterocitos⁽¹⁴⁵⁾. Su deficiencia, secundaria a una nutrición parenteral exclusiva o enteral sin fibra, podría perjudicar al epitelio intestinal, especialmente al colónico, y favorecer la translocación bacteriana.

En diferentes modelos animales experimentales se ha demostrado que la nutrición parenteral facilita la translocación bacteriana. Se ha intentado determinar la relación entre atrofia intestinal provocada por la nutrición parenteral y la translocación, siendo los resultados muy controvertidos. Parece bastante claro que a pesar de que se desarrolla una atrofia intestinal tras la nutrición parenteral, ésta no parece estar relacionada con la translocación⁽¹⁴⁶⁾. En cambio, sí se evidencia una permeabilidad intestinal a las macromoléculas aumentada, y este hecho sí se podría correlacionar con la translocación bacteriana⁽¹⁴⁰⁾.

4.4- TENDENCIAS ACTUALES

Actualmente se están evaluando hipótesis que intentan conjugar los tres aspectos fundamentales en la génesis del MODS; la isquemia y la posterior reperfusión del intestino actuarán como proceso inflamatorio, induciendo al tejido linfático asociado al intestino a producir y liberar citoquinas y otros factores del sistema inmune-inflamatorio incluso en ausencia de bacteriemia portal detectable. Además hay crecientes evidencias de la activación de los neutrófilos a nivel intestinal, responsables de la lesión a órganos distantes (sobretudo pulmón) si son captados por la microcirculación y liberan sus productos tóxicos. Por otra parte, la translocación de bacterias y endotoxinas serán responsables de la liberación de mediadores inflamatorios sistémicos al activar los macrófagos hepato-esplénicos.

Estas nuevas teorías que implican al intestino como un órgano generador de citoquinas, activador de neutrófilos y generador de oxidantes, sugiere que el tracto gastrointestinal bajo “estrés” puede contribuir al desarrollo del MODS mediante la liberación directa de mediadores sistémicos así como a través del proceso de translocación bacteriana.

Recientemente, teorías más innovadoras, identifican al MODS como un prototipo de la TEORÍA DE LOS SISTEMAS COMPLEJOS NO LINEALES⁽³⁹⁾. Según estas tendencias, cometemos un error de concepto al suponer que los sistemas biológicos siguen un sistema *determinístico* o lineal, en el cual para una misma variación de la causa, se obtiene siempre la misma variación del efecto. Un sistema *no lineal* es aquel en que sus componentes no son la simple suma o multiplicación de las variables, sino que las ecuaciones que lo definen incluyen en su formulación productos y potencias de las variables del sistema^(38, 39). Estos sistemas se caracterizan porque mínimas variaciones en sus parámetros iniciales conllevan resultados finales completamente

divergentes e impredecibles, además, alteraciones en ciertas variables pueden variar las relaciones entre otras variables.

Los sistemas no lineales, a diferencia del mundo de la física, son la regla en los sistemas biológicos. La progresión de un SIRS a MODS implica necesariamente la interconexión entre varios órganos, siguiendo un modelo no lineal. Así, el MODS se caracteriza por una compleja y exagerada respuesta del huésped que surge de la interrelación entre mecanismos inmunes, metabólicos neuroendocrinos e inflamatorios que normalmente ocurren después de un insulto masivo o infección. El síndrome clínico que emerge refleja el estado de balance dinámico que existe entre cada uno de los componentes del sistema. La respuesta del huésped a la agresión se comporta como un sistema complejo no lineal que implica a un gran número de variables y sistemas de variables. A pesar de la naturaleza dinámica de la respuesta del huésped, las propiedades del sistema, es decir, el “todo” permanece estable en la gran mayoría de individuos garantizando la homeostasis, sin desencadenar un MODS⁽³⁹⁾.

Hasta ahora, el tratamiento de los pacientes críticos ha sido fundamentalmente de soporte y a pesar de la inicial confianza en la aplicación de las nuevas terapias antimedidores los resultados han sido decepcionantes en los numerosos estudios realizados⁽⁷⁷⁾. La teoría de los sistemas complejos no lineales proporciona una explicación para el fracaso de las terapias antimedidores en el tratamiento de pacientes con MODS, ya que la mayoría de los estudios practicados hasta la actualidad se han centrado en evaluar mecanismos inmunológicos individuales asumiendo relaciones lineales. La utilización de un anticuerpo contra un determinado mediador puede dar resultados impredecibles en función del estado del sistema en ese momento en el tiempo⁽⁴²⁾.

Las implicaciones del reconocimiento de la naturaleza compleja de la disfunción orgánica son fundamentales para el desarrollo de estrategias destinadas a prevenir o tratar el proceso. Las acciones terapéuticas dirigidas contra estadios precoces del proceso no tendrán ningún efecto si se aplican una vez que se ha iniciado la liberación de mediadores pro-inflamatorios y el proceso ya se ha vuelto autónomo.

La tendencia de los estudios va encaminada a desarrollar sistemas de detección precoz de la disfunción orgánica y evaluación dinámica de ésta en el tiempo⁽⁴²⁾. Se aboga por centrar las investigaciones en las interacciones entre los constituyentes del sistema, en lugar de describir aspectos aislados de la enfermedad⁽¹⁴⁷⁾.

DEPLECIÓN DE MACRÓFAGOS

1- MACRÓFAGOS

Los macrófagos derivan de los promielocitos de la médula ósea que, tras su diferenciación en monocitos sanguíneos, finalmente asientan en los tejidos como macrófagos maduros que forman parte de sistema fagocítico mononuclear. La otra célula fagocítica importante, el neutrófilo polimorfonuclear, está confinada en el torrente circulatorio excepto cuando es reclutado en sitios de inflamación aguda⁽¹⁴⁸⁾.

Los macrófagos se hallan presentes en todo el tejido conectivo y alrededor de las membranas basales de los vasos pequeños. Su concentración es especialmente elevada en el pulmón (macrófagos alveolares), el hígado (células de Kupffer), en la pared de los sinusoides esplénicos y en los senos medulares de los ganglios linfáticos, donde su ubicación es estratégica para filtrar y eliminar el material extraño. Otros ejemplos son las células mesangiales en los glomérulos renales, la microglia del encéfalo y los osteoclastos del tejido óseo⁽¹⁴⁸⁾.

Los microorganismos se adhieren a la superficie de la célula fagocítica, activan el proceso de endocitosis y son internalizados dentro de una vacuola o fagosoma. Los gránulos citoplasmáticos se fusionan con el fagosoma y liberan su contenido produciendo la muerte y digestión celular.

Los macrófagos constituyen la primera línea de defensa del huésped contra microorganismos y sustancias potencialmente nocivas. Están implicados en la eliminación de complejos antígeno-anticuerpo, procesamiento y presentación del antígeno, así como en la regulación de la función de los linfocitos⁽¹⁴⁹⁾.

Los macrófagos sufren una transformación morfológica, funcional y metabólica hacia un estado de activación al ser expuestos a determinados estímulos (endotoxinas, tioglicolato, zimosan e inmunocomplejos entre otras). El macrófago activado o célula efectora, presenta un aumento de la concentración intracelular y secreción de enzimas hidrolíticas, aumenta la capacidad endocítica y de opsonización, y aumenta el metabolismo oxidativo⁽¹⁴⁸⁾.

Los macrófagos activados tienen la capacidad de generar importantes cantidades de anión superóxido, óxido nítrico y citoquinas (IL₁, IL₆, TNF). En un sistema bien regulado, su acción beneficia al huésped y ayuda a mantener el sistema de defensa inmunitario⁽¹⁴⁹⁾.

2- MACRÓFAGOS Y MODS

Tanto una incontrolada activación de los macrófagos como la pérdida de la función de la barrera intestinal se han implicado en el desarrollo del síndrome del distress respiratorio del adulto y el síndrome de disfunción multiorgánica.

En el modelo inflamatorio del MODS, el desencadenante que inicia la cascada de eventos que lleva al MODS es una excesiva e incontrolada producción de citoquinas y otros productos inmuno-inflamatorios por los macrófagos activados. En la hipótesis del intestino, la pérdida de la función de la barrera intestinal produce translocación de bacterias y/o endotoxinas hacia órganos sistémicos y otros tejidos donde inician, exacerban o perpetúan la respuesta inflamatoria sistémica. La habilidad de las bacterias y endotoxinas de activar las células de Kupffer y otras poblaciones macrofágicas ha sido bien documentada experimentalmente^(150, 151). Existe una importante interrelación

entre ambas hipótesis ya que los mediadores que conducen al daño orgánico son similares en ambas teorías.

Conceptualmente, la eliminación de macrófagos podría interrumpir la secuencia de eventos que conducen al daño orgánico, al suspender la señal inflamatoria. No obstante, los macrófagos están implicados en la cicatrización de heridas, defensa antibacteriana del huésped y en la respuesta metabólica, por lo que impedir la función de los macrófagos podría tener consecuencias perjudiciales.

3- DEPLECIÓN DE MACRÓFAGOS

La inhibición de los macrófagos clásicamente se había realizado mediante la administración de sílice, asbesto⁽¹⁵²⁾ o anticuerpos antimacrófagos, pero esta eliminación no resultaba ni selectiva ni completa. Posteriormente se observó que la aplicación de la “técnica del suicidio macrofágico mediada por liposomas”⁽¹⁵³⁾, constituía la mejor opción para el estudio de los efectos de la depleción macrofágica “in vivo”⁽¹⁵⁴⁾.

La eliminación de macrófagos se realiza mediante **Diclorometileno-difosfonado encapsulado en liposomas** (CL₂MDP-liposomas).

El diclorometileno-difosfonado (CL₂MDP), denominado también **clodronato** o ácido clodrónico, pertenece a la familia de los bifosfonados, análogos del pirofosfato inorgánico e inhibidores de la reabsorción ósea. Es un bifosfonado no nitrogenado que es metabolizado a análogos no hidrolizables del ATP produciendo apoptosis (muerte celular programada) de los osteoclastos y otras células del sistema mononuclear fagocítico⁽¹⁵⁵⁾. Estudios farmacológicos y clínicos han demostrado su eficacia en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica y otras condiciones que cursan con

exceso de reabsorción ósea como la enfermedad de Paget, hipercalcemia tumoral maligna, metástasis osteolíticas e hiperparatiroidismo. Así mismo, es eficaz en la reducción del dolor óseo en patologías osteopénicas^(156, 157).

La utilización del clodronato en la depleción macrofágica se basa en la acción de éste sobre las células del sistema mononuclear fagocítico. Tras el proceso de encapsulación, los liposomas actúan como transportadores del clodronato de forma que facilitan la fagocitosis por endocitosis de esta sustancia por los macrófagos. Las vacuolas resultantes se unen a los lisosomas que contienen fosfolipasas. Las enzimas lisosomales rompen las uniones de fosfolípidos de los liposomas permitiendo la liberación intracelular del clodronato y la consiguiente muerte del macrófago.

Se ha demostrado “in vivo” el mecanismo de acción molecular del clodronato y el clodronato encapsulado en liposomas⁽¹⁵⁸⁾. Ambas sustancias son metabolizadas a adenosin 5’-(beta, gamma-diclorometileno) trifosfato (AppCCl₂p) por los osteoclastos y macrófagos; la acumulación intracelular de este metabolito produce apoptosis celular explicando el efecto antireabsortivo óseo e inhibidor de la cascada inflamatoria del clodronato.

El clodronato liberado a la circulación tras la destrucción del macrófago tiene una vida media muy corta, y no es capaz de atravesar las membranas celulares, lo que explicaría que las células no fagocíticas no se hallen afectadas^(159, 160).

Las poblaciones macrofágicas eliminadas dependen de la ruta de administración de la sustancia. Debido a que los liposomas no pueden atravesar ni el epitelio ni el endotelio, sólo los macrófagos hepáticos y esplénicos serán eliminados tras la inyección endovenosa. Los macrófagos de órganos sin sinusoides como los del pulmón, ganglios linfáticos mesentéricos o de la lámina propia del intestino no serán eliminados usando la vía intravenosa. Los efectos de la administración endovenosa de CL₂ MDP-liposomas

parece ser dosis dependiente. Se ha evidenciado que todas las subpoblaciones de macrófagos esplénicos son eliminadas tras la administración de 0,2 mililitros de una suspensión de liposomas conteniendo 2 miligramos de clodronato en ratones⁽¹⁶¹⁾.

Después de la muerte de los macrófagos hepáticos y esplénicos, el animal permanecerá en un estado de depleción macrofágica hasta que estos compartimentos sean repoblados por macrófagos que en un principio se pensó que procedían de la médula ósea. Esta repoblación requiere de por lo menos 7 días en el hígado, y dependiendo de la subpoblación de macrófagos, de 7 a 30 días en el bazo^(159, 161). Posteriormente⁽¹⁶²⁾, se ha observado que la repoblación de las células de Kupffer parece ser que procede de un pool de precursores macrofágicos presentes en el hígado, en lugar de monocitos de la médula ósea. La producción local en el hígado de factor estimulante de los macrófagos parece que juega un papel crucial en la diferenciación, maduración y proliferación de las células de Kupffer.

Para examinar qué influencia tiene la depleción de macrófagos en un modelo de inflamación generalizada asociado a translocación bacteriana, Nieuwenhuijzen⁽¹⁶³⁾ utilizó la “técnica del suicidio macrofágico mediada por liposomas” para producir una depleción de los macrófagos hepáticos y esplénicos previa a la inyección de zimosan. Ésta es una sustancia que induce una respuesta inflamatoria generalizada que se asocia a translocación bacteriana, signos de sepsis y desarrollo de un síndrome similar al MODS⁽¹²⁹⁾. En su estudio, Nieuwenhuijzen⁽¹⁶³⁾ evidencia que, aunque la incidencia de translocación bacteriana está aumentada tras la depleción macrofágica, la respuesta tóxica sistémica y la mortalidad están significativamente reducidas en el grupo de eliminación de macrófagos. Concluye que los efectos letales y tóxicos del zimosan están más relacionados con una excesiva activación de los macrófagos que con la liberación sistémica de bacterias.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) es actualmente la principal causa de mortalidad en pacientes críticos quirúrgicos, así como en pacientes politraumáticos una vez transcurridas las primeras 24 horas tras la agresión⁽⁸⁾.

En la actualidad se considera que el traumatismo provoca inicialmente la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (citoquinas); al llegar a un determinado nivel crítico, se produce una respuesta compensadora anti-inflamatoria en un intento de regular la homeostasis. En algunos pacientes, la excesiva reacción pro-inflamatoria desencadenará una respuesta autodestructiva (SIRS) que conducirá al fracaso multiorgánico. En otros, la exagerada respuesta anti-inflamatoria dejará al paciente inmunodeprimido provocando un fallo multiorgánico⁽⁴⁵⁾.

Las tres hipótesis patogenéticas actuales del fracaso multiorgánico son: hipótesis de los mediadores, hipótesis de la isquemia-reperfusión e hipótesis del intestino; que sean tres hipótesis diferenciadas o diferentes aspectos de la misma situación, está aún por determinar⁽⁵⁴⁾. La teoría del intestino como “motor” del fracaso multiorgánico se basa en la idea de que las endotoxinas y bacterias translocadas llegan a los macrófagos hepáticos y esplénicos iniciando la liberación de mediadores que pueden desencadenar o perpetuar la respuesta hipermetabólica y pro-inflamatoria⁽⁹³⁾.

Existe la posibilidad de eliminar selectivamente los macrófagos del eje hepatoesplénico mediante la administración de diclorometileno-difosfonato contenido en liposomas, evitando así la activación de éstos y la liberación de la cascada de mediadores pro-inflamatorios⁽¹⁶³⁾.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La depleción de los macrófagos hepáticos y esplénicos mediante la administración endovenosa de diclorometileno-difosfonato contenido en liposomas (DCL2MDP-liposomas) en un modelo de politraumatismo experimental, podría regular la génesis del fracaso multiorgánico y disminuir la mortalidad.

OBJETIVOS

En un modelo de politraumatismo experimental, previamente testado, se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

1- Comparar la incidencia de translocación bacteriana a nivel de ganglios mesentéricos, hígado, bazo y pulmón entre un grupo de animales politraumatizados sometidos a depleción macrofágica y un grupo control con población macrofágica normal.

2- Comparar la toxicidad sistémica postraumática (signos tóxicos, movilidad y diferencia de peso) entre el grupo de animales con depleción macrofágica y el grupo control.

3- Comparar la mortalidad postraumática precoz y tardía entre dos grupos de animales, con y sin depleción macrofágica.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1- APARATO GENERADOR DE POLITRAUMATISMO (AGP)

Nuestro trabajo se fundamenta en el Aparato Generador de Politraumatismo (AGP), diseñado y modificado por López Negre⁽¹⁶⁴⁾ desde un modelo original de Schildt y Nilsson⁽¹⁶⁵⁾, que permite reproducir un politraumatismo controlado y de intensidad variable en animales de experimentación (Figura 7).

En síntesis, el aparato consta de seis partes diferenciadas:

Motor: Motor eléctrico rotativo que funciona con corriente alterna de 220 voltios y gira a velocidad constante. Tiene su eje central conectado a una polea construida en aluminio de 90mm de diámetro y 12,5mm de grosor. La polea presenta en su circunferencia periférica un surco de sección cónica de 4mm de profundidad, al que se adaptan tres correas de transmisión circulares de diversos diámetros. Transmiten el movimiento de la polea principal a otras tres que están adaptadas a la caja principal del aparato. Estas tres poleas tienen su centro situado a 21cm de altura del centro del eje de la polea del motor. Se pueden obtener velocidades variables de giro de la caja donde se alojará el animal de experimentación en función del uso de las poleas y correas, a razón de 35, 40 y 45 revoluciones por minuto (rpm). El motor va montado sobre una pletina móvil que permite su desplazamiento hacia delante y atrás siguiendo un ángulo de 30 grados a fin de mantener siempre la vertical entre la polea del motor y las poleas de la caja principal.

