

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



Universidad de Salamanca

FACULTAD DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL

**“Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica experimental
inducida por Zymosan A, su regulación con Celecoxib®.”**

DOCTORANDO:

D. Luis Antonio Ortega Casanueva

DIRECTORES:

Prof. Francisco Javier García Criado

Prof. Joaquín F. López Marcos

Septiembre, 2010

**Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria. Director del Departamento de Cirugía.
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.**

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica experimental inducida por Zymosan A, su regulación con Celecoxib®.**” realizada por D. Luis Antonio Ortega Casanueva en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, para optar al Grado de Doctor por esta Universidad, cumple todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmo el presente certificado en, Salamanca a uno de junio de dos mil diez.

Fdo. Prof. Clemente Murile Villoria
Director del Departamento de Cirugía

**Prof. Dr. D. Francisco Javier García Criado. Profesor Titular de Cirugía.
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.**

**Prof. Dr. D. Joaquín F. López Marcos. Profesor Asociado. Facultad de
Medicina. Universidad de Salamanca.**

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica experimental inducida por Zymosan A, su regulación con Celecoxib®.**” presentada por D. Luis Antonio Ortega Casanueva, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante un Tribunal.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en, Salamanca a uno de junio de dos mil diez.

Prof. F.J. García Criado

Prof. J.F. López Marcos

DIRECTORES DE LA TESIS

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar quiero manifestar mi gratitud a los Profesores. D. Joaquín F. López Marcos y D. Francisco Javier García Criado Directores de esta Tesis Doctoral por su absoluta disponibilidad y por todas las facilidades ofrecidas.

Al Departamento de Cirugía y particularmente a su Director, el Prof. D. Clemente Muriel Villoria por los medios prestados. Al personal de los Servicios de Bioquímica y de Microbiología del Hospital Universitario de Salamanca por su inestimable colaboración en este trabajo.

Al equipo de trabajo que ha participado en el desarrollo del proyecto en el que se encuentra englobado este trabajo: D. Francisco Javier García Criado, D. Joaquín F. López Marcos y Dña. María Begoña García Cenador.

Finalmente doy las gracias a todas aquellas personas que me han ayudado de forma anónima y desinteresada en la realización del presente trabajo para la consecución de esta Tesis Doctoral.

A mis Padres

ÍNDICE:

	Página
I. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	1
1.- Inflamación	3
1.1.- Mediadores químicos de la inflamación	6
1.2.- Interacción Leucocito-Endotelio	23
2.- Translocación Bacteriana (TB) e Infección	35
2.1.- Concepto de TB	36
2.2.- Fisiopatología de la TB	37
2.3.-Factores que alteran la barrera intestinal	38
2.4.- Factores que modifican la tendencia bacteriana a la TB	44
2.5.- Mecanismos de TB	46
3.- Celecoxib	48
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	61
III. MATERIAL Y MÉTODO	65
1.- Material	67
2.- Método	68
IV. RESULTADOS	85
1.- Estudio de la Supervivencia	87
2.- Estudios microbiológicos	88

3.- Estudios de la Función Renal	91
4.- Mieloperoxidasa	93
5.- Radicales libres del oxígeno	95
6.- Citocinas	100
7.- Óxido Nítrico	105
8.- Expresión CAMs	108
9.- Activación NFkB	112
V. DISCUSIÓN	113
1.- Discusión del diseño experimental	115
2.- Discusión de los resultados	119
VI. CONCLUSIONES	127
VII. BIBLIOGRAFÍA	130

I.- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

1.- INFLAMACIÓN

La inflamación se puede definir como la reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local. La respuesta inflamatoria está íntimamente ligada con el proceso de reparación, poniendo en marcha una serie de fases con el fin de destruir o aislar el agente lesivo y reparar el tejido lesionado. Debemos tener en cuenta que sin la inflamación, las infecciones no serían autocontroladas, pero también es verdad, que en ocasiones la inflamación y la reparación pueden ser potencialmente perjudiciales.

Los agentes causales que pueden dar lugar a la inflamación comprenden además de las infecciones microbianas, agentes físicos (quemaduras, radiaciones, traumatismos), agentes químicos (toxinas, ácidos, álcalis, etc.), tejidos necróticos y todo tipo de reacción inmunológica.

La inflamación se puede dividir en aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una duración que puede oscilar desde unos minutos a varias horas o incluso días. Sus características van a ser la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos.

Durante la inflamación aparecen cambios del flujo y del calibre vascular. Inicialmente se observa una vasoconstricción transitoria de las arteriolas que se sigue de una vasodilatación por lo que se incrementa el flujo vascular (hecho fundamental de los cambios hemodinámicos precoces en la inflamación aguda). Como consecuencia disminuye la velocidad de la circulación que determina que los leucocitos, principalmente neutrófilos, se desplacen hacia el endotelio vascular. Estos leucocitos se adhieren al endotelio, inicialmente de forma transitoria y luego más fuertemente, migrando a través de la pared vascular. Además, se van a producir cambios en la permeabilidad vascular que se manifiestan clínicamente como edema (Figura 1).

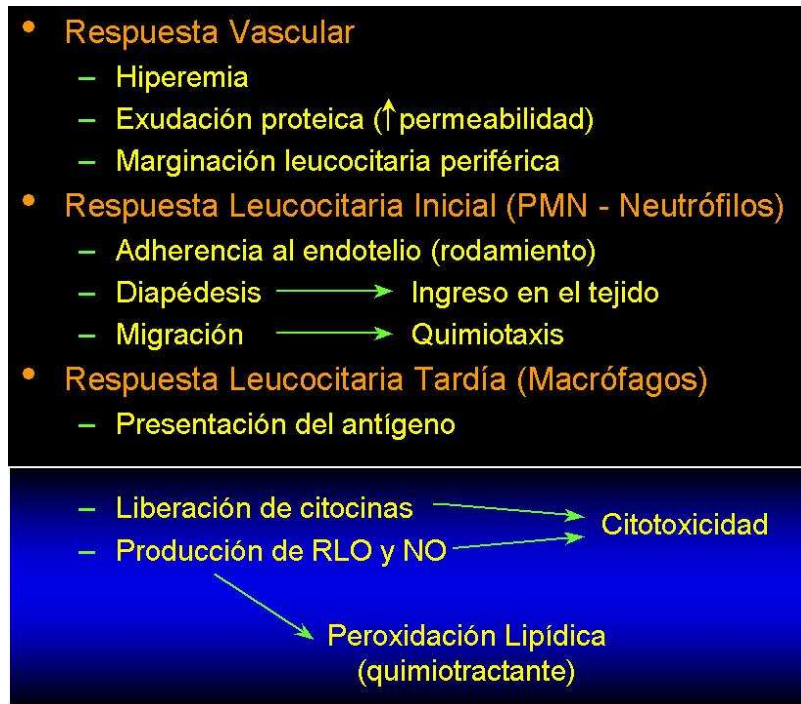


Figura 1.- Respuestas ante la inflamación

Las células que van a participar en el proceso inflamatorio son principalmente leucocitos (neutrófilos y monocitos). Los leucocitos van a englobar y degradar las bacterias, inmunocomplejos y restos celulares necróticos contribuyendo sus enzimas lisosómicas a la respuesta defensiva. Sin embargo, debemos tener en cuenta que los leucocitos a su vez, pueden prolongar la inflamación y aumentar el daño tisular por la liberación de mediadores químicos, enzimas y radicales tóxicos (Figura 2).

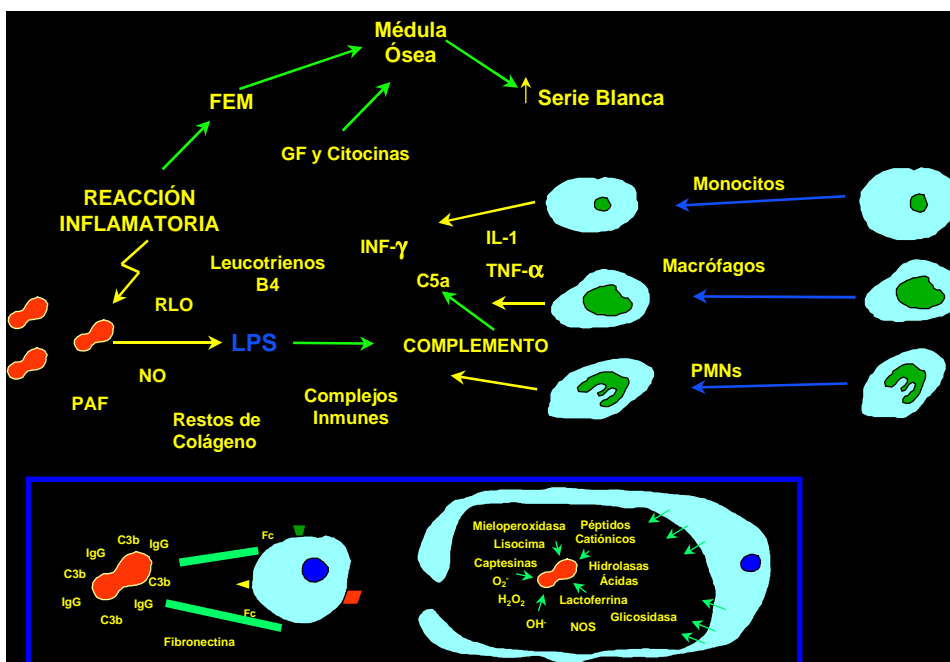


Figura 2.- Esquema de la respuesta inflamatoria ante la infección.

La secuencia de este proceso va a ser la siguiente:

a) Marginación: Al producirse una pérdida de velocidad y estancamiento del flujo, los leucocitos van a entrar en contacto con el endotelio.

b) Adherencia: Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular debido a la activación de una serie de moléculas de adhesión presentes en el leucocito y el endotelio vascular. La expresión de estas moléculas es inducida, aumentada o alterada por los agentes inflamatorios y mediadores químicos.

c) Migración y quimiotaxis: Los leucocitos se desplazan por la superficie endotelial y finalmente atraviesan la membrana basal pasando al espacio extravascular. Una vez fuera, responden a estímulos quimiotácticos siendo los más significativos para los neutrófilos: productos bacterianos, componentes del sistema del complemento, principalmente C5a y productos de la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B.

d) Fagocitosis y degranulación: Inicialmente la partícula que va ser ingerida se adhiere a la superficie del leucocito, después es englobada y finalmente es destruida o degradada. A continuación pasamos a describir de manera somera estas fases.

- Reconocimiento y adherencia: La mayoría de los microorganismos no son reconocidos si no están revestidos de factores séricos denominados opsoninas. Los dos principales son, la IgG (subtipos 1 y 3) y C3b, generada por la activación del complemento por mecanismos inmunológicos o no.
- Englobamiento: Cuando el fagocito reconoce a las partículas como extrañas, la partícula queda incluida en el citoplasma de la célula dentro de un fagosoma o vacuola fagocítica. La membrana de esta vacuola se fusiona con la de un gránulo lisosomal y éste vierte enzimas hidrolíticas y sustancias bactericidas dentro de la vacuola fagocítica. Durante este proceso, puede haber salida de enzimas hidrolíticas y productos metabólicos (radicales libres del oxígeno) desde la célula al espacio intersticial pudiendo dar lugar a lesiones tisulares.
- Destrucción o degradación: Es el último paso en la fagocitosis. Son conocidos dos tipos de mecanismos bactericidas: dependientes o independientes del oxígeno.

1.1.- Mediadores Químicos de la Inflamación

Dentro de los mediadores químicos de la inflamación vamos a destacar los siguientes:

1.1.1.- Aminas vasoactivas:

a) Histamina: La histamina o sustancia H está siempre presente en las fases iniciales de la inflamación⁽⁴⁰³⁾. Se encuentra almacenada, de forma inactiva, en los gránulos de las células cebadas, leucocitos, basófilos, eosinófilos y plaquetas. En menor cantidad se halla en diversos tejidos como piel, mucosa intestinal y pulmones.

El papel de la histamina y su directa relación con las células cebadas y la degranulación de éstas, en las fases iniciales de la inflamación, y la supresión de la respuesta vascular por los antihistamínicos están suficientemente demostrados, induciendo dilatación de las vénulas y capilares, con aumento de la permeabilidad y contracción del músculo liso. Es el principal mediador de la primera fase de la inflamación; aunque tiene una acción muy fugaz, inactivándose a los 15 minutos.

La degranulación de las células cebadas es un proceso muy complejo, que puede ser desencadenado por una gran variedad de causas: agentes físicos, inmunocomplejos, factores del complemento, toxinas bacterianas y fracciones lisosómicas de las células inflamatorias. Su liberación está regulada por el nivel intracelular del 3'-5' adenosinmonofosfato cíclico (AMPc). La histamina es un mediador importante en la fase inicial de la inflamación y en las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE.

b) Serotonina (5-hidroxitriptamina): Fue identificada en las células cromafines intestinales⁽⁴⁰³⁾. Aunque es uno de los mediadores químicos más importantes en algunos animales, su papel en el fenómeno inflamatorio humano es de menor importancia. Se encuentra en los gránulos de las células cebadas, en las plaquetas y también en el intestino, bazo y tejido nervioso.

1.1.2.- Mediadores químicos del plasma

Por la presencia de proteasas, una serie de proteínas presentes en el plasma, se van a romper creando un conjunto de mediadores que intervienen en la reacción inflamatoria⁽⁴⁰³⁾.

a) Sistema de las cininas: Las cininas son pequeños polipéptidos, con una potente acción vasodilatadora prolongada⁽⁴⁰³⁾. La acción de estas sustancias consiste en vasodilatación arteriolar, contracción lenta del músculo liso, aumento de la permeabilidad, sobre todo en el lecho capilar, y efecto hipotensor. También producen un efecto similar al de la histamina y serotonina en las vénulas, con separación de las uniones intercelulares de las células endoteliales. Son responsables del dolor en el foco inflamatorio.

La formación de las cininas se inicia por la activación del factor de Hageman (factor XII) cuando se pone en contacto con superficies de carga negativa, como la membrana basal o el colágeno. Un fragmento, el factor XIIIa, transforma a la precalicreína plasmática en la enzima activa calicreína. Ésta actúa sobre los cininógenos (α_2 globulina) y los escinde; dando como producto final la bradicinina, potente mediador químico de la inflamación, pero de acción corta, ya que es inactivado por la enzima cininasa. La calicreína es además un potente activador del factor de Hageman, lo que permite la autoactivación del sistema.

b) Sistema del Complemento: El sistema del complemento fue descrito como el factor auxiliar del suero que no se inactivaba por el calor y que actuaba sobre células recubiertas de anticuerpos para causar su muerte. Se conocen más de veinte proteínas séricas que circulan de forma inactiva y que una vez activadas forman parte de un sistema de amplificación en cascada muy complejo, que juega un papel muy importante en las defensas del individuo⁽⁴⁰³⁾.

Este conjunto de proteínas séricas se sintetizan fundamentalmente en el hígado, también por linfocitos, macrófagos y células del sistema linforreticular; al ser activadas, interaccionan entre sí de forma secuencial originando una serie de reacciones en cascada con la producción de diferentes fragmentos proteicos, capaces de ejercer diversos efectos biológicos entre los que destacan, la lisis de membranas celulares, el incremento de la eficacia fagocítica celular y la inducción de reacción inflamatoria⁽⁵⁵⁾. Desempeña un papel muy importante en la respuesta inmunitaria y desde luego en el

proceso inflamatorio, componente inespecífico de dicha respuesta; durante el desarrollo de la inflamación se incrementa la síntesis de las proteínas del complemento, bajo la estimulación de citocinas, como la IL-1 y el INF- γ . Pertenece al grupo de defensas inmunitarias inespecíficas del organismo, aunque actúa muy integradamente con las defensas específicas adquiridas, como Igs, especialmente la IgG y la IgM.

La activación del sistema del complemento puede iniciarse y desarrollarse por dos vías diferentes, la clásica y la alternativa (Figura 3), que terminan en una vía final común, cuyo objetivo es llegar a formar un complejo proteico con capacidad para atacar, el MAC (membrane attack complex), perforando la membrana y produciendo la lisis celular.

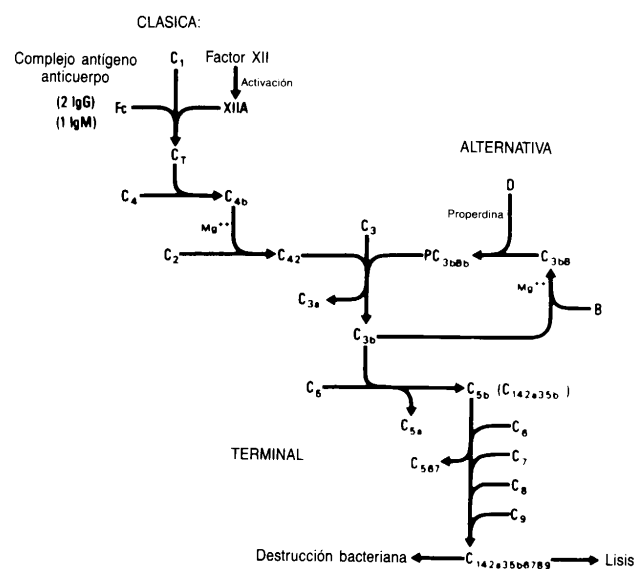


Figura 3.- Vías de activación del complemento.

Además de ésta, su activación es responsable de otras acciones biológicas claves en el proceso defensivo frente a la invasión, especialmente bacteriana:

- Oponización: recubrimiento de las “partículas” extrañas por sustancias (opsoninas), haciéndolas más susceptibles a la fagocitosis (el C3a es la opsonina más importante del sistema del complemento y, en menor grado, C4b y C5b).
- Estimulación de la respuesta inflamatoria: mediante liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas por mastocitos y basófilos (acción de dichos componentes [C3a, C4a, C5a], escindidos de los principales y que actúan como anafilotoxinas, y de los fenómenos de quimiotaxis de las células fagocíticas (fragmentos C5a y C3a).

Vía clásica: La activación del complemento por esta vía comienza por la deposición, en la superficie celular, de complejos antígeno/anticuerpo (Ag/Ac) (regiones Fc de las Igs de la clase IgM y subclases 1, 2 y 3 de la IgG), a los que se van uniendo

fragmentos del sistema, comenzando por los C1 (q, r, y s) que secuencialmente van siendo activados. Cuando se activa el C1s actúa sobre el C4 escindiéndolo en el fragmento C4a que pasa a la fase fluida (se comporta como una anafilotoxina que estimula la degranulación de los mastocitos y los basófilos) y el C4b que se fija a la membrana junto al complejo C1/Ac, siendo el primer fragmento que se fija a la superficie celular. Prosigue con la unión del fragmento C4b al C2, sobre el que actúa el C1s liberando los fragmentos C2a y C2b, éste, activo enzimáticamente, permanece unido al C4b. El resultado final es la formación del complejo C4b2b, que es la convertasa del fragmento C3, en la vía clásica; y que al actuar sobre éste, lo escinde en C3a, que se libera como anafilotoxina, y el C3b, que unido al complejo C4b2b, forma el complejo C4b2b3b, que es la convertasa del fragmento C5, y representa la vía final común.

Vía alternativa: Biológicamente más primitiva, se eluden los fragmentos C1, C4 y C2 pero sí se produce la activación del C3, no siendo necesaria para su iniciación la presencia de los complejos de Ag/Ac, en su desencadenamiento pueden actuar como inductores LPS o ciertos virus y parásitos. En circunstancias fisiológicas cabe la posibilidad de encontrar en el plasma una mínima cantidad del fragmento C3b, siendo su producción masiva el paso clave en esta vía. El estímulo que inicia la vía alternativa para generar C3b, sobrepasando la inhibición que normalmente ejercen en este sentido los factores H e I, parte de componentes de las paredes bacterianas. Las sustancias estimulantes pueden ser el LPS, es decir, la endotoxina en las bacterias Gram -, y los ácidos teicoicos, en las bacterias Gram +; también puede iniciarse por estímulos originados en componentes estructurales de parásitos. Estimulada la generación del fragmento C3b y su adherencia a la membrana celular, se une al factor B, formando el complejo C3bB y tras la acción del factor D se constituye el complejo C3bBb, que es estabilizado por la acción de una proteína, la properdina, convertasa para el fragmento C5 en la vía alternativa iniciándose así una vía final común para ambos procesos.

Vía final común: Se accede a ella por ambas vías, generándose dos tipos de convertasa para el fragmento C5, escindiéndolo en C5a y C5b que se une a la membrana y determina el ensamblaje de los componentes C6, C7, C8 y C9; a partir de este momento comienza realmente la secuencia final que termina con la formación del complejo C56789 o MAC, muy inestable, que es el que posee la capacidad de perforar la membrana de la célula atacada, creando canales que permiten el paso libre de agua y de iones, y la consiguiente lisis celular.

Durante este proceso de activación del sistema molecular del complemento se generan otros fragmentos con gran actividad biológica: así, diversas células del organismo expresan receptores para el C3b, como monocitos-macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, lo que favorece que se adhieran con más eficacia a elementos formes recubiertos por este componente intensificando su capacidad fagocítica. Otras células, como los linfocitos B, pueden expresar también receptores para C3b, que al interactuar con ellos modulan su activación y diferenciación a células plasmáticas. Los fragmentos C3a y C5a poseen una importante actividad quimiotáctica, fundamentalmente para los neutrófilos. Ambas moléculas tienen también un efecto de mediadores de la inflamación, induciendo la contracción de la musculatura lisa, incrementando la permeabilidad vascular y provocando la degranulación de los basófilos.

c) Sistema de la Coagulación: El grupo de proteínas plasmáticas que forman este sistema, pueden ser activadas por el factor XII. El punto final es la transformación del fibrinógeno en fibrina, con liberación de fibrinopéptidos que producen aumento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis de los leucocitos⁽⁴⁰³⁾.

El sistema fibrinolítico puede participar también en el fenómeno inflamatorio, a través de su relación con el sistema de las cininas. La calicreína transforma el plasminógeno en plasmina; ésta, además de disolver el coágulo de fibrina, actúa en el foco inflamatorio al iniciar la formación de bradicinina por activar el factor Hageman, cerrando el ciclo de activación mutua de ambos sistemas. La plasmina puede también activar el sistema del complemento por la vía alterna. Los productos de la degradación de la fibrina producen alteraciones de la permeabilidad.

1.1.3.- Derivados del ácido araquidónico

Prostaglandinas y Leucotrienos. El ácido araquidónico es un ácido graso insaturado que procede de la dieta o del metabolismo del ácido linoleico⁽⁴⁰³⁾. No se encuentra libre en las células, sino formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Para su utilización por la célula, debe ser liberado de los fosfolípidos mediante la activación de una fosfolipasa. Esta activación se desencadena mediante una serie de estímulos físicos, mecánicos o químicos (C5a). Una vez liberado, puede seguir dos vías metabólicas⁽⁵⁵⁾:

a) Vía de la ciclooxigenasa dando lugar a prostaglandinas, que se consideran hormonas de acción local, corta y rápida que poseen varias actividades farmacológicas y regulan las funciones celulares a través del sistema del AMP cíclico. En el foco inflamatorio, actúan como mediadores y reguladores de la inflamación; a veces con acciones antagónicas. La ciclooxigenasa transforma el ácido araquidónico en un endoperóxido: la PGG₂, que es transformada por oxidación enzimática en PGH₂. Ambas prostaglandinas producen agregación plaquetaria y contracción del músculo liso.

La PGH se transforma en tres sustancias diversas según su localización:

- PGI₂ o prostaciclina, presente en la pared vascular y, más concretamente, en el endotelio. Es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y posee acción vasodilatadora.
- Tromboxano A₂, se localiza en las plaquetas. Tiene una acción muy corta con un efecto antagónico a la anterior: favorece la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.
- PGE₂, PGD₂ y PGF₂. Son otras prostaglandinas más estables y presentes en diversos tejidos. Entre sus acciones destaca la vasodilatación. Inducen también la formación de colágeno y están implicadas en la aparición de la fiebre (PGE₂) y el dolor.

b) Vía de la lipooxigenasa que origina los leucotrienos. El ácido araquidónico, bajo la acción de la lipooxigenasa, se transforma en una serie de productos denominados leucotrienos por haber sido aislados inicialmente en los leucocitos y por su estructura química característica. Estas sustancias pueden originarse también en macrófagos, células cebadas y otras células del tejido conjuntivo.

Alguno de los leucotrienos (LTB₄, LTD₄, LTE₄) producen broncoespasmo, vasoconstricción y aumento de la permeabilidad. El LTE₄ tiene una acción similar a la histamina pero mucho más potente. Actúan sobre los leucocitos promoviendo su adherencia al endotelio y su extravasación al espacio tisular. Además, el LTB₄ es un potente quimiotáctico para neutrófilos, eosinófilos y monocitos y favorece la liberación de enzimas lisosómicas.

1.1.4.- Factor activador de las plaquetas (PAF)

Mediador derivado de los fosfolípidos que ejerce una acción mucho más potente que la histamina sobre la permeabilidad vascular y, a concentraciones bajas, produce vasodilatación^(55, 269, 400).

