

Reproducción de un modelo experimental para sepsis abdominal

Reproduction of an experimental model for abdominal sepsis

Dr. Jesús Tapia Jurado, Dr. José Luis Jiménez Corona, MVZ Benjamín León Mancilla, QFB Carmen Magdalena Peña Jiménez, ENF Carolina Baños Galeana, Dr. Juan José García García

Resumen

Objetivo: Reproducir un modelo de sepsis abdominal en el animal de experimentación. **Sede:** Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM. **Sede:** Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

Diseño: Descriptivo, comparativo.

Análisis estadístico: Se compararon los grupos a las 24, 48 y 96 horas, utilizando las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

Material y métodos: Se operaron 18 ratas Wistar, divididas en 3 grupos:

Grupo I: Se realizó laparotomía y cierre de pared. **Grupos II y III:** Se realizó laparotomía y se ligó con jareta la base del ciego, al que se le realizaron tres punciones con aguja 20 gauge y se cerró la pared abdominal. A las 24 horas a los 3 grupos se les laparotomizó y cultivó la cavidad abdominal. Además al Grupo III se le lavó la cavidad abdominal con solución salina y se cerró. A las 48 y 96 horas se realizó nuevamente laparotomía y cultivo de cavidad abdominal.

Resultados: Existieron diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo I con respecto a los grupos II y III. La comparación entre estos dos últimos a las 48 horas no mostró diferencias en el número de UFC. A las 96 horas sólo se encontraron diferencias entre el grupo control y el grupo II (p 0.010). Entre los grupos I y III no hubo diferencias, (p 0.076), sin embargo, es compatible con el posible efecto del lavado con solución salina que igualó condiciones.

Conclusiones: Se demostró estadísticamente que la punción del ciego ligado produce aumento significativo en el número de UFC/ml, y que al lavar la cavidad abdominal con solución salina se logra disminuir el número de UFC/ml.

Abstract

Objective: To reproduce an abdominal sepsis model in the experimental animal. **Setting:** Department of Surgery, School of Medicine, UNAM.

Design: Descriptive, comparative study.

Statistical analysis: We compared groups at 24, 48, and 96 hours, using Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis.

Material and methods: We operated 18 Wistar rats, divided in 3 groups. Group I was subjected to laparotomy and wall closure. Groups II and III were subjected to laparotomy and the base of the cecum was ligated. Three punctures were made in the cecum with a 20-gauge needle. At 24 hours, all three groups were subjected to Laparotomy and samples from the abdominal cavity were taken for culture. The abdominal cavity of Group III was additionally washed with saline solution and closed. At 48 and 96 hours a new laparotomy was performed and samples were taken again from the abdominal cavity.

Results: Differences between Group I and Groups II and III were statistically significant. Comparison between the two last ones at 48 hours revealed no differences in the number of CFU. At 96 hours, differences were only found between the control Group (I) and Group II (p 0.010). Between groups I and III no differences were found (p 0.076); however, this could be due to a possible effect of the saline solution washing that made conditions similar between these two groups.

Conclusions: It was statistically demonstrated cecal ligation and puncture induces a significant increase in the number of CFU/ml, and that washing of the abdominal cavity with saline solution leads to a decrease in the number of CFU/ml.

Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

Recibido para publicación: 22 junio 2006.

Aceptado para publicación: 22 febrero 2007.

Correspondencia: Dr. Jesús Tapia Jurado, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM. Tel. 56 23 21 60.

E-mail: tapiajj@amcg.org.mx

Palabras clave: Sepsis, cavidad abdominal.
Cir Gen 2007;29:140-144

Key words: Sepsis, abdominal cavity.
Cir Gen 2007;29:140-144

Introducción

El "Consenso Internacional para Definición de Sepsis", realizado en 2001, permitió homologar definiciones y criterios médicos para un buen diagnóstico, tratamiento y estandarización de protocolos de investigación.¹⁻² Sepsis es el proceso patológico causado por la invasión a tejido o fluido estéril por microorganismos patógenos o potencialmente patógenos. Hablamos de sepsis grave cuando se asocia con disfunción orgánica, hipoperfusión, hipotensión, acidosis láctica, oliguria y alteración del estado mental. Choque séptico es la falla circulatoria aguda caracterizada por hipotensión arterial persistente y no explicable más que por una infección grave. Síndrome de disfunción orgánica múltiple es la presencia de alteraciones funcionales de varios órganos en un paciente grave, en que la homeostasis no se puede mantener sin su tratamiento específico. Y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) es la liberación en cascada de múltiples mediadores de la inflamación, los cuales, al actuar en forma desorganizada, precipitan alteraciones multiorgánicas e inmunológicas que ponen en riesgo la vida del paciente.