Poleas: Además de la polea de transmisión del motor, existe una segunda polea unida al cilindro o caja principal construida en aluminio de 12mm de espesor. Esta última, está dividida en tres segmentos de 75, 60 y 50mm de diámetro, donde se ubican tres correas sucesivas de distinta medida, lo que les confiere velocidades de giro de 35, 40 y 45rpm.

Correas de transmisión: Correas de nylon de 5mm de grosor y de 18, 20 y 22cm de diámetro, resistentes y algo elásticas; que transmiten el giro de la polea del motor a las poleas de la caja principal.

Pletina: Placa construida en acero inoxidable de 2mm de espesor y un tamaño de 16 por 16cm; presenta dos ranuras en su superficie paralelas entre sí, que permiten el desplazamiento de la misma de forma oblicua en la horizontal según un ángulo de 30 grados. El motor con su polea se mantiene fijo a la pletina; de esta manera, en los desplazamientos de la misma se mantiene la verticalidad entre la polea del motor y la de la caja principal, lo que asegura una transmisión óptima del movimiento. La pletina se desplaza sobre la base vertical del aparato a través de sus ranuras que están atravesadas por dos ejes con rosca en los que se fijan dos tornillos palomita, que permiten su inmovilización en la posición deseada.

Cilindro o caja principal: Es el habitáculo donde se aloja el animal de experimentación previa anestesia general. Mide 29,5cm de diámetro, 17,5cm de altura o profundidad y está construido en plancha de acero inoxidable de 1,5mm de grosor. Su cara anterior la constituye la tapa o puerta de la caja y encaja perfectamente en el cilindro, sujetándose al mismo mediante ranuras oblicuas y tornillos palomita, que permiten la apertura rápida y cómoda. La puerta presenta en su centro un tirador esférico de latón que permite su manejo y extracción con comodidad. Se ha cuidado que el cilindro tenga una superficie totalmente lisa en su interior, con ausencia de elementos que puedan producir heridas incisivas en el animal. Se han incorporado a la superficie

interna del cilindro dos grandes resaltes de forma piramidal, de base periférica y vértice interno totalmente romo; tienen 30mm de altura y 30mm de base y están situados de forma opuesta en el interior del aparato, de manera que en cada giro hacen que el animal salga proyectado contra el lado opuesto en dos ocasiones. De no existir estos resaltes, el aparato se comportaría como una simple centrifugadora, haciendo girar al animal sin producirle ningún traumatismo, ya que la fuerza centrífuga mantendría al animal contra la superficie interna de la caja sin golpearse contra las paredes.

Elementos de soporte: Todo el aparato va montado sobre una plataforma de hierro de 60 por 40cm, con un espesor de 15mm, lo que da al conjunto un peso de unos 25kg y le confiere la solidez suficiente para evitar movimientos o desplazamientos durante el giro de la caja. Dos pequeños ejes con rosca soldados a la superficie de la base de hierro atraviesan las ranuras de la pletina sobre la que está fijo el motor y permiten sus desplazamientos. La fijación de la pletina se consigue mediante dos tornillos palomita. Las tres poleas solidarias a la caja central se mantienen y giran con su centro a una altura de 21cm del centro de la polea del motor gracias a una estructura tubular soldada en posición vertical sobre la base del aparato. Esta barra está construida con acero inoxidable de 1,5mm de espesor y tiene un diámetro de 2,5cm. En su parte superior presenta, en posición horizontal, una varilla a la que se adapta un cojinete de bolas, cerrado, con orificio de lubricación, que soporta y permite el giro de la caja principal. Planos detallados del aparato pueden consultarse en la tesis doctoral de López Negre⁽¹⁶⁴⁾.

El método experimental de politraumatismo ha sido aprobado por la Direcció General de Producció i Indústries Agroalimentàries (Generalitat de Catalunya; Departament de

Ramaderia i Pesca; Servei de Ramaderia, Barcelona) con autorización del día 25/7/1994 nº 5367, según normas dictadas por el Reial Decret 223/1988 de 14 de Marzo.

Figura 7: Aparato Generador de Politraumatismo



2- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Balb/c machos mayores de 8 semanas de vida y con pesos comprendidos entre los 22 y 32 gramos, procedentes de la empresa CRIFFA (Santa Perpétua de la Mogoda, Barcelona).

Los animales fueron mantenidos en el estabulario convencional del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) (c/ Aiguader 80, Barcelona), con unas condiciones de temperatura de 21-23° C, humedad del 40-70%, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y dieta de mantenimiento “ad libitum”. Los ratones han seguido alimentación por vía oral equilibrada en todos los principios inmediatos, utilizándose pienso completo garantizado por Industrias Panlab tipo VAR-A-04; la composición se detalla en la (Tabla 1). Se calcula en unas 4 a 6 horas el tiempo tras la anestesia en que los animales son capaces de nuevo de alimentarse por sí mismos si no son traumatizados, y alrededor de 12 horas tras el traumatismo.

Tabla 1. Composición del pienso VAR-A-04

ANÁLISIS (%)	ADITIVOS (Kg)
Proteína bruta.....15,60	Vitamina A.....7.500 UI
Materias grasas brutas..... 2,80	Vitamina D3.....1.500 UI
Celulosa bruta..... 4,80	Vitamina E (alfa-tocoferol)..... 15 mg
Cenizas brutas..... 4,60	Cu (sulfato cúprico pentahidratado).....14,7 mg

El estabulario cumple las directrices 86/609/CEE del 24 de Noviembre de la Comunidad Económica Europea referente a la protección de los animales utilizados en experimentación y otras finalidades científicas; la ley 5/1995 del 21 de Junio de la

Generalitat de Catalunya y el decreto 214/1997 del 30 de Julio que desarrolla esta ley referente a los animales usados en experimentación. El estabulario también cumple la Resolución de Estrasburgo referente a las categorías del personal que utiliza animales de experimentación.

3- ANESTESIA

Todos los animales han sido sometidos a anestesia general previamente al traumatismo mediante el uso de tiopental sódico, a dosis de 60 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal. La anestesia completa se consigue entre los 6 y 10 minutos después de la administración del fármaco, y se valora como efectiva al observarse la pérdida del reflejo que permite la recuperación espontánea de la posición de decúbito prono por parte del animal.

4-DICLOROMETILENO-DIFOSFONATO

(CL₂MDP) CONTENIDO EN LIPOSOMAS

El Diclorometileno-difosfonato (CL₂MDP) o **clodronato**, sustancia pura, ha sido proporcionado por Productos Roche, S.A. Departamento Médico. (C/ Josefa Valcarcel nº 2, Madrid).

Para su utilización en el estudio se ha procedido a la encapsulación en liposomas de la sustancia pura obteniendo CL₂MDP-liposomas en el Departamento de Biología y Bioquímica Molecular de la Facultad de Química. Universidad de Barcelona. (C/ Martí y Franquès nº 1, Barcelona).

Preparación de clodronato encapsulado en liposomas.

En el presente trabajo se han utilizado vesículas unilamelares grandes⁽¹⁶⁶⁾, obtenidas por sonicación en baño de dispersiones de vesículas multilamelares, hasta un diámetro de poro final inferior a 450 nm, que permite su esterilización por filtración.

a) Obtención de vesículas multilamelares.

Los liposomas multilamelares pueden ser considerados como los precursores de los otros tipos de liposomas ya que su obtención suele ser una etapa previa en los distintos procesos de preparación descritos. El método más utilizado consiste en la dispersión mecánica de una película lipídica en un medio acuoso salino.

El proceso se inicia con la preparación de una película fina de lípido. Para ello se disuelve la cantidad necesaria de fosfolípido en cloroformo, en un tubo de vidrio, y el disolvente se evapora mediante una corriente suave de nitrógeno durante 30 minutos aproximadamente, de manera que el lípido se deposita sobre la pared del tubo de ensayo. En el caso de sistemas mixtos, los lípidos deben disolverse previamente juntos en cloroformo, a fin de que la mezcla sea completa y homogénea. En nuestro caso se ha utilizado una mezcla lipídica de fosfatidilcolina de huevo: colesterol 6:1 (relación molar).

Para asegurar la eliminación total del disolvente, el tubo se deja en un desecador de anhídrido fosfórico toda la noche.

La hidratación de la película lipídica se realiza con una disolución acuosa de 0,25 g/mL de clodronato mediante los siguientes pasos:

1^{er} paso: Ciclos de 30 segundos cada uno de agitación mecánica y calentamiento a 30°C, alternadamente, durante 20 minutos.

2^o paso: 5 ciclos de congelación-descongelación con nitrógeno líquido, pasando por la temperatura de transición.

b) Obtención de vesículas unilamelares

Las vesículas unilamelares están formadas por una sola capa bimolecular de lípido rodeando una fase acuosa, su rango de tamaños es de 80 a 1000 nm. Este tipo de vesículas las obtendremos por sonicación en baño de la dispersión de las vesículas multilamelares obtenidas anteriormente, durante una hora a 40°C de temperatura.

La dispersión liposomal obtenida se mantiene durante una hora a una temperatura superior a la temperatura de transición de la mezcla lipídica (30-35°C). Este proceso se denomina “*annealing*” y permite la recuperación estructural de las bicapas defectuosas.

Para separar el material no encapsulado en el interior liposomal, la suspensión se cromatografía por una columna de Sephadex G-50 equilibrada con PBS (sal tamponada de fosfato). Finalmente los liposomas unilamelares se han esterilizado por filtración a través de 0,45µm. La suspensión final de liposomas que encapsulan clodronato tiene una concentración de 27 mM de lípido total y 5 mg/mL de clodronato.

5- TEST DE MOVILIDAD

Para realizar el test de movilidad se utilizó una tabla de melamina blanca, de un metro cuadrado y 1,5 cm de grosor, dividida en cuadros de 10 cm mediante trazos transversales y longitudinales con rotulador negro de punta gruesa.

El test consiste en cuantificar el número de cuadros que recorre el animal durante un minuto en dicha tabla. Para facilitararlo, se reproduce el movimiento del animal en un papel, que es una plantilla a menor escala del cuadriculado de la tabla, quedando así constancia de los test de movilidad de cada animal.

La Figura 8 ilustra el test de movilidad.

Figura 8: Test de movilidad



6- DETERMINACIÓN DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

La obtención de muestras (pulmón, ganglios linfáticos mesentéricos, bazo e hígado) se ha realizado en el Quirófano de Cirugía Experimental del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM). Se ha dispuesto de lupas de 2,5 aumentos de la casa Keeler para ampliar el campo quirúrgico.

El instrumental quirúrgico utilizado ha sido esterilizado en la Unidad de Esterilización Central del Hospital del Mar (Paseo Marítimo 25-29, Barcelona), así como los tubos de ensayo donde se depositaban las muestras.

Una vez obtenidas, las muestras fueron introducidas en tubos de ensayo estériles que contenían 2 mililitros de caldo de tripticasa, y trasladadas al Laboratorio Central de Referencia de Cataluña donde se procedió a su homogenización en mortero estéril.

Posteriormente, cada muestra fue sembrada en tres placas de Agar Sangre de Carnero (Biomerieux) de diferentes diluciones (100, 500 y 1000 μ l), que se incubaron durante 72 horas y realizándose lectura diaria. El número de colonias que creció en cada placa se multiplicó por la dilución correspondiente. Los microorganismos fueron identificados siguiendo los métodos microbiológicos convencionales. Se consideró translocación bacteriana al crecimiento de bacterias en cualquier dilución de las anteriormente citadas.

MÉTODOS

Para comprobar la hipótesis se han diseñado dos experimentos, cada uno con metodología diferente y objetivos concretos. Se describen en primer lugar los métodos comunes a todas las técnicas realizadas, y posteriormente el diseño del estudio, que incluye los dos experimentos realizados.

1- ADMINISTRACIÓN DE LA ANESTESIA

Tal y como se ha descrito anteriormente, se ha utilizado tiopental sódico a dosis de 60 mg/kg diluido en suero fisiológico. El anestésico se ha administrado por vía intraperitoneal a nivel del cuadrante superior izquierdo del abdomen, inyectándose un volumen total de líquido entre 0,15 y 0,25 ml según el peso del animal, y usándose una aguja de insulina de 25 5/8 GA. La anestesia se prepara diluyendo 0,5 g de tiopental sódico en 50 ml de suero fisiológico, dilución de 10 mg/ml.

La anestesia se consigue a los 6-10 minutos de la inyección, y se valora como completa cuando el animal pierde el reflejo que le permite recuperar la posición prona.

2- INYECCIÓN ENDOVENOSA

Todos los animales del estudio reciben 48 horas antes del traumatismo una inyección endovenosa de 0,20 ml de clodronato (CL2MDP-liposomas), o de suero fisiológico, según pertenezcan al grupo de depleción macrofágica o al grupo control respectivamente. El animal, previamente anestesiado, es introducido en decúbito lateral

en un aparato inmovilizador de ratones que permite realizar la inyección endovenosa en una de las venas laterales de la cola. El animal es excluido del estudio si se produce extravasación de la sustancia inyectada.

3- GENERACIÓN DEL TRAUMATISMO

Nuestro modelo presenta una mortalidad que depende de la intensidad del traumatismo, parámetro que podemos modificar a demanda. Asumiendo un peso promedio de 25 g, y que la distancia que recorre en cada giro el animal es de 21 cm, la energía de cada impacto es de 0,052 Joules y para un tiempo de 7 minutos, la energía global que recibe cada animal es de aproximadamente unos 33 Joules, equivalente al choque de un ser humano de 70 kg contra un obstáculo a una velocidad de 85 km/h. Esta energía produce una mortalidad global que ronda el 40%, siendo de un 16% la que se produce en las primeras 24 horas, y el resto (24%) más allá de las 24 horas.

La energía final para cada experimento se puede predefinir (y por lo tanto el número de revoluciones del aparato) según las necesidades. En el presente estudio hemos definido tres tipos de traumatismo según la energía final recibida: traumatismo leve (15 Joules), traumatismo moderado (30 Joules) y traumatismo grave (45 Joules). En cada tipo de traumatismo el tiempo de exposición al Aparato Generador de Politraumatismo es variable dependiendo del peso del animal. El cálculo del tiempo de exposición para una energía final determinada se ha obtenido calculando la velocidad del animal en el momento de cada impacto dentro del AGP, convirtiendo esta energía cinética en energía mecánica y multiplicando por el número de impactos que recibe cada animal (variable que depende del tiempo que gira el AGP). Ajustando al máximo el tiempo en función de la masa del animal, se consigue que las variaciones de energía recibidas para cada uno

de ellos sean del orden del 2'5% únicamente. El tiempo promedio de exposición para el traumatismo leve es de 3 minutos, de 6 minutos para el traumatismo moderado y de 9 minutos para el grave (Tablas 2,3 y 4).

Los animales siempre se traumatizaron por parejas cuyos pesos fueron similares y previa anestesia general.

4- INTRODUCCIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Los datos de los experimentos se introdujeron en una base de datos ACCESS 97, con formato protegido para intentar minimizar la entrada de valores anómalos o fuera de rango. La base de datos se transfirió a SPSS 11.5.2 para su análisis estadístico. El primer paso en SPSS fue su depuración, analizando los datos perdidos si los había y recuperando todos los posibles.

En los datos descriptivos se utilizó la media, mediana e intervalo de confianza del 95% para las variables continuas, así como porcentajes e intervalo de confianza del 95% para las variables categóricas.

La comparación de dos variables categóricas se efectuó mediante el test exacto de Fisher. Se comprobó si las variables seguían una distribución normal, utilizándose la t de Student si seguían la Ley Normal y la U de Mann-Whitney si no era el caso. Se utilizaron las respectivas pruebas para datos apareados si así correspondía. En la comparación de diversas medias distribuidas a lo largo del tiempo se utilizó el test de ANOVA múltiple.

Se usó la regresión logística para valorar la diferente implicación del traumatismo y del clodronato en la translocación bacteriana, siendo ésta la variable dependiente y el

traumatismo y la administración del clodronato las independientes. Se usó la regresión por pasos hacia atrás. Se ha utilizado siempre la prueba de razón de verosimilitud en lugar de la prueba de Wald, ya que es más potente cuando el valor del parámetro B se aleja de cero. Por último, para valorar la discriminación del modelo, se ha utilizado la curva ROC (Receiver Operating Characteristics). El punto de corte óptimo para cada curva se calcula en función de la sensibilidad, especificidad y prevalencia. Se puede obtener una valoración cuantitativa de la precisión diagnóstica del modelo midiendo el área bajo la curva mediante cálculo trapezoidal. Se pueden comparar índices de precisión y sus errores estándar usando un método estadístico desarrollado por Hanley y McNeil^(167, 168).

Los análisis de supervivencia se realizaron mediante la regresión de Cox, para poder controlar la influencia de las diversas variables (clodronato y traumatismo).

En todos los análisis se utilizó el error alfa de 0,05, sin efectuarse correcciones por comparaciones múltiples.

5- DISEÑO DEL ESTUDIO

Para cumplir los objetivos fijados se han diseñado dos experimentos independientes, el primero es un estudio a corto plazo (24 horas) y el segundo a largo plazo (14 días):

Experimento 1: Influencia de la eliminación de los macrófagos en la translocación bacteriana y la toxicidad sistémica.

Experimento 2: Análisis de mortalidad y toxicidad sistémica (pérdida de peso, movilidad y signos tóxicos).