Produce agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, activación de neutrófilos y, además, aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio, quimiotaxis, liberación de enzimas lisosomiales y broncoespasmo. El PAF puede ser producido por una serie de células como los basófilos, neutrófilos, monocitos y endotelio.

1.1.5.- Citocinas

Son un grupo de polipéptidos producidos por varios tipos de células, especialmente por monocitos, macrófagos linfocitos y células endoteliales. En la actualidad se han descrito más de 20; detallaremos a continuación las más importantes relacionadas con el proceso inflamatorio^(149, 230, 321, 325, 399).

- Interleucina-1 (IL-1): Es un polipéptido del que se conocen dos formas moleculares, α y β , codificadas por genes localizados en el cromosoma 2. La homología entre ambas formas de IL-1 únicamente es del 26%, pero interaccionan con el mismo receptor y comparten actividades biológicas similares. Es producida por macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, etc. Y por otros tipos celulares relacionados con la respuesta inmune (linfocitos B, células NK, etc.).

Dentro de la respuesta inflamatoria destacamos las siguientes funciones:

- Es capaz de activar los macrófagos, siendo también producida por ellos, se convierte en uno de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
- Aumenta la producción de prostaglandinas y la actividad citotóxica del macrófago.
- Junto a otras citocinas, factores de crecimiento y el factor estimulador de la monocitosis (FEM) liberados en el foco inflamatorio, incrementa la actividad de la médula ósea para aumentar la producción de la serie blanca.

- Estimula a células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, etc. incrementando la producción de diferentes factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.).
- Induce la proliferación de los fibroblastos.
- Actuando sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE₂, apareciendo así fiebre y dolor.
- Provoca el aumento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular como veremos más adelante.
- Aumenta la producción de moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y provoca la activación de la ciclooxigenasa.
- Causa la activación de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) incrementando así la producción de óxido nítrico.

Entre otros efectos, destacamos los realizados sobre células del Sistema Inmunitario; así puede señalarse su acción reguladora de la activación linfocitaria T y de la secreción de linfocinas, y de forma determinante, de la IL-2. También actúa sobre los linfocitos B en los que induce una señal que favorece la proliferación celular y su diferenciación hacia células secretoras de Igs.

- Interleucina-6 (IL-6): Es una glicoproteína producida por diversos tipos celulares entre los que se incluyen macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T. Su producción en el proceso inflamatorio induce activación de los monocitos y disminución de la producción de otras citocinas como IL-1 y TNF- α , es una de las citocinas más importantes en la regulación negativa del fenómeno inflamatorio. También posee una relevante función reguladora sobre la diferenciación de los linfocitos B, y parece que modula la activación de las células T⁽⁴⁰³⁾.

- Interleucina-10 (IL-10): Es una proteína que presenta una gran similitud estructural con el genoma del virus de Epstein Barr. Es producida, entre otros, por macrófagos y células T. Entre sus funciones en la respuesta inflamatoria, destacamos la capacidad de activar o inhibir los macrófagos (dependiendo de su concentración) convirtiéndose, junto con la IL-6, en otra de las citocinas moduladoras del fenómeno inflamatorio. Parece que también ejerce su acción, estimulando la proliferación de células B y T, tanto maduras como inmaduras⁽⁴⁰³⁾.

- Factor de necrosis tumoral (TNF): Es una citocina segregada fundamentalmente por los monocitos y macrófagos, aunque también la pueden producir los linfocitos T y las

células NK, cuyo gen se localiza en el cromosoma 6. Presenta dos formas la α y la β que aunque poseen funciones similares (en la inflamación) las desarrollan con diferente intensidad^(232, 318, 346).

Dentro del fenómeno inflamatorio destacamos las siguientes funciones:

- Es capaz de activar los macrófagos, siendo también producida por ellos se convierte en uno de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
- Junto a otras citocinas, factores de crecimiento y el factor estimulador de la monocitosis (FEM) liberados en el foco inflamatorio, incrementan la actividad de la médula ósea para aumentar la producción de la serie blanca.
- Estimula a células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, etc. incrementando la producción de diferentes factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.).
- Induce la proliferación de los fibroblastos.
- Actuando sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE₂, apareciendo así fiebre y dolor.
- Provoca el aumento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular como veremos más adelante.
- Aumenta la producción de moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y provoca la activación de la ciclooxigenasa.
- Causa la activación de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) incrementando así la producción de óxido nítrico.
- Incrementa la producción de radicales libres del oxígeno, especialmente del anión superóxido.
- Estimulador de la síntesis del PAF.

En el sistema inmune es capaz de regular la activación de los macrófagos y linfocitos T y B, modulando su proliferación y maduración. Representa una citocina clave en el desarrollo del shock séptico y otras respuestas sistémicas (SIRS, FMO, etc.).

- Interferón (INF): En la actualidad, y por los progresos conseguidos en la clonación de los genes que codifican los diferentes polipéptidos que forman esta familia molecular, se identifican tres clases de interferones, denominados alfa, beta y gamma (α , β , γ). El α y el β forman el previamente llamado INF de tipo 1 y los producen con preferencia los leucocitos y fibroblastos, respectivamente. El INF- γ , es segregado por los

macrófagos, linfocitos T y por las células NK, es el anteriormente denominado de tipo 2 o inmune que tiene una importante actuación en la respuesta inflamatoria.

Los INF- α y - β comparten una homología de al menos el 30% en su estructura proteica primaria; sin embargo, la secuencia de aminoácidos del INF- γ no guarda ninguna relación con la de los otros dos tipos citados previamente. El INF- γ es una glicoproteína cuya síntesis está codificada por un gen localizado en el cromosoma 12. Hasta la actualidad, se han caracterizado dos formas moleculares diferentes. Dentro de sus acciones en la inflamación, destacamos, el aumento de la producción de macrófagos y su activación y el incremento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular, como veremos posteriormente. Sus funciones en el sistema inmunitario son de gran importancia, regulando la función de diferentes células del mismo como los linfocitos T y B, las células NK y los ya comentados macrófagos.

1.1.6.- Productos Lisosómicos de los Leucocitos

La liberación de las sustancias contenidas en los lisosomas de las células que forman parte del exudado inflamatorio, neutrófilos y monocitos, puede contribuir al mantenimiento de la respuesta inflamatoria e inducir la destrucción tisular. Dentro de este grupo tenemos a las proteínas catiónicas que aumentan la permeabilidad vascular y tienen poder quimiotáctico para los monocitos; las proteasas neutras que pueden degradar sustancias extracelulares (colágeno, membranas basales, fibrina, elastina, etc.) y activar directamente el C3 y C5 y; las proteasas ácidas que degradan las proteínas en un medio ácido⁽²⁴⁵⁾. Todas estas enzimas son inhibidas por antiproteasas dentro de las cuales tenemos a la alfa-1 antitripsina que es el principal inhibidor de la elastasa de los neutrófilos⁽⁴⁰³⁾.

1.1.7.- Radicales Libres del Oxígeno (RLO):

El oxígeno molecular puede aceptar en total cuatro electrones para formar agua; sin embargo, se puede reducir en pasos univalentes para generar tres especies oxidantes^(110, 245).

- La reducción univalente produce el anión superóxido O_2^- . Su toxicidad suele atribuirse a su función como precursor de especies más reactivas del oxígeno.

- El peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , se produce como resultado de la reducción bivalente o dismutación del O_2^- .
- La tercera especie de radical que se deriva del oxígeno molecular es el radical hidroxilo, $\bullet OH$, que se forma por interacción del O_2^- y el H_2O_2 , y es un agente oxidante muy potente.

El resultado de la formación de los RLO es perjudicial para una serie de biomoléculas que se encuentran en los tejidos, entre ellas ácidos nucleicos, lípidos de membrana, enzimas y receptores. Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la membrana son muy accesibles al ataque del $\bullet OH$ en un proceso que da por resultado peroxidación de los lípidos. Ésta puede alterar la fluidez de la membrana celular y provocar la lisis.

Los RLO son producidos, por dos mecanismos⁽¹³⁹⁾:

- Xantinoxidasa: La xantinoxidasa es una enzima que tiene capacidad de generar RLO durante la oxidación de hipoxantina a xantina.
- NADPHoxidasa que reduce al oxígeno molecular hasta el anión superóxido. Y la mieloperoxidasa que cataliza la formación de ácido hipocloroso, HOCl, a partir del peróxido de hidrógeno y de iones cloruro.

Los RLO producidos, entre otros, por neutrófilos y macrófagos, pueden ser liberados tras la exposición a los agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o ante la fagocitosis, etc. Y están implicados en:

- Inactivación de proteasas como la alfa-1 antitripsina que puede dar lugar a un aumento en la destrucción de los componentes estructurales tisulares, como la elastina. La inactivación puede ser debida a la oxidación de los residuos metionil en la molécula antiproteasa a sulfóxido, con pérdida de la actividad biológica.
- Lesión de las células endoteliales con aumento de la permeabilidad vascular.
- Lesión de otros tipos celulares (hematíes, células tumorales, células parenquimatosas).

El organismo posee diferentes mecanismos protectores antioxidantes, entre los que destacamos los siguientes: la ceruloplasmina, la transferrina, la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, etc.^(3, 226, 254, 283).

1.1.8.- Óxido Nítrico (NO)

La importancia suscitada en los últimos años en el fenómeno inflamatorio por el óxido nítrico, ha incrementado exponencialmente el número de estudios que se han realizado sobre este importante mediador de la respuesta inflamatoria, que parece estar involucrado incluso en la regulación genética del proceso.

El enzima implicado en la síntesis del óxido nítrico (NO) es la NO-sintasa (L-arginina-NADPH-oxidoreductasa-NO-sintasa), que convierte el grupo guanidina terminal de la L-arginina en NO con un compuesto intermediario de ω -hidroxil-L-arginina. Requiere oxígeno y 4 cofactores (grupo hemo, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina), así como la presencia de calmodulina (Figura 4)^(242, 325, 363, 400, 401).

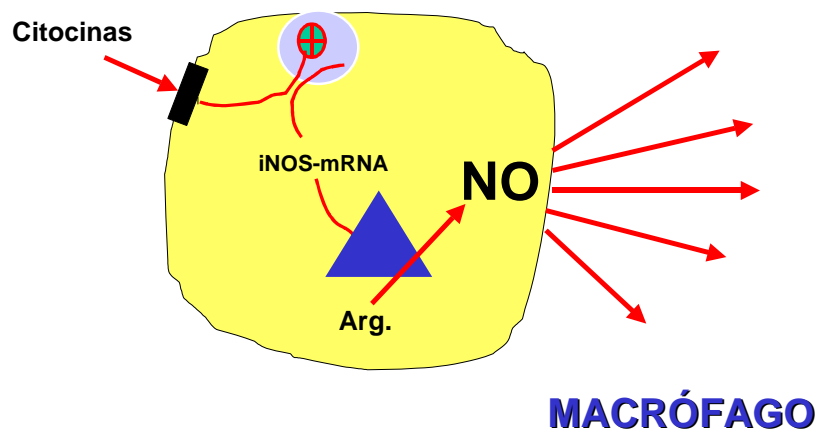


Figura 4.- Ruta de síntesis del NO en el macrófago

Se describen 3 genes responsables de las síntesis de otras tantas formas del enzima productor del NO, con un 60% de similitud entre sus moléculas: dos de ellas expresadas constitutivamente (cNOS) y otra inducible por estímulos principalmente inmunológicos (iNOS).

- cNOS:
 - eNOS: Fue la primera identificada, en las células del endotelio vascular, de ahí su denominación.
 - nNOS: Inicialmente aislada en las neuronas, se ha encontrado también en células beta-pancreáticas, células musculares estriadas, células epiteliales del pulmón, etc.

- iNOS:

-Inicialmente identificada como inducible en los macrófagos, no está expresada inicialmente de forma constitutiva, pero seguida a la exposición a productos bacterianos y citocinas, puede encontrarse en un amplio número de células, no sólo en macrófagos, sino también, en células hepáticas, células musculares lisas y células endoteliales de los vasos.

Las formas eNOS, se encargan de la producción en condiciones fisiológicas, siendo su liberación pulsátil y a niveles bajos en función del estrés sobre el órgano y de la acción de otros agentes vasoactivos como las prostaglandinas I_2 y E_2 y el tromboxano A_2 . La enzima iNOS, en cambio, produce un flujo continuo y de gran cantidad de NO desde el momento en que es activada (inducida); algunos autores apuntan la posibilidad de que en situaciones de activación, ese enzima podría sufrir un efecto de control en la producción del NO, por retroalimentación negativa ejercido por el propio NO producido.

Los diferentes estudios realizados concluyen que, entre otros, los principales estímulos para la activación de la iNOS son: Productos derivados de las bacterias (LPS, restos de la pared, etc.), $INF-\gamma$, IL-1, el $TNF-\alpha$, los RLO, el factor nuclear κB , y el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) (Figura 5). En cuanto a su inhibición, otra serie de citocinas parecen inhibir su producción (IL-4 e IL-10), causando el mismo efecto inhibitor el factor de crecimiento de los macrófagos ($TGF-\beta$) (Figura 5).

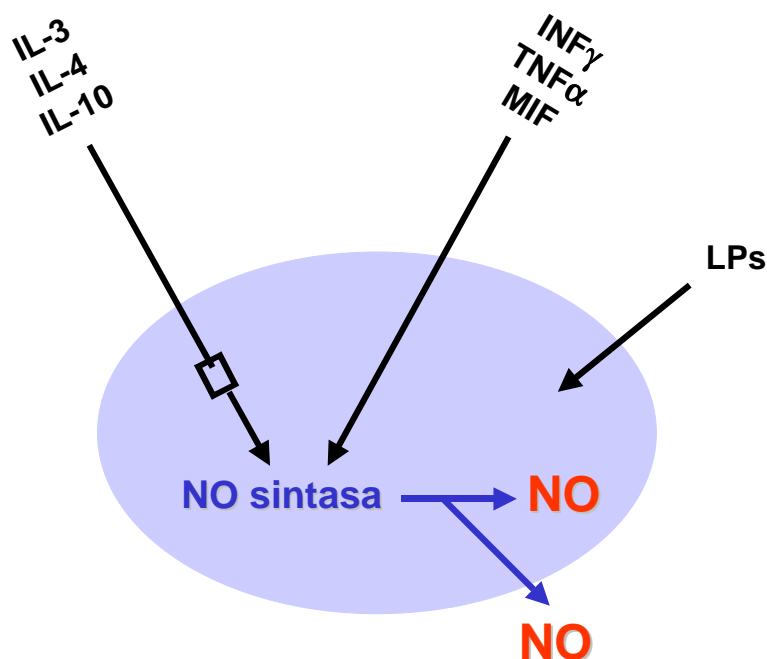


Figura 5.- Síntesis de NO en los macrófagos

Mucho se ha investigado sobre el papel que podría jugar el NO en el fenómeno inflamatorio, otorgándole últimamente un efecto protector, si bien, el balance final de su actividad, los diferentes caminos en los que se encuentra implicado, y los efectos que pudiese ejercer, aún no están completamente dilucidados y conducen a la controversia^(69, 76, 208, 209, 255, 306, 343). Entre los efectos beneficiosos parecen demostrados los siguientes^(2, 19, 23, 45, 71, 75, 77, 108, 167, 168, 180, 224, 290, 303, 309) (Tabla I):

- Es un inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria mediante el incremento de los niveles intracelulares de GMPc evitando así la trombosis del vaso.
- Disminución de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, acumulado durante el proceso inflamatorio⁽²⁹⁰⁾.
- Bloquea la adherencia y posible migración de los monocitos, hecho demostrado “in vitro”.
- Es un inhibidor de la activación neutrofilica que conduce a la adhesión celular al endotelio^(194, 200, 219, 233); así como a la generación de radicales libres del oxígeno⁽¹¹⁶⁾; así como bloquea la liberación de productos con acciones vasoconstrictoras, citotóxicas y multiplicadoras de la reacción inflamatoria (leucotrienos, citocinas, prostaglandinas, etc.) y parece ejercer además un efecto citoprotector directo sobre las células endoteliales. En relación con estos aspectos, cabe destacar:
 - Algunos trabajos le otorgan también un efecto directo sobre los fenómenos más íntimos de la adhesión celular. En estos estudios, cuando la producción de NO se bloqueó, la expresión de ICAM-1, en las células endoteliales, se incrementó; y cuando se indujo la producción de NO, los niveles expresados de ICAM-1 disminuyeron^(201, 219, 221).
 - Se ha demostrado cómo el NO puede inhibir la producción de radicales libres del oxígeno, por parte de los neutrófilos, por la inhibición directa de la NADPH-oxidasa.
 - Reacciona con los radicales libres del oxígeno, actuando como inactivador de sus efectos. En concreto, reacciona con el anión superóxido generando peroxinitritos que son transformados, a su vez, en nitratos con la liberación del radical hidroxilo.
 - Modula las hemoproteínas que pueden actuar como receptores de los radicales libres del oxígeno.
- Parece actuar como un mensajero intracelular que no requiere transportadores de membrana.
- Es un protector de la mucosa intestinal, favoreciendo de este modo la función de barrera.

Tabla I.- Algunas de las acciones del óxido nítrico

DIANA	RESPUESTA
Guanilato-ciclasa.	Elevación del GMPc.
Plaquetas.	Inhibición de la agregación y adhesión.
Células musculares lisas.	Relajación.
Leucocitos.	Inhibición de la NADPH-oxidasa y activación de la prostaglandín-sintetasa.
Radicales libres.	“Barrendero” formando peroxinitritos.
Metaloproteínas.	A altas concentraciones, inhibición directa de la citocromo-C-oxidasa y otros enzimas que las contienen.
Lípidos.	Formación de peróxidos lipídicos, a través de su descomposición, para formar productos lipídicos vaso-activos.

La modulación de la producción endógena de NO, mediante la administración de su precursor, la L-arginina, puede conducir a una disminución del daño en los tejidos isquémicos que son reperfundidos^(159, 170, 227, 264, 267, 281, 320, 348, 392). En experiencias consistentes en la administración de NO exógeno, se ha observado: una disminución de la actividad de la enzima neutrofílica mieloperoxidasa (marcador más sensible de la infiltración neutrofílica); un mantenimiento de los requerimientos locales de oxígeno; que no ejerce acción alguna sobre la situación hemodinámica sistémica o local en el transcurso del proceso inflamatorio, hecho este último contradicho en algunos modelos de isquemia-reperfusión intestinal donde podría, para esos autores, generar una hipotensión marcada por reducción de las resistencias vasculares periféricas con incremento del daño. También se ha comprobado una disminución de la producción de radicales libres del oxígeno y de citocinas proinflamatorias^(272, 336, 366, 398).

En otras líneas experimentales, en cambio, los resultados son inversos. Así se ha observado, en modelos de isquemia-reperfusión miocárdica, un efecto cardiodepresor y lesiones similares a las inducidas en situación de shock. Algunos autores coinciden en la explicación de que el origen, del incremento del daño, podría ser la formación de peroxinitritos, dióxido de nitrógeno y radicales hidroxilo; que serían los responsables de estos efectos adversos. Pero algunos trabajos, en cambio, indican, por un lado, que el ONOO- podría jugar un papel no tan importante en el desarrollo de lesión y, por otro, que el efecto lesivo podría tener su origen en la activación de la ciclo-oxigenasa de las células hipotálamicas y de las células endoteliales, induciendo la producción de citocinas, multiplicando así la respuesta inflamatoria. La última tendencia es considerar que esos

efectos contrarios podrían deberse a un exceso de producción, a su vez, secundaria a la estimulación de la producción de la iNOS en las células endoteliales y en los macrófagos, que además dicho sobreexceso, algunos autores piensan que bloquearía la transcripción de la vía constitutiva o a que el efecto predominantemente beneficioso durante la reperfusión, proviene del NO producido por cNOS. De hecho el bloqueo de la producción de NO por un inhibidor específico del cNOS (L-NAME = NG-nitro-L-arginine methyl ester), mostró en modelos de isquemia-reperfusión intestinal un efecto adverso, morfológico y funcional, respecto al uso de bloqueantes no selectivos de ambas enzimas (L-NMMA = N-monometil-L-arginina).

En modelos de isquemia-reperfusión renal^(58, 99), se ha comprobado cómo el NO, juega un papel muy importante en la regulación del flujo renal, así como en la excreción de Na^+ y H_2O_2 en condiciones fisiológicas y durante el fallo renal agudo secundario a isquemia-reperfusión. Se ha demostrado cómo el tratamiento pre-reperfusión, con el precursor del NO endógeno, la L-arginina, o con NO exógeno, se sigue de una mejora de la función renal fundamentada en un incremento de la excreción de sodio, descenso sérico de creatinina y aumento del flujo renal arterial. Confirmado al bloquear la ruta sintética endógena del NO, con un antagonista de la L-arginina, L-NNA en uso sistémico o intra-arteria renal, respectivamente, se generaba una vasoconstricción arteriolar con el consiguiente descenso del flujo arteriolar y por tanto de la diuresis. Se comprueba también cómo este efecto es menor, sólo incremento discreto de la diuresis, si el tratamiento se realiza una vez iniciada la reperfusión.

Ante toda esta confusión y contradicciones, no debemos descartar dos aspectos muy importantes; el primero de ellos sería la posible activación, secundaria a la de la iNOS, de fenómenos que causen un incremento del daño en la inflamación; y el segundo sería el momento, dentro del proceso patológico, en el que se administra el tratamiento (bloqueantes, precursores o exógeno). De todas las formas, deberemos esperar nuevos resultados que aclaren todos los aspectos comentados y otros aún desconocidos. La controversia continúa debido a que algunos datos demuestran que el NO endógeno juega un papel mínimo en isquemia-reperfusión, pero el NO exógeno parece tener un claro efecto beneficioso^(57, 252, 313). Se ha comprobado una gran disminución de la producción endógena del NO, mantenida en el tiempo, en modelos de isquemia-reperfusión donde se ha tratado a los animales de experimentación con NO exógeno; en estos casos no podemos descartar que la inactivación de la iNOS pueda tener algo que ver con los efectos beneficiosos encontrados.

Muy poco se conoce acerca de cómo se controla la liberación de citocinas, o de cómo se modulan las moléculas de adhesión celular durante la inflamación. Basado en algunos trabajos de la literatura^(57, 121, 128, 392), se piensa que el NO es el paso final que eventualmente ejerce una retroalimentación negativa en la producción/liberación de las citocinas^(121, 160, 237) y/o la expresión/activación de las moléculas de adhesión celular^(121, 166, 338); muy posiblemente, todo ello mediado por la regulación del factor transcripcional NF κ B (Figura 6).

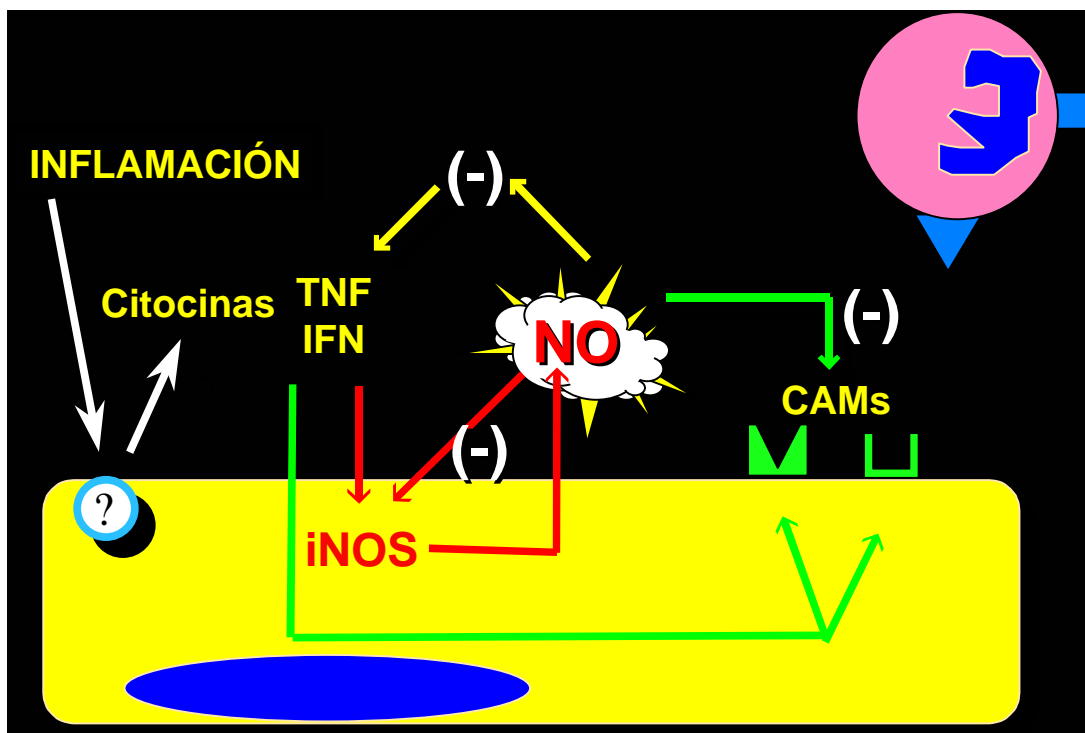


Figura 6.- Posible mecanismo de acción del NO en la inflamación

1.2.- Interacción Leucocito Endotelio

Clásicamente, el endotelio ha sido considerado una estructura relativamente inerte, que participaba en la composición de arterias, venas y capilares, así como, en la hemostasia primaria y en el transporte de iones y sustancias orgánicas, con una discreta acción de transformación local de algunas de esas sustancias.