En los Estados Unidos de Norteamérica, la sepsis es la primera causa de muerte en las UCI no coronarias y la décimo-tercera causa del total de defunciones, calculando sus costos en \$17 billones de dólares anualmente.^{3,4} Se reportan más de 1.5 millones de casos de sepsis grave en los países de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), lo que habla de más de 500,000 muertes al año, o sea 1,400 por día. El aumento considerable en esta patología es debido al creciente número de pacientes con edad avanzada, al aumento de tratamientos agresivos en hospederos severamente inmunocomprometidos, y al desarrollo de un gran número de tecnologías invasivas y traumáticas.

Cada día los conocimientos sobre la sepsis se incrementan, se hacen más complejos y existen controversias; de tal forma que es deseable desarrollar o reproducir modelos experimentales que permitan establecer patrones más precisos del comportamiento de este proceso en el laboratorio. Existen básicamente cuatro modelos de sepsis en el animal de experimentación:⁵⁻⁸

1. Modelo de toxemia, secundario a la infusión de endotoxina o lipopolisacáridos.^{9,10}
2. Modelos de sepsis mediante infusión intravenosa de bacterias vivas.¹¹
3. Modelo de contaminación peritoneal en ratones, al colocar un catéter 20-gauge a nivel de colon ascendente, que comunica la luz del colon a la cavidad abdominal.¹²

4. Modelos de lesión de la barrera intestinal del animal de experimentación por ligadura cecal y punción.¹³⁻¹⁵

El objetivo del presente trabajo es iniciar una línea de investigación de sepsis abdominal, comenzando por la reproducción de un modelo de sepsis abdominal en el animal de investigación, mediante la ligadura cecal y punción del mismo, para producir peritonitis y poder demostrarla desde el punto de vista microbiológico cuantitativo.

Material y métodos

Universo. Se operaron un total de 18 ratas de la cepa Wistar de 250 g, sin distinción de sexo, a las cuales se les administró anestesia general con ketamina (50 mg/kg de peso) y xilacina (8 mg/kg de peso) y previa asepsia de la región. En todos los animales se realizó laparotomía y se les asignó aleatoriamente a tres grupos, seis ratas en cada uno, con el siguiente esquema de manejo:

Grupo I: En el tiempo 0, se realizó laparotomía y cierre de pared (Grupo control).

Grupos II y III: En el tiempo 0, se realizó laparotomía media para explorar la cavidad abdominal e identificar el intestino grueso; sin alterar la continuidad del tracto digestivo se procedió a ligar la base del ciego con una jareta de seda "000", a continuación al ciego se le realizaron tres punciones sobre su borde antimesentérico con una aguja del número 20 que atravesó su pared hasta la luz intestinal, posteriormente se procedió a recolocar el intestino dentro de la cavidad abdominal y se cerró la pared en dos planos.

A las 24 horas, a los tres grupos (18 ratas) se les laparotomizó y cultivó la cavidad abdominal para la cuantificación de unidades formadoras de colonias y la comparación entre grupos. El grupo II quedó como control de sepsis. En este mismo momento y después del cultivo, al Grupo III se le lavó la cavidad abdominal con 20 ml de solución salina y se cerró la cavidad abdominal.

A las 48 horas de iniciado el experimento, sólo a los grupos II y III se les realizó nuevamente laparotomía y cultivo de cavidad abdominal. Finalmente a las 96 horas y a las 18 ratas (Grupos I, II y III), se les volvió a realizar laparotomía y cultivo de la cavidad abdominal.