EXPERIMENTO 1

- Objetivos**
1. Comparar la incidencia de translocación bacteriana entre los animales sometidos o no a depleción macrofágica.
 2. Comparar la toxicidad sistémica postraumática entre ambos grupos.

Métodos

Para examinar si la eliminación de macrófagos puede influir en la translocación bacteriana y en la toxicidad sistémica, los animales fueron randomizados en 4 grupos homogéneos:

- GRUPO 1. Traumatismo leve (15 J) sin depleción de macrófagos (n=11)
- GRUPO 2. Traumatismo leve (15 J) con depleción de macrófagos (n=7)
- GRUPO 3. Traumatismo grave (45 J) sin depleción de macrófagos (n=10)
- GRUPO 4. Traumatismo grave (45 J) con depleción de macrófagos (n=8)

Los animales con depleción macrofágica recibieron una inyección endovenosa en la cola de 0,20 ml de diclorometileno-difosfonato (CL₂MDP) contenido en liposomas y disuelto en sal tamponada de fosfato (PBS 0,125 g/ml), 48 horas antes de ser sometidos al traumatismo. Previamente a la inyección, los animales son pesados y anestesiados con tiopental sódico a dosis de 60 mg/ kg de peso por vía intraperitoneal. A los animales de los grupos en los que no se realiza depleción de macrófagos se les administra la misma cantidad endovenosa de suero fisiológico. Después de la inyección son devueltos a sus jaulas con acceso libre a comida y bebida.

Transcurridas 48 horas después de la inyección, los animales son pesados y se introducen por parejas con pesos similares en el aparato generador de politraumatismo (AGP) a 45 revoluciones por minuto, previa anestesia general. Para los sujetos sometidos a traumatismo leve (15 J), se calcula el tiempo de traumatismo según la Tabla

2; y para los animales que reciben un traumatismo grave (45 J) según la tabla 4. Inmediatamente después de ser extraídos del AGP son devueltos a sus jaulas con acceso libre a comida y bebida. Sólo han sido incluidos como válidos los animales que han sobrevivido al traumatismo.

Veinticuatro horas después del traumatismo se anotaron de forma ciego simple (el investigador desconoce a qué grupo pertenece cada animal), en una tabla de recogida de datos para cada animal, la toxicidad sistémica (cuantificada mediante tres variables: signos tóxicos, peso del animal y test de movilidad), así como el número de lesiones externas.

Se describieron como signos tóxicos la presencia de alguno de los siguientes parámetros: respiración forzada, espasticidad, convulsiones, letargia, alopecia, diarrea, conjuntivitis, pelo rizado y ausencia de ingesta de líquidos y/o sólidos^(163, 169). Se definió signos de toxicidad global como la suma de signos tóxicos que presenta cada animal a las 24 horas del traumatismo.

Se anotaron el número de lesiones externas que presentaba cada animal. El número máximo de lesiones externas se estableció en 8; se consideraron como posibles lesiones: pabellones auriculares (2), extremidades (4), hocico (1), boca y dientes (1).

Tras estas valoraciones se procedió a la disección de cada espécimen previa anestesia general. Se realizó extracción en condiciones de esterilidad de pulmón derecho, hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. Las muestras para cultivo fueron pesadas e introducidas en tubos de ensayo estériles que contenían 2 ml de caldo de tripticasa. Las muestras se enviaron al Departamento de Microbiología del Laboratorio de Referencia de Cataluña para su cultivo y lectura.

Se diseñaron cuatro grupos control de 5 animales cada uno para verificar que ni el PBS, ni el CL₂MDP (sustancia pura), ni espontáneamente, ni los liposomas producen translocación bacteriana o mortalidad por sí mismos:

<u>GRUPO 5.</u> PBS	(n=5)
<u>GRUPO 6.</u> CL ₂ MDP	(n=6)
<u>GRUPO 7.</u> Suero Fisiológico (espontáneo)	(n=5)
<u>GRUPO 8.</u> Liposomas	(n=5)

En estos grupos control se realizó el mismo procedimiento sin someter a los animales de experimentación a traumatismo. Así, 48 horas después de la inyección, se realizó el test de movilidad y se procedió a la disección y obtención de las muestras para microbiología siguiendo el mismo procedimiento que en los grupos anteriores.

EXPERIMENTO 2

- Objetivos**
1. Comparar la mortalidad postraumática precoz y tardía entre los animales sometidos o no a depleción macrofágica.
 2. Comparar la diferencia de peso entre los animales de ambos grupos.
 3. Comparar la movilidad entre ambos grupos.
 4. Comparar los signos de toxicidad sistémica entre el grupo de depleción de macrófagos y el grupo control.

Métodos

Estudio experimental prospectivo y randomizado en el que 40 ratones Balb/c machos fueron distribuidos en dos grupos para analizar en ambos la mortalidad y la toxicidad sistémica (signos tóxicos, diferencia de peso y movilidad):

<u>GRUPO 9.</u> Traumatismo moderado (30 J) sin depleción de macrófagos	(n=20)
<u>GRUPO 10.</u> Traumatismo moderado (30 J) con depleción de macrófagos	(n=20)

Antes de iniciar el estudio, a todos los animales se les sometió a un test de movilidad inicial.

Al igual que en el Experimento 1, los animales recibieron una inyección endovenosa de 0,20 ml de clodronato en el Grupo 9, y la misma cantidad de suero fisiológico en el Grupo 10.

A las 48 horas de la inyección todos los sujetos del estudio fueron introducidos por parejas en el AGP, previa anestesia general, y sometidos a un traumatismo moderado (30 Joules). No fueron excluidos los animales que no sobrevivieron al traumatismo. Inmediatamente después del traumatismo se anotaron el número de lesiones externas, ya descritas anteriormente, que presentaba cada animal.

Se realizó un seguimiento durante 14 días de todos los animales, sometiéndolos cada 24 horas a un test de movilidad, determinación de presencia o no de signos de toxicidad sistémica y peso.

Se definió como mortalidad precoz a aquella que se presentó en las primeras 24 horas tras el traumatismo, y como mortalidad tardía la que se produjo más allá de las 24 horas postraumatismo. Al decimocuarto día, los animales que no habían fallecido fueron sacrificados mediante dislocación cervical una vez finalizado el estudio.

Tabla 2: Cálculo de tiempo en el AGP para un traumatismo leve

CÁLCULO DE TIEMPO PARA ENERGÍA FINAL DETERMINADA	
Impacto total (joules)	15
distancia (m):	0,21
gravedad (m/s ²)	9,81
numerador ecuación	0,080902222
Masa en gramos	Tiempo trauma (minutos,segundos)
22	3,41
22,1	3,40
22,2	3,39
22,3	3,38
22,4	3,37
22,5	3,36
22,6	3,35
22,7	3,34
22,8	3,33
22,9	3,32
23	3,31
23,1	3,30
23,2	3,29
23,3	3,28
23,4	3,27
23,5	3,27
23,6	3,26
23,7	3,25
23,8	3,24
23,9	3,23
24	3,22
24,1	3,21
24,2	3,21
24,3	3,20
24,4	3,19
24,5	3,18
24,6	3,17
24,7	3,17
24,8	3,16
24,9	3,15
25	3,14
25,1	3,13
25,2	3,13
25,3	3,12
25,4	3,11
25,5	3,10
25,6	3,10
25,7	3,09
25,8	3,08
25,9	3,07
26	3,07
26,1	3,06
26,2	3,05
26,3	3,05
26,4	3,04

26,5	3,03
26,6	3,02
26,7	3,02
26,8	3,01
26,9	3,00
27	2,60
27,1	2,59
27,2	2,58
27,3	2,58
27,4	2,57
27,5	2,57
27,6	2,56
27,7	2,55
27,8	2,55
27,9	2,54
28	2,53
28,1	2,53
28,2	2,52
28,3	2,52
28,4	2,51
28,5	2,50
28,6	2,50
28,7	2,49
28,8	2,49
28,9	2,48
29	2,47
29,1	2,47
29,2	2,46
29,3	2,46
29,4	2,45
29,5	2,45
29,6	2,44
29,7	2,43
29,8	2,43
29,9	2,42
30	2,42
30,1	2,41
30,2	2,41
30,3	2,40
30,4	2,40
30,5	2,39
30,6	2,39
30,7	2,38
30,8	2,38
30,9	2,37
31	2,37
31,1	2,36
31,2	2,36
31,3	2,35
31,4	2,35
31,5	2,34
31,6	2,34
31,7	2,33
31,8	2,33
31,9	2,32
32	2,32

Tabla 3: Cálculo de tiempo en el AGP para un traumatismo moderado

CÁLCULO DE TIEMPO PARA ENERGÍA FINAL DETERMINADA	
Impacto total (joules)	30
distancia (m):	0,21
gravedad (m/s ²)	9,81
numerador ecuación	0,161804443
Masa en gramos	Tiempo trauma (minutos.segundos)
22	7,21
22,1	7,19
22,2	7,17
22,3	7,15
22,4	7,13
22,5	7,11
22,6	7,10
22,7	7,08
22,8	7,06
22,9	7,04
23	7,02
23,1	7,00
23,2	6,58
23,3	6,57
23,4	6,55
23,5	6,53
23,6	6,51
23,7	6,50
23,8	6,48
23,9	6,46
24	6,45
24,1	6,43
24,2	6,41
24,3	6,40
24,4	6,38
24,5	6,36
24,6	6,35
24,7	6,33
24,8	6,31
24,9	6,30
25	6,28
25,1	6,27
25,2	6,25
25,3	6,24
25,4	6,22
25,5	6,21
25,6	6,19
25,7	6,18
25,8	6,16
25,9	6,15
26	6,13
26,1	6,12
26,2	6,11
26,3	6,09
26,4	6,08

26,5	6,06
26,6	6,05
26,7	6,04
26,8	6,02
26,9	6,01
27	5,60
27,1	5,58
27,2	5,57
27,3	5,56
27,4	5,54
27,5	5,53
27,6	5,52
27,7	5,50
27,8	5,49
27,9	5,48
28	5,47
28,1	5,45
28,2	5,44
28,3	5,43
28,4	5,42
28,5	5,41
28,6	5,39
28,7	5,38
28,8	5,37
28,9	5,36
29	5,35
29,1	5,34
29,2	5,32
29,3	5,31
29,4	5,30
29,5	5,29
29,6	5,28
29,7	5,27
29,8	5,26
29,9	5,25
30	5,24
30,1	5,23
30,2	5,21
30,3	5,20
30,4	5,19
30,5	5,18
30,6	5,17
30,7	5,16
30,8	5,15
30,9	5,14
31	5,13
31,1	5,12
31,2	5,11
31,3	5,10
31,4	5,09
31,5	5,08
31,6	5,07
31,7	5,06
31,8	5,05
31,9	5,04
32	5,03

Tabla 4: Cálculo de tiempo en el AGP para un traumatismo grave

CÁLCULO DE TIEMPO PARA ENERGÍA FINAL DETERMINADA	
Impacto total (joules)	45
distancia (m):	0,21
gravedad (m/s ²)	9,81
numerador ecuación	0,242706665
Masa en gramos	Tiempo trauma (minutos.segundos)
22	11,02
22,1	10,59
22,2	10,56
22,3	10,53
22,4	10,50
22,5	10,47
22,6	10,44
22,7	10,42
22,8	10,39
22,9	10,36
23	10,33
23,1	10,30
23,2	10,28
23,3	10,25
23,4	10,22
23,5	10,20
23,6	10,17
23,7	10,14
23,8	10,12
23,9	10,09
24	10,07
24,1	10,04
24,2	10,02
24,3	9,59
24,4	9,57
24,5	9,54
24,6	9,52
24,7	9,50
24,8	9,47
24,9	9,45
25	9,42
25,1	9,40
25,2	9,38
25,3	9,36
25,4	9,33
25,5	9,31
25,6	9,29
25,7	9,27
25,8	9,24
25,9	9,22
26	9,20
26,1	9,18
26,2	9,16
26,3	9,14
26,4	9,12

26,5	9,10
26,6	9,07
26,7	9,05
26,8	9,03
26,9	9,01
27	8,59
27,1	8,57
27,2	8,55
27,3	8,53
27,4	8,51
27,5	8,50
27,6	8,48
27,7	8,46
27,8	8,44
27,9	8,42
28	8,40
28,1	8,38
28,2	8,36
28,3	8,35
28,4	8,33
28,5	8,31
28,6	8,29
28,7	8,27
28,8	8,26
28,9	8,24
29	8,22
29,1	8,20
29,2	8,19
29,3	8,17
29,4	8,15
29,5	8,14
29,6	8,12
29,7	8,10
29,8	8,09
29,9	8,07
30	8,05
30,1	8,04
30,2	8,02
30,3	8,01
30,4	7,59
30,5	7,57
30,6	7,56
30,7	7,54
30,8	7,53
30,9	7,51
31	7,50
31,1	7,48
31,2	7,47
31,3	7,45
31,4	7,44
31,5	7,42
31,6	7,41
31,7	7,39
31,8	7,38
31,9	7,37
32	7,35

RESULTADOS

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

1- DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS

Se utilizaron, en este experimento, un total de 57 animales repartidos en 8 grupos.

Distribuimos a los animales en función del traumatismo aplicado (leve o grave) y si fueron sometidos o no a depleción macrofágica en 4 grupos, denominados grupos de traumatismo (Tabla 5).

Así mismo, se diseñaron 4 grupos control para demostrar que ninguna de las sustancias administradas (PBS, CL₂MDP (sustancia pura), suero fisiológico o liposomas), producen translocación bacteriana por sí mismos. Por este motivo, a los grupos control no se les sometió a traumatismo (Tabla 6).

Tabla 5: Grupos de traumatismo

<i>Traumatismo</i>	<i>Depleción</i>	
	<i>No</i>	<i>Sí</i>
Leve	Grupo 1 (n=11)	Grupo 2 (n=7)
Grave	Grupo 3 (n=10)	Grupo 4 (n=8)

Tabla 6: Grupos control

<i>Sustancia administrada</i>	<i>Grupo</i>
PBS	Grupo 5 (n=5)
CL ₂ MDP	Grupo 6 (n=6)
Suero Fisiológico	Grupo 7 (n=5)
Liposomas	Grupo 8 (n=5)

PBS= Sal tamponada de fosfato;
CL₂MDP= Clodronato no encapsulado.

El peso de los animales al inicio del experimento, la energía recibida en el traumatismo expresada en Joules (E Traumatismo), el número de lesiones externas, la movilidad (recuadros/minuto) a las 24 horas de la agresión, el peso del animal al final del experimento y los signos de toxicidad global, se recogen por grupos en las Tablas 7 y 8. Las diferencias de peso observadas al inicio del experimento son atribuibles al azar.

Tabla 7: Traumatismo leve

Grupo	Parámetros	Media	IC 95%		Mediana
			Límite inferior	Límite superior	
1 (n=11)	Peso inicial (g)	28,81	22,04	35,59	30,60
	E Traumatismo (J)	15	-	-	15
	Lesiones (n°)	0,55	-0,15	1,24	0,00
	Movilidad (recuadros/min)	13,18	8,02	18,34	12,00
	Peso final (g)	30,00	27,57	32,49	30,40
	Signos de toxicidad global	0,09	-0,11	0,29	0,00
2 (n=7)	Peso inicial (g)	29,64	27,87	31,41	29,60
	E Traumatismo (J)	15	-	-	15
	Lesiones (n°)	1,00	0,24	1,76	1,00
	Movilidad (recuadros/min)	16,00	7,52	24,48	15,00
	Peso final (g)	27,33	22,40	32,26	28,00
	Signos de toxicidad global	1,85	-1,53	5,25	0,00

IC 95%= Intervalo de confianza del 95%; g=gramos; E= Energía; J= Joules; n°= número; Recuadros /min= número de recuadros recorridos en un minuto.

Tabla 8: Traumatismo grave

Grupo	Parámetros	Media	IC 95%		Mediana
			Límite inferior	Límite superior	
3 (n=10)	Peso inicial (g)	30,75	29,78	31,71	30,70
	E Traumatismo (J)	45	-	-	45
	Lesiones (n°)	2,90	1,10	4,70	2,50
	Movilidad (recuadros/min)	9,90	3,61	16,19	9,00
	Peso final (g)	28,57	27,36	29,77	28,45
	Signos de toxicidad global	1,10	-0,53	2,73	0,00
4 (n=8)	Peso inicial (g)	28,66	26,90	30,42	28,40
	E Traumatismo (J)	45	-	-	45
	Lesiones (n°)	5,25	3,93	6,5	6,00
	Movilidad (recuadros/min)	9,63	1,58	17,67	8,00
	Peso final (g)	25,91	24,15	27,67	26,10
	Signos de toxicidad global	1,37	-2,93	3,04	1,00

IC 95%= Intervalo de confianza del 95%; g=gramos; E= Energía; J= Joules; n°= número; Recuadros /min= número de recuadros recorridos en un minuto.

En los cuatro grupos control se recogieron los parámetros no relacionados con el traumatismo: peso inicial, movilidad y peso final (Tabla 9).

Tabla 9: Grupos control

Grupo	Parámetros	Media	(IC 95%)		Mediana
			Límite inferior	Límite superior	
5 (n=5)	Peso inicial (g)	32,54	31,00	34,07	33,10
	Movilidad (recuadros/min)	12,20	4,38	20,02	14
	Peso final (g)	31,74	30,62	32,85	32,00
6 (n=6)	Peso inicial (g)	31,63	29,73	33,53	32,20
	Movilidad (recuadros/min)	12,90	8,22	17,59	14,81
	Peso final (g)	31,16	29,22	33,10	31,65
7 (n=5)	Peso inicial (g)	32,98	30,57	35,38	32,70
	Movilidad (recuadros/min)	17,20	14,37	20,03	18,00
	Peso final (g)	32,86	30,10	35,61	33,60
8 (n=5)	Peso inicial (g)	32,84	31,70	33,97	32,60
	Movilidad (recuadros/min)	8,80	6,11	11,49	9,00
	Peso final (g)	33,12	32,10	34,13	33,50

IC 95%= Intervalo de confianza del 95%; g=gramos;
 Recuadros /min= número de recuadros recorridos en un minuto.

2- TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

Al analizar el patrón de translocación bacteriana en los cultivos de las muestras obtenidas (pulmón hígado, GLM y bazo), se observó un predominio de Bacilos Gramnegativos, principalmente *Pasteurella* y *Escherichia Coli*. Les siguen en frecuencia Cocos Grampositivos del tipo *Enterococos* y *Staphylococos*. En la mayoría de los cultivos se aisló un solo germen, en los casos de cultivos polimicrobianos éstos eran de origen intestinal.

El primer objetivo del experimento fue comparar la **incidencia de translocación bacteriana (TB)** entre los animales sometidos o no a depleción macrofágica. En las Tablas 10a y 10b se recoge el porcentaje de translocación bacteriana de cada grupo.

Tabla 10a: Translocación bacteriana en los grupos de traumatismo

<i>Grupos traumatismo</i>	<i>Frec TB</i>	<i>TB (%) (IC 95%)</i>	<i>p</i>	
Leve	1	5/11	45,4 (16,7-76,6)	0,151
	2	6/7	85,7 (42,1-99,6)	
Grave	3	7/10	70 (34,7-93,3)	1
	4	5/8	62,5 (24,5-91,5)	
Total		23/36	63,9 (46,2-79,2)	

Frec TB= Frecuencia de translocación bacteriana;
IC 95%= Intervalo de confianza del 95%.

Tabla 10b: Translocación bacteriana en los grupos control

<i>Grupos control</i>	<i>Frec TB</i>	<i>TB (%) (IC 95%)</i>
5	0/5	0 (0-52,2)
6	1/6	16 (0,4-64,1)
7	1/5	20 (0,5-71,6)
8	0/5	0 (0-52,2)
Total	2/21	9,5 (1,2-30,4)

Frec TB= Frecuencia de translocación bacteriana;
IC 95%= Intervalo de confianza del 95%.

Se observó que los animales sometidos a traumatismo presentaron un mayor porcentaje de translocación bacteriana (63,9% IC95% entre 46,2 y 79,2) que los no traumatizados (9,5% IC95% entre 1,2 y 30,4), diferencia estadísticamente significativa ($P<0,001$).

Al comparar el porcentaje de translocación entre los grupos de traumatismo leve (Grupos 1 y 2) observamos que, si bien no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P=0,151$), los animales que son sometidos a depleción macrofágica tienen más tendencia a translocar que los animales no deplecionados. Del mismo modo, cuando los animales se someten a un traumatismo grave (Grupos 3 y 4), tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a translocación bacteriana si se les administra clodronato o suero fisiológico ($P=1$).

La Tabla 11 simplifica la relación entre traumatismo y translocación bacteriana. Obtuvimos una incidencia de translocación bacteriana total del 43,8% (25/57), con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) entre los animales sometidos a traumatismo 63,9% (23/36) y los animales del grupo control 9,5% (2/21).

Tabla 11: Relación entre traumatismo y translocación bacteriana

		<i>Traumatismo</i>		<i>Total</i>
		<i>Sí</i>	<i>No</i>	
Translocación bacteriana	Sí	23	2	25
	No	13	19	32
Total		36	21	57

Así mismo, también se ha estudiado la relación entre la administración de clodronato y la presencia de translocación bacteriana. Los resultados se exponen en las Tablas 12a y 12b.

Tabla 12a: Translocación bacteriana y depleción macrofágica

<i>Grupos</i>	<i>Frec TB</i>	<i>TB (%) (IC 95%)</i>	<i>p</i>
Clodronato (2 y 4)	12/21	57,1 (34-78,2)	
No Clodronato (1 y 3)	13/36	36,1 (20,8-53,8)	0,169

Frec TB= Frecuencia de translocación bacteriana;
IC 95%= Intervalo de confianza del 95%.

Tabla 12b: Relación entre clodronato y translocación bacteriana

		<i>Clodronato</i>		<i>Total</i>
		<i>Sí</i>	<i>No</i>	
Translocación bacteriana	Sí	12	13	25
	No	9	23	32
Total		21	36	57

Se demostró que, aunque los animales sometidos a depleción macrofágica presentaron mayor porcentaje de translocación bacteriana (57,1%) que el grupo control (36%), las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P=0,169$).

Factores de riesgo de translocación bacteriana

Se analizó mediante regresión logística la relación entre translocación bacteriana como variable dependiente, y la administración de clodronato y energía del traumatismo como variables independientes. En este mismo análisis se consideró la variable de interacción clodronato x energía del traumatismo.

Los resultados del análisis logístico se resumen en la Tabla 13, en la que se comprueba que la administración de clodronato no tiene un valor predictivo en la translocación bacteriana ($P= 0,27$); en cambio, la energía del traumatismo sí lo tiene ($P<0,001$).

Tabla 13: Variables de la ecuación

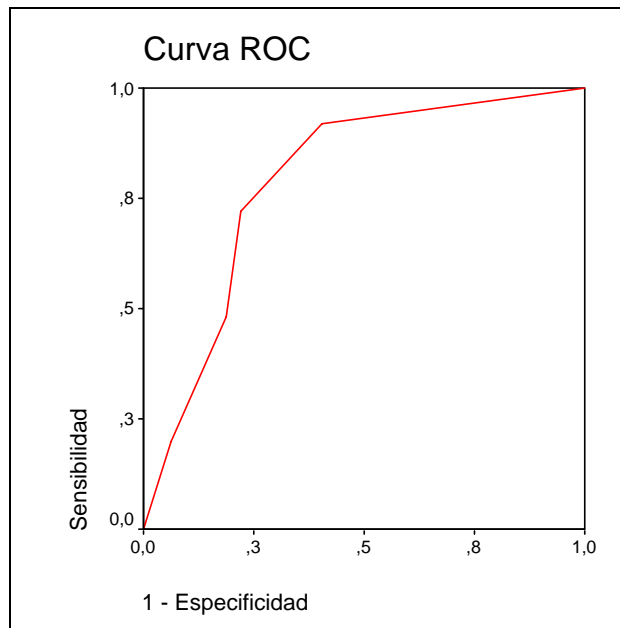
	<i>B</i>	<i>Sig</i>	<i>Exp(B)</i>
E trauma	0,059	<0,001	1,060
Clodronato	0,71	0,27	
Constante	-1,560		

Ante estos resultados, podemos afirmar que la translocación bacteriana depende de la energía del traumatismo y no de la administración de clodronato. Podemos predecir la presencia de translocación bacteriana aplicando la fórmula de la regresión logística:

$$translocación = \frac{1}{1+e^{-(-1'560 + 0'059xetraumatismo)}}$$

Esta fórmula permite predecir si habrá translocación bacteriana o no, en función de la energía del traumatismo. Esta ecuación nos da una precisión del modelo del 79,1%, calculado mediante curva ROC (Figura 9):

Figura 9: Curva ROC



3- TOXICIDAD SISTÉMICA

El segundo objetivo del experimento fue comparar la toxicidad sistémica entre ambos grupos (depleción macrofágica o no), para ello se han analizando los signos tóxicos y la movilidad.

3.1- SIGNOS TÓXICOS

El análisis de los signos tóxicos se realizó mediante una U de Mann-Whitney, los resultados se exponen en la Tabla 14.

Tabla 14: Signos de toxicidad global

Clodronato	Media	(IC 95%)		Mediana	Desv. Típ.
		Límite inferior	Límite superior		
No	0,57	-1,17	1,31	0,00	1,63
Sí	1,60	0,05	3,15	1,00	2,80

IC 95%= Intervalo de confianza del 95%; Desv. Típ. = Desviación típica.

	<i>Toxicidad global</i>
U de Mann-Whitney	104,50
W de Wilcoxon	335,50
Z	-2,034
Sig. Asint. (bilat)	0,042

Sig. Asint. (bilat)= Significación asintótica bilateral

En nuestro estudio se demostró que la toxicidad global es superior en los animales sometidos a depleción macrofágica que en los animales control (1,60 versus 0,57). Existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P= 0,042$).

Factores de riesgo de toxicidad

Para responder a la pregunta de si es el clodronato un factor de riesgo de toxicidad independiente de la energía del traumatismo, se aplicó una regresión logística multivariante. Las variables de la ecuación se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Variables de la ecuación

	<i>B</i>	<i>E.T.</i>	<i>Wald</i>	<i>gl</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
E. Trauma	0,024	0,29	0,713	1	0,398	1,024
Clodronato	1,580	0,759	4,331	1	0,037	4,857
Constante	-1,447	0,556	6,779	1	0,009	0,235

E. Trauma= Energía del traumatismo;
gl= grados de libertad; Sig.= Significación estadística.

Se evidenció que la administración de clodronato previo al traumatismo es un factor de riesgo de presentar signos de toxicidad sistémica ($P= 0,037$). En cambio, no se ha demostrado que lo sea la energía del traumatismo ($P= 0,39$).

3.2- MOVILIDAD

Se comparó también la movilidad a las 24 horas del traumatismo entre los animales sometidos o no a depleción macrofágica (Tabla 16).

El análisis se realizó mediante una U de Mann-Whitney.

Tabla 16: Movilidad

<i>Clodronato</i>	<i>Media</i>	<i>(IC 95%)</i>		<i>Mediana</i>	<i>Desv. Típ.</i>
		Límite inferior	Límite superior		
No	11,62	7,89	15,35	11,00	8,19
Sí	12,60	7,26	17,94	12,00	9,65

IC 95%= Intervalo de confianza del 95%; Desv. Típ. = Desviación típica.

	<i>Toxicidad global</i>
U de Mann-Whitney	149,00
W de Wilcoxon	380,00
Z	-0,27
Sig. Asint. (bilat)	0,78

Sig. Asint. (bilat)= Significación asintótica bilateral

A las 24 horas del traumatismo se observó que la movilidad es similar en ambos grupos, una media de 12,6 recuadros recorridos en 1 minuto en el grupo de depleción versus 11,6 en el grupo control ($P=0,785$). En nuestro estudio a corto plazo la movilidad no está afectada por la administración de clodronato.

EXPERIMENTO 2

1- DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS

En este experimento se utilizaron 40 animales a los que se les sometió a un traumatismo moderado de 30 Joules, distribuidos en dos grupos (Grupo 9 y 10). A los animales del Grupo 9 se les realizó depleción macrofágica mediante la administración de clodronato, mientras que a los animales del Grupo 10 se les administró suero fisiológico.

2- MORTALIDAD

El primer objetivo fue comparar la mortalidad precoz y tardía entre ambos grupos.

Datos recogidos en la Tabla 17:

Tabla 17: Mortalidad y supervivencia.

<i>Clodronato</i>	<i>N</i>	<i>Mortalidad</i>			<i>Supervivientes</i>	<i>% supervivencia al 14º día</i>	<i>P</i>
		<i>Precoz</i>	<i>Tardía</i>	<i>Total</i>			
Sí	20	4	1	5	15	75	
No	20	3	1	4	16	80	0,69
Total	40	7	2	9	31	77,50	

El estudio bivalente demostró que no había diferencias en la supervivencia entre los dos grupos estudiados.

Las muertes que se producen antes de las 24 horas del traumatismo (mortalidad precoz) son atribuidas al propio traumatismo, observamos que ésta es similar en ambos grupos, 3/20 en el grupo control versus 4/20 en el grupo de depleción macrofágica.

La mortalidad tardía es atribuible al síndrome de disfunción multiorgánica, se produce un caso en el 9º día de seguimiento en el grupo al que se le administra clodronato, y otro único caso en el 10º día en el grupo control. No existen tampoco diferencias en cuanto a mortalidad tardía entre ambos grupos.

El 75% de los animales del grupo al que se les administra clodronato sobreviven al experimento frente a un 80% en el grupo control, observamos que no existen diferencias en cuanto a supervivencia entre ambos grupos ($P= 0,69$).

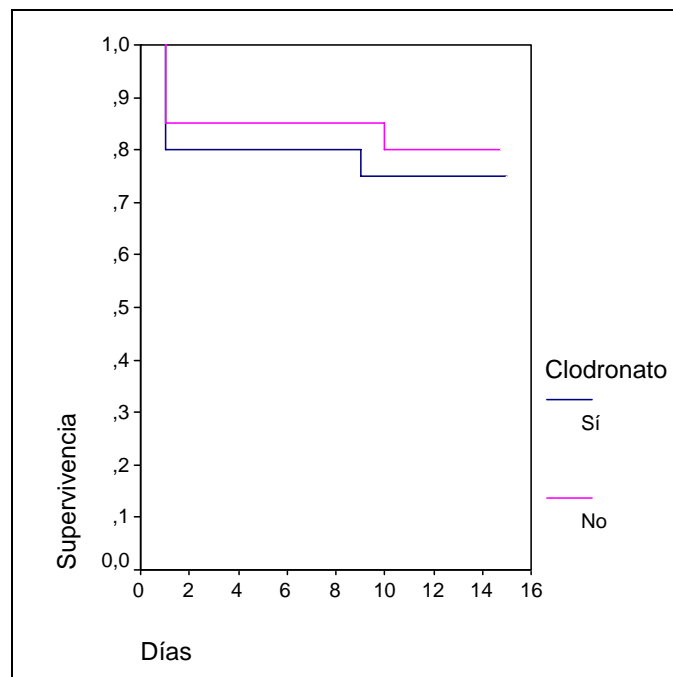
La comparación entre ambas supervivencias se efectuó además mediante una regresión de Cox. La Tabla 18 recoge los resultados de esta regresión.

Tabla 18: Resultados de la regresión de Cox para la supervivencia.

	<i>B</i>	<i>E.T.</i>	<i>Wald</i>	<i>gl</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
Clodronato	0,244	0,671	0,132	1	0,716	1,276

Finalmente, se realizó un análisis de Kaplan-Meyer, comparando la supervivencia de ambos grupos mediante el test de log rank. La Figura 10 muestra las curvas de supervivencia en ambos grupos.

Figura 10: Curvas de supervivencia



Con estos resultados interpretamos que el clodronato no afecta la supervivencia en casos de politraumatismo experimental. De todas formas, sólo tenemos dos casos de mortalidad tardía atribuible al síndrome de disfunción multiorgánica, por lo que esta muestra resulta demasiado pequeña para conocer el efecto del clodronato sobre la mortalidad.

3- TOXICIDAD SISTÉMICA

3.1- PÉRDIDA DE PESO

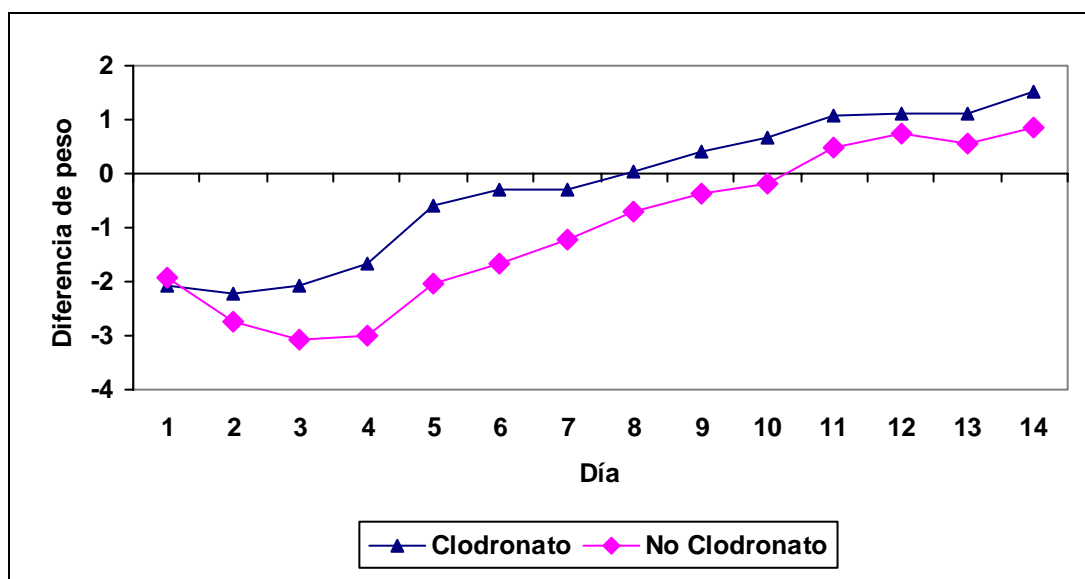
El segundo objetivo fue comparar las diferencias de peso observadas respecto al peso inicial, entre los animales sometidos o no a depleción macrofágica; los resultados se exponen en la Tabla 19:

Tabla 19: Diferencia de peso media

<i>Diferencia de peso media (peso final-peso inicial)</i>	<i>Clodronato</i>	
	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Día 1	-2,08	-1,91
Día 2	-2,21	-2,75
Día 3	-2,09	-3,06
Día 4	-1,67	-2,99
Día 5	-0,59	-2,05
Día 6	-0,30	-1,66
Día 7	-0,29	-1,24
Día 8	0,05	-0,71
Día 9	0,39	-0,36
Día 10	0,68	-0,20
Día 11	1,07	0,50
Día 12	1,11	0,75
Día 13	1,12	0,54
Día 14	1,53	0,86

En la Figura 11 se muestra la evolución del peso a lo largo del tiempo y en función de la administración o no de clodronato:

Figura 11: Evolución del peso



Observamos que la máxima pérdida de peso se produce al segundo día en el grupo de depleción macrofágica y al tercer día en el grupo control, siendo mayor la pérdida de peso máxima en el grupo control (-3,06 g) que en el grupo de clodronato (-2,21 g).