Desde hace 15 años se ha identificado como un órgano extremadamente activo. Su localización en la interfase sangre-tejido, le convierte en un centro clave de procesamiento de señales celulares y de mediadores, que deben transferir de la circulación a las células o tejidos próximos, ejerciendo por lo tanto su función, no sólo por su propia modulación metabólica, sino también por las órdenes transmitidas a las células vecinas, fundamentalmente musculares y leucocitos, como veremos más adelante.

Respecto a su actividad metabólica, se comporta como secretor, implicado en numerosos mecanismos bioquímicos y fisiológicos, incluyendo: regulación del tono vascular, adhesión y transferencia de leucocitos en la inflamación, protección local de los tejidos en situaciones de isquemia, regulación del crecimiento de las células musculares lisas, así como productor y regulador de la matriz extracelular.

Teniendo el origen común, las células endoteliales, alcanzan diferentes fenotipos con especializaciones según el territorio u órgano en los que se asienta. Su participación directa en la protección del funcionalismo vascular viene mediada por su capacidad de segregar metabolitos extremadamente activos y antagónicos, como el óxido nítrico y la endotelina para la regulación de la contracción de las células musculares lisas, o la de activadores de la fibrinólisis como el t-PA o el u-PA y de su inhibidor el PAI-1, que controlan la fibrinólisis.

Las interacciones entre los leucocitos y el endotelio son cruciales en el mecanismo de lesión en la inflamación y su conocimiento será determinante para el tratamiento del fenómeno inflamatorio en general^(4, 247, 377, 392, 396).

Han sido descritos dos mecanismos para explicar las interacciones inflamatorias de los leucocitos y las células endoteliales, invocando activación primaria del neutrófilo y como consecuencia, activación secundaria de la célula endotelial, o activación de la

célula endotelial y secundariamente del leucocito; todo ello después del fenómeno de inflamación.

A.- Adhesión dependiente del neutrófilo

Todos los mediadores de la inflamación presentes en el suero, influyen en la adherencia del leucocito al endotelio a través de la modulación de la actividad del receptor de CD18. Este proceso es rápido con el punto más alto de adhesividad para los neutrófilos alrededor de 10 minutos y decayendo en un periodo aproximado de 45 minutos⁽¹⁷³⁾.

B.- Adhesión dependiente del endotelio

El segundo mecanismo es el de la célula endotelial activada primariamente, con lo que el neutrófilo circulante será atraído, activado y adherido en respuesta a las señales derivadas del endotelio activado. Este proceso dependiente del endotelio implica dos pasos en la respuesta inflamatoria: la adhesión temprana y la tardía dependientes de la célula endotelial⁽²⁰⁴⁾.

- Adhesión temprana: Las sustancias implicadas son RLO, leucotrienos, tromboxanos, PAF y componentes de la cascada del complemento. Estos productos pueden iniciar el mecanismo de respuesta temprana que provoca adhesión celular rápida leucocito-endotelial. Esta respuesta inmediata de adhesión dependiente del endotelio tiene su punto más alto de actividad a los 5-10 minutos y decae hacia los 30-45 minutos.

- Adhesión tardía: En contraste, los efectos del periodo de respuesta tardía tienen su punto más alto a las 4-6 horas que siguen al estímulo y persisten hasta 48 horas. Esto incluye la estimulación del endotelio por las citocinas y la síntesis y expresión de las moléculas de adhesión. Estas moléculas están implicadas en una variedad de interacciones leucocito-endoteliales que juegan un papel importante en los procesos inflamatorios.

1.2.1.- Moléculas de adhesión celular

En el momento de la respuesta inflamatoria, tanto el endotelio como los leucocitos, expresan en la superficie de sus membranas celulares las moléculas de

adhesión celular (CAMs), las cuales inducen infiltración neutrofílica y lesión tisular^(4, 247, 331, 337, 365, 392, 393, 396). La comprensión de los mecanismos en los cuales se basa la adhesión de los leucocitos al endotelio aportará las bases necesarias para el tratamiento antiadhesivo del proceso inflamatorio. A pesar de que la mayoría de los estudios se han desarrollado en modelos de experimentación animal, han aportado las primeras evidencias significativas de la adhesión como un paso esencial en la progresión de la lesión inflamatoria^(151, 282, 356).

1.2.1.1.- Interacción leucocito-endotelio: Etapas de la inflamación

La interacción leucocito-endotelio juega un importante papel en la patogénesis de la inflamación. Se ha demostrado una masiva infiltración de leucocitos en el tejido postisquémico paralela a su lesión^(128, 151, 358, 380, 397). Esta interacción se divide en cuatro etapas específicas, que exponemos a continuación^(246, 319, 359) (Figura 7):

- A. Rodamiento:** Es la primera interacción entre leucocitos y las células endoteliales. Los leucocitos, debido a las alteraciones del flujo laminar, disminuyen sensiblemente su velocidad y quedan marginados en la periferia rodando sobre el endotelio vascular y siendo expuestos a los mediadores de la inflamación liberados por el endotelio. Esta fase es rápidamente inducida y varios estudios han sugerido el papel de los receptores de selectinas en el rodamiento de los leucocitos.
- B. Activación:** En esta fase los leucocitos, debido a la disminución de su velocidad, marginación y rodamiento, están expuestos a los mediadores de la inflamación de forma más intensa y esto provocará la expresión/activación de las moléculas de adhesión celular tanto en ellos como en el endotelio.
- C. Adhesión:** Una vez activados los leucocitos y las células endoteliales se provoca una firme adhesión entre ellos a través de las moléculas de adhesión celular.
- D. Migración:** Finalmente, después de la adherencia transitoria (rodamiento) y más tarde de la firme (adhesión), los leucocitos migran a través de la matriz subendotelial al tejido extravascular inflamado.

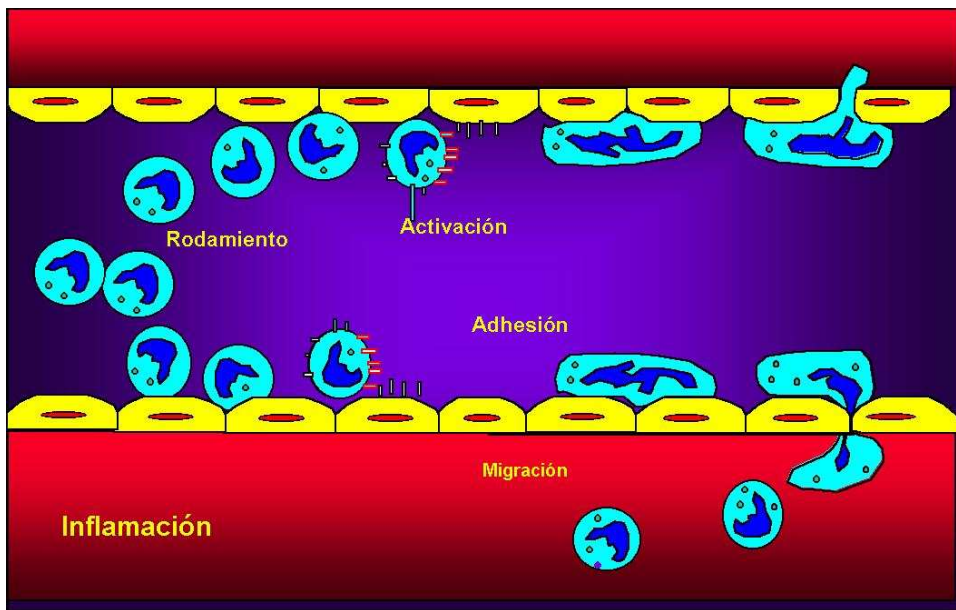


Figura 7.- Interacción leucocito-endothelium en la inflamación

Este proceso implica a múltiples moléculas de adhesión celular, que se expresan tanto en la superficie de los leucocitos como en la de las células endoteliales, y que son las responsables de la interacción leucocito-endothelium. Las moléculas de adhesión celular más importantes, asociadas con el fenómeno inflamatorio, han sido clasificadas en tres familias^(246, 319, 359) (Figuras 8 y 9):

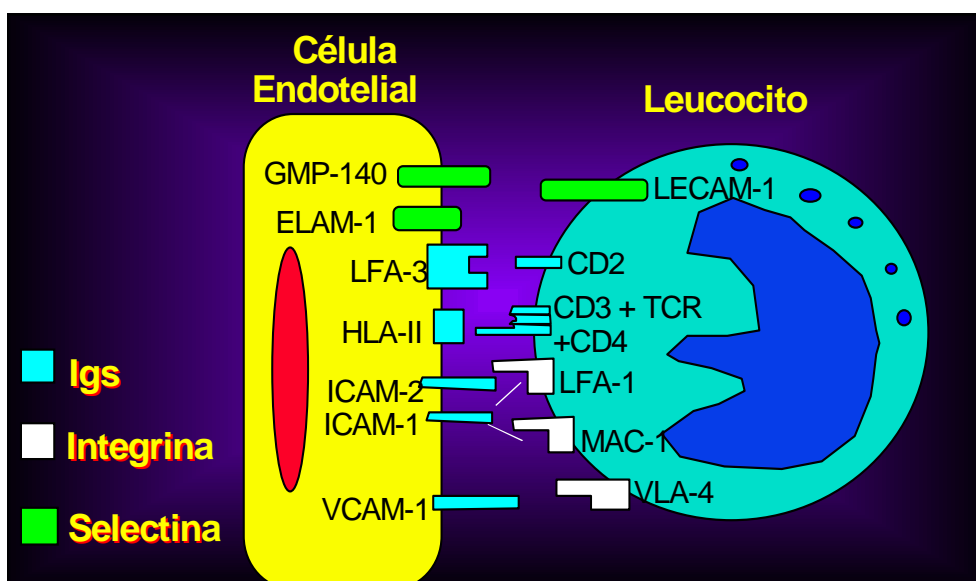


Figura 8.- Familias de CAMs y células que las expresan I

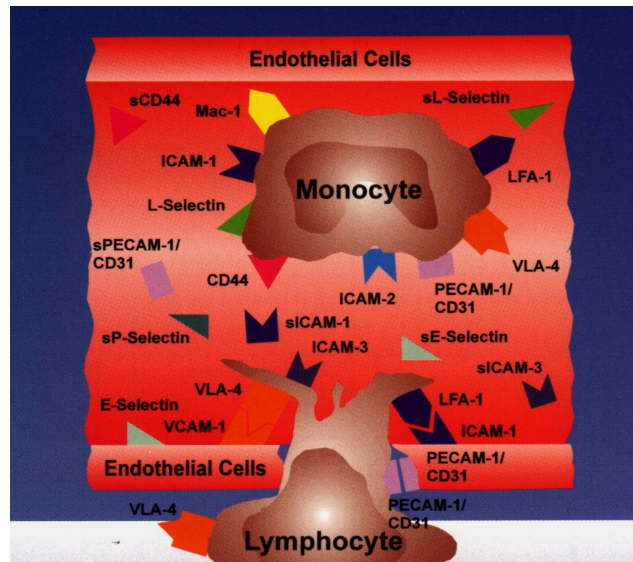


Figura 9.- Familias de CAMs y células que las expresan II

A.- Superfamilia de las inmunoglobulinas

Los miembros de esta familia se caracterizan por contener los llamados dominios inmunoglobulínicos, que consisten en dos láminas peptídicas en estructura β -plegada y en disposición antiparalela estabilizadas por puentes disulfuro. Estas características estructurales son compartidas por moléculas que participan en el reconocimiento antigénico y en la activación linfocitaria como los anticuerpos, el receptor T, los antígenos de clases I y II del sistema mayor de histocompatibilidad y sus contrarreceptores CD8 y CD4.

En general, las moléculas de esta familia se hallan presentes en células presentadoras de antígenos y tienen un papel crucial como moléculas accesorias en el reconocimiento antigénico y la activación linfocitaria.

Entre sus componentes, teniendo en cuenta su importancia en el fenómeno inflamatorio, destacamos las siguientes^(103, 158, 177, 225, 273, 278, 280, 338, 360, 349-351) (Tabla II):

- Molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1, CD54).
- Molécula de adhesión intracelular-2 (ICAM-2).
- Molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, INCAM-110).
- Molécula de adhesión celular plaquetaria-endotelial-1 (PECAM-1).

Tabla II.- Superfamilia de las inmunoglobulinas

CAMs	Célula en la que se expresa	Ligando	Célula en la que se expresa el ligando
ICAM-1*	Endotelial, Monocito, Linfocito T y B, Dendrítica	Mac-1	Leucocitos Monocitos
ICAM-2**	Endotelial, Monocito, Dendrítica	LFA-1	Leucocitos
VCAM-1*	Endotelial	VLA-4	Linfocitos, Monocitos
PECAM-1*	Endotelio, Monocitos, Linfocitos	CD31	Endotelio, Plaquetas

* Inducible por citocinas; ** Constitutiva

B.- Familia de las integrinas

Son glucoproteínas heterodiméricas compuestas por una cadena α y otra β presentes en una amplia variedad de estirpes celulares. Constituyen los principales receptores con que las células interactúan con la matriz extracelular. Algunas de ellas también participan en interacciones celulares. Las integrinas se clasifican en familias, cuya identidad queda establecida por la cadena β . Se han identificado al menos 9 cadenas β distintas que definen las correspondientes familias. Cada cadena β puede unirse a distintas cadenas α lo cual resulta en un gran número de posibles combinaciones. Las integrinas se expresan constitutivamente en los leucocitos y su regulación es principalmente funcional. Consolidan las interacciones iniciadas por otras moléculas de adhesión celular, principalmente las selectinas, y al unirse a sus contrarreceptores producen importantes cambios funcionales en los leucocitos. Su conexión con el citoesqueleto celular les confiere también un importante papel en el proceso de migración. Nos centraremos, a continuación, en las más importantes relacionadas con el fenómeno inflamatorio^(95, 165, 347) (Tabla III):

- Antígeno relacionado con la función linfocítica-1 (LFA-1, β_2 -integrina, CD11a/CD18).
- Macrófago-1 (Mac-1, β_2 -integrina, CD11b/CD18).
- Antígeno de activación muy tardía-4 (VLA-4, β_1 -integrina, CD49d/CD29).

Tabla III.- Familia de las integrinas

CAMs	Célula en la que se expresa	Ligando	Célula en la que se expresa el ligando
LFA-1*	Leucocito	ICAM-1 ICAM-2	Endotelial
Mac-1**	Monocito, Neutrófilo	ICAM-1	Endotelial

* Inducible por citocinas; ** Constitutiva

C.- Familia de las selectinas

Son las moléculas de adhesión celular que vehiculizan el contacto inicial en las interacciones leucocito-endotelio. Son glucoproteínas de membrana que comparten un dominio aminoterminal tipo lectina, por donde se unen a hidratos de carbono específicos. Las selectinas reconocen oligosacáridos sialilados o sulfatados relacionados con los antígenos Lewis^a o Lewis^x que pueden formar parte de la porción glucídica de diversas glucoproteínas. Son proteínas relacionadas con las mucinas y un elevado porcentaje de su peso molecular corresponde a su parte glucídica.

Las interacciones mediadas por esta familia de moléculas de adhesión celular son de una gran complejidad y redundancia, siendo las responsables del inicio de las interacciones leucocito-endotelio en la respuesta inflamatoria. Hasta el momento se conocen tres selectinas^(52, 101, 129, 157, 212, 214, 216-218, 228, 243, 285, 297, 334, 385, 391) (Tabla IV):

- Molécula de adhesión leucocitaria (L-selectina, LAM-1, LECAM-1).
- Molécula de adhesión endotelial leucocitaria (E-selectina, ELAM-1, LECAM-2).
- Activador plaquetario dependiente del gránulo de membrana (P-selectina, PADGEM, GMP-140, LECAM-3, CD62).

Tabla IV.- Familia de las selectinas

CAMs	Célula en la que se expresa	Ligando	Célula en la que se expresa el ligando
L-selectina*	Linfocito	Mucine	Endotelial
E-selectina**	Endotelial	Moléculas fucosiladas ó sialiladas	Neutrófilo Monocito
P-selectina***	Plaquetas Endotelial	Moléculas fucosiladas ó sialiladas	Plaqueta Neutrófilo Monocito

* Disminuida por citocinas; ** Inducida por citocinas; *** Liberada por citocinas

1.2.1.2.- Modulación de las CAMs

Uno de los principales mecanismos de control de las moléculas de adhesión celular, es la afinidad del receptor por su ligando. Los leucocitos en reposo no se adhieren espontáneamente y una serie de estímulos pueden inducir interacciones célula-célula mediadas por las β_1 -, β_2 -, y β_3 -integrinas⁽²¹⁾. Una característica interesante es que después de estos estímulos, se induce la adhesión sin un aparente incremento en la expresión de los receptores^(74, 210, 383). Esto ha sugerido que la afinidad del receptor por su ligando, o cambios en la organización de los receptores en la superficie celular, son los que causan el incremento de la adhesión.

1.2.1.3.- Expresión de las CAMs en los leucocitos

Los fenómenos precisos, intracelulares, que regulan la adhesión celular mediada por integrinas aún no son bien conocidos. Algunas observaciones^(21, 44) sugieren que CAMs en la superficie tales como CD2 y CD3 pueden activar a la integrina LFA-1 por medio de señales intracelulares (signaling pathway). Estas y otras observaciones sugieren que la hipótesis de activación de LFA-1 puede ser inducida a través de diferentes receptores de superficie, lo que muestra que la vía LFA-1/ICAM-1 es una vía común de adhesión que pueden seguir los leucocitos bajo diferentes condiciones fisiopatológicas (inflamación, reperfusión, infección, rechazo, etc.).

1.2.1.4.- Expresión de CAMs en el endotelio

ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, E- y P-selectina son las CAMs expresadas en la superficie de las células endoteliales. Los mecanismos involucrados en la modulación de la expresión de estas CAMs no están completamente esclarecidos. Se ha observado que los receptores de las integrinas no expresan una forma activa e inactiva como es el caso de las observaciones para el receptor de LFA-1^(11, 275, 374). Sin embargo, es bien conocido que la producción de citocinas incrementa localmente la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales^(299, 300), de aquí que faciliten la adhesión celular en general. La inmunoneutralización de ICAM-1 atenúa la adherencia neutrofílica en isquemia-reperfusión mesentérica y reduce el secuestro neutrofílico y el edema en la postisquemia pulmonar. Las selectinas son un caso especial, por ejemplo, la P-selectina es una glicoproteína localizada en las plaquetas y en los cuerpos de Weidel-Palade de las células endoteliales. Después de la activación endotelial, los cuerpos de Weidel-Palade se fusionan con la membrana plasmática y la P-selectina se transloca rápidamente a la

superficie en aproximadamente 5 minutos⁽¹⁵¹⁾. La E-selectina no se expresa en células en reposo o en células endoteliales multitransferidas; sin embargo, hay una expresión baja en células endoteliales que han sido obtenidas de cordones umbilicales. Su pico de expresión después de la activación es tardío a diferencia del de la P-selectina, el cual es máximo a las 4-6 horas después de la estimulación con citocinas^(7, 30, 61, 107, 110, 111, 172, 194).

1.2.1.5.- Citocinas, endotelio y CAMs

Como mencionamos anteriormente, las citocinas más importantes implicadas en la modulación de las CAMs son el TNF- α , la IL-1 y el IFN- γ . Después de la adición de citocinas al endotelio (TNF- α , IL-1), la expresión de ICAM-1 se incrementa, llegando a un pico máximo a las 24 h., manteniendo su expresión al menos 72⁽³⁷¹⁾. Por otro lado, VCAM-1 es inducida por la IL-4, la IL-1 y el TNF- α pero no por el IFN- γ . Esta molécula alcanza su máxima expresión alrededor de las 6 horas y declina a las 48h⁽³⁷²⁾. La E-selectina se expresa en las células endoteliales después de inducción con la IL-1 y el TNF- α pero no con el IFN- γ ⁽³⁷¹⁾. En cultivos de tejidos, estas citocinas activan la transcripción de ELAM-1 causando un pico de expresión en la superficie celular entre las 4-6 h., retornando a niveles basales a las 24 h.

1.2.1.6.- Citocinas, leucocitos y CAMs

El TNF- α es la citocina más potente que estimula a los neutrófilos para incrementar temporalmente su adhesividad. Este incremento dura de 30 a 60 minutos⁽²⁵¹⁾ y parece inducir una disminución en los niveles de AMP cíclico⁽¹⁹²⁾. También el TNF- β , y el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) tienen efectos cualitativamente similares al TNF- α en los neutrófilos, sin embargo estas moléculas son menos potentes. Después de la activación de neutrófilos con TNF- α y GM-CSF se incrementa la producción de Mac-1, y L-selectina cambia la afinidad por su ligando.

1.2.1.7.- El factor transcripcional NF κ B

La importancia de la regulación del fenómeno de respuesta inflamatoria nos hace prestar, en la actualidad, especial atención a los mecanismos intracelulares, de tipo genético, que controlan la replicación del DNA y la consecuente inducción de actividad celular. De este modo se han logrado conocer algunos de los responsables de la transcripción del DNA a RNAm y los genes regulados por los mismos, entre ellos destacamos, por su importancia en la inflamación, al factor transcripcional NF κ B.

NF κ B es una proteína activadora transcripcional que pertenece a la familia Rel de factores transcripcionales y ha sido punto focal de atención en el intento de comprender cómo las señales extracelulares inducen la expresión específica de grupos de genes en eucariotes superiores⁽³¹⁾. Originalmente fue identificada como un complejo proteico que consistía en una subunidad de 65 kDa (p65) que se une al DNA y una subunidad de 50 kDa (p50) asociada^(79, 141, 143).

El interés en este factor transcripcional se ha generado por la complejidad del sistema NF- κ B, ya que hay múltiples formas de subunidades Rel asociadas NF κ B (NF κ B/Rel) y también hay múltiples formas de I κ B (porción inhibidora)⁽¹⁶²⁾. Esta complejidad ofrece un potencial enorme de combinaciones para el control en la regulación de la transcripción específica de genes.

Los mecanismos de activación citoplasmática de NF κ B se han dividido en 4 fases: fosforilación, ubiquitinización, degradación o procesamiento proteico y transporte^(162, 366) (Figuras 10 y 11). Las fases anteriormente descritas tienen como objeto preparar la porción que penetrará en el núcleo y activará la replicación del DNA y dependiendo de la información transmitida se replicará en un RNAm específico que activará los diferentes mecanismos celulares necesarios para la producción y/o liberación de mediadores o inductores en el fenómeno inflamatorio.

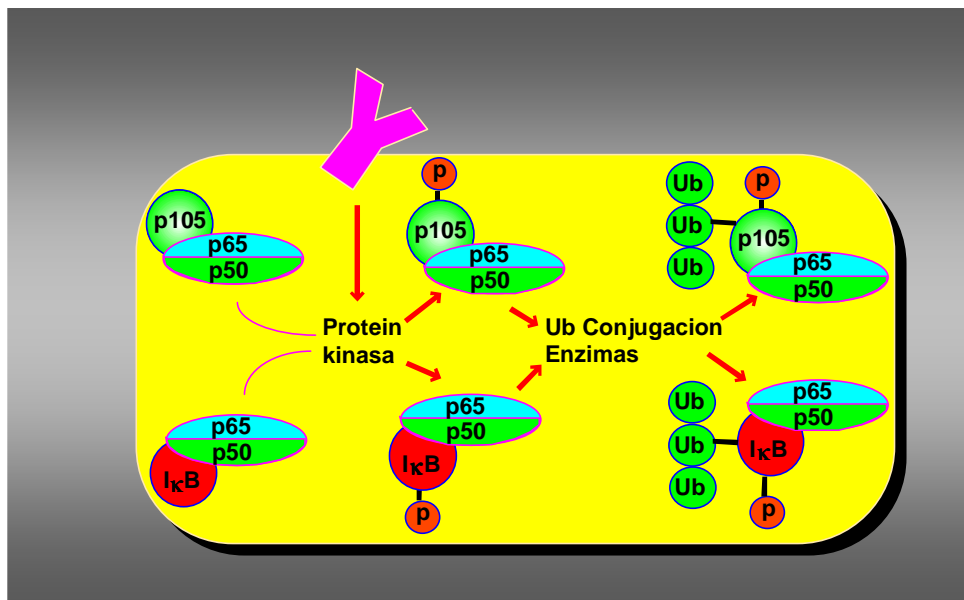


Figura 10.- NF κ B (p65-p50) se encuentra atrapado en el citoplasma en condiciones normales formando un complejo, inactivo, con la subunidad inhibidora I κ B. Después de su activación, I κ B es primero fosforilada y posteriormente ubiquitinizada.