La toma de muestras fue realizada por el cirujano por medio de un hisopo estéril, rotando el hisopo en ambos cuadrantes inferiores del abdomen y en el hueco pélvico. La muestra así recolectada se introdujo en un tubo con 1 ml de medio de cultivo "Caldo Nutritivo" y, bajo condiciones de esterilidad y campana, utilizando mechero, las muestras fueron inoculadas en medio de cultivo eosina azul de metileno, EMB (un medio selectivo para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes). El volu-

men de muestra inoculado fue de 100 μ l, medidos por medio de pipeta automática con puntas estériles. Ya inoculadas las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas los dos primeros cultivos y por 72 horas el tercero y último. El conteo de las colonias se hizo bajo microscopio estereoscópico, relacionando el número de colonias por mililitro. Las características esperadas de las colonias de *Escherichia coli* fueron de 2-3 mm de diámetro, azul negras en la parte central y bordes claros a luz transmitida y presentación de un brillo metálico verdoso a la luz reflejada.¹⁶ Para el manejo y cuidado de los animales de experimentación, se siguió el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y la Norma Oficial Mexicana-062-Z00.¹⁷ El protocolo fue aprobado por la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM con la clave CIRJTJ05022.

Para realizar el análisis estadístico, además de la pertenencia a cada uno de los grupos conformados, la variable de interés fue el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), las cuales, por ser de tipo cuantitativo discreto fueron procesadas gráficamente en histogramas para observar el comportamiento, pero sólo se muestra una gráfica de barras asociadas para apreciar la distribución con respecto al tiempo en el que se realizaron los cultivos. La variable UFC se describió tomando como base el valor de la mediana y de los percentiles 25 y 75, y se calcularon medidas de razón y porcentajes. Para el análisis se utilizaron dos estrategias: primero se compararon los grupos por parejas, cada uno de los experimentales (II y III) con respecto al grupo control, y aquellos entre sí, a las 24, 48 y 96 horas, utilizando la prueba U de Mann-Whitney, con un nivel de significancia de 0.05; en segundo lugar se compararon los tres grupos simultáneamente (para los datos relativos a las 24 y 96 horas) utilizando la prueba Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0.05, para lo cual se emplearon el paquete SPSS, versión 13.0, y Minitab versión 14.0.

Resultados

El Grupo I de laparotomía sin ningún otro procedimiento se mantuvo sin desarrollo bacteriano a las 24 horas. A las 96 horas, se registró contaminación en tres de las seis ratas, para una mediana de grupo de 800 UFC/ml. En los Grupos II y III, donde intencionadamente se realizaron punciones sobre el ciego ligado para generar peritonitis, a las 24 horas se tuvo una mediana de 1075 y 3490 UFC/ml, respectivamente. A las 48 horas se obtuvieron 13,500 y 10,407 UFC/ml o sea un incremento en razón de casi 13 a 1 para el grupo II, y de alrededor de 3 a 1 para el grupo III. Por lo que toca al Grupo III, como se señala arriba, presentaron 3,490 UFC/ml 24 horas después de las punciones sobre el ciego, a cada rata se le lavó la cavidad abdominal con 20 ml de solución salina en ese mismo momento y 24 horas después tenían 10,407 UFC/ml, o sea prácticamente 23% menos que si no se hubiesen lavado con la solución salina, y 72 horas después del lavado (96 horas después de la punción) se obtuvie-

ron 6,957 UFC/ml, es decir. un 62% menos que en el Grupo II, que desarrolló 18,248 UFC/ml y el cual no se lavó con solución salina.

Comparación por pares

En función de que no hubo desarrollo de colonias a las 24 horas en el grupo control, existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos II y III. La comparación entre estos dos últimos, sin embargo, no mostró diferencias.

A las 48 horas la única comparación realizada fue precisamente entre los dos grupos experimentales, II y III, que no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de UFC (**Figura 1**).

A las 96 horas sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo II ($p = 0.010$). No hubo diferencias entre los grupos I y III ($p = 0.076$) ni entre los grupos II y III ($p = 0.055$).

La comparación de los tres grupos en forma simultánea reveló: A las 24 horas se obtuvo un resultado de la prueba de 7.78, que fue estadísticamente significativo, con un valor de $p = 0.02$. A las 96 horas, el resultado de la prueba arrojó un valor de 8.89, que también fue estadísticamente significativo, con un valor de $p = 0.012$.