En cuanto a la recuperación del peso, ésta se produce antes en el grupo clodronato (8° día) que en el grupo control (11° día), observando que la recuperación del peso al final del experimento (14° día) es mayor en el grupo de depleción macrofágica.

Podemos constatar que con la administración de clodronato la pérdida máxima de peso es menor que en el grupo control, y que la recuperación del peso se produce antes. Además, los animales pierden menos peso al administrarles clodronato y la recuperación de éste al final del experimento es mayor. A pesar de ello, esta diferencia no alcanza significación estadística ($P=0,450$).

3.2- MOVILIDAD

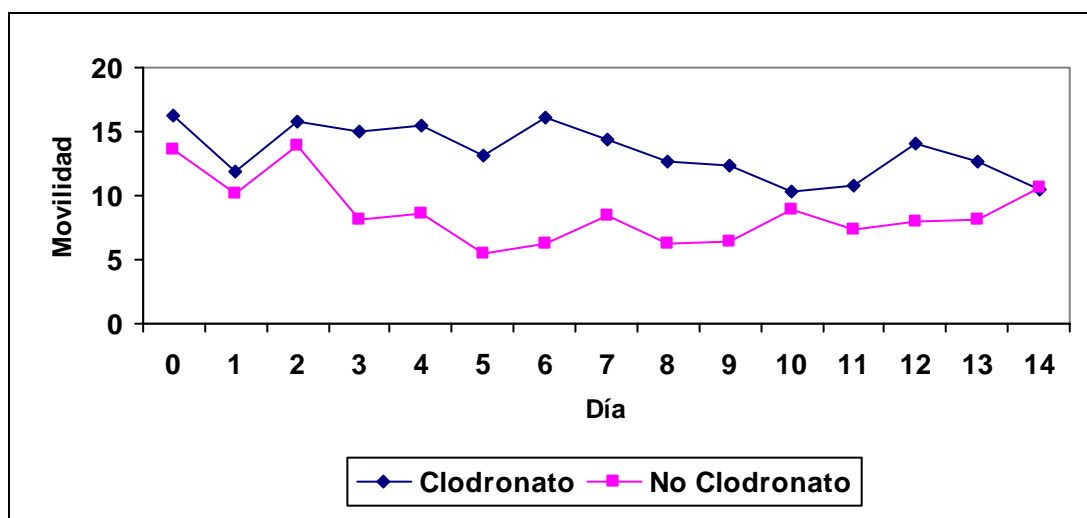
El tercer objetivo fue comparar la movilidad entre ambos grupos, los resultados se recogen en la Tabla 20:

Tabla 20: Movilidad media

<i>Movilidad (recuadros/min)</i>	<i>Clodronato</i>	
	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Inicial	16,2	13,6
Día 1	11,8	10,1
Día 2	15,8	13,9
Día 3	15,0	8,1
Día 4	15,4	8,6
Día 5	13,1	5,4
Día 6	16,1	6,2
Día 7	14,4	8,5
Día 8	12,7	6,3
Día 9	12,4	6,4
Día 10	10,3	8,9
Día 11	10,8	7,3
Día 12	14,1	7,9
Día 13	12,7	8,1
Día 14	10,4	10,7

En la Figura 12 se muestra la evolución de la movilidad a lo largo del tiempo y en función de la depleción macrofágica.

Figura 12: Evolución de la movilidad



Observamos que tienen mayor movilidad los animales sometidos a depleción macrofágica que los animales del grupo control. Estas diferencias son significativas entre los día 3 y 9 ($P < 0,04$).

3.3- SIGNOS TÓXICOS

El último objetivo fue comparar los signos de toxicidad sistémica entre ambos grupos. En la Tabla 21 se recoge el número de signos de toxicidad presentes para cada animal, así como los sujetos que fallecen y qué día del experimento lo hacen.

Tabla 21: Signos de toxicidad sistémica

<i>Animal</i>	<i>Signos Toxicidad Sistémica</i>	
	<i>Grupo control</i>	<i>Grupo clodronato</i>
1	1	No
2	Exitus (Día 1)	No
3	No	Exitus (Día 1)
4	No	No
5	No	No
6	No	No
7	No	Exitus (Día 1)
8	3 Exitus (Día 11)	Exitus (Día 1)
9	No	Exitus (Día 1)
10	No	5
11	No	No
12	No	No
13	4	5 Exitus (Día 10)
14	No	No
15	No	No
16	No	No
17	No	No
18	No	No
19	Exitus (Día 1)	No
20	Exitus (Día 1)	No

Observamos que hay tres animales con signos de toxicidad sistémica en el grupo control y dos casos en el grupo clodronato. Como ya se ha expuesto anteriormente tan sólo hay un caso de mortalidad tardía por grupo. El número de signos tóxicos hallados son insuficientes para cualquier análisis estadístico.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1- EL MODELO EXPERIMENTAL

En el 5º Congreso Europeo de Cirugía que se celebró en Barcelona en Noviembre de 1995, y concretamente en el Simposio sobre Experimentos en Animales, todos los ponentes estuvieron de acuerdo en que no existe un modelo experimental de politraumatismo en animales que sea fácilmente reproducible y que refleje con exactitud las múltiples interrelaciones que se producen en la especie humana tras un traumatismo grave. La literatura también coincide con esta apreciación⁽¹⁷⁰⁾, y de hecho, en los últimos años se aboga por modelos complejos constituidos por la unión de varios modelos previos conocidos (por ejemplo, usar modelos de shock hemorrágico en animales sanos como procedimiento preliminar a la aplicación a estos mismos animales de otro modelo de sepsis), evitando así usar animales sanos que a menudo no reflejan en absoluto al paciente crítico⁽¹⁷¹⁾. De hecho, el modelo experimental que más se parece a un modelo humano de disfunción multiorgánica tras un traumatismo consiste en aplicar sucesivamente a ovejas un shock hemorrágico, una intervención quirúrgica (raspado medular del fémur), administración de endotoxina y finalmente administración de plasma activado previamente con zimosan⁽¹⁷²⁾. Basándose en este modelo, sus autores han demostrado que la aprotinina y 21-esteroides consiguen atenuar el desarrollo del síndrome de disfunción multiorgánica^(173, 174). Hay que destacar, no obstante, la complejidad de las manipulaciones que deben efectuarse a los animales.

Durante la década de los 80, una gran cantidad de datos de laboratorio, principalmente de estudios en roedores, plantearon la hipótesis de que las alteraciones producidas en la barrera intestinal jugaban un papel primordial en el desarrollo del MODS que caracteriza a los pacientes que sufren un politraumatismo. Sin embargo, estudios clínicos posteriores no consiguen demostrar esta atractiva hipótesis en pacientes politraumatizados. Podemos especular acerca del fallo de la evidencia clínica en corroborar los datos experimentales, pero lo más lógico es suponer que los modelos experimentales no son adecuados⁽¹⁷⁵⁾. Parece demostrado que la barrera intestinal de los roedores es bastante más inestable que la de los humanos, y por lo tanto, que la translocación bacteriana que se induce en los ratones es de una menor significación clínica de la que aparenta a primera vista. Los mismos autores que afirman esto, reconocen que el MODS, definido como la progresiva (y a veces secuencial) disfunción de los sistemas fisiológicos en presencia de un cuadro clínico de sepsis, es un síndrome complejo, muy difícil de reproducir en animales de laboratorio^(175, 176).

Sin embargo, hay otras razones por las cuales no hay una correlación entre los estudios clínicos y los experimentales, atribuibles a las especiales características de ambos tipos de estudios. La metodología de los estudios clínicos carece en ocasiones de ciertos requisitos que sí pueden darse en los animales de experimentación. Es habitual que los criterios de inclusión en estudios clínicos sean amplios, uniendo así a pacientes con diferentes enfermedades de base y que la monitorización esté a menudo limitada. Una extensa crítica de los modelos clínicos se puede obtener en el artículo publicado por Moore⁽¹⁷⁰⁾. Los estudios experimentales adolecen de otro tipo de problemas. Es una crítica habitual la ausencia de estudios a largo plazo en condiciones idénticas o lo más similares posibles a las Unidades de Cuidados Intensivos. Normalmente, en los estudios experimentales no se simula correctamente el a menudo retrasado inicio de la disfunción

orgánica, hecho característico de la situación clínica. Por último, los modelos experimentales usan un esquema de tiempo fijo para iniciar los tratamientos, en lugar de usar la sepsis o criterios de disfunción orgánica como sucede en la práctica clínica diaria⁽¹⁷¹⁾.

Fue en 1970, mucho antes de que se conociera el MODS como tal, cuando Schildt y Nilsson⁽¹⁶⁵⁾ describen el método de politraumatismo en ratones sobre el que se basa el nuestro. Nosotros hemos utilizado el modelo creado por López Negre⁽¹⁶⁴⁾ que introduce algunas modificaciones del modelo original, como base para nuestro estudio. Como cualquier otro modelo experimental, tiene ventajas e inconvenientes. Se trata de un modelo “tosco”, en el sentido de que no todos los animales tienen exactamente las mismas lesiones, y no son monitorizados exhaustivamente en el momento de la producción del traumatismo. Pero en cambio, es el reflejo más fiel que existe actualmente en animales de experimentación de la situación que encontramos diariamente en los pacientes politraumáticos. Así pues, no es un buen modelo si pretendemos analizar las variaciones de la tensión arterial tras una agresión traumática, o si pretendemos analizar los niveles sanguíneos de cualquier sustancia tras un shock hipovolémico (para eso ya existen modelos diseñados), pero en cambio es el mejor para obtener un grupo homogéneo de animales que han sufrido la misma intensidad de un politraumatismo, parámetro éste que es imposible de conseguir en humanos. Respecto a modelos que intentan reflejar todos los acontecimientos del MODS en politraumáticos como el comentado en ovejas⁽¹⁷²⁾, es evidente su mayor sencillez de aplicación, tanto por lo que respecta al animal utilizado, como por las manipulaciones que se requieren. Nuestro modelo nos proporciona la posibilidad de variar la intensidad del traumatismo de una manera homogénea para todos los animales, y por lo tanto podemos obtener una

mortalidad predefinida (datos disponibles en el trabajo de Rebasá)⁽⁵⁴⁾. Aunque nuestro trabajo no ha sido diseñado para analizar las causas de la muerte, es lógico y así lo demostraron Schildt y Nilsson⁽¹⁶⁵⁾ que la mortalidad en las primeras 24 horas se debe al efecto del impacto directo por el traumatismo, mientras que los fallecimientos que se producen más allá de las 24 horas presentan cambios histopatológicos de disfunción multiorgánica precoz. Así pues, nuestro modelo permite disponer de un grupo homogéneo de animales que han sufrido idéntica intensidad de traumatismo, que nosotros podemos variar, y que tengan diversas lesiones que conducen a un cuadro de disfunción multiorgánica, sobre el que podemos actuar.

2- TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

Ya se ha discutido la hipótesis de que el tracto gastrointestinal juega un papel preponderante en la patogénesis del síndrome de disfunción multiorgánica tras una agresión. Sin embargo, y a pesar de la extensa investigación en este sentido, no hay estudios clínicos ni experimentales que demuestren de una manera irrefutable esta hipótesis^(175, 177).

Hemos podido determinar en este trabajo si existe translocación bacteriana asociada o no a nuestro modelo de politraumatismo, y si ésta está relacionada o no con la intensidad o energía del traumatismo.

Hemos demostrado que tras cualquier intensidad de traumatismo existe una translocación bacteriana que oscila entre el 46 y el 79% de los animales (Tabla 10a), datos consistentes con trabajos previos al nuestro utilizando el mismo modelo de politraumatismo⁽⁵⁴⁾. Numerosas publicaciones han descrito translocación bacteriana

asociada al traumatismo tanto en modelos experimentales como en humanos^(94, 95, 178, 179).

Uno de los hallazgos más relevantes de nuestro trabajo es que la translocación bacteriana depende de la energía del traumatismo, es decir, a mayor intensidad de traumatismo, mayor translocación bacteriana. Podemos saber, con una precisión del 79,1%, si habrá translocación bacteriana o no en función de la energía del traumatismo aplicado (Figura 9).

Algunos trabajos experimentales también observan mayor translocación bacteriana a mayor intensidad del traumatismo. Oztuna⁽¹⁸⁰⁾, en un modelo experimental de fracturas óseas en ratas, demuestra mayor incidencia de translocación bacteriana cuanto mayor es el número de fracturas asociadas y sobre todo si se produce fractura craneal (traumatismo grave). Así mismo, se ha descrito, en un trabajo sobre la patogénesis del daño de la barrera intestinal tras lesiones múltiples por heridas de arma de fuego en un modelo animal porcino, que el trauma múltiple causa isquemia de la mucosa intestinal incluso sin shock hemorrágico y que el daño de la barrera intestinal es más severo en el trauma con lesiones múltiples que en el que se produce una lesión aislada, promoviendo mayor translocación bacteriana⁽¹⁸¹⁾.

Al estudiar la interacción entre la energía del traumatismo y depleción macrofágica, observamos que en un traumatismo leve (15 Joules), la administración de clodronato sí que puede variar el porcentaje de translocación, existe una tendencia a que ésta esté aumentada (45,4% sin depleción, 85,7% con depleción). En cambio, en el traumatismo grave (45 Joules), la translocación bacteriana está determinada por el propio traumatismo; aunque realicemos una depleción macrofágica no se obtienen variaciones en cuanto a la translocación (Tabla 10a).

Sabemos que tras un traumatismo de intensidad leve se libera una moderada cantidad de elementos capaces de generar translocación bacteriana (radicales libres de oxígeno, citoquinas, productos de activación de los neutrófilos y de las células endoteliales)⁽⁵²⁾. Si nosotros actuamos inhibiendo la acción de los macrófagos (uno de los elementos que impide la translocación bacteriana), el porcentaje de ésta en el grupo de traumatismo leve y depleción será mayor que en el grupo control, al que no se ha eliminado la población macrofágica. En cambio, tras un traumatismo grave se produce una liberación masiva de mediadores de la respuesta inflamatoria (tal y como, entre otros, demuestra el estudio de Waydhas⁽⁵²⁾); el mero hecho de actuar solamente sobre uno de los ejes de la respuesta inflamatoria al administrar clodronato, será insuficiente para modificar la translocación bacteriana ya que ha sido activada de forma masiva por los otros mediadores de la respuesta inflamatoria (neutrófilos y células endoteliales).

Al analizar la relación entre depleción macrofágica y translocación bacteriana independientemente de la energía del traumatismo, hemos observado una mayor incidencia de translocación bacteriana en los animales sometidos a depleción, aunque sin alcanzar la significación estadística (Tabla 12a). Como era de esperar, nuestros resultados no difieren mucho de los obtenidos en un modelo de inflamación sistémica inducida por zimosan, donde se evidencia que la translocación bacteriana a órganos sistémicos está significativamente aumentada en el grupo de depleción macrofágica⁽¹⁶³⁾. Reynolds⁽¹¹⁰⁾, en un modelo de ictericia obstructiva secundaria a la ligadura del conducto biliar en ratas, evidencia un aumento de la translocación bacteriana y un descenso de la producción de TNF, anión superóxido y óxido nítrico, como consecuencia de la supresión de la activación macrofágica en estados de ictericia obstructiva.

En nuestro trabajo encontramos una mayor tendencia a presentar translocación bacteriana en el grupo de depleción macrofágica, la explicación más plausible sería que las bacterias translocadas que llegan al hígado y bazo tienen mayor posibilidad de sobrevivir cuando los macrófagos están ausentes. Es decir, en ausencia de macrófagos hepáticos y esplénicos, las endotoxinas y bacterias circulantes no son eliminadas eficazmente. Apoyando esta hipótesis, ha sido documentada una mayor translocación bacteriana en ratones con deficiencia macrofágica⁽¹⁸²⁾.

No hemos intentado determinar la especie bacteriana translocada porque creemos que no es trascendente para los resultados. De hecho, en los experimentos iniciales sobre translocación, los investigadores sí que determinaban la especie; pero en la mayoría de los trabajos publicados en los últimos años, la translocación se convierte en una variable dicotómica del tipo “sí/no”, existiendo algún autor que incluso afirma taxativamente que la especie translocada es lo de menos⁽¹⁸³⁾. En cualquier caso, la activación del sistema inflamatorio viene determinada por el simple contacto con un germen, sea éste el que sea. En nuestro estudio obtenemos un patrón de translocación con predominio de microorganismos de origen intestinal.

3- DEPLECIÓN MACROFÁGICA

Una elevación prolongada de citoquinas es el estímulo para desarrollar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una situación clínica caracterizada por las consecuencias de una activación generalizada de los macrófagos^(18, 48). Microorganismos, necrosis tisular, isquemia y otros estímulos inician y perpetúan esta cascada inflamatoria⁽¹⁸⁴⁾. Algunos casos de respuesta inflamatoria sin sepsis sugieren

que las reacciones a la agresión, más que la agresión misma, son la base del SIRS^(44, 45, 185).