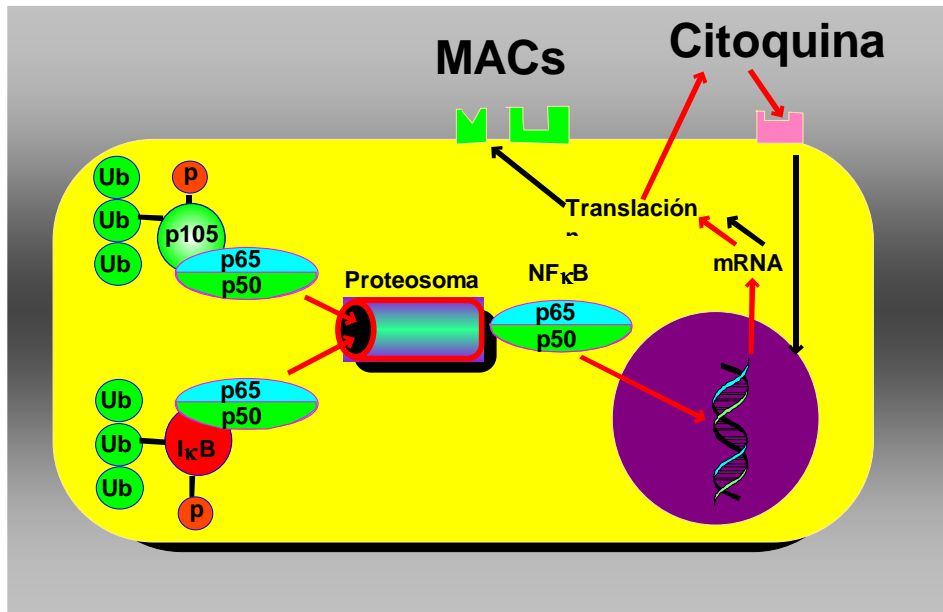


Figura 11.- IκB y p105 son procesados por lisis o sólo liberados. NFκB es entonces capaz de ser transportado dentro de la membrana nuclear donde activa la transcripción de diferentes genes incluyendo TNF-α, INF-γ y otras proteínas como CAMs.

La actividad de NFκB es inducida por mitógenos y probol éster, aun en presencia de inhibidores de la síntesis proteica⁽¹⁴¹⁾. También se ha demostrado que factores séricos de crecimiento y citocinas proinflamatorias como TNF-α e IL-1 inducen su actividad independientemente de que la síntesis proteica esté activa o no^(229, 279) (Tabla V).

Tabla V.- Inductores de NFκB

Lista parcial de inductores de NFκB

- Probol éster PMA
- Lipopolisacárido (LPS)
- Factores séricos Growth/derivados plaquetarios de factor Growth (PDGF)
- Radicales libres del oxígeno (H₂O₂)
- Factor de necrosis tumoral (TNF)
- Interleucina-1
- Infección viral
- Proteínas virales:
 - Proteína X del virus de la hepatitis B
 - Proteína Tax del HTLV-1
 - Proteína latente de membrana (LMP)

La lista conocida de genes que son regulados por NF κ B incluye los genes clásicos de función inmune e inflamación, y básicamente no se conoce cómo son controlados, aunque en la actualidad se está investigando mucho en este sentido (Tabla VI).

Tabla VI.- Genes regulados

Lista parcial de genes regulados por la familia Rel (NF κ B, Rel o Dorsal)
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)
Interleucina-2 (IL-2)
GM-CSF
VCAM-1
Interferón γ (IFN- γ)
Receptor de la interleucina-2
MHC Clase I
c-Myc
p50-p150 NF κ B
Urokinasa
HIV (LTR)
Gro (Factor estimulador del melanoma)

El control de la actividad de NF κ B aun no ha sido completamente dilucidado. La forma clásica de NF κ B (p50/p65) es aparentemente inactiva en la mayoría de las células en las cuales se encuentra asociada con el inhibidor I κ B⁽¹⁴⁾. I κ B inhibe la translocación de NF κ B al núcleo.

La inducción por los agentes mencionados anteriormente, produce una localización nuclear de la proteína, supuestamente, a través de la liberación de I κ B⁽²⁵⁾. Pero no han sido aclaradas cuáles son las señales involucradas en esta liberación, ni tampoco el control de la resíntesis de NF κ B, ni el restablecimiento del complejo NF κ B-I κ B en el citoplasma.

2.- TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

Las complicaciones infecciosas continúan siendo una causa importante de morbi-mortalidad en los pacientes críticos (politraumatismos, polioperados, quemados, etc.) a pesar de los avances técnicos en las unidades de cuidados intensivos, tratamientos multidisciplinarios y profilácticos^(248, 256). Un desenlace fatal, desde una situación de sepsis, habitualmente es el resultado final de un fallo multiorgánico progresivo o de un shock séptico⁽²⁵⁷⁾. Los pacientes en situación crítica, por ejemplo por politraumatismos, sufren numerosas alteraciones de la inmunidad humoral y celular, conduciendo a una disminución de las defensas contra la infección⁽²⁶⁰⁾. Por otra parte, la función de barrera del epitelio mucoso intestinal y la capacidad de aclaramiento de bacterias por los fagocitos, influye en el número de bacterias viables en los tejidos, hecho asociado al proceso de translocación de bacterias o de sus productos. Berg y cols. y Deitch y cols. popularizaron el concepto de translocación en las décadas 70 y 80^(263, 265).

2.1.- Concepto

En los modelos experimentales se han determinado tres grandes vías de fallo de la función barrera⁽⁸⁴⁾:

- Alteración del equilibrio ecológico, lo que permite un sobrecrecimiento bacteriano.
- Alteraciones en las defensas inmunológicas del huésped.
- Alteración en la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal.

Este fallo de la barrera intestinal ha sido considerado el posible desencadenante de infecciones, fallo multiorgánico y/o muerte^(80, 284).

Aun hoy, la frecuencia del proceso de TB es discutida. Para algunos autores el proceso es poco frecuente aun cuando se ha demostrado que en pacientes críticos, la mortalidad está relacionada con un incremento de la permeabilidad intestinal y por tanto de TB^(284, 292). Además se ha admitido un papel no menos importante para la TB, en el desarrollo de las neumonías nosocomiales en pacientes severos, que el dado a la aspiración de las secreciones nasofaríngeas contaminadas⁽¹⁰⁶⁾.

2.2.- Fisiopatología

La TB se puede estudiar en varias situaciones, clínica y experimentalmente, tanto en un sentido protector como promotor. Ambos se encuentran intensamente interrelacionados. Así podemos encontrar: factores inductores, capaces de producir TB; factores favorecedores que junto con otros contribuyen a su aparición y factores potenciadores que van a incrementar el grado de TB ya existente. Clasificar las causas de translocación en uno de estos grupos es casi imposible debido a las numerosas interacciones existentes entre ellas. Por esto es mucho más útil diferenciarlas según el mecanismo de actuación: alterando la capacidad de la barrera intestinal o modificando la tendencia bacteriana a la translocación.

2.3.- Factores que Alteran la Barrera Intestinal

La capacidad de la barrera intestinal, fisiopatológicamente, puede verse sometida a diferentes alteraciones que en muchos casos se superponen: alteraciones de la inmunidad, alteraciones del flujo sanguíneo, alteraciones de la dieta, deficiencias nutricionales, agresiones sobre la mucosa o incluso inflamaciones intraabdominales^(62, 98, 189).

2.3.1.- Factores que disminuyen la inmunidad intestinal

La alteración del sistema inmune en el proceso de translocación parece tener un carácter permisivo. La función del sistema inmunológico es la del aclarado de las bacterias o toxinas que hayan logrado atravesar la mucosa intestinal, con una función esencial para que esa translocación no se complique con un estado de sepsis y de fallo multiorgánico⁽³¹⁶⁾.

En este sentido debemos mencionar el aumento de la supervivencia de las bacterias translocadas debido a la influencia de las transfusiones de sangre, la edad del huésped que influye a través de un envejecimiento del sistema inmune y una cierta inmunosupresión, la infección por citomegalovirus o la presencia de niveles altos de corticoesteroides que para algunos autores no parecen influir en la incidencia de TB⁽¹⁸²⁾ aunque estos fármacos sí favorecen la adhesión de la bacteria al epitelio, y por tanto, la TB.

Además existen situaciones o patologías que se comportan como inmunosupresoras favoreciendo la infección y la TB. Dentro de éstas nos encontramos las intervenciones quirúrgicas (comprobándose que dietas suplidas con arginina, ARN o ácidos grasos Ω -3, ayudan a restablecer la normalidad inmunitaria tras estos procesos⁽³²⁸⁾ (Figura 12)); la diabetes mellitus⁽²⁷⁾ o incluso la dieta, ya que se ha observado que la malnutrición proteica provoca una disminución de la respuesta a los mitógenos por parte de las células T e histológicamente una atrofia linfoide. Lo que no se ha observado es una alteración de la respuesta a los mitógenos por parte de los linfocitos B⁽⁸⁵⁾.

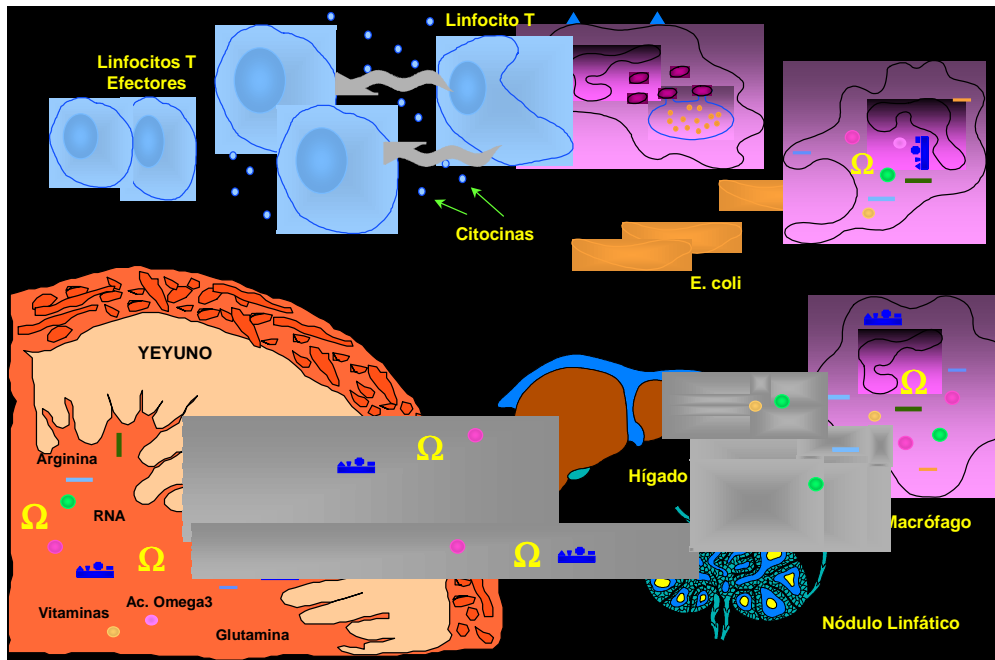


Figura 12.- Nutrientes específicos e inmunidad.

El sistema inmune, además, tiene otra función de gran importancia, la síntesis de inmunoglobulinas, que ayudarían a mantener la función de barrera dificultando la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal. Se ha observado que en animales a los que se suministra glucocorticoides o endotoxina, se produce una alteración del sistema inmune con una disminución de la síntesis de IgA, lo que favorece la adhesión de bacterias al epitelio intestinal y por tanto su translocación^(8, 9, 345).

Por último, debemos considerar que el propio desarrollo de TB, empeora el estado inmunológico del paciente, ya que se altera la función de algunas células inmunes, como son los linfocitos T y las células de Kupffer. Esto contribuye a establecer un círculo favorable a la entrada de bacterias en el organismo⁽²³⁸⁾.

2.3.2.- Factores que alteran la fisiología de la mucosa intestinal

La mucosa intestinal es uno de los lugares con mayor actividad mitótica y metabólica del organismo, por lo que es fácil comprender que sea uno de los más fácilmente dañables. Para que la integridad de la misma se pueda mantener, es necesario que exista una buena vascularización, una dieta adecuada que proporcione una buena nutrición de la mucosa y la ausencia de agresiones.

a) Alteraciones en la dieta

El ayuno, por si sólo, no es causa suficiente para producir translocación, pero sí es un factor asociado importante⁽²⁰⁾. La presencia de alimento en la luz intestinal supone uno de los mayores estímulos proliferativos de la mucosa intestinal. El reposo intestinal, bien durante la nutrición parenteral o el ayuno, da lugar a una atrofia de las vellosidades y a una disminución de las funciones intestinales, más importantes a nivel yeyunal, que comienzan a revertir rápidamente con la reanudación de la alimentación. Sin embargo, el ayuno crónico y la desnutrición van a provocar daños más profundos, lo que determina que al iniciar la realimentación, se sobrepase la capacidad de absorción de la mucosa alterada produciéndose malabsorción, distensión y diarrea. Los complejos de unión y las membranas apicales de las células epiteliales no van a realizar la función de barrera, convirtiéndose la mucosa, en estas circunstancias, en puerta y puente para la salida de bacterias.

Se ha comprobado, experimentalmente, que la nutrición parenteral total, da lugar a un aumento del recuento de bacterias cecales, provoca un sobrecrecimiento bacteriano y a su vez aumento de la incidencia de TB. Este sobrecrecimiento bacteriano es uno de los factores principales para el desarrollo de TB⁽¹⁰⁾.

La atrofia de la mucosa observada en la malnutrición o en la nutrición intravenosa no juega un papel tan importante como el sobrecrecimiento bacteriano, ya que medidas como la descontaminación antibiótica se muestran más eficaces que aquellas medidas tendentes a disminuir la atrofia⁽¹⁸⁾. Se ha observado que la atrofia de la mucosa producida durante la alimentación intravenosa se puede revertir eficazmente mediante la administración de prostaglandina-E oral; sin embargo esto no se asocia a una menor incidencia de TB⁽¹⁵⁵⁾. Por tanto, nos debemos plantear que la reversión inducida por la prostaglandina-E no es total o bien deben existir otros factores asociados a la nutrición parenteral total implicados en la TB.

Tenemos que tener en cuenta, además, que dietas pobres en ácidos grasos esenciales⁽²⁰⁾, proteínas y más concretamente en glutamina^(164, 169, 171, 394) o dietas líquidas, dan lugar a un aumento en la incidencia de TB. Esto demuestra la influencia que tienen determinados nutrientes, ácidos grasos esenciales y glutamina en el mantenimiento de la barrera mucosa^(20, 49). Una dieta enriquecida con glutamina se ha mostrado como protectora frente a la TB; este efecto parece que está mediado por el

sistema inmune secretor de IgA⁽⁶³⁾. También se ha demostrado que la falta de fibra en la dieta es un factor importante en el desarrollo de sobrecrecimiento bacteriano⁽³⁴⁴⁾.

b) Alteraciones del flujo sanguíneo intestinal

Alteraciones del flujo sanguíneo intestinal, aun en periodos cortos de tiempo, pueden dar lugar a TB y fallo multiorgánico⁽¹⁶⁰⁾. La mucosa intestinal se ve afectada por la hipotensión e inestabilidad hemodinámica, apareciendo desprendimiento de las células mucosas y cese de producción de moco, áreas de necrosis superficial, apertura de las uniones firmes existentes entre las células epiteliales y edema de la mucosa. Todo esto determina una alteración de la permeabilidad y edema de la pared intestinal⁽⁹⁷⁾.

Las grandes quemaduras son causa de TB. La quemadura se asocia a una vasoconstricción mesentérica que daña la mucosa; en ella, juega un papel importante el vasoconstrictor tromboxano A2 (y su metabolito el tromboxano B2) y el sistema renina-angiotensina^(156, 183). La inhibición de la tromboxano-sintetasa o el empleo de enalapril, así como la infusión de nitroprusiato sódico (donador de óxido nítrico) en la arteria mesentérica superior, previene la vasoconstricción y reduce la TB⁽¹⁸³⁾.

Estudios como los de Deitch y cols.⁽⁸²⁾, por otra parte, han confirmado la existencia de TB en situaciones de isquemia intestinal, como es el caso del shock hemorrágico, observando su aumento sobre todo durante el proceso de reperfusión, implicando en ello a la activación del sistema xantina-xantino oxidasa⁽⁸¹⁾.

c) Agresiones a la mucosa intestinal

Las agresiones pueden ser de tipo químico, mecánico o radiológico. Entre las agresiones químicas se ha descrito la producida por el ácido ricinoleico (componente activo del aceite de castor), que con una sola dosis intragástrica produce translocación de la flora gastro-intestinal a ganglios linfáticos, bazo e hígado, con un pico máximo a los 4 días. Este modelo no se puede considerar como un modelo estricto de TB ya que en el concepto de TB no se admiten cambios visibles de la mucosa⁽²⁵⁷⁾.

Fisiopatológicamente es comprensible que la TB pueda tener su origen en agresiones mecánicas tal y como se ha comprobado en las peritonitis secundarias a la preparación del colon previa a colonoscopia y en la cirugía colo-rectal^(301, 354).

Las radiaciones, experimentales, sobre el campo abdominal han dado lugar a translocación con sepsis posterior por *E. coli* en ratones, sin que exista daño aparente en la mucosa intestinal, condición requerida para admitir estrictamente la existencia de TB^(136, 148, 193). Se puede observar en estos animales un descenso de los leucocitos sanguíneos, de las células peritoneales y de los linfocitos de las placas de Sélter, así como una disminución de la respuesta mitógena de los linfocitos de varios tejidos linfáticos sin que esté alterada la función de las células de Kupffer⁽¹⁹³⁾.

d) Inflamaciones intraabdominales

La existencia de procesos inflamatorios intraabdominales supone también un factor desencadenante de TB. Se ha observado experimentalmente, que la pancreatitis obtenida por obstrucción biliopancreática da lugar a un aumento del número de bacterias en los ganglios linfáticos mesentéricos, sangre, hígado, bazo y páncreas⁽³¹⁵⁾. Por tanto, parece claro, experimentalmente, que el desarrollo de sepsis en la pancreatitis aguda es debido al proceso de TB⁽²⁴⁹⁾.

Experimentalmente, también, se ha visto que los materiales protésicos intraperitoneales provocan TB^(145, 146, 256). Dichos materiales son contaminados por la flora intestinal con una incidencia semejante a la de la TB en los ganglios linfáticos mesentéricos. El mecanismo propuesto sería la atracción quimiotáctica de células que han fagocitado partículas y bacterias en la pared intestinal a focos vecinos de inflamación⁽³¹⁵⁾.

En la enfermedad de Crohn, el mecanismo de TB se ha tratado de explicar a través de las estenosis típicas de la enfermedad, aunque hay que tener en cuenta también, la existencia de otros posibles mecanismos que den lugar a TB en otros pacientes sin estenosis. Dentro de estos mecanismos se debe tener en cuenta el inflamatorio, ya que los ganglios afectados suelen ser los correspondientes al drenaje de esos segmentos afectados por el proceso inflamatorio⁽²⁰⁷⁾.

e) Estados inflamatorios sistémicos

Experimentalmente, se ha observado cómo animales traumatizados (con mutilación a la altura femoral) y sobre todo animales traumatizados con tejidos necróticos (quemados) sufren TB, hecho que se ve intensificado si se altera su flora intestinal normal (animales monoasociados con *E. coli*)⁽⁷⁹⁾.

En la práctica clínica, se ha comprobado que en los pacientes politraumatizados, el fallo multiorgánico, está asociado a un aumento de la permeabilidad intestinal (determinada por el método lactulosa-manitol-concentración urinaria, cuando la función renal está conservada) y por tanto de TB⁽²⁸⁴⁾.

Se piensa que la asociación entre traumatismos y TB es debida a disfunciones inmunes y alteración de la permeabilidad intestinal por activación de mediadores de la inflamación, e incluso inflamación sistémica⁽²⁶⁸⁾.

Debemos incluir en este apartado el modelo experimental por Zymosan ya que es capaz de dar lugar a una inflamación aséptica intraabdominal y sistémica⁽⁸⁴⁾.

2.4.- Factores que Modifican la Tendencia Bacteriana a la Translocación

La tendencia bacteriana a la traslocación está relacionada con la situación del huésped. Con el fin de comprender más fácilmente la etiopatogenia de este proceso, podemos hacer una división entre las características cualitativas y cuantitativas de la flora intestinal en el proceso de la translocación.

2.4.1.- Aspectos cualitativos de la flora intestinal

La flora intestinal saprófita situada en el intestino delgado distal y colon está formada en su mayor parte por microorganismos anaerobios (*Bacteroides*, *Clostridios*, *Peptoestreptococcus*, *Peptococcus*, etc.). La supresión de esta flora anaerobia mediante la administración de metronidazol parenteral, se asocia con una mayor incidencia de translocación^(384, 387-388). Se ha comprobado que la TB es un proceso casi exclusivo de las bacterias aerobias Gram -⁽³⁸⁹⁾, aunque en un modelo de TB por Zymosan la translocación es casi exclusiva de bacterias aerobias Gram +⁽¹²⁰⁾. Todo esto sugiere que existe un mecanismo competitivo de la flora intestinal por el cual las bacterias anaerobias juegan un papel protector evitando el desarrollo de patogenicidad por parte de las bacterias aerobias e impidiendo la colonización de especies patógenas nuevas no anaerobias a nivel intestinal^(46, 120, 343, 386, 387).

Para Wells y cols.⁽³⁸⁸⁾, el factor que parece tener mayor relevancia en el proceso de TB es la especie microbiana de que se trate ya que se observan diferencias en el grado de TB si se tiene en cuenta este aspecto.

2.4.2.- Aspectos cuantitativos de la flora intestinal

El sobrecrecimiento bacteriano es el aspecto cuantitativo más importante a la hora de estudiar la TB. Situaciones que lo favorecen se consideran promotoras de la translocación. Muchas de ellas serán sinérgicas, sobre todo en el paciente crítico. Así, la nutrición parenteral total o nutriciones inadecuadas, son capaces de desarrollar sobrecrecimiento bacteriano, promoviendo el desarrollo de TB en mayor grado que la

atrofia de la mucosa que pueden producir^(10, 18). Se ha observado que la administración de sulfato de morfina parenteral aumenta también la incidencia de TB en animales sometidos a nutrición parenteral total. El efecto de la morfina se debe, posiblemente, a la alteración de la motilidad intestinal y a que favorece un sobrecrecimiento bacteriano⁽²⁰³⁾. La utilización de ambos productos es muy habitual en las unidades de cuidados intensivos, con las implicaciones clínicas que esto conlleva.

Otro factor a tener en cuenta, es la ausencia de administración de fibra en las nutriciones parenterales, lo que lleva al desarrollo de un sobrecrecimiento bacteriano⁽³⁴⁴⁾.

En el paciente crítico la motilidad intestinal en muchas ocasiones se encuentra alterada. El estancamiento del contenido intestinal, favorece la adhesión de las bacterias a la pared intestinal, sobrecrecimiento y por tanto TB. Se debe tener en cuenta, por tanto, aquellas causas que pueden dar lugar a pseudoobstrucción o a íleo paralítico. Se ha comprobado que una obstrucción del colon o del intestino delgado, en el humano, se asocia con TB y que el germen más frecuentemente hallado es el *E. coli*^(86, 207).

Se ha podido observar que la ausencia de bilis, que ayuda a mantener la relativa esterilidad del tracto gastrointestinal superior, en el intestino, promueve el desarrollo de TB^(54, 342). Esto es debido, probablemente, al cese del efecto bacteriostático de la bilis o bien a una posible agresión a la mucosa por esta situación. También el fallo hepático agudo provocado por hepatectomía del 90%, induce sobrecrecimiento bacteriano que coincide con el inicio de TB⁽³⁸²⁾.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se evidencia que la etiopatogenia de la TB es muy compleja ya que pueden existir varios tipos de situaciones: unas son desencadenantes por sí mismas (quemaduras extensas, traumatismos severos), mientras que otras se comportan como potenciadoras o favorecedoras ante la presencia de las primeras. De este modo la TB clínicamente podría pasar desapercibida y terminar en una resolución natural, o bien ser el inicio de un cuadro agresivo que contribuya al desarrollo de fracaso multiorgánico y la muerte del paciente. Su manifestación va a depender del equilibrio entre agresión dosis-dependiente y resistencia del huésped.

2.5.- Mecanismos de Translocación Bacteriana

Los mecanismos de translocación no están claramente definidos, pero parece que existen una serie de fases en el desarrollo de la misma.

En una primera fase se produce la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal siendo esto necesario para el posterior desarrollo de la TB⁽⁶⁾. En condiciones normales esta adhesión no sucede debido a la existencia de una serie de mecanismos como son, secreción de IgA (mecanismo específico) y moco, descamación, etc. (mecanismos inespecíficos).