Discusión

La evolución de un cuadro de sepsis es irregular,¹⁸⁻²¹ algunos avanzan rápidamente a choque séptico y otros se desplazan a cuadros variables de disfunción orgánica, existiendo hasta el momento controversias en innumerables facetas de la sepsis abdominal y, aunque ha habido progresos en su fisiopatología, diagnóstico y terapéutica, todavía el camino de la investigación es largo. Ahora bien, si en el mismo modelo animal observamos dificultad para condicionar una sepsis grave, el querer demostrar que los resultados terapéuticos obte-

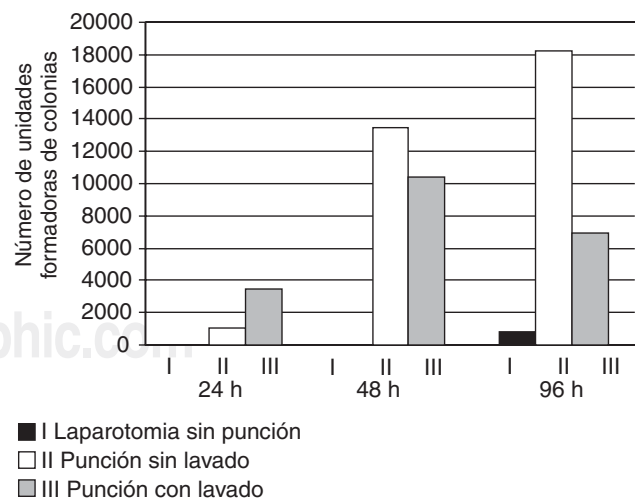


Fig. 1. Comportamiento de los tres grupos, de acuerdo al momento en que se tomaron los cultivos y el número de colonias desarrolladas.

nidos en ratas sean comparables con los obtenidos en seres humanos es bastante difícil. Autores como Esmon²² y Schultz²³ nos hablan de por qué algunos modelos animales fracasan en reproducir la sepsis en seres humanos. Entre las diferencias más importantes están: habitualmente el animal de experimentación es joven y sano, el ser humano puede ser viejo y con múltiples enfermedades secundarias (diabetes mellitus, enfermedad vascular sistémica, hipertensión arterial, inmunosupresión, cáncer); en los seres humanos, la evolución es paulatina, el fenómeno en los animales es agudo. En los animales, la intervención experimental sucede en las etapas tempranas de la sepsis, cuando todavía los niveles de citocinas inflamatorias están elevados y el daño orgánico y vascular es mínimo, a diferencia del ser humano, donde la intervención terapéutica habitualmente ya es cuando la respuesta de las citocinas proinflamatorias está cambiando a anti-inflamatorias y el daño orgánico ya es aparente. El ser humano también ya está recibiendo algún soporte hemodinámico como líquidos, agentes vasopresores y ventilación artificial. Por otro lado, en el animal de experimentación se tiene control sobre el germen que inicia la sepsis, en el ser humano habitualmente la sepsis es por una combinación de gérmenes Gram-positivos y negativos, aerobios y anaerobios y hongos, y ya con múltiples tratamientos antibióticos. La intervención en el ser humano es habitualmente en etapas tardías, lo que habla de diferentes condiciones a las del animal de experimentación, que habitualmente es en etapas tempranas. Sin embargo, la investigación en modelos animales continuará siendo indispensable para el mejor entendimiento de la sepsis. Por lo que, para iniciar una línea de investigación en sepsis, se reprodujo este modelo conocido de ligadura y punción del ciego y logramos producir aumento de las UFC/ml de acuerdo al tiempo de evolución, con datos de significancia estadística para las primeras 96 horas de evolución. También demostramos que al lavar la cavidad abdominal con solución salina se logra disminuir su contaminación al bajar las UFC/ml comparativamente con los no lavados; sin embargo, a las ratas las dejamos sobrevivir sin ningún apoyo adicional por 8 días más, tiempo en el que observamos clínicamente la recuperación de la rata, sin llegar a fallecer ninguna de los tres grupos en estudio, lo que nos puede estar traduciendo que es un modelo adecuado para una peritonitis aguda de 96 horas, pero que las ratas se recuperaran posteriormente sin necesidad de ayuda antibiótica o cirugía adicional. La ausencia de diferencias entre los grupos I y III a las 96 horas es compatible con el posible efecto del lavado con solución salina que igualó condiciones con los controles que desarrollaron UFC en baja cantidad, por una contaminación a pesar de que no se les puncionó el ciego. Por lo que respecta al contraste entre los grupos II y III, los valores encontrados en la prueba de significancia son prácticamente limítrofes ($p = 0.055$), sugestivos de un efecto del pequeño tamaño de los grupos y de una amplia variabilidad en el número de UFC, particularmente en el grupo II.