Ningún trabajo clínico ha conseguido buenos resultados intentando modificar la respuesta de la cascada inflamatoria tras administrar anticuerpos anticitoquinas. Un amplio resumen de la mayoría de los trabajos publicados puede obtenerse en la revisión de Gullo y Berlot⁽¹⁸⁶⁾, así como en la de Fisher⁽¹⁸⁷⁾. El primer intento de modificar la cascada inflamatoria fue un estudio doble ciego multicéntrico con controles placebo utilizando dos anticuerpos monoclonales antiendotoxina sin éxito⁽¹⁸⁸⁾. Desde entonces, se ha intentado con anticuerpos contra la proteína activadora de permeabilidad bacteriana (BPIP; bacterial permeability-increasing protein)⁽¹⁸⁹⁾, anti-TNF^(32, 34), anti-IL₁⁽³⁵⁾, y con anti-IL₆^(190, 191) en animales. A la vista de estos resultados, algunos autores⁽⁴⁸⁾ apuntan la necesidad de modular la respuesta fagocítica, basándose en la hipótesis de que el MODS y el SIRS son la consecuencia del fracaso de la apoptosis (muerte celular programada) de los macrófagos después de que su acción ya no es necesaria. Si aceptamos que la respuesta inflamatoria sigue las reglas de la Teoría de los complejos no lineales, nuestra hipótesis cobra más sentido ya que la estrategia de este trabajo se basa en evitar la activación de esta cascada en su mismo origen al evitar la activación macrofágica, y no en intentar anular la acción de una citoquina concreta dentro de lo que es una compleja interrelación de fenómenos.

Nuestra hipótesis inicial es que la anulación de los macrófagos hepáticos y esplénicos mediante la administración de clodronato, aumenta la translocación bacteriana y la diseminación sistémica de bacterias (las bacterias translocadas que llegan al hígado y bazo tienen mayor posibilidad de sobrevivir cuando están ausentes los macrófagos), pero disminuye la respuesta tóxica sistémica o SIRS (al impedir la liberación de

citoquinas y otros mediadores de la inflamación), por lo que disminuye la mortalidad y la toxicidad sistémica.

Nuestra teoría es que actuando directamente sobre la población de macrófagos hepáticos y esplénicos sería posible atenuar o interrumpir la cascada inflamatoria y sus consecuencias deletéreas.

Aunque se ha demostrado una mayor eficacia de otras sustancias encapsuladas en liposomas en la depleción macrofágica, como la propamidina (agente antimicrobiano perteneciente a la familia de las poliamidinas aromáticas)⁽¹⁹²⁾, el clodronato ha sido la sustancia más empleada en la literatura para estudiar los efectos de la depleción macrofágica in vivo. Por este motivo, y porque prácticamente no existen estudios experimentales que utilicen la propamidina con este propósito, hemos optado por usar clodronato en nuestro trabajo para producir depleción macrofágica del eje hepatoesplénico, y observar los efectos que produce sobre diversos parámetros como la toxicidad sistémica (signos tóxicos, movilidad, pérdida de peso) y la mortalidad.

3.1- DEPLECIÓN MACROFÁGICA Y TOXICIDAD SISTÉMICA

Hemos incluido tres variables para el análisis de la toxicidad sistémica, parámetro que nos permite conocer la afectación clínica del animal tras el traumatismo y, de forma indirecta, indicador de SIRS.

En los estudios experimentales publicados sólo se evalúan los signos de toxicidad sistémica o signos tóxicos⁽¹⁶³⁾. Hemos incluido como idea de nuestro grupo el análisis de dos variables más como son la pérdida de peso y la movilidad que, de una manera objetiva, nos permite evaluar la repercusión del traumatismo y la depleción macrofágica en el animal de experimentación.

En un trabajo precursor al nuestro⁽⁵⁴⁾ se analiza la pérdida de peso, demostrando que todos los animales sometidos a traumatismo sufren una pérdida de peso tras el mismo y que es tanto más acentuada como intenso es el trauma. En nuestro estudio, como segunda variable de toxicidad sistémica hemos analizado la diferencia de peso tras el traumatismo en ambos grupos (depleción macrofágica y control).

La última variable sometida a estudio fue la movilidad, índice que no había sido evaluado previamente y que es original de este trabajo; su análisis nos permite una rápida percepción del estado general del animal tras ser sometido a traumatismo y cómo se modifica tras la depleción macrofágica.

3.1.1- SIGNOS DE TOXICIDAD SISTÉMICA

Nos hemos basado en los signos de toxicidad sistémica descritos por Nieuwenhuijzen^(163, 193) para evaluar el SIRS en nuestros animales de experimentación. A los 4 signos tóxicos descritos (conjuntivitis, pelo rizado, letargia y diarrea) se han añadido otros como la respiración forzada, espasticidad, convulsiones, alopecia y ausencia de ingesta de líquidos y/o sólidos⁽¹⁶⁹⁾. A diferencia de Nieuwenhuijzen, se ha decidido no realizar una gradación de cada signo usando una escala de cinco puntos (0= ninguno; 1= mínimo; 2= moderado; 3= grave; 4= extenso), por lo subjetivo que puede resultar atribuir cada valor. En su lugar lo hemos simplificado asignando el valor 1 a la presencia de un determinado signo tóxico, o el valor 0 en caso de ausencia de éste. La suma de los signos presentes en cada animal constituye la toxicidad global. Así, si un animal presenta respiración forzada, conjuntivitis y pelo rizado, la toxicidad global será igual a 3. Un motivo de discusión sería si tiene el mismo significado en cuanto a gravedad presentar respiración forzada que conjuntivitis, ya que les asignamos el mismo

valor. Arbitrariamente hemos considerado que sí para facilitar la cuantificación de un parámetro tan difícil de medir como es la toxicidad sistémica.

Uno de los hallazgos a destacar es que al analizar los signos de toxicidad sistémica a las 24 horas de la agresión (Experimento 1) observamos, en contra de lo esperado, que hay mayor toxicidad global en los animales sometidos a depleción macrofágica que en los del grupo control (Tabla 14). Evidenciamos que el clodronato constituye por sí mismo un factor de riesgo para desarrollar toxicidad sistémica, independientemente de la energía del traumatismo (Tabla 15).

En la literatura, se describe una menor toxicidad sistémica en los animales sometidos a depleción macrofágica mediante clodronato que en los animales control en un modelo inflamatorio⁽¹⁶³⁾.

Una explicación a estos resultados contradictorios sería que, a diferencia de Nieuwenhuijzen que utiliza un modelo inflamatorio, nosotros utilizamos un modelo de politraumatismo.

Se ha descrito que, durante las primeras 48 horas que transcurren tras un trauma moderado-grave, se produce un estado de inmunosupresión postraumática debido a la presencia de macrófagos disfuncionales^(194, 195). Existe, en este periodo, un predominio de la actividad inhibitoria macrofágica, con aumento de la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias: prostaglandina E₂ (PGE₂) y supresión de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (IL₁); junto con un descenso importante de los niveles de Interferón gamma (activador macrofágico). Además, se ha descrito una alteración en el procesamiento y presentación del antígeno por parte de los macrófagos tras el traumatismo grave. Esta depresión de la respuesta inmune favorece el desarrollo de un estado séptico⁽¹⁹⁶⁾.

Posiblemente, al administrar clodronato en un modelo de politraumatismo moderado-grave, éste no sería fagocitado por los macrófagos disfuncionales (que presentan una alteración en la presentación y procesamiento del antígeno), permitiendo la liberación de citoquinas anti-inflamatorias por parte de éstos al no eliminarlos. En cambio, el clodronato sí ejercería su acción sobre los pocos macrófagos normofuncionantes existentes, inhibiendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias al destruirlos. Todo ello actuaría potenciando el estado de inmunosupresión y por ende, la toxicidad sistémica. Por otro lado, con la administración de suero fisiológico (animales control) no se interferiría en la evolución de la respuesta inmunitaria, este grupo presentaría menos signos tóxicos al no verse potenciado el estado de inmunosupresión postraumática. Esta teoría justificaría el aumento de los signos de toxicidad sistémica observados en nuestro trabajo a corto plazo, hecho que no se evidencia en un modelo inflamatorio.

El mecanismo de acción resultaría diferente en un modelo inflamatorio inducido por la inyección de zimosan⁽¹⁶³⁾. Se conoce que el glucano (estimulador macrofágico) es un elemento constituyente del zimosan, que propicia el estado pro-inflamatorio⁽¹⁹⁶⁾. El clodronato produciría su acción directamente sobre los macrófagos activados atenuando la aparición de signos de toxicidad sistémica, ya que en este modelo no existe un predominio de macrófagos disfuncionales como en el politraumatismo.

Hubieran sido interesantes los hallazgos en cuanto a signos tóxicos en el análisis a largo plazo (Experimento 2), pero no podemos sacar conclusiones al ser los datos insuficientes, posiblemente por tratarse de una muestra demasiado pequeña. Por otra parte, tampoco hemos encontrado trabajos experimentales que estudien los signos de toxicidad sistémica a largo plazo.

3.1.2- MOVILIDAD

Creemos que es importante destacar la movilidad (medida por el número de recuadros recorridos en un minuto) como indicador del estado general del animal. Aunque en la literatura no se describe ningún modelo similar, consideramos que el nuestro, además de sencillo, es un sistema bastante objetivo para medir la actividad del animal como indicador del estado de gravedad tras el traumatismo. Resulta obvio que un animal con actitud postrada y con escasa movilidad, presenta mayor gravedad que otro que se moviliza con agilidad. Además, el test se practica antes de que el animal entre en el estudio y después del traumatismo, lo que nos permite comparar la movilidad de cada ratón antes y después de la agresión.

Observamos que no hay diferencias en cuanto a movilidad entre los animales sometidos a depleción macrofágica y los del grupo control en el estudio a corto plazo (Experimento 1: Tabla 16). Pensamos que a las 24 horas, el estado de actividad del animal depende más de la acción del propio traumatismo, que del efecto del clodronato. Esta hipótesis se apoya en que observamos que los animales sometidos a traumatismo leve (Tabla 7) se movilizan casi el doble que los sometidos a un traumatismo de mayor intensidad o grave (Tabla 8), aunque sin alcanzar la significación estadística.

Uno de los hallazgos más interesantes lo obtenemos al evaluar la movilidad a largo plazo (Experimento 2). Si bien durante los dos primeros días después del traumatismo no hay diferencias en cuanto a movilidad entre grupos, observamos que entre los días tercero y noveno la movilidad es significativamente mayor en el grupo de depleción, para posteriormente igualarse de nuevo (Figura 12).

Una explicación a este fenómeno la encontraríamos en el efecto modulador de la respuesta inflamatoria descrito del clodronato. La acumulación de metabolitos derivados del clodronato en el interior del macrófago conduce a la muerte de éste; se produce una supresión transitoria de la función del macrófago con inhibición de la liberación de mediadores de la cascada inflamatoria. Este fenómeno es el llamado “efecto anti-inflamatorio” del clodronato⁽¹⁵⁸⁾. En consonancia con esto, en un modelo experimental de shock séptico, Fujimoto⁽¹⁹⁷⁾ evidencia un descenso de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF_{α}) y anti-inflamatorias (IL_{10}) en el plasma de ratones a los que se les induce depleción macrofágica mediante clodronato. Así mismo, se ha observado un descenso de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARN_m) de determinadas citoquinas (IL_1 , IL_{10} y TNF_{α}) tras la administración de clodronato en un modelo infeccioso inducido por la administración de lipopolisacárido⁽¹⁹⁸⁾.

De forma secundaria, vale la pena hacer mención al efecto analgésico descrito del clodronato. Es conocido que el tratamiento con bifosfonados es capaz de reducir el dolor asociado a diferentes enfermedades que cursan con reabsorción ósea⁽¹⁵⁶⁾. En esta línea, Bonabello⁽¹⁹⁹⁾, en un estudio experimental en ratones a los que aplica dos test algesimétricos, observa un efecto antinociceptivo central y periférico del clodronato. Aunque no puede establecer el mecanismo de acción, sugiere el papel de la farmacocinética del clodronato en la modulación del dolor en situaciones agudas no relacionadas con la osteolisis, probablemente relacionado con los receptores opiáceos celulares. No obstante, a pesar de lo atractivo de esta teoría, no se han publicado más trabajos sobre el tema.

En nuestro estudio, durante las primeras 48 horas observamos una movilidad similar en los animales de ambos grupos (clodronato y control), explicable por el hecho de que en

este periodo de tiempo prima el efecto del traumatismo por sí mismo, independientemente de producir depleción macrofágica o no. Este hallazgo se correlaciona con el hallado en el Experimento 1 en el que tampoco observamos variaciones de la movilidad 24 horas después del traumatismo al administrar clodronato; en cambio, sí observamos una tendencia a que se movilicen más los animales sometidos a un traumatismo leve que los sometidos a uno grave, indicándonos que en este periodo lo importante es la energía del traumatismo aplicada.

Pasados los primeros dos días evidenciamos, de forma significativa, que los animales a los que se les administra clodronato se movilizan más que los del grupo control. En este periodo la acción moduladora de la respuesta inflamatoria del clodronato se hace patente, observando una mayor recuperación de la actividad del animal tras la depleción macrofágica.

Estos hallazgos se correlacionan con la distribución trimodal de la morbimortalidad del traumatismo⁽³⁾. Con la administración de clodronato no actuamos sobre el momento agudo (cuyas lesiones dependen de la gravedad del traumatismo), sino que actuamos directamente sobre la tercera fase, modulando en parte, la respuesta inflamatoria.

3.1.3- PÉRDIDA DE PESO

Si nuestro modelo es válido como reflejo del politraumatismo humano, es lógico pensar que tiene que existir un balance nitrogenado intensamente negativo en los primeros días tras la agresión, hecho ya conocido desde la descripción por Cuthberson⁽²⁰⁰⁾ de las fases del metabolismo tras la agresión. La pérdida del nitrógeno muscular depende de la intensidad del traumatismo⁽²⁰¹⁾; en nuestro experimento (Experimento 2), sometemos a los animales a la misma energía de traumatismo, por lo que las diferencias observadas son atribuibles a la modulación de la toxicidad sistémica tras la administración de

clodronato. Tal y como apuntábamos en nuestra hipótesis, al inhibir el eje macrofágico hepatoesplénico se evita la activación de los macrófagos y la liberación de citoquinas, obteniéndose una disminución de la toxicidad sistémica, en este caso demostrada por una menor pérdida de peso de los animales sometidos a traumatismo y depleción respecto al grupo control.

Hemos demostrado que todos los animales sometidos a traumatismo sufren una pérdida de peso tras el mismo (Figura 11). Puede argumentarse que la pérdida de peso observada se podría deber a una menor ingesta en los animales traumatizados. Para descartar completamente esta objeción, deberíamos colocar a cada animal en una jaula metabólica, midiendo exactamente su ingesta oral y calculando el balance nitrogenado diario. Sin embargo, nuestros animales han sido sometidos a la misma intensidad de traumatismo, y por lo tanto, todos deberían tener las mismas dificultades a priori, y tardar el mismo tiempo en iniciar la ingesta oral.

Constatamos, como hallazgos más relevantes, que los ratones sometidos a depleción macrofágica presentaban una menor pérdida máxima de peso, con una recuperación del peso inicial más precoz y con una ganancia de peso al final del estudio casi dos veces mayor que los animales del grupo control. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, sí son de relevancia clínica (Figura 11).

Ya que se desconoce en la actualidad que el clodronato tenga efecto sobre el metabolismo nitrogenado directamente, una posible explicación a nuestros resultados la podemos encontrar en el efecto inhibitorio de la liberación de citoquinas del clodronato al producir depleción macrofágica^(158, 198). Ello permite al animal iniciar una actividad normal con mayor prontitud, facilitando una ingesta más precoz respecto a los animales del grupo control con la consiguiente mejoría del balance nitrogenado.

Creemos que la pérdida de peso es un dato de gran utilidad en cuanto que refleja de una forma objetiva la afectación metabólica del animal tras el traumatismo. Como parámetro indirecto de SIRS ha sido utilizado por primera vez en un estudio predecesor al nuestro siguiendo la misma línea investigadora⁽⁵⁴⁾, evidenciando que el tratamiento con Insulin-like Growth Factor (IGF-I) y hormona del crecimiento combinadas consigue atenuar la pérdida de peso de los animales traumatizados.

3.2- DEPLECIÓN MACROFÁGICA Y MORTALIDAD

Uno de nuestros principales objetivos ha sido demostrar que la depleción macrofágica produce un descenso de la mortalidad.

En contra de lo esperado, no hemos obtenido variaciones en cuanto a mortalidad precoz ni tardía entre los grupos comparados (Tabla 17).

Tiene lógica no hallar diferencias en la mortalidad precoz, ya que en etapas tan tempranas después del traumatismo es poco probable que pueda hacerse patente el efecto de la depleción macrofágica, siendo la mortalidad en estas primeras 24 horas causada por el impacto directo tal y como describieron Schildt y Nilsson⁽¹⁶⁵⁾ en su trabajo. Es más, no nos hubiera extrañado encontrar un aumento de la mortalidad precoz en el grupo al que se administra clodronato al impedir la primera línea de defensa que supone el sistema macrofágico contra cualquier agresión al organismo⁽¹⁴⁹⁾.

Es la mortalidad tardía la que está determinada por el desarrollo de un síndrome de disfunción multiorgánica; y es en ésta en la que hubiéramos esperado encontrar un descenso tras la administración de clodronato al interferir en el inicio de la cascada de mediadores inflamatorios, tal y como obtienen otros autores en trabajos similares al

nuestro, aunque con un modelo diferente^(163, 202). En un modelo inflamatorio de fracaso multiorgánico originado por la infusión de zimosan⁽¹⁶³⁾, se obtiene una incidencia de mortalidad al doceavo día del 0% en el grupo sometido a depleción macrofágica, y del 27% en el grupo control.