En una segunda fase, se produce el paso de bacterias a través del epitelio-pared intestinal sin que existan, en el fenómeno de TB, alteraciones estructurales de la misma, aunque sí puede haber un aumento de la permeabilidad que se ha asociado a diversas alteraciones como la activación de enzimas tisulares, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y sustancias vasoactivas que surgen en la respuesta al estrés tras una agresión^(182, 184).

La tercera fase corresponde al mecanismo íntimo de fuga bacteriana, el cual todavía hoy en día no está aclarado. La hipótesis más aceptada es el transporte de las bacterias por medio de los macrófagos, los cuales las ingieren y las transportan en su interior desde la luz digestiva hacia lugares extraintestinales. Esta teoría se basa en el hecho de que cuando se emplean macrófagos defectuosos disminuye dicha translocación⁽³⁹⁰⁾ así como el hecho de que los porcentajes de TB se alteran al utilizar agentes que modulan la respuesta inmune incluida la fagocitosis⁽³⁸⁹⁾.

La cuarta fase o fase de propagación, se caracteriza porque las bacterias han salido del sector intestinal y se propagan por vías variadas relacionándose con la magnitud de la agresión.

Mainous y cols.⁽²³⁶⁾ en un modelo experimental de TB inducido por Zymosan comprobaron que su administración, a una dosis de 0,1 mg/g, inducía translocación exclusivamente en ganglios linfáticos y que a una dosis mayor, ésta era sistémica por vía portal.

Estudios recientes dan gran importancia a la vía linfática ya que en un trabajo por quemaduras, la linfadenectomía mesentérica daba lugar a la ausencia de TB en los tejidos estudiados (bazo, hígado, riñón) y sólo la mostraba en el líquido peritoneal⁽³⁶⁷⁾.

Debemos tener en cuenta, que el Zymosan inyectado intraperitonealmente da lugar a una inflamación aséptica, inespecífica y sistémica⁽⁸³⁾; comportándose de manera similar a la endotoxina administrada intraperitonealmente, estimula los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y el sistema del complemento.

Inicialmente, la administración de Zymosan va a dar lugar a una primera respuesta inflamatoria, origen del fenómeno de TB; este fenómeno, secundariamente y debido al paso de bacterias a los ganglios linfáticos y a los órganos sistémicos, va a dar lugar a un proceso infeccioso que a su vez va a mantener e incrementar la respuesta inflamatoria.

3.- CELECOXIB

Celecoxib es un pirazol diaril sustituido, químicamente similar a otras sulfonamidas no arilaminas (ej: tiazidas, furosemida) pero que difiere de las sulfonamidas arilaminas (ej: sulfametoxizol y otros antibióticos sulfonamidas).

El dolor asociado a la inflamación es uno de los problemas más frecuentes en la práctica médica. Su naturaleza va desde el dolor autolimitado (por ejemplo el posterior a una extracción dentaria) al constante, tormentoso y extenuante de una degeneración crónica del cartilago articular, como ocurre en la artrosis. En estos casos la analgesia ha sido el objetivo principal de la medicina desde el principio de los tiempos, como lo demuestra el uso de salicilatos que se remonta a la prehistoria.

Las bases del conocimiento bioquímico del tratamiento del dolor inflamatorio se sentaron en 1971, cuando se postuló que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) actúan por inhibición de la síntesis de prostaglandinas. En 1976 se encontró la enzima clave de la vía de formación de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico y se la denominó ciclooxigenasa. Sin embargo, pronto se demostró que la misma enzima no solo cataliza la ciclooxigenación real, que es la etapa limitante de la conversión de la prostaglandina G₂, sino también la reacción de la peroxidasa que se produce inmediatamente después y convierte la PG₂ en PGH₂, precursoras de las prostaglandinas inflamatorias, así como también de la prostaciclina y el tromboxano A₂ (TXA₂).

Durante mucho tiempo se sostuvo que la ciclooxigenasa era una especie molecular simple que se manifestaba en casi todas las células. En 1991, varios laboratorios encontraron pruebas de una forma variante de la enzima, y en 1992 las técnicas de clonación molecular demostraron que, en realidad la enzima existente en dos formas, COX-1 y COX-2, eran expresadas por dos genes distintos con diferente regulación. Mientras la COX-1 se expresa predominantemente de modo constitucional, garantizando una actividad basal de la vía del ácido araquidónico (y de ahí la síntesis de TXA₂ y prostaciclina en la cantidad necesaria para mantener la función plaquetaria y la hemostasis), la expresión de la COX-2 es inducible por la mayor parte de las señales proinflamatorias. Aunque son muy similares en cuanto estructura, las dos isoformas están distribuidas de forma diferente en el organismo, y con suficiente desigualdad para permitir el desarrollo de inhibidores específicos de la COX-2, que prácticamente no interfieren con

la COX-1, la isoforma que se considera encargada de la síntesis de las prostaglandinas que protegen la mucosa gástrica y aseguran la función plaquetaria (1).

3.1.- MECANISMO DE ACCIÓN:

Los inhibidores selectivos de la COX-2 producen menos efectos secundarios graves como úlceras gastrointestinales, hemorragias y daño renal, que los que se asocian al uso crónico de AINE tradicionales, por ejemplo ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco. Estos últimos, no son selectivos respecto a las formas de la COX y a largo plazo producen úlceras (a menudo con hemorragias y perforaciones) en aproximadamente el 25 % de los usuarios crónicos, mientras que el meloxicam y la nimesulida tienen cierta especificidad para la COX-2 (2) y en este aspecto podrían ser mejores porque aprovecharían más la diferente distribución tisular de las enzimas ciclooxigenasas. Una reciente comparación entre más de 40 AINES, ha demostrado que la selectividad por la COX-2 en sangre humana o en cultivos de células humanas, guarda relación inversa con el riesgo de complicaciones gastrointestinales graves (3). Considerado junto al hecho de que los AINES convencionales se encuentran entre los fármacos que más se prescriben en el mundo, a pesar de su confirmada relación con las lesiones gastrointestinales, es evidente que el desarrollo de verdaderos inhibidores de la COX-2, con buenas propiedades farmacológicas, es un objetivo muy importante para la terapéutica clínica.

SC-236 era un inhibidor potente y selectivo de la COX-2, pero con una vida inaceptablemente larga. A partir de este compuesto inicial, reemplazando un sustituyente de cloro con metilo, Searle creó el celecoxib, que se iba a convertir en el primer fármaco inhibidor de la COX-2 de que se dispuso ampliamente (4).

3.1.1.- FARMACOLOGIA GENERAL Y COMPARADA

La determinación de los datos de inhibición in vitro para las ciclooxigenasas dependen mucho de la fuente de enzimas humanas (preparadas de sangre o expresadas en células CHO transfectadas), de las condiciones experimentales y de los sistemas de ensayo que se adopten. Esto está ilustrado por el hecho de que los investigadores de Searle registran valores de CL50 con celecoxib de 28-42 mM para la COX-2 frente a 10-15mM para la COX-1 (4), mientras que en el grupo de Merck, que ha desarrollado y caracterizado el segundo inhibidor de la COX-2 en el mercado, el rofecoxib, ha comunicado incluso con mayor consistencia, valores de CL50 de 1mM para la COX-2,

frente a 6,3 mM para la COX-2 con celecoxib. Aun así es evidente que el celecoxib es un potente inhibidor de las ciclooxigenasas humanas con clara preferencia por la COX-2 sobre la COX-1. Mientras el celecoxib presenta una débil inhibición competitiva de la COX-1, su efecto sobre la COX-2 es bimodal, con una débil inhibición competitiva “tipo ibuprofeno”, desplazada por una fuerte inactivación dependiente del tiempo, parecida a la observada por la indometacina.

Se considera que la selectividad por la COX-2 es una de las principales razones del bajo riesgo de daños gastrointestinales que presenta el tratamiento con celecoxib. En ratas el celecoxib no causo lesiones necroticas en la mucosa gastrointestinal sana, aunque si agravo lesiones previas causadas por indometacina, ácido acético o cisteamina. El celecoxib es eficaz en numerosos modelos animales estandar de inflamacion y dolor. Posee una fuerte actividad antiinflamatoria y de la inhibicion de la sintesis de la PGE2 en el modelo de inflamación de la pata de rata inducido por carragenina y reduce la inflamación crónica en el modelo de artritis adyuvante en la rata. Estos valores son parecidos a los encontrados con los AINES convencionales (4).

Las ciclooxigenasas intervienen en la curacion de heridas en diversos tejidos de todo el organismo. En un modelo de lesión cutánea crónica en rata, el celecoxib no tuvo efecto en los niveles de PGE2 del fluido de la herida ni en la curación, mientras que el naproxeno administrado a la misma dosis, redujo considerablemente el depósito de colágeno, que interfiere el proceso de curación (5).

Sin embargo, no todos los estudios con animales sobre la seguridad farmacológica han resultado favorables. Un informe reciente comunica que el celecoxib influye significativamente en la función vascular y renal en las ratas, con elevación de la presión arterial y adherencia leucocitaria, así como ganancia de peso, posiblemente como consecuencia de de la insuficiente excreción de sodio (6).

Un amplio estudio en ratas comparando los efectos secundarios gastrointestinales del celecoxib y el rofecoxib con los de la indometacina ha demostrado que mientras los inhibidores selectivos de la COX-2 no producían lesiones en la mucosa gastrointestinal intacta, sí empeoraban las úlceras ya existentes inducidas por sustancias químicas (en particular las inducidas por la indometacina) o por estrés (7).

Por último, la COX-2 podría ser casi tan importante como la COX-1 para garantizar la permeabilidad del conducto arterioso que provee de sangre al feto por el cordón umbilical. En fetos de cordero, el celecoxib incrementó la resistencia al flujo de la sangre en el conducto (aunque no con la misma intensidad que la indometacina) y disminuyó la concentración de PGE2 plasmática fetal (8).

Si bien la utilidad de la reducción de la prostaglandina por inhibición de la COX-2 para el tratamiento del dolor inflamatorio se conoce desde hace tiempo, es mucho menos conocido que el mismo mecanismo abre un camino hacia la quimiopreención del cáncer. La COX-2 es inducible por los oncogenes ras y scr, la interleucina-1, la hipoxia, el benzopireno, la luz ultravioleta, el factor de crecimiento epidérmico, el factor transformador de crecimiento beta y el factor de necrosis tumoral alfa. Muchos tumores, sobre todo los de colon, prostata, vejiga, esófago, estómago y piel, presentan un exceso de COX-2 en relación con su tejido progenitor (9). El hecho de que las prostaglandinas, sintetizadas preferentemente por la acción de la COX-2, sean necesarias para la angiogénesis, podría ser solo parte de la explicación. Hay pruebas evidentes de que tanto los AINES selectivos como los no selectivos, inhiben la angiogénesis por efectos directos en las células endoteliales, y que sólo alguno de estos mecanismos dependen directamente de las prostaglandinas (10). El celecoxib, pero no el AINE piroxicam, que prefiere la COX-1, induce apoptosis en las células humanas de líneas celulares de carcinoma de prostata cultivadas por bloqueo de la fosforilacion de la cinasa antiapoptótica clave, Akt, lo que implica una acción preventiva en una fase temprana de la carcinogénesis. No hay una explicación molecular clara para este mecanismo (11).

La actividad quimiopreventiva se ha convertido, por lo tanto, en un nuevo enfoque para el desarrollo del celecoxib, aparte del tratamiento del dolor. El fármaco ha demostrado ser efectivo frente a los carcinomas de piel inducidos por luz ultravioleta en ratones y también frente a los carcinomas de colon inducidos por azoximetano, el cáncer de mama inducido por dimetilbenzantraceno y el de vejiga urinaria inducido por N-butil-N-nitrosamina en ratas (10).

3.1.2.- EFICACIA CLÍNICA:

1-ARTRITIS REUMATOIDE:

Un amplio estudio multicéntrico, pero de corta duración, realizado en casi 100 centros de America del Norte, con más de 1000 pacientes con artritis reumatoide,

comparó los efectos antiinflamatorios y gástricos del celecoxib y el naproxeno a lo largo de 3 meses. Todas las dosis de celecoxib (100 - 400 mg) redujeron significativamente los signos y síntomas de artritis en las dos primeras semanas, y a las 2, 6 y 12 semanas la dosis de 200 y 400 mg de celecoxib, fueron mejor que el placebo respecto a la capacidad para desarrollar las actividades de la vida diaria. En el Health Assessment Questionnaire, los porcentajes de reducción para 20 ítems en las categorías 2 (ejecución con mucha dificultad) y 3 (incapacidad de ejecución) en la semana 12 fueron 10,9%, 23,8% y 19,9% para la dosis de 100, 200 y 400 mg de celecoxib, respectivamente. Con todas las dosis, la incidencia de úlceras gastroduodenales demostrables por endoscopia no fue estadísticamente diferente a la de placebo, mientras que en los pacientes tratados con un régimen único de naproxeno (500 mg) la incidencia fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que con placebo y con cualquier dosis de celecoxib (12, 13).

Un análisis conjunto del ACR, con tasas de respuesta del 20%, 50% y 70% en estudios controlados con placebo y AINE, sugieren que el celecoxib, además de tener un perfil alto de seguridad y tolerabilidad, ofrece unas tasas de respuesta equivalentes a naproxeno en dosis de 500 mg y marcadamente superiores a placebo, teniendo por ello el potencial de ofrecer mejoras sintomáticas inmediatas en pacientes con artritis reumatoide (14).

2-ARTROSIS:

Se efectuó un estudio en fase III de 12 semanas que comparó tres dosis de celecoxib con una dosis estándar de naproxeno en 1003 pacientes con artrosis de rodilla. Todas las dosis de celecoxib fueron eficaces en comparación con el placebo, aunque el régimen de 50 mg fue el que tuvo menos efecto. La dosis de 100 mg y 200 mg mostraron la misma eficacia (15). Al final del período de tratamiento, los pacientes de los cuatro grupos tenían un estado funcional significativamente mejor que los que recibieron placebo, según el índice de Artrosis de las Universidades de Western Ontario y McMaster. Los pacientes tratados con 100 mg de celecoxib dos veces al día mejoraron significativamente en cuanto a dolor, más que los tratados con placebo y naproxeno. De nuevo, el perfil de efectos secundarios gastrointestinales de la dosis eficaz de celecoxib no fue estadísticamente diferente a la del placebo. En un estudio de artrosis de cadera, prácticamente idéntico en cuanto a tamaño y diseño, se obtuvieron resultados muy parecidos (16).

Un análisis general de tres estudios comparativos aleatorizados, multicéntricos y doble ciego entre celecoxib y naproxeno en pacientes de edad avanzada con artrosis de rodilla, cadera o ambas, con inflamación, demostró la significativa eficacia de ambos tratamientos, si bien el celecoxib tuvo una tolerancia como el placebo, lo cual lo diferencia del AINE de referencia (17).

En el estudio SUCCESS-1 sobre 13.274 pacientes con artrosis, se comparó 200mg y 400 mg/día de celecoxib con 100 mg/día de naproxeno (pacientes de EE.UU y Canadá) y 100 mg al día de diclofenaco (pacientes de otros países). La eficacia de la dosis de celecoxib fue similar a los de los AINE referidos en casi todos los países, pero se observaron diferencias notables en la incidencia de trastornos gastrointestinales, siendo mucho menor la incidencia en los grupos de celecoxib que en los de AINE. El celecoxib también mostró una toxicidad hepática menor que el diclofenaco, e incluso se asocio a una baja incidencia de toxicidad cardiovascular y renal, similar a la causada por los AINE convencionales. Datos de otros estudios confirman que el celecoxib tiene efectos similares a AINE duales inhibidores de la COX en la presión sanguínea sistólica y diastólica (18).

3-ODONTALGIA Y DOLOR POSTOPERATORIO:

La odontalgia es diferente del dolor de las articulaciones, pero puede tener un componente inflamatorio que responda a los AINE; sobre todo después de una extracción un estudio de dolor postoperatorio con 272 pacientes después de la extracción del tercer molar, el rofecoxib fue claramente superior al celecoxib (y prácticamente igual que el ibuprofeno) en cuanto al tiempo de inicio del efecto y duración calmante, y ligeramente superior respecto al alivio del dolor máximo durante 8 horas (19).

La eficacia y tolerabilidad del celecoxib en el tratamiento del dolor agudo postoperatorio se determinó en otros dos estudios multicéntricos aleatorizados, comparativos y aleatorizados con placebos, con un total de 418 pacientes sometidos a Cirugía ortopédica ambulatoria, que recibieron 200 mg de celecoxib, 10 mg de hidrocodona/1000 mg de paracetamol o placebo dentro de las 23 horas siguientes al final de la anestesia. Los dos tratamientos activos fueron favorables en comparación con el placebo en cuanto a las diferencias en la intensidad del dolor, con una ventaja significativa para el celecoxib a las 7-8 horas de la dosis. Por otra parte mas pacientes del grupo de hidrocodona/paracetamol necesitaron medicacion de rescate, mientras que los

pacientes que recibieron celecoxib necesitaron menos dosis de la medicacion de estudio en los días 3 a 5 (209).

Un estudio reciente prospectivo, a doble ciego y controlado con placebo comparó celecoxib a dosis de 200 mg y 400 mg como medicación preoperatorio en pacientes que iban a ser intervenidos de nariz, garganta u oídos. Un total de 93 pacientes se asignaron a los tres grupos de estudio: control (placebo; n = 30), celecoxib 200mg (n = 30) y celecoxib 400mg (n = 33). Los pacientes recibieron el medicamento 30–45 minutos antes de la cirugía y durante el periodo postoperatorio se tuvieron en cuenta: escala de dolor, tiempo y calidad de recuperación, necesidad de medicación de rescate y efectos secundarios. El celecoxib a dosis de 400 mg fue significativamente más efectivo que el celecoxib a dosis de 200 mg (y que el placebo) en la reducción del dolor postoperatorio. Tanto el celecoxib a dosis de 200 como de 400 fueron más eficaces en cuanto a la disminución de los requerimientos de medicación de rescate postoperatoria (fentanilo; $74 + / - 67$ microgr y $56 + / - 62$ microgr versus $120 + / - 86$ microgr respectivamente). La dosis más alta de celecoxib redujo significativamente el dolor severo al alta, así como la dosis media de analgésicos por vía oral necesarios. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto al tiempo de recuperación y las otras variables secundarias (21).

4-OTRAS INDICACIONES:

Se comparó el efecto de un tratamiento de 14 días con 200 mg de celecoxib y 500 mg de naproxeno en 202 pacientes con dolor agudo de espalda. La eficacia de ambos tratamientos fue similar, con descensos medios en la puntuación analógica visual de 47,9 para celecoxib y 42,3 para naproxeno. Sin embargo, los pacientes que sufrieron dolores epigástricos fueron menos en el grupo de celecoxib, lo cual sugiere una mejor tolerancia del fármaco selectivo de la COX-2. En estudios posteriores, la dosis de 400 mg/día de celecoxib mostró una eficacia similar a la de la dosis máxima recomendada de ibuprofeno y naproxeno en pacientes con esguince de tobillo (22).

Se ha publicado el caso de una mujer con aparición repentina de periodos cortos hemicraneal paroxística crónica, que respondió con éxito al celecoxib después de presentar síntomas gástricos (ardor de estómago, náuseas, pérdida de apetito) durante el tratamiento con indometacina. El dolor de cabeza remitió a los tres días de comenzar el tratamiento con 200 mg de celecoxib, y durante los tres meses de tratamiento no se produjo ninguna recurrencia del dolor.

Como se ha comentado antes, la actividad quimiopreventiva se ha convertido en un nuevo enfoque para el desarrollo del celecoxib. Con respecto a este tema se han realizado varias publicaciones.

Un estudio reciente ha investigado la actividad quimiopreventiva de un tratamiento de 6 meses con 400 mg de celecoxib en 77 pacientes con poliposis adenomatosa familiar, una afección hereditaria precancerosa con un riesgo de casi el 100 % de derivar en cancer colorectal. El grupo de celecoxib obtuvo una reducción del 28 % en el número medio de polipos colorectales ($p = 0,003$ para la comparación con placebo) y del 30,7 % en la masa de pólipos (la suma de los diámetros de los pólipos) ($p = 0,001$) comparado con una reducción del 4,5 % y 4,9 % respectivamente en el grupo del placebo (24).

En cuanto a los efectos sobre otro tipo de cánceres, se ha realizado un estudio en fase II en el que se incluían. 29 pacientes con cáncer de pulmón (no de células pequeñas) en estadio IA a IIIA, que fueron tratados en el preoperatorio con dos ciclos de paclitaxel y carboplatino, más dosis diarias de celecoxib seguidos de resección quirúrgica. Se compararon los niveles de PGE2 en los tumores primarios y en los tejidos sanos adyacentes de 17 pacientes con 13 controles que recibieron preoperatoriamente la quimioterapia previamente descrita sin celecoxib. Todos los pacientes completaron la quimioterapia preoperatoria y 26 completaron el tratamiento preoperatorio con celecoxib. La tasa clínica de respuesta fue del 65 % (48 % respuesta parcial y 17 % respuesta completa). En 28 pacientes se realizó resección quirúrgica tumoral. No hubo respuestas patológicas completas, pero en 7 de ellos se observó una enfermedad microscópica mínima residual. Y aunque serán necesarios más estudios para confirmar estos resultados, los datos hasta ahora obtenidos sugieren que el celecoxib podría aumentar la respuesta preoperatoria del paclitaxel y carboplatino en este tipo de tumores. Además dosis de 400mg dos veces al día sería suficiente para normalizar el aumento de los niveles de PGE2 detectados en estos pacientes después del tratamiento quimioterápico (25).

La combinación de celecoxib y zylflo (inhibidor de la 5-lipooxigenasa) podría ser un nuevo concepto para disminuir el crecimiento tumoral en las metástasis hepáticas en pacientes con cáncer de páncreas avanzado. Un grupo alemán ha realizado un estudio en un modelo animal con hamsters en el que se evalúa el impacto del celecoxib y zylflo sobre las metástasis hepáticas de adenocarcinoma de páncreas. Se evaluaron la actividad de las enzimas antioxidativas y las concentraciones de los productos de

peroxidación, tanto en las metástasis hepáticas como en los tejidos hepáticos no metastásicos.

La incidencia (54,5 vs 100 %), número (3,17 + / - 0,98 vs 6,75 + / - 0,71) y el tamaño (2,67 + / - 1,97 vs 11,75 + / - 1,98 mm²) de las metástasis se redujeron con esta terapia combinada. Además la actividad de la GSHPX y SOD (enzimas antioxidativas) se incrementaron, mientras que la peroxidación lipídica disminuyó con la terapia combinada en los tejidos hepáticos no metastásicos (26).

La radiación induce la sobreproducción de citoquinas y el aumento de PGE₂ tanto local como sistémicamente. Un grupo de Philadelphia ha estudiado el efecto del celecoxib después de una dosis de radiación de 50 Gy sobre ratones que previamente se les había inoculado intramuscularmente células tumorales mamarias Mca-35 y se había esperado hasta que el tumor alcanzara un diámetro de 8-9 mm. El celecoxib se administró 2 horas antes, 2 días después y 7 días después de una dosis de radiación. Los animales tratados con celecoxib tenían menos inflamación en la dermis en comparación con los controles tratados con suero salino. En un 23,8 % de los ratones tratados con 50 Gy ocurría una dermatitis severa, pero sólo en un 17,6 %, 5,3 % y 11,1 % de los grupos de los ratones de dos horas antes, dos días después y 7 días después respectivamente tuvieron dermatitis severa en el día 20. El celecoxib también disminuyó significativamente la expresión de receptores de mRNA en los tejidos cutáneos irradiados pero no en los tejidos tumorales. Además el celecoxib también disminuye la infiltración de monocitos y neutrófilos en los tumores localmente irradiados y los tejidos adyacentes normales (27).

Un estudio muy reciente valoró también la eficacia del tratamiento durante seis semanas con celecoxib (100 mg) o ketoprofeno (100 mg) en 246 pacientes con espondilitis anquilosante. El dolor y el deterioro funcional se redujeron significativamente con ambos tratamientos en comparación con el placebo, con una tendencia a favor del celecoxib al comparar las dos formas de tratamiento activo. La incidencia del dolor epigástrico fue similar en los tres grupos (28).

3.2.- SEGURIDAD:

Los estudios iniciales en humanos demostraron que la biosíntesis de TxA₂ dependiente de la COX-1 en las plaquetas y la agregación plaquetaria no se inhiben por dosis en bolo de celecoxib de hasta 800mg, y que éste y el ibuprofeno alcanzan valores

comparables de inhibición de la COX-2 después de una sola dosis de 800 mg de cada fármaco (29). Esto se corroboró en un estudio a doble ciego comparando una dosis supraterapéutica de celecoxib (600 mg) con una dosis estándar de naproxeno (500 mg) (30). Al contrario que el naproxeno, el celecoxib no produjo reducciones estadísticamente significativas en la agregación plaquetaria ni en la cantidad de TxB2 en suero, ni aumentos en el tiempo de sangrado. Dos estudios adicionales de fase II de determinación de la dosis en la artritis reumatoide y la artrosis, que duraron cuatro y dos semanas, respectivamente, indicaron una eficacia comparable a la de los AINE estándar, sin problemas de tolerancia ni seguridad.