Con la información obtenida, podemos decir que contamos con un modelo experimental de sepsis abdominal que será útil para futuros estudios sobre respuesta inflamatoria y metabólica.

Conclusiones

La punción del ciego ligado produce un aumento estadísticamente significativo en el número de UFC/ml, pero se logra disminuir al lavar la cavidad abdominal con solución salina.

Es un modelo adecuado para estudiar la evolución de peritonitis dentro de las 96 horas posteriores a la agresión, sin embargo, el hecho de que las ratas sobrevivieron sin ayuda de fármacos o nuevos lavados quirúrgicos hace suponer que el modelo no ayuda para mantener sépticas a las ratas por más de 3-4 días.

Agradecimientos

Ing. José Jorge García Loya. Ingeniero en Comunicaciones y Electrónica, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

Alumnos: Alma Rosa Chalico Domínguez, Raúl Rosales García, Lilia Burgos y Adriana Osorio Miranda, de la Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo en la búsqueda bibliográfica y durante el desarrollo de la investigación realizada.

Referencias

1. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-1256.
2. Castañón J. Definición fisiopatológica, clasificación y tratamiento del estado de choque. En: Aguirre R, Garza L, editores. *Tratado de Cirugía General*. Ed. Manual Moderno, México, 2003: 137-141.
3. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278: 234-240.
4. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27: S3-S9.
5. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 854-865.
6. Rodrigues FH, Carneiro BG, Rocha RF, Petroianu A. Inhibition of abdominal absceso formation: mortality by sepsis. *Arq Gastroenterol* 2005; 42: 50-4.
7. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001; 88: 22-30.
8. Garrido AG, Figueiredo LFP, Silva MRE. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir Bras* 2004; 19(2): 82-88.
9. Johnston TD, Hampton WW, Fry DE. Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg* 1989; 46: 101-3.
10. Brackett DJ, Schaefer CF, Tompkins P, Fagraeus L, Peters LJ, Wilson MF. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. *Circ Shock* 1985; 17: 273-84.
11. Hardaway RM, Williams CH, Sun Y. A new approach to the treatment of experimental septic shock. *J Surg Res* 1996; 61: 311-6.
12. Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzman B, Heidecke CD, Pfeffer K. Essential role of gamma interferon in

- survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 1998; 66: 2300-2309.
13. Bluth MH, Kandil E, Mueller CM, Shah V, Lin YY, Zhang H, et al. Sphorolipids block lethal effects of septic shock in rats in a cecal ligation and puncture model of experimental sepsis. *Crit Care Med* 2006; 34: 188-95.
 14. Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 549-53.
 15. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005; 24(Suppl 1): 52-7.
 16. *Agar Levine con Eosina y Azul de Metileno*. En: Medios de cultivo, Bioxon de México S.A. México, D.F. Pag 9.
 17. *Norma Oficial Mexicana. Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. NOM-062-ZOO-1999.
 18. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 1995; 274: 968-974.
 19. Martin GS, Bernard GR. International Sepsis Forum. Airway and lung in sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27: S63-S79.
 20. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* 1997; 277: 1058-1065.
 21. Tapia J, Rey A, Sánchez I, Ostos L, Butron L, Rosete R. Efectos hemodinámicos y renales del aumento de la presión intra-abdominal. *Cir Gen* 1992; 14: 17-21.
 22. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004; 32: S219-22.
 23. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001; 88: 22-30.