Se han publicado estudios con resultados similares a los nuestros en cuanto a depleción macrofágica y mortalidad. Por ejemplo, aunque el bloqueo de las células de Kupffer mediante cloruro de gadolinio, en un modelo de ligadura cecal y punción, atenúa la inmunidad sistémica mediada por células, la tasa de mortalidad está incrementada⁽²⁰³⁾. En otro trabajo⁽²⁰⁴⁾, la administración de clodronato encapsulado en liposomas antes y después de la inyección endovenosa de zimosan, no sólo no produjo variaciones en cuanto a la mortalidad, sino que su administración por vía intraperitoneal produjo un aumento de la mortalidad del 50 al 90%. Más recientemente⁽¹⁹⁷⁾, se ha observado en un modelo experimental de sepsis inducida por la instilación intrapulmonar de *Pseudomona Aeruginosa*, que la depleción macrofágica no produce un aumento de la supervivencia, aunque sí se evidencia un descenso de los niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias. En consonancia con este último estudio, nosotros hemos encontrado con nuestro modelo experimental que, sin variar la mortalidad, sí hemos sido capaces de modificar la respuesta inflamatoria, medida por la pérdida de peso y la movilidad, tras la administración de clodronato.

3.3- APLICABILIDAD CLÍNICA DEL CLODRONATO

Cada vez resulta más evidente que el clodronato es útil para modular la respuesta inflamatoria. En los últimos años, ha sido motivo de estudio la aplicabilidad del clodronato encapsulado en liposomas como inhibidor de la cascada inflamatoria en el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas por macrófagos⁽²⁰⁵⁾.

En un estudio experimental en ratones⁽²⁰⁶⁾ se ha demostrado su efectividad en el manejo de la púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI). Esta enfermedad cursa con la presencia de anticuerpos contra las plaquetas circulantes, produciéndose un secuestro de las plaquetas sensibilizadas en el hígado y en el bazo. En los últimos años se ha confirmado la importancia de los receptores Fc gamma de los macrófagos en el secuestro de plaquetas en esta enfermedad. La depleción de los macrófagos hepáticos y esplénicos mediante clodronato encapsulado inhibe de forma dosis dependiente la trombocitopenia inducida por anticuerpos, además de restaurar rápidamente (24 horas) el recuento de plaquetas a valores hematológicamente seguros.

Existen otros trabajos que estudian el papel de los macrófagos hepáticos y esplénicos en un modelo experimental en ratones de Síndrome Hemolítico Urémico (HUS) inducido por la inyección de la toxina Shiga 2⁽²⁰²⁾. El HUS es un síndrome clínico caracterizado por anemia, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda; la presencia de citoquinas como el TNF α e IL $_{1\beta}$ son necesarias para el desarrollo de este síndrome. Este estudio demuestra que la depleción macrofágica mediante clodronato encapsulado aumenta la supervivencia en el 50% de los animales a los que se les inyecta la toxina Shiga 2.

Sería interesante que en un futuro se pudiesen realizar estudios clínicos sobre el efecto inhibitorio de la cascada inflamatoria del clodronato en pacientes politraumatizados. Por el momento, es posible que aún no sea factible, ya que quedan importantes cuestiones por resolver como en qué momento administrar el clodronato, qué efectos indeseables en cuanto a toxicidad sistémica presenta en pacientes politraumatizados y en qué tipo de traumatismo atendiendo a su energía (leve, moderado o grave) sería aplicable, entre otras.

Con nuestro trabajo se deja una línea de investigación abierta a futuros estudios experimentales que nos acerquen a prevenir o atenuar el síndrome de disfunción multiorgánica que se produce tras el politraumatismo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- Los animales sometidos a un traumatismo tienen mayor incidencia de translocación bacteriana que los del grupo control y ésta depende de la energía del traumatismo. Tras un traumatismo leve, los animales que son sometidos a depleción macrofágica tienen más tendencia a translocar que los animales no deplecionados.

- 2- Toxicidad sistémica:
 - La administración de clodronato es un factor de riesgo de presentar signos de toxicidad sistémica independientemente de la energía del traumatismo.
 - Transcurridas las primeras 48 horas tras el traumatismo, los animales sometidos a depleción macrofágica presentan mayor movilidad que los animales del grupo control.
 - Los animales sometidos a depleción macrofágica pierden menos peso y lo recuperan antes que los animales no deplecionados.

- 3- La mortalidad no se ve afectada por la depleción macrofágica en nuestro modelo de politraumatismo experimental.

RESUMEN

RESUMEN

Debido a los avances de los últimos años en el cuidado de enfermos críticos, ha surgido un nuevo tipo de paciente, el paciente crónicamente crítico o con Síndrome de Disfunción Multiorgánica (MODS).

Un 30% de los pacientes politraumáticos desarrollan un MODS, constituyendo la principal causa de muerte en éstos transcurridas las primeras 24 horas tras la agresión.

La disfunción secuencial de órganos aparece después de un periodo de días o semanas del insulto original. Generalmente empieza por un fracaso respiratorio seguido de fracaso intestinal, hepático, renal, hematológico y cardiaco. El orden exacto de aparición varía en función de las enfermedades preexistentes y de la naturaleza del insulto causal. La mortalidad se correlaciona con el número de órganos afectados así como con la edad y duración de la disfunción orgánica.

Durante tres décadas, las investigaciones se han centrado en encontrar un agente específico como causa del MODS. Inicialmente, se creyó que era una infección incontrolada la que precipitaba la disfunción multiorgánica. Posteriormente quedó claro que la infección era el estímulo iniciador en sólo la mitad de los pacientes con MODS, en el otro 50% este síndrome ocurre sin identificar un foco infeccioso. Así, los estudios se centraron en la respuesta del huésped frente a la agresión. Una reacción inflamatoria localizada es una respuesta fisiológica protectora que es controlada por el organismo en el lugar de la agresión. La pérdida del control local o una desmesurada activación de esta respuesta, da lugar a una exagerada respuesta sistémica identificada clínicamente como SIRS. Ante esta situación se activan unos mecanismos compensadores y el resultado final (resolución, MODS o muerte), depende del balance entre el SIRS y sus

mecanismos compensadores (CARS). Se desarrolla un MODS cuando las respuestas inflamatoria o anti-inflamatoria del huésped a la agresión (o ambas) son excesivas.

El descubrimiento de múltiples mediadores inflamatorios abrieron camino a nuevas teorías sobre la patogénesis del MODS incluidas dentro de la respuesta “hiperactiva” a la agresión: teoría de la isquemia-reperfusión, teoría de los mediadores y teoría del intestino. La teoría del intestino como “motor” del MODS se basa en que las endotoxinas y bacterias translocadas llegan a los macrófagos del eje hepato-esplénico que al ser activados inician la síntesis y liberación incontrolada de citoquinas a la circulación sistémica conduciendo a un SIRS y posteriormente a la disfunción multiorgánica.

Los mediadores inflamatorios se consideran los causantes de una generalizada, persistente y exagerada respuesta inflamatoria del huésped. Las terapias anti-mediadores surgieron en un intento de atenuar la respuesta inflamatoria a la agresión; a pesar de los numerosos estudios clínicos realizados en este campo, los resultados han sido decepcionantes.

Ya que sabemos que actuar sobre la cascada inflamatoria una vez iniciada está condenado al fracaso, formulamos una hipótesis basada en impedir la activación de ésta en su mismo origen. Una revisión de la literatura nos hizo saber que existe la posibilidad de eliminar selectivamente los macrófagos del eje hepato-esplénico mediante la administración de clodronato contenido en liposomas. A pesar de que la depleción macrofágica aumenta la translocación bacteriana (las bacterias no son fagocitadas y pasan a la circulación sistémica), se evita la activación de los macrófagos y la liberación de la cascada de mediadores inflamatorios.

Aplicando esta hipótesis a un modelo de politraumatismo experimental hemos evidenciado un aumento en la incidencia de translocación bacteriana tras la depleción macrofágica en un traumatismo de baja intensidad. Al evaluar los efectos de la eliminación macrofágica sobre la toxicidad sistémica hemos observado un efecto tóxico del clodronato (aumento de los signos de toxicidad sistémica) no descrito anteriormente. A pesar de esto sí hemos demostrado una modulación de la respuesta inflamatoria basada en la mayor movilidad y menor pérdida de peso de los animales sometidos a depleción macrofágica. Sin embargo, a pesar de haber sido descrito, no hemos observado diferencias en cuanto a mortalidad al administrar o no clodronato.

Todos estos hallazgos nos llevan a concluir que la depleción macrofágica en un modelo de politraumatismo no mejora la mortalidad aunque sí modula, en parte, la respuesta inflamatoria.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Navarro Soto S. Metabolismo y nutrición en el paciente politraumatizado. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 1989.
2. Pla de Salut de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social: Generalitat de Catalunya; 1999-2001.
3. American Trauma Life Support. 6th ed; 1997.
4. Shires GT, Cunningham J, CR. B. Alterations in cellular membrane function during hemorrhagic shock in primates. *Ann Surg* 1972;176:288-295.
5. Montgomery A, Stager M, Carrico C, Hudson L. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:485-489.
6. Gómez Rubí J, Nicolás S, Seller G. Shock y fracaso multiorgánico en el politraumatizado grave. Springer-Verlag Ibérica SA, editor. Shock y fallo multiorgánico. Barcelona; 1992. p. 179-189.
7. Baker C, Oppenheimer L, Stephens B. Epidemiology of trauma deaths. *Am J Surg* 1980;140:144-150.
8. Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potencial future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134.
9. Tran DD, Cuesta MA, van Leeuwen PA, Nauta JJ, Wesdorp RI. Risk factors for multiple organ system failure and death in critically injured patients. *Surgery* 1993;114(1):21-30.
10. Tilney N, Bailey G, Morgan A. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: An unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg* 1973;178:117-122.
11. Baue AE. Multiple, progressive or sequential systems failure: A syndrome of the 1970s. *Arch Surg* 1975;110:779-781.
12. Border J, Chemier R, McManamy R. Multiple systems organ failure: Muscle fuel deficit with visceral protein malnutrition. *Surg Clin North Am* 1976;56:1147-1167.
13. Eiseman B, Beart R, Norton L. Multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet* 1977;144:323-326.
14. Fry D, Garrison R, Williams H. Patterns of morbidity and mortality in splenectomy for trauma. *Am Surg* 1980;46:28-32.
15. Fry D, Garrison R, Heitch R. Determinants of death in patients with intraabdominal abscess. *Surgery* 1980;89:517-523.
16. Fry D, Pearlstein L, Fulton R, Polk H. Multiple system organ failure: the role of uncontrolled infection. *Arch Surg* 1980;115:136-140.
17. Norton L. Does drainage of intra-abdominal pus reverse multiple organ failure? *Am J Surg* 1985;149:347-350.
18. Goris R, teBoekhorst T, Nuytinck K. Multiple organ failure: Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 1985;115:136-140.
19. Marshall J, Chistou N, Hom R. The microbiology of multiple organ failure. *Arch Surg* 1988;123:309-315.
20. Cerra FB, Maddaus M, Dunn D. Selective gut decontamination reduces nosocomial infections and length of stay but not mortality or organ failure in surgical intensive care unit patients. *Arch Surg* 1992;127:163-169.

21. Beutler B, Greenwald D, Hulmes K. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. *Nature* 1985;316:552-554.
22. Okusawa S, Gelfand J, Ikejima T. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits: Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclo-oxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;81:1162-1172.
23. Damas P, Reuter A, Gysen P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1989;17:975-978.
24. Baue AE. The horror autotoxicus and multiple organ failure. *Crit Care Med* 1992;17:975-978.
25. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20(4):411-7.
26. Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
27. Ziegler E, Fisher C, Sprung C. Treatment of Gram-negative bacteriemia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med* 1991;324:429-436.
28. Greenberg R, Wilson K, Kunz A, Wedel N, Gorelick K. Observations using antiendotoxin antibody (E5) as adjuvant therapy in humans with suspected, serious, Gram-negative sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:730-735.
29. Bone RC, Balk R, Fein AM. A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group. 1995;23:994-1006.
30. Opal S, Gluck T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31(1):S57-S64.
31. McCloskey R, Straube R, Sanders C. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1994;121:1-5.
32. Fisher C, Opal S, Dhainaut J. Influence on an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels of patients with sepsis. *Crit Care Med* 1993;21:318-327.
33. Dhainaut J, Vincent J, Richard C. CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor alpha: Safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody and cytokine concentrations in patients with septic shock. *Crit Care Med* 1995;23:1461-1469.
34. Abraham E, Wunderink R, Silverman H. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *JAMA* 1995;273:934-941.
35. Fisher C, Dhainaut J, Opal S. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: Results from a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *JAMA* 1994;271:1836-1843.
36. Marshall J. Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: What have we learned? *Intensive Care Med* 2000;26:S75-S83.
37. Matsubara T. Monoclonal antibodies against inflammatory mediators for the treatment of patients with sepsis. *Nippon Rinsho* 2002;60(3):578-84.
38. Godin P, Buchman T. Uncoupling of biological oscillators: A complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 1996;24(7):1107-1116.

39. Seely A, Christou NV. Multiple organ dysfunction syndrome: exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med* 2000;28:2193-2200.
40. Levy M, Fink MP, Marshall J, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31(4):1250-1256.
41. Bone RC, Balk R, Cerra FB. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. *Chest* 1992;100:1644-1655.
42. Marshall J. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2001;29(7Suppl.):99-106.
43. Marshall J, Cook D, Christou N, Bernard G, Sprung C, Sibbald W. The multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995;23:1638-1652.
44. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997;84(7):920-35.
45. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996;24(1):163-72.
46. Nathens AB, Marshall JC. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name? *World J Surg* 1996;20(4):386-91.
47. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995;75(2):257-77.
48. Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 1996;20(4):418-21.
49. Bersten A, Sibbald W. Acute lung injury in septic shock. *Crit Care Clin* 1989;5:49-79.
50. Pape HC, Remmers D, Kleeman W, Goris RJ. Posttraumatic multiple organ failure: a report on clinical and autopsy findings. *Shock* 1996;2:228-234.
51. Faist E, Baue A. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma* 1983;23:775.
52. Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Zetl R, Kick M. Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. *J Trauma* 1996;40:624-631.
53. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125(8):680-7.
54. Rebas Cladera P. Utilidad de Insulin-like Growth Factor-I y Hormona del Crecimiento en el tratamiento del fallo multiorgánico secundario a un politraumatismo experimental. Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina; 1997.
55. Schlag G, Redl H, Hallstrom S. The cell in shock: the origin of multiple organ failure. *Resuscitation* 1991;21(2-3):137-80.
56. Bulkley G. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet* 1994;344:934-936.
57. Zimmermann B, Granger D. Lesión por reperfusión. En: *Clínicas Quirúrgicas de Norteamérica*; 1992. p. 61-78.
58. Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 1996;20(4):406-10.
59. Koike K, Moore F, Moore E. Gut ischemia mediates lung injury by xanthine-oxidase dependent neutrophil mechanisms. *J Surg Res* 1993;54:469-473.

60. Jarasch E, Bruder G, Heid H. Significance of xantine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 1986;548:39-46.
61. Fink MP. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma and sepsis. *Crit Care Med* 1991;19,May:627-641.
62. Carden D, Smith J, Zimmermann B, Korthuis R, Granger D. Reperfusion injury following circulatory collapse: the role of reactive oxygen metabolites. *J Crit Care* 1989;4:294-307.
63. Hinshaw D, Burger J. Protective effects of glutamine on endothelial cell ATP in oxidant injury. *J Surg Res* 1990;49:222-227.
64. Koike K, Moore E, Moore F. Phospholipase A2 inhibition decouples lung injury from gut ischemia-reperfusion. *Surgery* 1992;112(2):173-180.
65. Koike K, Moore EE, Moore FA, Read RA, Carl VS, Banerjee A. Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. *Crit Care Med* 1994;22(9):1438-44.
66. Malmros C, Holst E, Hansson L. Dynamic accumulation of neutrophils in lungs and visceral organs during early abdominal sepsis in the pig. *World J Surg* 1994;18:811-817.
67. Deitch EA. Cytokines yes, cytokines no, cytokines maybe? *Crit Care Med* 1993;21(6):817-819.
68. Durum S, Oppenheim J. Proinflammatory cytokines and immunity. In: *Fundamental Immunology*. Third ed. New York: Raven Press; 1993. p. 801-834.
69. Dinarello CA. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112:321S-329S.
70. van der Poll T, van Deventer SJ, Hack CE. Effects of leucocytes following injection of tumor necrosis factor into healthy humans. *Blood* 1991;79:693-698.
71. Casey L, Balk R, Bone RC. Plasma cytoquine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993;119:771-778.
72. Panacek E, Kaul M. IL-6 as a marker of excessive TNF-alfa activity in sepsis. *Sepsis* 1999;3:65-73.
73. Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidants vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 1996;24:392-397.
74. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor alfa concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-384.
75. Pellegrini J, Puyana J, Lapchak P. A membrane TNF-alfa/TNFR ratio correlate to MODS score and mortality. *Shock* 1996;6:389-396.
76. Guirao X, Lowry S. Biologic control of injury and inflammation: much more than too little or too late. *World J Surg* 1996;20:437-446.
77. Zeni F, Freeman B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: A reassessment. *Crit Care Med* 1997;25(7):1095-1100.
78. Fraenkel A. Ueber peritoneale infektion. *Wien Klin Wochenschr* 1891;4:265-285.
79. Flexner S. Peritonitis caused by migration of the *Micrococcus Lanceolatus* from the intestine. *John's Hopkins Hosp Bull* 1895;6:64-67.
80. von Gierke E. *Handbuch der Speziellen Patologische Anatomic und Histologie*. Berlin: Julius Springerr; 1926.
81. Abt I. *Pediatrics*. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1923.