En un estudio posterior, doble ciego y multicéntrico sobre 537 pacientes con artrosis o artritis reumatoide, tras 12 semanas de tratamiento con 200 mg de celecoxib o 500 mg de naproxeno, las tasas de úlcera fueron del 9 % y del 41 % respectivamente. En el grupo del celecoxib las úlceras gastroduodenales se asociaron mayoritariamente a infecciones causadas por *Helicobacter pylori*, el uso concurrente de aspirina e historial de úlceras (31).

La cuestión más importante con el uso de los AINE es el riesgo de úlceras gastrointestinales, incluyendo hemorragia, perforación y obstrucción del vaciado gástrico. Este riesgo es mucho menor con celecoxib que con los AINE clásicos. El primer estudio en artritis reumatoide comparó 200 mg de celecoxib con 75 mg de una formulación de liberación sostenida de diclofenaco durante seis meses, con endoscopia en 430 de los 655 pacientes inicialmente incluidos; las primeras investigaciones clínicas habían indicado que esta técnica podía detectar lesiones ulcerosas inducidas por AINE después de una semana de tratamiento. Aunque ambos fármacos fueron iguales en cuanto a la reducción de los signos y síntomas de la artritis, las úlceras gastroduodenales fueron cuatro veces más comunes en los pacientes tratados con diclofenaco que en los que recibieron celecoxib. Además la tasa de abandonos del estudio por episodios gastrointestinales fue casi tres veces superior en el grupo del diclofenaco de liberación sostenida (32).

Recientemente, un grupo de Shanghai ha publicado un estudio realizado en ratas en el que tras inducir daño gástrico con etanol al 100 %, se administraba separadamente celecoxib e indometacina. Se midieron las concentraciones de 6-keto-PGF1alfa y TXB2, y se valoraron los cambios morfológicos de la mucosa gástrica por microscopio de luz polarizada y electrónico. La indometacina produjo un daño en la mucosa gástrica muy importante (13,38 +/- 2,06) y reducciones significativas de los niveles de 6-keto-PGF1alfa.

Celecoxib no produjo lesiones en la mucosa gástrica sana pero las lesiones gástricas que previamente se habían inducido con el etanol tras la administración de celecoxib empeoraron (33).

La aparición de esofagitis es excepcional aunque se ha publicado el caso de un hombre de 87 años que tras tomar celecoxib durante 5 meses por neuralgia del trigémino, comenzó con disfagia y odinofagia. Se realizó una endoscopia donde se observó una esofagitis descamativa severa. Se suspendió celecoxib y se inició tratamiento con omeprazol. Tres meses después se realizó un control endoscópico donde se pudo observar la total cicatrización de la mucosa esofágica (34).

La artritis, al igual que la hipertensión, es una afección común entre los ancianos. Esto hace que la comorbilidad sea bastante habitual en la población general, y como tal, el tratamiento de la artritis no debe interferir con el control farmacológico de la presión arterial. Esto fue valorado en 810 pacientes hipertensos que recibieron tratamiento con celecoxib o rofecoxib además de tratamiento contra la hipertensión. Durante las seis semanas de tratamiento, la presión arterial aumentó significativamente en más pacientes del grupo de rofecoxib que del celecoxib. Los cambios medios de la presión arterial sistólica a las seis semanas eran de + 2,6 mmHg para rofecoxib y - 0,5 mmHg para celecoxib, una diferencia estadísticamente significativa (35). Sin embargo en un estudio recientemente publicado, donde se comparaban las cifras de tensión arterial ambulatoriamente en dos grupos de pacientes tratados con celecoxib y AINES tradicionales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (36).

En un 5-10 % de los pacientes con asma, la aspirina y la mayoría de los AINE clásicos inducen ataques agudos. El celecoxib parece ser bastante seguro en este tipo de pacientes y así lo demuestra un estudio publicado en el que se estudiaron 33 pacientes, los cuales padecían asma inducida al menos por dos tipos diferentes de AINE. A todos ellos se les administró dosis de celecoxib en tres días diferentes, hasta alcanzar dosis terapéuticas de 200 mg con buena tolerancia (37, 38).

La tolerancia de celecoxib es similar a la de placebo; sin embargo, se han realizado algunas publicaciones que describen los efectos secundarios cutáneos más frecuentes (39). En un estudio retrospectivo con seis pacientes, el comienzo de la reacción cutánea fue de 10,2 días en aquellos que tomaban la medicación por primera vez y de 48 horas en un paciente que la tomaba por segunda vez. Los efectos secundarios cutáneos no fueron muy severos, con una erupción máculo papulosa y

edema en la cara. Dos pacientes tuvieron fiebre y otros tuvieron afectación de la mucosa bucal. Uno de ellos presentó lesiones ampollosas mínimas. En pacientes con historia de alergia a sulfamidas, se contraindica el uso de celecoxib. Sin embargo, el celecoxib no tiene la amina aromática de las sulfamidas y no está demostrado que haya una reacción cruzada entre estas dos familias. Esta amina se suele asociar con reacciones medicamentosas severas, lo que podría explicar que los casos severos asociados a celecoxib sean muy raros (40).

3.3.- CONCLUSIONES:

El celecoxib fue el primer fármaco antirreumático no esteroideo con especificidad por la COX-2 disponible en el mercado. Todos los datos preclínicos y clínicos indican que es el primer representante de una clase nueva de AINE, que se asocia con una menor incidencia de úlceras clínicamente sintomáticas y otras complicaciones gastrointestinales en comparación con los inhibidores de la ciclooxigenasa no selectivos convencionales, a la vez que mantiene sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Sin embargo, por las características inherentes a la naturaleza, distribución y función del sistema COX-1/COX-2 en el organismo humano, los inhibidores selectivos de la COX-2, que no interfieren con la COX-1, no escapan por completo del perfil de los efectos secundarios de los AINE; lo cual significa que estos fármacos también pueden, aunque en menor grado, precipitar episodios gastrointestinales que pongan la vida en peligro, así como producir deterioro renal. No se debe utilizar durante el embarazo.

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- HIPÓTESIS

El tratamiento con Celecoxib[®] en un modelo experimental de síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica, con traslocación bacteriana y fallo multiorgánico, inducida por Zymosan A, regulará la respuesta inflamatoria disminuyendo la misma y el fallo multiorgánico consecuente.

2.- OBJETIVOS

1. Objetivar la respuesta inflamatoria, la traslocación bacteriana y el fallo multiorgánico en el modelo experimental planteado.
2. Valorar las alteraciones en los mediadores bioquímicos de la respuesta inflamatoria.
3. Estudiar la interacción leucocito-endotelio y sus consecuencias.
4. Estudiar el grado de lesión renal.
5. Demostrar la efectividad del tratamiento propuesto.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1.- Generalidades

1.1.1.- Instalaciones

Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, que cumple la legislación vigente para la cría, mantenimiento y control de los animales de experimentación.

Laboratorios de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, dotados de toda la infraestructura necesaria para la realización del modelo experimental y todos los estudios excepto los reseñados en los apartados siguientes.

Laboratorios de Bioquímica del Hospital Universitario de Salamanca, donde se realizaron las determinaciones de función renal.

Laboratorios de Microbiología del Hospital Universitario de Salamanca, donde se realizaron los cultivos microbiológicos y su valoración cuali-cuantitativa para el estudio de la translocación bacteriana.

1.1.2.- Animal de experimentación

Ratas machos cepa Wistar de un peso comprendido entre 250-275 g., suministradas por el SEA.

2.- MÉTODOS

2.1.- Generalidades

El planteamiento del trabajo se realizó siguiendo un estudio ciego, es decir, tanto en el momento de la administración de los diferentes fármacos, como en la determinación y valoración estadística de los resultados, el personal que realizó dichas tareas no sabía qué producto estaba administrando, a qué grupo pertenecía la muestra que se encontraba estudiando, o la identidad de los grupos que analizaba estadísticamente.

Se realizaron búsquedas bibliográficas en diferentes Bases de Datos (MEDLINE®, MLA Bibliography®, PsycLIT Journal Articles®, CC Search (R) All 7 CC Editions®, U.S. National Library of Medicine®) en el periodo comprendido entre 2000 y 2008, utilizando algunas referencias más antiguas.

Tanto el material como los métodos experimentales empleados con animales de laboratorio que se detallan a continuación, se han regido siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

a) Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE relativa a la protección de los animales de laboratorio utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N° L 358/1-358/6 del 18 de Diciembre de 1986.

b) Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE nº 67, pp 8509-8512 del 18 de Marzo de 1988.

c) Disposición general nº 25805. Instrumento de ratificación del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de Marzo de 1986. BOE 256 pp 31349-

31362, del 25 de Octubre de 1990. Esta ratificación entró en vigor en España el 1 de Enero de 1991.

2.1.1.- Estudios preliminares

Nuestro primer objetivo era desarrollar un modelo experimental de fallo multiorgánico inducido por respuesta inflamatoria y translocación bacteriana. Teniendo en cuenta la experiencia de nuestro grupo de trabajo en modelos de TB inducida por Zymosan A (Zy)^(73, 120, 123, 239, 288), buscamos una dosis de Zy que provocará una mortalidad entre el 80 y 90%. La dosis de Zy en este modelo se estableció en 600 mg/kg.

En segundo lugar debíamos valorar la dosis adecuada del tratamiento a emplear y teniendo en cuenta la experiencia previa de nuestro grupo de investigación y las recomendaciones de los laboratorios decidimos utilizar el doble de la dosis clínica terapéutica de dicho fármaco: Celecoxib[®] 800 mg/kg.

Finalmente debíamos plantear el momento más apropiado de administración del tratamiento, para ello, teniendo en cuenta la evolución de la respuesta inflamatoria en modelos de TB inducida por Zy^(60, 90, 124), administramos a los animales de experimentación 600 mg/kg de Zy y el fármaco a diferentes tiempos; después de valorar la supervivencia de los animales estudiados, se decidió aplicar el tratamiento a los siguientes tiempos: Celecoxib[®] 6 horas antes de la administración del Zy.

2.1.2.- Diseño experimental

- Animales de experimentación:

Se han utilizado 50 ratas machos de la cepa Wistar de un peso comprendido entre 250-275 gr. (20 animales para los estudios previos y 30 para el desarrollo del proyecto) que se distribuyeron en los diferentes grupos experimentales:

Grupo 1 BASAL.- Se anestesiaron los animales con cloruro de ketamina + diazepam + atropina intraperitoneal y se realizó una laparotomía media procediéndose a

la toma de muestras de ciego, intestino delgado, ganglios mesentéricos, riñón y sangre (N=5).

Grupo 2 SIMULADO.- Se inyectaron intraperitonealmente 2 ml de aceite mineral (vehículo del Zymosan A) y a las 12 horas se anestesiaron con cloruro de ketamina + diazepam + atropina intraperitoneal y se realizó una laparotomía media procediéndose a la toma de muestras de ganglios mesentéricos, riñón y sangre (N=5).

Grupo 3 CONTROL.- Se inyectaron intraperitonealmente 0,6 g/Kg de Zymosan A suspendido en 2 ml de aceite mineral y a las 12 horas (momento de máxima respuesta inflamatoria, según estudios previos) y a las 24 horas (situación de fallo multiorgánico establecida, según estudios previos) se anestesiaron con cloruro de ketamina + diazepam + atropina intraperitoneal y se realizó una laparotomía media procediéndose a la toma de muestras de ganglios mesentéricos, riñón y sangre (N=5 por tiempo).

Grupo 4 CELECOXIB®.- Se administró oralmente (a través de sonda) el inhibidor de la COX2 (800 mg/kg) y a las 6 horas se inyectaron intraperitonealmente 0,6 g/Kg de Zymosan A suspendido en 2 ml de aceite mineral y a las 12 y 24 horas se anestesiaron con cloruro de ketamina + diazepam + atropina intraperitoneal y se realizó una laparotomía media procediéndose a la toma de muestras de ganglios mesentéricos, riñón y sangre (N=5 por tiempo).

Diez horas antes del estudio las ratas fueron sometidas a dieta absoluta, manteniéndolas solamente con agua ad libitum.

2.1.3.- Técnica quirúrgica

La técnica quirúrgica se realizó en condiciones de asepsia. Una vez anestesiado utilizando cloruro de ketamina (75mg/kg) + diazepam (50 mg/kg) + atropina (20 mg/kg) y rasurado el animal, se procedió a la preparación del campo quirúrgico mediante la aplicación de una solución de povidona yodada (Betadine®, Asta Médica) y a su colocación y fijación sobre paños estériles.

Se realizó una laparotomía xifo-pubiana y se procedió a la extracción de las muestras siguiendo un orden determinado: ganglios mesentéricos, sangre, mediante

punción de la aorta abdominal, y riñones. Ganglios mesentéricos y parte de un riñón se recogieron en frascos estériles de boca ancha así como 1 cc de sangre que se recogió en tubos de sistema aislador de hemocultivos (AISBAT) después de haber desinfectado el capuchón de goma con alcohol, enviando, de forma inmediata, estas muestras al Servicio de Microbiología. El resto de las muestras (sangre y riñón) fueron procesadas para realizar los estudios de las variables posteriormente descritas. Terminada esta fase el animal fue sacrificado.

2.1.4.- Variables a Estudiar

- a) Supervivencia.
- b) Translocación bacteriana.
- c) Estudio microbiológico de la TB.
- d) Pruebas de Función Renal.
- e) Infiltración Neutrófila por la Mieloperoxidasa.
- f) Radicales Libres del Oxígeno: las enzimas detoxificantes Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutathion peroxidasa y el radical libre Anión superóxido.
- g) Citocinas: Factor de necrosis tumoral α , Interleucina 1 β , Interleucina 6, Interleucina 10 e Interferón- γ .
- h) Determinación de la producción de óxido nítrico: nitritos-nitratos y actividad de la sintasa inducible del óxido nítrico.
- i) Estudios de Western blot de moléculas de adhesión celular: ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 y P-selectina.
- j) Estudios de la activación del factor transcripcional κ B.

a) Supervivencia:

Una vez realizado el diseño experimental según el estudio planteado, las ratas (N=5 por grupo, animales de los estudios preliminares) fueron estabuladas durante 7 días manteniendo observación diaria.

b) Estudio de la traslocación bacteriana:

El Servicio de Microbiología realizó siembras para bacterias aerobias y anaerobias, tanto grampositivas como gramnegativas. Después se practicaron las oportunas identificaciones específicas.

Se obtuvieron muestras de sangre en un sistema de lisis-centrifugación (DuPont isolator) y ganglios linfáticos mesentéricos, y riñón fueron fragmentados con un homogeneizador de tejidos, inoculando porciones iguales de las muestras en los medios de cultivo.

Se usaron los siguientes medios de cultivo: agar Columbia sangre; agar Chocolate enriquecido con Isovitalex; agar Enterococcus enriquecido con 10% de sales biliares; agar Manitol sal; agar MacConkey Campyloset cefoperazona, vancomicina y anfotericina; medio HPA; agar sangre Wilkins-Chalgren con vancomicina y ácido nalidíxico; agar clara de huevo y agar Sabourand cloramfenicol gentamicina. Las placas de agar aeróbico fueron incubadas durante 24-48 horas a 37°C y las placas de agar anaeróbico durante 72 horas a 37°C en recipientes anaeróbicos bajo las condiciones producidas por el sistema anaeróbico GasPak Plus (BBL Microbiology Systems, Becton-Dickinson and Co. Cockeysville, MD, USA).

Identificación de bacterias: Las bacterias fueron identificadas mediante técnicas estándar con aerobios y Gram-positivos facultativos y las bacterias Gram-negativas y anaerobias fueron identificadas primariamente por el API Staph (*Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp), API 20 STREP (*Streptococcus*, *Enterococcus* spp), API CORYNE (Gram-positive bacilli), API 32 GN (*Enterobacteriaceae*, nonfermentative Gram-negative bacilli), API 20 A, RAPID ID 32 A (anaerobios) y API 20 C AUX (yeast) (bioMérieux, France).

Los cultivos fueron hechos en ganglios linfáticos mesentéricos para valorar la afectación local, y en riñón y sangre para estudiar la agresión sistémica (N=6 por grupo). En estudios previos se había establecido la flora bacteriana normal del animal de experimentación utilizado sometido a una dieta estándar y a las condiciones de estabulación del SEA.

c) Pruebas de función renal:

Se determinaron como marcadores de la función renal las concentraciones de los iones sodio, potasio y cloro y de urea y creatinina evaluándose también el aclaramiento de esta última. Se obtuvieron muestras sanguíneas (N=5 por grupo) para realizar las determinaciones anteriormente descritas en un analizador automático Hitachi 747-200 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN).

Para la realización del aclaramiento de creatinina (N=5 por grupo, animales de los estudios preliminares), previo corte de la cola de la rata, se tomaban 5 capilares de sangre y junto con la orina de 24 horas. En el aclaramiento de creatinina (flujo urinario \times $(\text{creatinina})_{\text{orina}} / (\text{creatinina})_{\text{plasma}}$) para su determinación en plasma y orina se empleó un método colorimétrico basado en la reacción de Jaffé. La creatinina forma derivados rojizos en presencia de soluciones picrato-alcálinas, cuya absorbancia tiene un máximo a una longitud de onda de 510 nm.

Se mezclaron 100 μl de picrato sódico (35 mg/ml), 100 μl de hidróxido sódico (12 mg/ml) y 100 μl de plasma u orina diluida en agua destilada (1:30). Se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se completó el volumen de la reacción con 700 μ de H_2O destilada, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm. Cuando la muestra era plasma, tras esta primera lectura se añadió un agente ácido (ácido succínico 36 mg/ml, ácido cítrico 150 mg/ml y ácido clorhídrico 60 ml/l), se incubó durante 10 minutos y se realizó una segunda lectura. Esta segunda determinación se realiza porque en el plasma hay otros constituyentes que se acomplejan con el picrato; el complejo creatinina-picrato desaparece a pH ácido, mientras que los otros constituyentes del suero retienen su color derivado del complejo X-picrato. El incremento de absorbancia es proporcional a la concentración de creatinina en plasma. La concentración de creatinina se obtuvo por extrapolación en una recta patrón obtenida con estándar de creatinina.

d) Actividad de la enzima mieloperoxidasa:

La presencia de mieloperoxidasa, una enzima específica de los neutrófilos utilizada como índice para valorar la acumulación neutrofílica en el riñón, fue analizada en el tejido renal (N=5 por grupo) mediante el método de Bradley modificado por Mullane⁽²⁶⁰⁾. Una vez obtenidas las muestras son pesadas entre hielo y congeladas en nitrógeno líquido siendo posteriormente almacenadas a -80°C en un congelador (REVCO ULT-1386-V-O-C) hasta su posterior determinación. Posteriormente las muestras son homogeneizadas en una solución compuesta por un tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,5% de hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma Chemical) y 0,146% de EDTA (Sigma Chemical) a un pH de 6,0 y en la proporción de un gramo de tejido por 10 ml de solución de homogeneizado. A continuación son homogeneizadas y sometidas a un proceso de sonicación entre hielo 10 veces y cinco segundos cada vez, para de esta forma romper las células, entre ellas los neutrófilos y dejar la mieloperoxidasa libre en la

solución. Este homogeneizado es centrifugado durante 30 minutos a 15.000 g manteniendo la temperatura en el interior de la centrífuga entre 3 y 4° C. El sobrenadante fue decantado e incubado durante 2 horas a 50° C para eliminar otro tipo de peroxidases y otros compuestos que interfiriesen en la determinación de la mieloperoxidasa. Se prepara el tampón para el ensayo compuesto por tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,167 mg/ml de O-dianisidine dihydrochloride (Sigma Chemical Co, St. Louis) y 0,005% de peróxido de hidrógeno (Sigma Chemical, St. Louis) a un pH de 6,0. Contra un blanco con el tampón de ensayo se realizaron las curvas estándares con cantidades conocidas de mieloperoxidasa en un espectrofotómetro de doble haz (HITACHI-U-2000) a 460 nm de longitud de onda (λ) y a 25° C. Se define la unidad (U) de actividad de la mieloperoxidasa a la cantidad de enzima que degrada 1 μ mol de H₂O₂ / minuto a 25° C.

e) Radicales libres del oxígeno:

Procesamiento de las muestras: Una vez extraído los riñones (N=5 por grupo) son introducidos, para su lavado, en el tampón de homogeneizado [fosfato potásico monobásico 0,05M y EDTA 1mM, solución a la que añadimos colato sódico al 0,25% (1+19); pH 7,8], a una temperatura entre 0 y 4° C para minimizar los procesos oxidativos. Posteriormente son pesados en una balanza (AND-ER-120A) y se homogeneizan con el tampón anteriormente descrito, según la proporción (1/10, Peso/Volumen), en un potter Elvehjem (BRAUN-Melsungen). El homogeneizado se centrifugó a 100.000 g (36.000 r.p.m.) durante 60 minutos, a una temperatura de 4°C en una ultracentrífuga (SORVAL-OTD-COMBI). La fracción soluble que se obtuvo se dividió en alícuotas en tubos de eppendorf y se congeló a -80° C hasta el momento del procesado de las muestras en un arcón congelador (REVCO ULT-1386-V-O-C). Todas las técnicas descritas a continuación se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz (HITACHI-U-2000 o PHILIPS PU8700), empleando reactivos de la casa PANREAC (para la preparación de los tampones) y SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis, USA (resto de los reactivos). Las cubetas eran de poliestireno, excepto las utilizadas para la técnica de la actividad de la catalasa, que eran de cuarzo.

Actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD). El fundamento de la técnica descrita, por Misra y Fridovich, se basa en la inhibición, por la SOD, de la formación de adrenocromo en la autooxidación de la epinefrina⁽²⁵⁴⁾. La formación de adrenocromo está mediada por radicales superóxido y, como sabemos, la SOD cataliza la dismutación de este radical de acuerdo a la siguiente reacción:

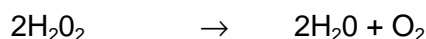


La epinefrina permanece estable en soluciones ácidas, pero espontáneamente se oxida en soluciones básicas, favoreciendo la formación de adrenocromo. Basándose en este fenómeno, la SOD se puede medir espectrofotométricamente siguiendo el cambio de absorbancia de la epinefrina a una λ de 480 nm, en la que se presenta un pico de absorción. Este ensayo requiere los siguientes reactivos:

- 1- Epinefrina 10^{-2} M.
- 2- Tampón: 0,05 M Na H CO₃-Na₂ CO₃; pH 10,2.

Inicialmente se midió la autooxidación máxima de la epinefrina. Para ello se añadieron en la cubeta de muestra (con un paso de luz de 1 cm) 850 μ l del tampón NaHCO₃-Na₂CO₃ y 150 μ l de epinefrina. Paralelamente, en la cubeta de referencia se substituyó la epinefrina por un volumen igual de tampón. Se efectuó la lectura espectrofotométrica a 480 nm de λ y a 30° C. La actividad SOD de las diferentes muestras se realizó añadiendo en las cubetas, además de los reactivos anteriores, 100 μ l de la fracción soluble de las distintas muestras. La lectura permite conocer el porcentaje de inhibición de la autooxidación de la epinefrina. Se define como una Unidad (U) de SOD aquella cantidad de la misma requerida para inhibir la curva de autooxidación de la epinefrina al 50%. Los resultados se expresan en U de SOD por mg de proteínas.

Técnica de determinación de la actividad enzimática de la Catalasa (CAT). El fundamento de la técnica descrita por H. Aebi se basa en la eliminación del peróxido de hidrógeno por la catalasa⁽³⁾ de acuerdo a la siguiente reacción:



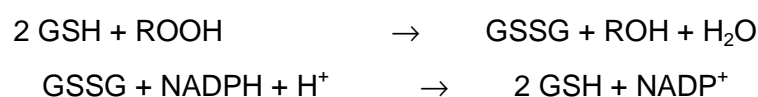
Esta descomposición del H₂O₂ se puede medir, de forma directa, a través del descenso de absorbancia a 240 nm de λ . Este ensayo requiere los reactivos siguientes:

- 1.- Tampón fosfato 50 mM; pH 7.
- 2.- H₂O₂ 30 mM.

En la cubeta de muestra se añadieron 2 ml. de nuestra solución problema (fracción soluble) y 1 ml de H₂O₂. Se leyó durante un tiempo de 30 segundos contra una cubeta de referencia en la que se substituyó el H₂O₂ por 1 ml del tampón fosfato. Las

cubetas eran de cuarzo con un volumen de 3 ml, 1 cm. de paso de luz, la λ de 240 nm y una temperatura de 25° C. No es posible definir la unidad internacional de CAT debido a su cinética anormal. Por este motivo se aceptan diferentes unidades y métodos de evaluación de esta enzima. Nosotros trabajamos con la constante de velocidad de una reacción de primer orden: K. Los resultados se expresaron en K/mg. de proteínas.