82. Arnold L, Brody L. Passage of bacteria through the intact intestinal mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 1928;25:247-248.
83. Schweinburg F, Seligman A, Fine J. Transmural migration of bacteria. Study based on use of radioactive Escherichia Coli. *N Engl J Med* 1950;242:747-751.
84. Jacob S, Weizel H, Gordon E, Korman H, Schweinburg F, Frank H, et al. Bacterial action in development of irreversibility to transfusion in hemorrhagic shock in the dog. *Am J Physiol* 1954;179:523-540.
85. Fine J. Current status of the problem of traumatic shock. *Surg Gynecol Obstet* 1965;120:537-544.
86. Ravin H, Rowley D, Jenkins C, Fine J. On the absorption of bacterial endotoxin from the gastrointestinal tract of the normal and shocked animal. *J Exp Med* 1960;112:783-790.
87. Berg R, Garlington A. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403-411.
88. Alexander JW, Boyce S, Babcock GF, Gianotti L, Peck M, Dunn D, et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990;212:496-512.
89. Polk H, Shields C. Remote organ failure: a valid sign of occult intra-abdominal infection. *Surgery* 1977;81:310-313.
90. Kreger B, Craven D, Carling P, McCabe W. Gramnegative bacteriemia. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980;68:332-343.
91. Meakins J, Marshall J. The gastrointestinal tract: The motor of multiple organ failure. *Arch Surg* 1986;121:197-201.
92. Marshall J, Chistou N, Meakins J. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg* 1993;218:111-119.
93. Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 1997;84(10):1340-50.
94. Brathwaite CE, Ross SE, Nagele R, Mure AJ, O'Malley KF, Garcia-Perez FA. Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence. *J Trauma* 1993;34(4):586-9; discussion 589-90.
95. Reed L, Martin M, Mangano R, Newson B, Kocka F, Barrett J. Bacterial translocation following abdominal trauma in humans. *Circ Shock* 1994;42:1-6.
96. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 1988;28(7):896-906.
97. Deitch EA, Morrison J, Berg R, Specian RD. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. *Crit Care Med* 1990;18:529-536.
98. Yong-Ming Y, Bahrami S, Leichtfried G, Redl H, Schlag G. Pathogenesis of hemorrhage-induced bacteria/endotoxin translocation in rats. Effects of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein. *Ann Surg* 1995;221:398-405.
99. Barber A, Illner H, Shires GT. Bacterial translocation in burn injury. *Semin Nephrol* 1993;13(4):416-9.
100. Herndon D, Zeigler S. Bacterial translocation after thermal injury. *Crit Care Med* 1993;21:50-54.
101. Baron P, Traber L, Nguyen TS, Hollyoak M, Heggors J, Herndon D. Gut failure and translocation following burn and sepsis. *J Surg Res* 1994;57:197-204.

102. Marshall JC. The ecology and immunology of the gastrointestinal tract in health and critical illness. *J Hosp Infect* 1991;19 Suppl C:7-17.
103. Berg R. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tract of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. *Infect Immun* 1981;33:854-861.
104. Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989;124:699-701.
105. Madara J. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 1990;137:1273-1281.
106. Antonsson J, Fiddian-Green RG. The role of the gut in shock and multiple organ failure. *Eur J Surg* 1991;157:3-12.
107. Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S, et al. Clinical significance of translocation. *Gut* 1994;35(1 Suppl):S28-34.
108. Jacob A, Goldberg P, Bloom N, Degenstein G, Kozinn P. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977;72:1268-1270.
109. Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990;159:79-84.
110. Reynolds J, Murchan P, Redmond H, Watson R, Leonard N, Hill A, et al. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Br J Surg* 1995;82:534-538.
111. Berg R. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995;3:149-154.
112. Barber A, Jones W, Minei J, Fahey T, Lowry S, Shires GT. Bacterial overgrowth and intestinal atrophy in the etiology of gut barrier failure in the rat. *Am J Surg* 1991;161:300-304.
113. Steffen E, Berg R. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immun* 1983;39:1252-1259.
114. Steffen E, Berg R, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis* 1988;157:1032-1038.
115. Spaeth G, Berg R, Specian RD, Deitch EA. Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1990;108:240-247.
116. Spaeth G, Gottwald T, Specian RD, Mainous MR, Berg R, Deitch EA. Secretory immunoglobulin A, intestinal mucin, and mucosal permeability in nutritionally induced bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1994;220:798-808.
117. Albanese C, Smith S, Watkins S, Kurkchubasche A, Simmons R, Rowe M. Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. *J Am Coll Surg* 1994;179:679-688.
118. Berg R. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Curr Microbiol* 1983;8:285-292.
119. Owens W, Berg R. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract in thymectomized mice. *Curr Microbiol* 1982;7:169-174.
120. Gautreaux M, Gelder F, Deitch EA, Berg R. Adoptive transfer of lymphocytes to T-cell-depleted mice inhibits escherichia coli translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1995;63:3827-3834.
121. Dijkstra H, Apperloo-Renkema H, Manson W, van der Waaij D, Klasen H. The role of systemic antibodies against intestinal *Escherichia coli* in the prevention

- of bacterial translocation of *Escherichia coli* in a burn model in mice. *J Trauma* 1994;36:482-485.
122. Deitch EA, Bridges W, Berg R, Specian RD, Granger D. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. *J Trauma* 1990;30:942-952.
 123. Sagar PM, MacFie J, Sedman PC, Mancey-Jones B, Johnstone D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum* 1995;38:640-644.
 124. Deitch EA, Bridges W, Ma J, Ma L, Berg R, Specian RD. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. *Am J Surg* 1990;159:394-401.
 125. Berg R, Wommack E, Deitch EA. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch Surg* 1988;123:1359-1364.
 126. Jones W, Minei J, Barber A, Rayburn J, Fahey T, Shires GT. Bacterial translocation and intestinal atrophy after thermal injury and burn wound sepsis. *Ann Surg* 1990;211:399-405.
 127. Guzman-Stein G, Bonsack M, Liberty J, Delaney J. Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res* 1989;46:104-107.
 128. Mainous MR, Xu D, Deitch EA. Role of xanthine-oxidase and prostaglandins in inflammatory-induced bacterial translocation. *Circ Shock* 1993;40:99-104.
 129. Deitch EA, Specian RD, Grisham M, Berg R. Zymosan-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. *Crit Care Med* 1992;20:782-788.
 130. Deitch EA, Ma J, Ma L, Berg R, Specian RD. Endotoxin-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. *Surgery* 1989;106:292-300.
 131. Foitzik T, Fernandez-del Castillo C, Ferraro M, Mithofer K, Rattner D, Warshaw A. Pathogenesis and prevention of early pancreatic infection in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg* 1995;222:179-185.
 132. Runkel N. Pathogenesis of pancreatogenic sepsis. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:439-42.
 133. Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003;7(1):26-35; discussion 35-6.
 134. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990;125(3):403-4.
 135. Fink MP, Cohn S, Lee P, Rothschild H, Deniz Y, Wang H, et al. Effect of lipopolysaccharide on intestinal intramucosal hydrogen ion concentration in pigs: evidence of gut ischemia in a normodynamic model of septic shock. *Crit Care Med* 1989;17:641-646.
 136. Xu D, Qiu H, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deitch EA. Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis. *J Trauma* 1993;34:676-683.
 137. Deitch EA, Taylor M, Grisham M, Ma L, Bridges W, Berg R. Endotoxin induces bacterial translocation and increases xanthine oxidase activity. *J Trauma* 1989;29:1679-1683.
 138. Deitch EA, Specian RD, Berg R. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med* 1991;19:785-791.

139. Deitch EA, Specian RD, Berg R. Induction on early-phase tolerance to endotoxin-induced mucosal injury, xanthine oxidase activation, and bacterial translocation by pretreatment with endotoxin. *Circ Shock* 1992;36:208-216.
140. Lipman T. Bacterial translocation and enteral nutrition in humans: an outsider looks in. *JPEN* 1995;19:156-165.
141. Deitch EA, Ma WJ, Ma L, Berg RD, Specian RD. Protein malnutrition predisposes to inflammatory-induced gut-origin septic states. *Ann Surg* 1990;211(5):560-7; discussion 567-8.
142. Wilmore D, Smith R, O'Dwyer S, Jacobs D, Ziegler T, Wand X. The gut: A central organ after surgical stress. *Surgery* 1988;104:917-923.
143. Souba W, Herskowitz K, Klimberg V. The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann Surg* 1990;212:543-545.
144. Herskowitz K, Souba W. Intestinal glutamine metabolism during critical illness: A surgical perspective. *Nutrition* 1990;6:199-206.
145. Elsen R, Bistrain B. Recent developments in short-chain fatty acid metabolism. *Nutrition* 1990;7:7-10.
146. Illig K, Ryan C, Hardy D, Rhodes J, Locke W, Sax H. Total parenteral nutrition-induced changes in gut mucosal function: atrophy alone is not the issue. *Surgery* 1992;112:631-637.
147. Tjardes T, Neugebauer E. Sepsis research in the next millennium: concentrate on the software rather than the hardware. *Shock* 2002;17(1):1-8.
148. Roitt I. Inmunidad innata. Panamericana Em, editor. En: *Inmunología*. 9ª ed; 1998. p. 3-21.
149. Unanue E, Allen P. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987;236:551-557.
150. Keller G, West MA, Cerra FB, Simmons R. Macrophage mediated modulation of hepatic function in multiple-system failure. *J Surg Res* 1985;39:555-563.
151. Callery MP, Kamei T, Mangino M, Flye W. Organ interactions in sepsis: host defense and the hepatic-pulmonary macrophage axis. *Arch Surg* 1991;126:28-32.
152. Kagan E, Hartmann D. Elimination of macrophages with silica and asbestos. *Methods Enzymol* 1984;108:325-329.
153. van Rooijen N. The liposome-mediated macrophage "suicide" technique. *J Immunol Methods* 1989;124:1-6.
154. van Rooijen N. Liposome-mediated elimination of macrophages. *Res Immunol* 1992;143(2):215-9.
155. Frith J. Antagonistic effects of different classes of bisphosphonates in osteoclasts and macrophages in vitro. *J Bone Miner Res* 2003;18(2):204-212.
156. Brandi ML. Use of clodronic acid in mineral metabolism conditions: state of the art in 2000. *Minerva Med* 2001;92(4):251-68.
157. Ghinoi V. Clodronate: mechanisms of action on bone remodelling and clinical use in osteometabolic disorders. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3(11):1643-1656.
158. Frith J, Monkkonen J, Auriola S. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum* 2001;44(9):2201-2210.
159. van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with

- liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 1990;260(2):215-22.
160. van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994;174(1-2):83-93.
 161. van Rooijen N, Kors N, Kraal G. Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J Leukoc Biol* 1989;45(2):97-104.
 162. Yamamoto T, Naito M, Moriyama H, Umezu H, Matsuo H, Kiwada H, et al. Repopulation of murine Kupffer cells after intravenous administration of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Am J Pathol* 1996;149(4):1271-86.
 163. Nieuwenhuijzen GA, Haskel Y, Lu Q, Berg RD, van Rooijen N, Goris RJ, et al. Macrophage elimination increases bacterial translocation and gut-origin septicemia but attenuates symptoms and mortality rate in a model of systemic inflammation. *Ann Surg* 1993;218(6):791-9.
 164. López Negre J. Politraumatismo experimental. *Metabolismo de los lípidos e hígado graso*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. 1994.
 165. Schildt B, Nilsson A. A method for standardized mechanical trauma in mice. *Europ Surg Res* 1970;2:181-187.
 166. Love WG, Camilleri JP, Williams BD. Efficient clodronate entrapment within multilamellar and unilamellar liposomes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992;27(3):185-9.
 167. Hanley J, McNeil B. The meaning and use of the area under de Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29-36.
 168. Hanley J, McNeil B. A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristics curves derived from the same cases. *Radiology* 1983;148:839-843.
 169. Olfert E. Defining an acceptable endpoint in invasive experiments. *AWIC Newsletter* 1995;6(1):3-7.
 170. Moore F, Sauaia A, Moore E. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996;40:501-512.
 171. Redl H, Schlag G, Bahrami S. Animals models as the basis of pharmacologic intervention in trauma and sepsis patients. *World J Surg* 1996;20:487-492.
 172. Grotz M, Regel G, Dwenger A. Ein standardisiertes Grosstiermodell zum Multiorganversagen nach schwerem Trauma. *Unfallchirurg* 1995;98:63-71.
 173. Remmers D, Dwenger A, Grotz M. Attenuation of multiple organ dysfunction in a chronic sheep model by 21-aminosteroid U74389G. *J Surg Res* 1996;62:278-283.
 174. Dwenger A, Remmers D, Grotz M. Aprotinin prevents the development of the trauma-induced multiple organ failure in a chronic sheep model. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:207-214.
 175. Saadia R. Trauma and bacterial translocation. *Br J Surg* 1995;82(9):1243-4.
 176. Carrico C. The elusive pathophysiology of the multiple organ failure syndrome. *Ann Surg* 1993;218:109-110.
 177. Fink MP. Effect of critical illness on microbial translocation and gastrointestinal mucosa permeability. *Semin Respir Infect* 1994;9(4):256-60.
 178. Salman F, Buyruk M, Gurler N. The effect of surgical trauma on the bacterial translocation from the gut. *J Pediatric Surg* 1992;27(7):802-804.

179. Deitch EA, Rutan R, Waymack JP. Trauma, shock, and gut translocation. *New Horiz* 1996;4(2):289-99.
180. Oztuna V, Erson G, Ayan I. Head injury-associated bone fractures induce bacterial translocation: an experimental study. *J Orthop Trauma* 2004;18(2):92-95.
181. Li Z, Yang X, Lu L. Gut barrier function damage following multiple firearm injuries in a porcine model. *Chin Med Sci J.* 2001;16(4):209-213.
182. Deitch EA, Berg R, Specian RD. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185-190.
183. Helton W, Rockwell M, García R. TPN-induced sympathetic activation is related to diet, bacterial translocation, and an intravenous line. *Arch Surg* 1995;130:209-214.
184. Harris BH, Gelfand JA. The immune response to trauma. *Semin Pediatr Surg* 1995;4(2):77-82.
185. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24(7):1125-8.
186. Gullo A, Berlot G. Ingredients of organ dysfunction or failure. *World J Surg* 1996;20(4):430-6.
187. Fisher C, Zheng Y. Potencial strategies for inflammatory mediator manipulation: retrospect and prospect. *World J Surg* 1996;20:447-453.
188. Greenman R, Shein R, Martin M. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gramsepsis. *JAMA* 1991;266:1097-1102.
189. Rogy M, Moldawer L, Oldenburg H. Anti-endotoxin therapy in primate bacteremia with HA-1A and BPI. *Ann Surg* 1994;220:77-85.
190. Gennari R, Alexander J, Pyles T. Effects of antimurine interleukin-6 on bacterial translocation during gut-derived sepsis. *Arch Surg* 1994;129:1191-1197.
191. Wang Q, Fisher J, Hasselgren P. Treatment of endotoxemic mice with anti-interleukin-6 antibody paradoxically increases interleukin-6 levels and stimulates mucosal protein synthesis. *Arch Surg* 1997;132:82-88.
192. van Rooijen N, Sanders A. Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology* 1996;May 23(5):1239-1243.
193. Nieuwenhuijzen GA, Meyer MP, Hendriks T, Goris RJ. Deficiency of complement factor C5 reduces early mortality but does not prevent organ damage in an animal model of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 1995;23(10):1686-93.
194. Faist E, Mewes A, Strasser T. Alteration of monocyte function following major trauma. *Arch Surg* 1988;123:287-292.
195. Faist E, Wichmann MW. Immunology in the severely injured. *Chirurg* 1997;68(11):1066-70.
196. Browder W, Willians D, Pretus H. Beneficial effect of enhanced macrophage function in the trauma patient. *Ann Surg* 1990;211(5):605-613.
197. Fujimoto J, Wiener-Kronish JP, Hashimoto S, Sawa T. Effects of C12MDP-encapsulating liposomes in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *J Liposome Res* 2002;12(3):239-57.
198. Salkowski CA, Neta R, Wynn TA, Strassmann G, van Rooijen N, Vogel SN. Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression and radioprotection. *J Immunol* 1995;155(6):3168-79.

199. Bonabello A, Galmozzi M, Bruzzese T. Analgesic effect of biphosphonates in mice. *Pain* 2001;Apr;91(3):269-75.
200. Cuthbertson D. Observations on the disturbance of metabolism produced by injury to the limbs. *Q. J. Med* 1931;2:233-246.
201. Cuthbertson D. Post-shock metabolic response. *Lancet* 1942;1:433-436.
202. Palermo S, Alves-Rosa F, van Rooijen N. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethal effect of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):462-467.
203. Callery MP, Kamei T, Flye W. Kupffer cell blockade increases mortality during intra-abdominal sepsis despite improving systemic immunity. *Arch Surg* 1990;125:36-41.
204. Nieuwenhuijzen GA, Knapen MF, Hendriks T, van Rooijen N, Goris RJ. Elimination of various subpopulations of macrophages and the development of multiple-organ dysfunction syndrome in mice. *Arch Surg* 1997;132(5):533-9.
205. van Rooijen N, van Kesteren-Hendrikx E. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. *J Liposome Res* 2002;12(1-2):81-94.
206. Alves-Rosa F, Stanganelli C, Cabrera J. Treatment with liposome-encapsulated clodronate as a new strategic approach in the management of immune thrombocytopenic purpura in a mouse model. *Blood* 2000;Oct 15;96(8):2834-2840.