Técnica de determinación de la actividad enzimática de la Glutation peroxidasa (GPX). El fundamento de la técnica indirecta de determinación de la actividad de la glutacion peroxidasa⁽²⁸³⁾, descrita por primera vez por Paglia y Valentine, se basa en la siguiente reacción.



El GSSG (glutation oxidado) formado por la reacción de la glutacion peroxidasa es constantemente reducido por un exceso de actividad glutacion reductasa (GR), proporcionando un nivel constante de GSH (glutation reducido). La velocidad de oxidación de NADPH se monitoriza espectrofotométricamente a 340 nm de λ . Los reactivos necesarios son:

- 1.- Tampón fosfato potásico 0,1 M + 1 mM de EDTA; pH 7,0.
- 2.- Glutation reductasa : 2,4 U/ml.
- 3.- GSH 10 mM.
- 4.- NADPH 1,5 mM en 0,1 % NaHCO₃.
- 5.- H₂O₂ 1,5 mM.
- 6.- Azida 10 mM.

Se añadieron las siguientes soluciones en la cubeta de muestra (1 ml y 1 cm de paso de luz): 400 μ l de tampón fosfato 0,1 M, 100 μ l de azida 10 mM, 100 μ l de la dilución de la muestra problema, 100 μ l de glutacion reductasa (0,24 U) y exactamente 100 μ l de GSH 10 mM. La mezcla se incubó 10 min. a 37° C. Seguidamente, se añadieron 100 μ l de NADPH 1,5 mM y se monitorizó durante 3 min. el consumo de NADPH independiente de H₂O₂. La reacción general comenzó al añadir 100 μ l de H₂O₂ 1,5 mM precalentada. El descenso en la absorción a 340 nm de λ se registró durante 5 minutos. Un procedimiento idéntico se realizó con la cubeta de referencia, en donde se sustituyeron los 100 μ l de solución de muestra por un volumen equivalente de tampón fosfato. Se define como una unidad de glutacion peroxidasa a la cantidad de enzima capaz de inducir un descenso de

GSH del 90% de su concentración inicial en 1 min. a 37° C y pH 7,0. Los resultados se expresaron en U/mg. de proteínas.

Técnica de determinación del ritmo de producción del Radical Superóxido (ASO). La técnica que es modificación de la descrita por Boveris y Forman para mitocondrias, se basa en la reducción del citocromo C por el radical $O_2^{\cdot-}$ (109). Esta reducción del citocromo C no es, naturalmente, específica para el radical superóxido. Esta especificidad es conferida por el uso de SOD, para lo cual el radical superóxido es el único sustrato conocido. De acuerdo con esto, el ensayo se realiza con y sin SOD, y únicamente la reducción del citocromo C inhibida por SOD se usa para calcular la producción de superóxido. Esta reducción del citocromo C se sigue espectrofotométricamente a 550 nm de λ . Precisamos los siguientes reactivos:

- 1.- Tampón fosfato-potásico 0,1 M+0,1 mM EDTA ; pH 7,8.
- 2.- Citocromo C 75 μ M.
- 3.- SOD (aproximadamente 240 U).

La lectura espectrofotométrica se realizó a 550 nm de λ ; pH 7,8 y temperatura de 25° C durante 1 minuto con intervalos cada 6 seg., en cubetas de 1 ml, con un paso de luz de 1 cm. Nuestros resultados se expresaron en nmol de $O_2^{\cdot-}$ / mg prot. / min. El incremento de unidades de absorbancia en la mezcla de la reacción se convierte en nmol de ASO con el coeficiente de extinción molar: $\Delta E_{550} / 21,0 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$

Esta conversión depende del supuesto de que el citocromo C en la cubeta de referencia está totalmente oxidado y, por tanto, de que el incremento de absorbancia observada representa únicamente la absorbancia del producto reducido (Δ absorbancia: reducido - oxidado). Tras el establecimiento de las condiciones óptimas, exponemos a continuación el esquema de desarrollo del experimento. En la cubeta de referencia se añadieron 100 μ l de citocromo C (75 μ M), 20 μ l de SOD (aproximadamente 264 U) y 25 μ l de muestra. La diferencia de volumen hasta 1.000 μ l se completó con tampón fosfato potásico + EDTA. En la cubeta de referencia se sustituyó el volumen de tejido por uno equivalente de tampón. Se registró la lectura a 550 nm de λ en 2 fases:

- 1°.- Reducción del citocromo C inespecífica: sin SOD.
- 2°.- Reducción del citocromo C independiente del superóxido: con SOD.

La pendiente máxima se registró en el primer minuto. La temperatura fue de 25° C y pH de 7,8.

* Determinación de proteínas. Para la cuantificación de las proteínas tisulares, las muestras diluidas (1:100) en agua destilada se pusieron en contacto con el reactivo de Bradford (1:50) (azul de Coomassie G-250 0.1%, etanol 4.75%, ácido ortofosfórico 0.085%), y tras agitación fuerte para mezclar todos los componentes, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La lectura de la densidad óptica se efectuó a 595 nm por espectrofotometría (MILTON ROY, ESPECTRONIC 301). Cada una de las medidas se realizó por triplicado. Se elaboró previamente una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentración conocida de BSA (Fraction V. SIGMA). Se expresaron en mg/ml.

f) Citocinas:

Se estudiaron tanto citocinas pro- como anti-inflamatorias:

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α): Para la determinación del TNF utilizamos un kit comercial (Factor-Test-Rat TNF- α Elisa Kit de Genzyme Immunobiologicals MA, USA) basado en la técnica de ELISA específico para rata. El sistema de medición fue un lector de placas (Gest, General Elisa System Technology, MENARINI) para la técnica de ELISA automático con posibilidad de leer tres placas simultáneas.

Obtención de las muestras: Tanto el sobrenadante de cultivos celulares o muestras de suero pueden ser testadas con el kit. En nuestro caso utilizamos muestras sanguíneas (N=5 por grupo), las cuales no deben estar hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción son centrifugadas y el suero es extraído, dividido en alícuotas y depositado en tubos de eppendorf. Posteriormente son congeladas a -80°C en un arcón congelador (REVCO ULT-1386-V-O-C), evitando procesos de congelación y descongelación.

Principios del ensayo: Es un kit ELISA que emplea múltiples anticuerpos con el principio de "sándwich". En primer lugar se utilizó un plato con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α adherido en cada uno de ellos para capturar el TNF- α presente en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos junto con los blancos correspondientes. Después de lavar el plato para eliminar el material no adherido se añadió una peroxidasa conjugada policlonal anti-TNF-

α . A continuación el plato fue lavado de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato que inició la catalización de la peroxidasa. El cambio de color se detuvo por acidificación.

La absorbancia fue medida en un lector de placas (Gest, General Elisa System Technology, MENARINI) a 450 nm λ siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de TNF- α de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

Interleucina-1 β (IL-1 β): Para la determinación de la IL-1 utilizamos un kit comercial (Factor-Test-Rat IL-1 Elisa Kit de Genzyme Immunobiologicals MA, USA) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

Interferón- γ (INF- γ): Para la determinación de la INF- γ utilizamos un kit comercial (Factor-Test-Rat INF- γ Elisa Kit de Genzyme Immunobiologicals MA, USA) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

Interleucina-6 (IL-6): Para la determinación de la IL-6 utilizamos un kit comercial (Factor-Test-Rat IL-6 Elisa Kit de Genzyme Immunobiologicals MA, USA) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

Interleucina-10 (IL-10): Para la determinación de la IL-10 utilizamos un kit comercial (Factor-Test-Rat IL-10 Elisa Kit de Genzyme Immunobiologicals MA, USA) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

g) Producción de óxido nítrico:

Nitritos:

Se utilizó un método indirecto, cuantitativo y colorimétrico basado en la reacción de Griess. Utilizando las muestras de suero (N=5 por grupo) se separaron 500 μ l de sobrenadante de cada pocillo y se mezclaron con 250 μ l de reactivo de Griess (sulfametacina 1% y dihidrocloruro de naftil-etilen-diamida 0,1% en ácido ortofosfórico al

2,5%) (Sigma Aldrich). Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm. La concentración de nitritos se calculó interpolando en una recta patrón de concentraciones crecientes de nitrito sódico.

Inmunohistoquímica de iNOS:

Se depositó 1/8 de riñón en un molde de material plástico (7x7x5 mm) y se cubrió con una capa gruesa de una solución para congelar compuesta por alcohol polivinílico al 10% y polietilén glicol al 4% (Cryomatrix SHANDON®). El molde se introdujo sin ser sumergido en un vaso de precipitado que contenía 2-metilbutano a una temperatura comprendida entre -120°C y -150°C. La temperatura requerida se alcanzó introduciendo el vaso de precipitados en nitrógeno líquido y se controló con un termómetro de pentano (ARNO AMARELL). Una vez que la superficie de la muestra se endureció y adquirió un color blanco, se retiró del frío y se guardó dentro del molde en un congelador a -80°C.

Las muestras así obtenidas se prepararon para la inmunohistoquímica cortándolas en secciones de 4 µm mediante un criostato (MICROM HM 505 N), antes de cada prueba, los cortes se dejaron secar al aire durante 2 horas para fijarlos posteriormente en acetona a 4°C durante 10 minutos, dejándolos a continuación a temperatura ambiente. En la realización de esta técnica se empleó el kit *Santa Cruz Immunoperoxidase Staining* (Santa Cruz Biotechnology).

A partir de este momento, todos los pasos fueron precedidos de un lavado de los cortes con PBS durante 5 minutos. Se inhibió la peroxidasa endógena, lavando las preparaciones 10 minutos con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol; a continuación se incubaron 1 hora con suero bloqueante (dilución 1:67) para impedir el marcaje inespecífico, retirando siempre el exceso que pudiera quedar en ellas. Se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (dilución 1:50 en suero bloqueante) durante 1 hora, seguida de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:200 en PBS) durante 30 minutos, y por último, una incubación de 30 minutos con avidina-biotina.

Tras introducir las preparaciones en Triton X-100 al 1% durante 30 segundos, lavarlas en agua y secarlas, se incubaron en una solución de diaminobencidina durante 5 minutos. Después de un lavado en agua destilada durante 5 minutos, se realizó una tinción de contraste nuclear con hematoxilina.

Realizamos estudios de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) utilizando anticuerpos primarios de la casa Santa Cruz Biotechnology.

h-i) Western blot de moléculas de adhesión celular (CAMs) y factor nuclear κ B:

Aproximadamente 1/4 del riñón (N=5 por grupo) se congeló instantáneamente introduciéndolo en nitrógeno líquido, conservándolo a continuación en el interior de tubos de plástico cerrados a -80°C (REVCO ULT 1786 V-O-E). Posteriormente, el tejido congelado se troceó y lisó a 4°C con 3 ml de tampón de lisis por gramo (CINa 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris base 20 mM, pH 8. A este tampón se le añadieron dos inhibidores de proteasas: PMSF 2 mM e inhibidor de tripsina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se homogeneizó a 4°C y los restos del lisado se recogieron en un eppendorf, pasándolos con una jeringa a través de una aguja N^o21. Las muestras se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y se centrifugaron a 4°C y 15.000 g durante 20 minutos (centrífuga Hettich MIKRO). El sobrenadante se conservó a -20°C , en alícuotas, para la determinación de la cantidad de proteínas por el método de Bradford y para la realización del Western blot.

Para la cuantificación de las proteínas tisulares, las muestras diluidas (1:100) en agua destilada se pusieron en contacto con el reactivo de Bradford (1:50) (azul de Coomassie G-250 0.1%, etanol 4.75%, ácido ortofosfórico 0.085%), y tras agitación fuerte para mezclar todos los componentes, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La lectura de la densidad óptica se efectuó a 595 nm por espectrofotometría (MILTON ROY, ESPECTRONIC 301). Cada una de las medidas se realizó por triplicado. Se elaboró previamente una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentración conocida de BSA (Fraction V. SIGMA).

La separación de las proteínas contenidas en los lisados de tejido se llevó a cabo mediante electroforesis. El gel, de 1.5 mm de espesor, estaba constituido por un gel de carga al 17% de acrilamida mix (acrilamida 29.2%, bis-acrilamida 0.8%) y un gel de separación de acrilamida mix al 8%. Cada muestra se mezcló con un volumen igual de tampón de carga (2-mercapto-etanol 10%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.05%, glicerol 20%, Tris base 125 mM, pH 6.8), y junto con el marcador (BIO-RAD kaleidoscope prestained standards), se llevaron durante 5 minutos a una temperatura de 95°C en un baño seco (Thermolyne Type 17600 Dri-Bath). Se cargaron las proteínas (30-100 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$), depositando en los pocillos sin muestra una pequeña cantidad de tampón de

carga, y rellenando el espacio restante de todos los pocillos con tampón de electroforesis (glicina 192 mM, SDS 0.1%, Tris base 25 mM, pH 8.3).

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta (Mini-PROTEAN[®] II Cell, BIO-RAD) con tampón de electroforesis a un voltaje de 100 V y una corriente de 500 mA (fuente de alimentación: MODEL 1000/500 POWER SUPPLY).

La transferencia se realizó en una cubeta con solución de transferencia (glicina 190 mM, Tris base 20 mM, metanol 20%, SDS 0.1%, pH 7.5) a un voltaje de 400 V y una corriente de 450 mA, habiendo embebido previamente el material (papeles secantes y esponjas) y equilibrado el gel y la membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD Trans-Blot[®] Transfer Medium 0.45 μ m) en tampón de transferencia durante 15 minutos. La membrana se lavó 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con TBS (ClNa 500 mM, Tris base 20 mM, pH 7.5) y se dejó durante 24 h a 4°C en solución de bloqueo (TBS, leche en polvo Sveltesse Nestlé 8%), para evitar las uniones no específicas. Tras el bloqueo, se lavó 3 veces la membrana durante 5 minutos con TTBS (TBS; Tween 20, 0.1%) y se incubó durante 1 hora, en agitación constante, con el anticuerpo primario, dilución 1:1000 (TTBS, BSA 0.2%). Después de lavar 4 veces la membrana 5 minutos con TTBS, se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (Anti-goat IgG-HRP, mouse/human adsorbed, 200 μ g/0.5 mL. Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:2000 (TTBS, BSA 0.2%).

Se hicieron 4 lavados de 5 minutos con TTBS y se procedió al revelado utilizando una solución de reactivos estándar ECL (Amersham Pharmacia Biotech) y peróxido de hidrógeno, que se pusieron en contacto con la membrana durante 1 minuto. Inmediatamente, y bajo las condiciones adecuadas de iluminación, se impresionó la membrana en una autorradiografía (película de rayos X, FUJI PHOTO FILM) y se introdujo en la máquina de revelado (KODAK M35 X-OMAT Processor).

Tras digitalizar la autorradiografía, se procedió a la lectura de las densidades ópticas mediante el programa MacBAS V2.2, datos con los que se efectuó el análisis estadístico.

Realizamos estudios de diferentes moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 y P-selectina) y del factor transcripcional κ B utilizando anticuerpos primarios de la casa Santa Cruz Biotechnology.

2.1.5.- Estudio Estadístico:

Todos los valores en este trabajo han sido representados como $X \pm \text{SEM}$ (media \pm error estándar de la media). Los resultados obtenidos fueron analizados con los siguientes test estadísticos: Test exacto de Fisher, Test de Mann-Whitney U y ANOVA (test de Scheffe o Kruskal Wallis). Un valor de $p < 0,05$ se aceptó como resultado significativo.

IV.- RESULTADOS

1.- ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA

El Grupo Simulado no presenta mortalidad en el estudio, observándose un incremento significativo de la misma, desde el primer día, ($p < 0,001$) en el Control Zymosan, que llegó a ser del 100% a las 48 horas. El Grupo de animales tratado con Celecoxib[®] observamos una disminución de la mortalidad desde las primeras 24 horas que se mantiene en los días siguientes ($p < 0,05$) (Gráfico 1).

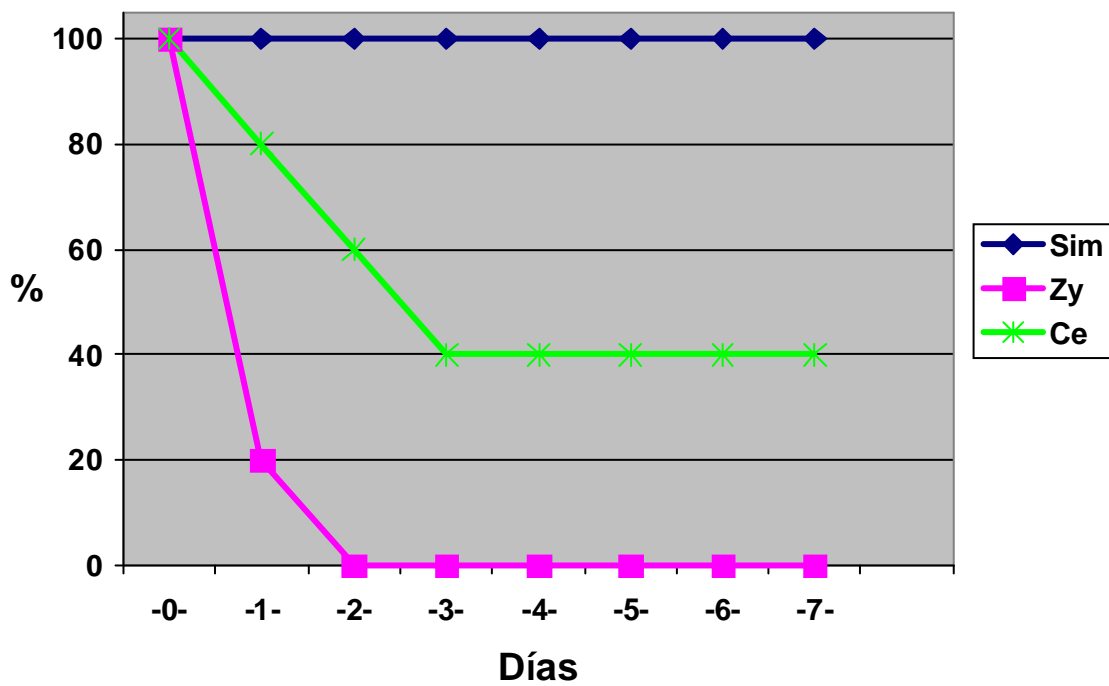


Gráfico 1.- Estudio de la supervivencia

2.- ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

La identificación de la flora cecal e intestinal, objeto de la TB, se realizó, en el animal de experimentación utilizado, en las muestras de ciego e intestino delgado obtenidas del Grupo basal. Una vez identificada esta flora bacteriana, en el resto de los grupos se realizaron los cultivos de los órganos extraídos (ganglios mesentéricos, riñón, y sangre) para valorar la TB, obteniéndose los siguientes resultados:

2.1.-Grupo Simulado:

Comprobamos, en este grupo de animales, que ni la anestesia, ni la técnica quirúrgica, ni la administración del vehículo del Zymosan (aceite mineral) inducen translocación bacteriana (Tabla VII).

Tabla VII.- Resultados de TB en el Grupo Sim.

ANIMAL	GANGLIO	RIÑÓN	SANGRE
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-

2.2.- Grupo Control Zymosan 12 h:

En este grupo en un animal fue imposible obtener la muestra de sangre (indicado, en la tabla, con el símbolo 0). En el resto, el 100% de los animales y el 100% de las muestras presentaron TB (Tabla VIII).

Tabla VIII.- Resultados de TB en el Grupo Zy 12h.

ANIMAL	GANGLIO	RIÑÓN	SANGRE
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	0
4	+	+	+
5	+	+	+

2.3.- Grupo Control Zymosan 24 h:

Tres animales fueron éxitos antes de obtener las muestras y en otro fue imposible obtener la sanguínea (son indicados, en la tabla, con el símbolo 0). En el resto, el 100% de los animales y el 100% de las muestras presentaron TB (Tabla IX).

Tabla IX.- Resultados de TB en el Grupo Zy 24h.

ANIMAL	GANGLIO	RIÑÓN	SANGRE
1	0	0	0
2	+	+	0
3	0	0	0
4	+	+	+
5	0	0	0

2.4.- Grupo Celecoxib[®] 12 h:

Se presenta TB en 4 animales en 3 de los cuales solamente es local (ganglios mesentéricos) (Tabla X).

Tabla X.- Resultados de TB en el Grupo Ce 12h.

ANIMAL	GANGLIO	RIÑÓN	SANGRE
1	+	-	-
2	-	-	-
3	+	-	-
4	+	+	+
5	+	-	-

2.5.- Grupo Celecoxib[®] 24 h:

En este grupo un animal fue éxitus antes de obtener las muestras (indicados, en la tabla, con el símbolo 0), y 4 presentaron TB, 2 únicamente a nivel local (ganglios mesentéricos) (Tabla XI).

Tabla XI.- Resultados de TB en el Grupo Ce 24h.

ANIMAL	GANGLIO	RIÑÓN	SANGRE
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	-	-
4	0	0	0
5	+	-	-

3.- ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL

El estudio de la función renal demostró una seria alteración de la misma en los grupos Zymosan (sobre todo a las 24 horas) observándose diferencias significativas ($p < 0,001$) con todos los grupos en los valores detectados de creatinina plasmática, y aclaramiento de creatinina (Gráfico 2).

El Grupo Celecoxib® presentó un mantenimiento de la función renal según los parámetros estudiados ($p < 0,05$) con respecto al Grupo Zymosan (Tabla XII).

A pesar de las graves alteraciones detectadas en la función renal, los valores observados en el estudio de los iones no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados. (Tabla XIII).

Tabla XII.- Pruebas de función renal I.

	Creatinina sérica	Aclaramiento Creatinina
Sim	4,3 ± 0,46	1,7 ± 0,2
Zy 12h	7,2 ± 0,8 *	0,6 ± 0,23 *
Zy 24h	36,9 ± 12,7 *	0,3 ± 0,18 *
Ce 12h	5,2 ± 0,9 **	1 ± 0,26 **
Ce 24h	10,6 ± 3,7 **	0,9 ± 0,14 **

* Zy vs Sim. ** Ce vs Sim $p < 0,01$

Tabla XIII.- Pruebas de función renal II.

	Na	K	Cl
Sim	136,2 ± 7,2	4,2 ± 0,26	106,3 ± 4,1
Zy 12h	147,5 ± 8,18	6,1 ± 1,46	117,4 ± 9,21
Zy 24h	149,5 ± 6,41	8,7 ± 1,8	118,7 ± 9,76
Ce 12h	140 ± 12,2	4,8 ± 0,6	107,9 ± 7,7
Ce 24h	142,7 ± 15,1	4,4 ± 0,6	112,5 ± 10,4

pNS

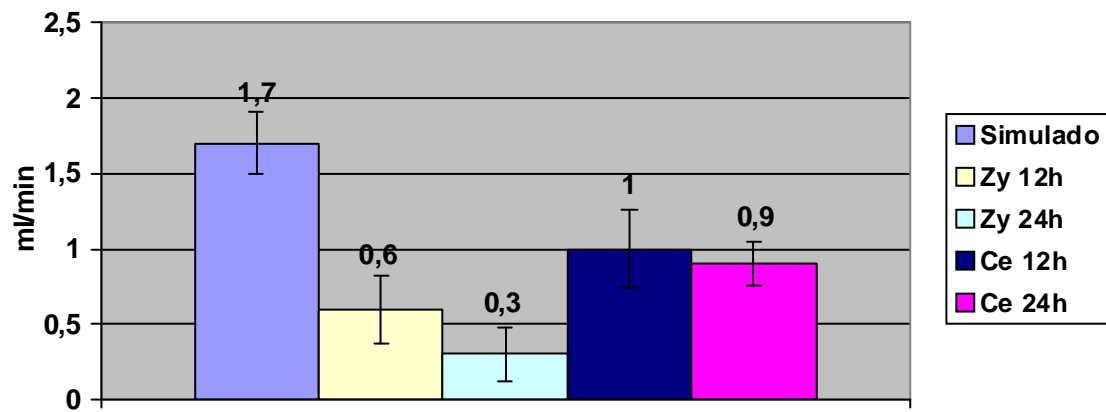


Gráfico 2.- Aclaramiento de la creatinina

4.- VALORACIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA

El estudio de la mieloperoxidasa, en el tejido renal, demostró un incremento altamente significativo en los subgrupos Zy, siendo el más evidente el Zy 24h ($p < 0,001$), valores que disminuyen significativamente en los animales tratados ($p < 0,001$) aunque siguen presentándolos significativamente superiores ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) a los observados en el Grupo Simulado (Tabla XIV y Gráfico 3).

Tabla XIV.- Resultados de mieloperoxidasa.

RIÑÓN	MIELOPEROXIDASA
Sim	$9,37 \pm 2,02$
Zy 12h	$251 \pm 16,94$ (* $p < 0,001$)
Zy 24h	$367,74 \pm 23,4$ (* $p < 0,001$)
Ce 12h	$78,8 \pm 22,9$ (* $p < 0,01$)
Ce 24h	$83,1 \pm 27,6$ (* $p < 0,01$)

U/g tej.

* vs Simulado y Zy

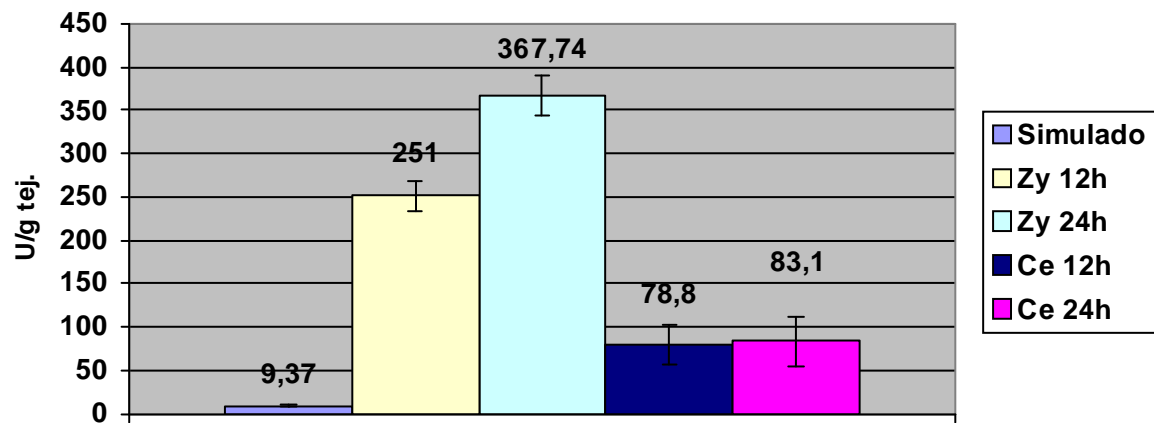


Gráfico 3.- Estudio de la mieloperoxidasa

5.- ESTUDIO DE LOS RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO

El estudio de las tres enzimas del sistema detoxificante de RLO (SOD, CAT y GPX) y del radical libre ASO demostraron los siguientes resultados.

5.1.- Superóxido dismutasa:

Observamos un incremento significativo ($p < 0,001$) en la actividad de este enzima en los grupos Zymosan con respecto al simulado, siendo éste más evidente a las 24 horas. Los Grupos estudio presentan una reducción significativa ($p < 0,001$ $p < 0,01$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo (12 y 24h) superior al Simulado ($p < 0,01$ $p < 0,05$) (Tabla XV y Gráfico 4).

Tabla XV.- Actividad de la Superóxido dismutasa.

RIÑÓN	SUPERÓXIDO DISMUTASA
Sim	38,11 ± 3,43
Zy 12h	293,66 ± 31,24 (* $p < 0,001$)
Zy 24h	498,7 ± 52,98 (* $p < 0,001$)
Ce 12h	100,3 ± 38,4 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,01$)
Ce 24h	90,8 ± 41,7 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)

U/mg prot. * vs Simulado. ** vs Zy.

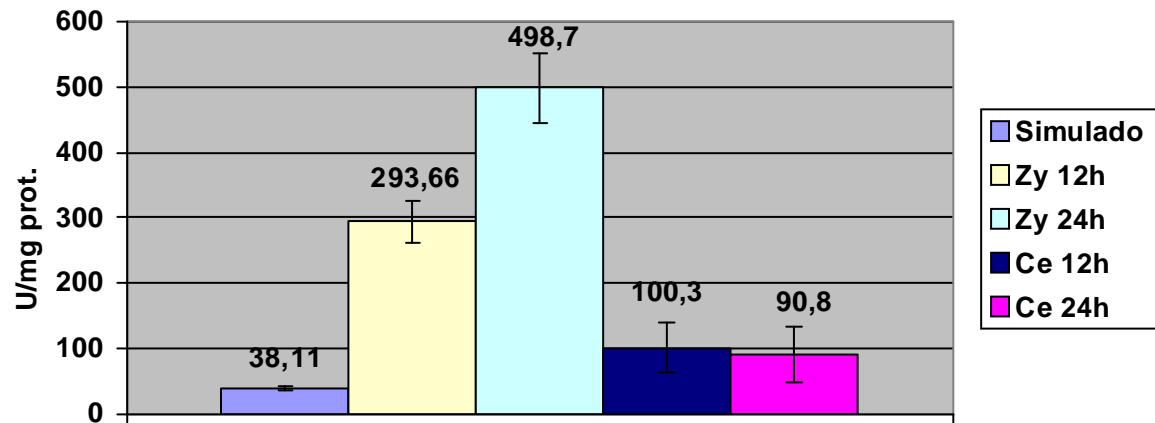


Gráfico 4.- Actividad de la Superóxido dismutasa

5.2.- Catalasa (CAT)

Al igual que en el caso anterior observamos un incremento significativo ($p < 0,01$) en la actividad de este enzima en los grupos Zymosan con respecto al Simulado, siendo éste más evidente a las 24 horas. Los Grupos estudio presentan una reducción significativa ($p < 0,01$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo superiores al Simulado ($p < 0,01$ $p < 0,05$) (Tabla XVI y Gráfico 5).

Tabla XVI.- Actividad de la Catalasa.

RIÑÓN	CATALASA
Sim	361,58 ± 36,35
Zy 12h	796,2 ± 63,41 (* $p < 0,01$)
Zy 24h	982 ± 85,67 (* $p < 0,01$)
Ce 12h	577,1 ± 98,2 (** $p < 0,01$)
Ce 24h	423,5 ± 84,7 (** $p < 0,001$)

K/mg prot. * vs Simulado. ** vs Zy.

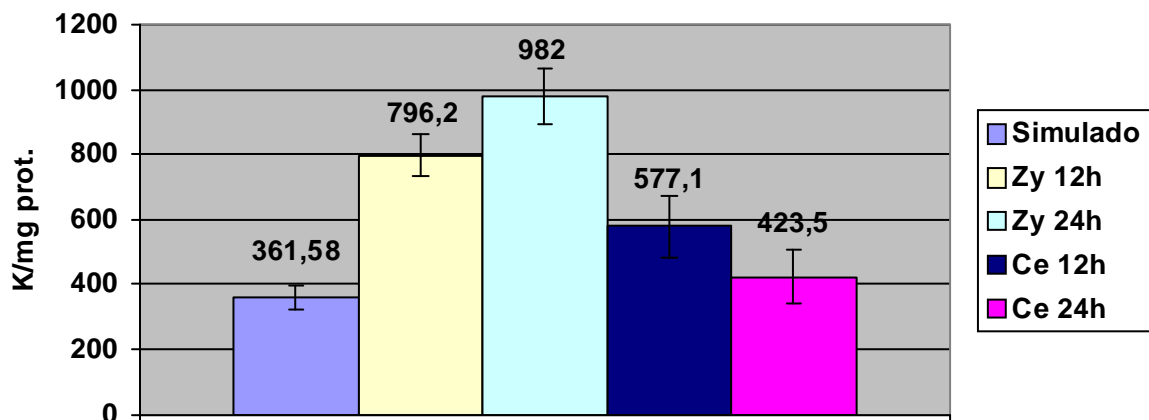


Gráfico 5.- Actividad de la Catalasa

5.3.- Glutation peroxidasa (GPX)

Al igual que en los dos casos anteriores observamos un incremento significativo ($p < 0,001$) en la actividad de este enzima en los grupos Zymosan con respecto al Simulado, siendo este incremento más evidente a las 24 horas. Los Grupos Celecoxib® presentaron una reducción significativa ($p < 0,01$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo (12 y 24h) significativamente superiores al Simulado (Tabla XVII y Gráfico 6).

Tabla XVII.- Actividad de la Glutation peroxidasa.

RIÑÓN	GLUTATION PEROXIDASA
Sim	2,21 ± 0,3
Zy 12h	12,69 ± 0,9 (* $p < 0,001$)
Zy 24h	36,7 ± 2 (* $p < 0,001$)
Ce 12h	7,8 ± 0,8 (** $p < 0,01$) (* $p < 0,05$)
Ce 24h	6,6 ± 1 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,01$)

U/mg prot. * vs Simulado. ** vs Zy.

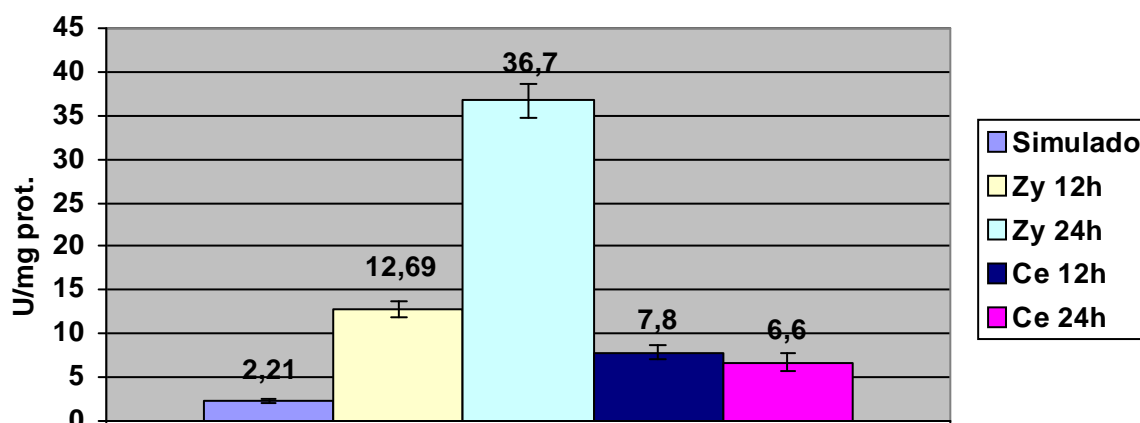


Gráfico 6.- Actividad de la Glutation peroxidasa

5.4.- Anión superóxido (ASO)

Comprobamos un incremento significativo ($p < 0,001$) en la producción de este radical libre del oxígeno en los grupos Zymosan con respecto al Simulado, siendo este incremento más evidente a las 24 horas. Los Grupos Celecoxib® presentaron una reducción significativa ($p < 0,001$ $p < 0,01$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo (12 y 24h) significativamente superiores al Simulado (Tabla XVIII y Gráfico 7).

Tabla XVIII.- Ritmo de producción del Anión superóxido.

RIÑÓN	ANIÓN SUPERÓXIDO
Sim	1,49 ± 0,05
Zy 12h	93,25 ± 19,37 (* $p < 0,001$)
Zy 24h	209,41 ± 28,7 (* $p < 0,001$)
Ce 12h	10,7 ± 2,3 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)
Ce 24h	10,1 ± 4,4 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)

nmol/mg prot./min. * vs Simulado. ** vs Zy.

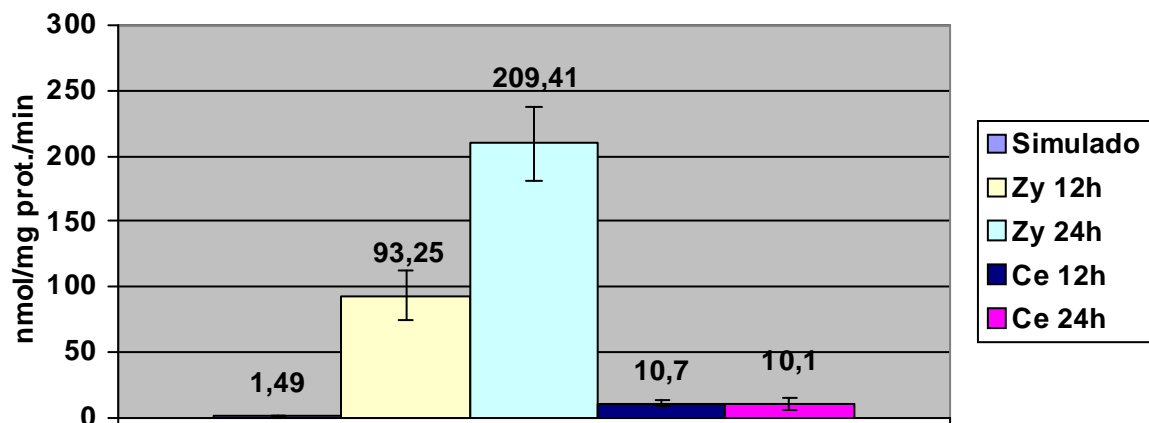


Gráfico 7.- Ritmo de producción del Anión superóxido

6.- VALORACIÓN DE LAS CITOCINAS

6.1.- Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

El TNF- α , se incrementa significativamente ($p < 0,001$) en los grupos Zymosan, desde las 12 h, con respecto al Simulado, siendo éste más evidente a las 24 h. Los Grupos estudio presentan una reducción significativa ($p < 0,001$ $p < 0,01$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo superiores al Simulado (Tabla XIX y Gráfico 8).

Tabla XIX.- Valores del Factor de necrosis tumoral- α .

SUERO	TNF- α
Sim	3,76 \pm 0,63
Zy 12h	458,2 \pm 30,07 (* $p < 0,001$)
Zy 24h	1054,73 \pm 114,03 (* $p < 0,001$)
Ce 12h	98,3 \pm 45 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,001$)
Ce 24h	111,6 \pm 39,9 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,001$)

pg/ml * vs Simulado. ** vs Zy.

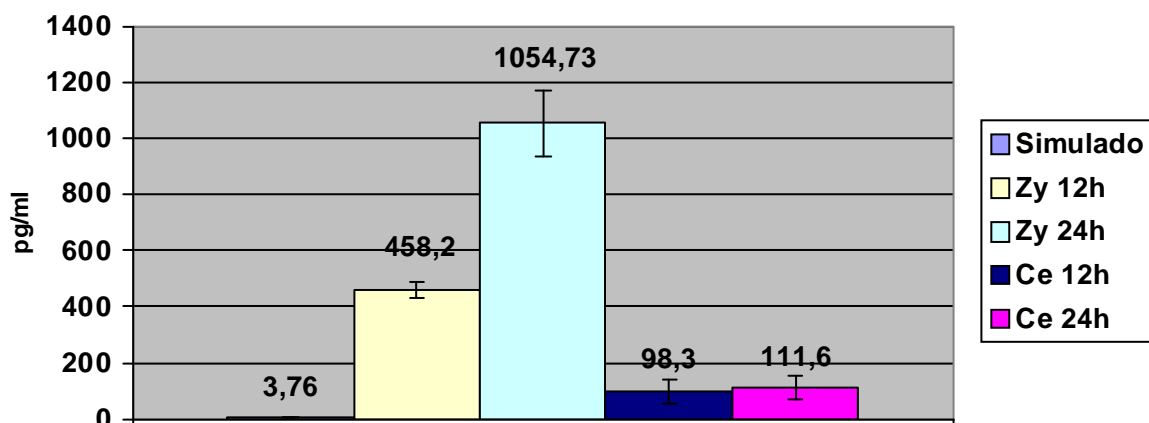


Gráfico 8.- Resultados del Factor de necrosis tumoral- α .

6.2.- Interleucina-1 β (IL-1 β)

La IL-1, se incrementa significativamente ($p < 0,001$) en los grupos Zymosan, desde las 12 h, con respecto al Simulado, siendo este incremento más evidente a las 24 h. El Grupo Celecoxib[®] presenta una disminución significativa ($p < 0,001$ $p < 0,05$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo superiores al Simulado (Tabla XX y Gráfico 9).

Tabla XX.- Resultados de la Interleucina-1.

SUERO	IL-1 β
Sim	2,51 \pm 0,9
Zy 12h	218,26 \pm 31,07 (* $p < 0,001$)
Zy 24h	795,1 \pm 52,92 (* $p < 0,001$)
Ce 12h	63,1 \pm 28,6 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)
Ce 24h	70,4 \pm 32,5 (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)

pg/ml * vs Simulado. ** vs Zy.

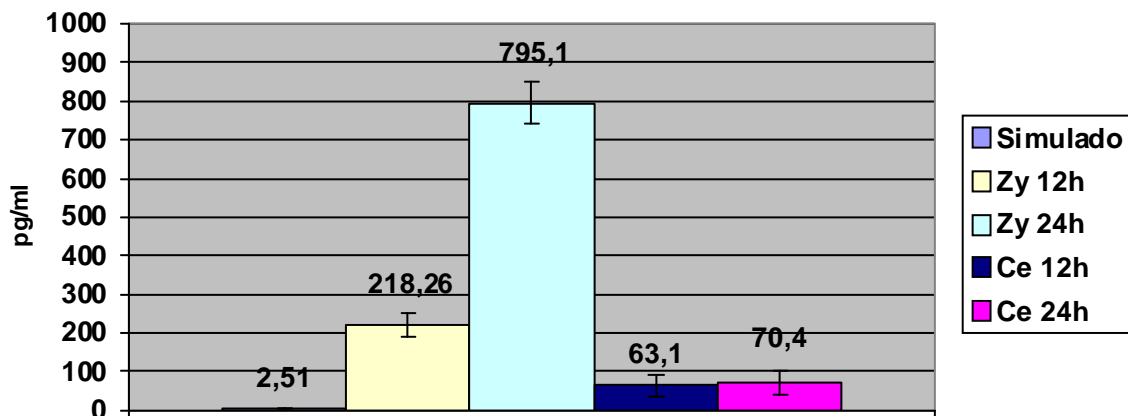


Gráfico 9.- Interleucina-1 β .

6.3.- Interferón- γ (INF- γ)

El INF- γ , se incrementa significativamente ($p < 0,001$) en los grupos Zymosan, desde las 12 h, con respecto al Simulado, siendo el incremento más evidente a las 24 h. Los Grupos tratados con Celecoxib[®] presentaron una reducción significativa ($p < 0,01$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo significativamente superiores al Simulado ($p < 0,01$) (Tabla XXI y Gráfico 10).

Tabla XXI.- Estudio del Interferón- γ .

SUERO	IFN- γ
Sim	0,9 \pm 0,1
Zy 12h	175,22 \pm 22,54 (* $p < 0,001$)
Zy 24h	206,13 \pm 27,19 (* $p < 0,001$)
Ce 12h	101,9 \pm 20,1 (** $p < 0,01$) (* $p < 0,001$)
Ce 24h	54,6 \pm 48,7 (** $p < 0,01$) (* $p < 0,001$)

pg/ml * vs Simulado. ** vs Zy.

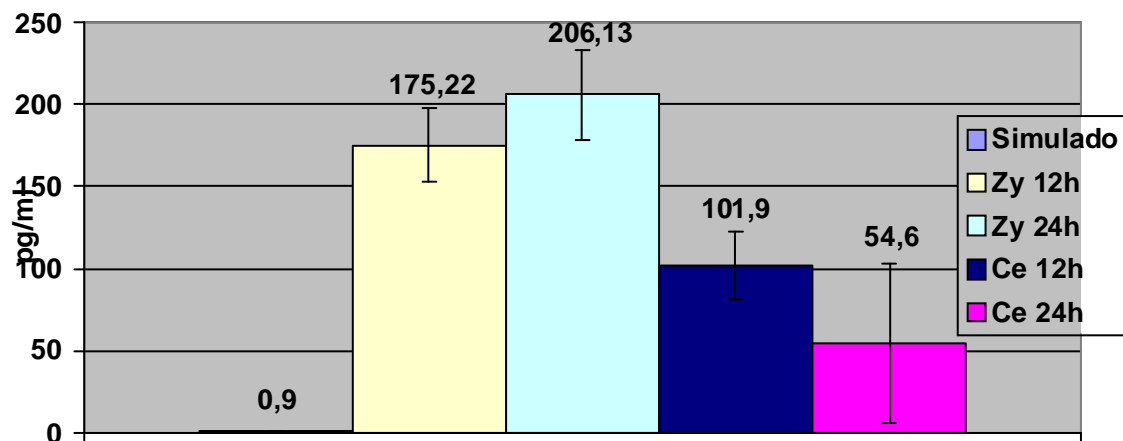


Gráfico 10.- Resultados del Interferón- γ .

6.4.- Interleucina-6 (IL-6)

La IL-6, disminuye significativamente ($p < 0,05$) en los grupos Zymosan, desde las 12 h, con respecto al Simulado, siendo la disminución más evidente a las 24 h. El Grupo Celecoxib[®] no presenta diferencias significativas con el Zymosan comprobándose unos valores de IL-6 significativamente inferiores a los evaluados en los Grupos Simulado ($p < 0,05$) (Tabla XXII y Gráfico 11).

Tabla XXII.- Resultados de la Interleucina-6

SUERO	IL-6
Sim	63,45 ± 7,21
Zy 12h	49,03 ± 5,72 (* $p < 0,05$)
Zy 24h	40,69 ± 10,5 (* $p < 0,05$)
Ce 12h	50 ± 9,9 (* $p < 0,05$)
Ce 24h	65,2 ± 10,7 (* $p < 0,05$)

pg/ml

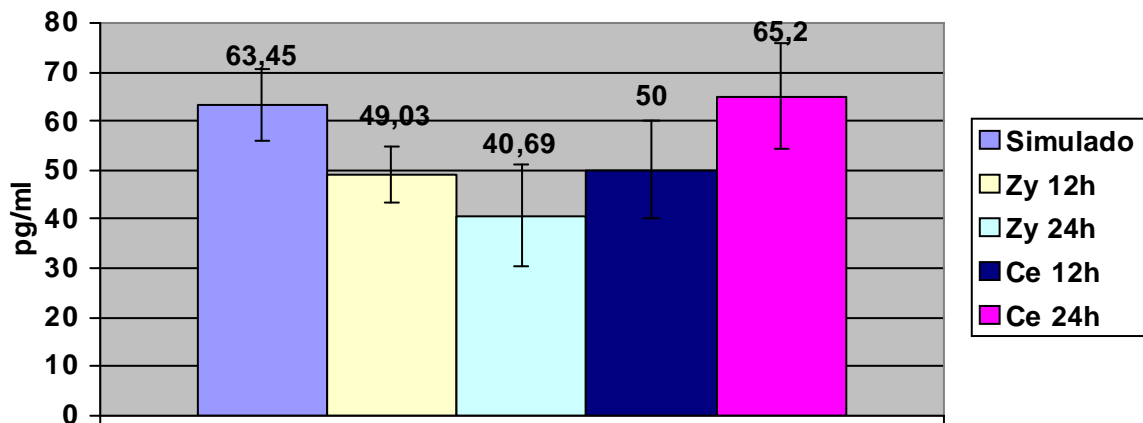


Gráfico 11.- Valores de la Interleucina-6.

6.5.- Interleucina-10 (IL-10)

La IL-10, no presenta diferencias significativas entre los Grupos Zymosan y Simulado. El Grupo Celecoxib[®] no presenta diferencias significativas con el Simulado y Zymosan (pNS) (Tabla XXIII y Gráfico 12).

Tabla XXIII.- Resultados de la interleucina-10

SUERO	IL-10
Sim	114,32 ± 19,48
Zy 12h	108,52 ± 33,02
Zy 24h	95,73 ± 27,16
Ce 12h	90,9 ± 19,7
Ce 24h	103,6 ± 41,3

pg/ml

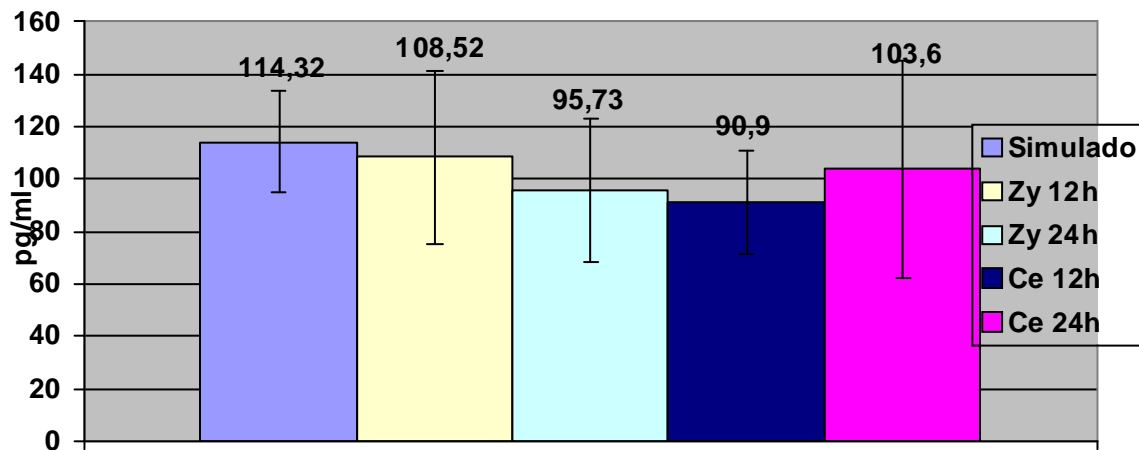


Gráfico 12.- Valores detectados de la Interleucina-10.

7.- ESTUDIO DEL ÓXIDO NÍTRICO

7.1.- Nitritos

La producción de nitritos se incrementa significativamente ($p < 0,001$) en los grupos Zymosan con respecto al Simulado, siendo este incremento más evidente a las 24 horas. El Grupo Celecoxib[®] presentan una reducción significativa ($p < 0,05$) en comparación con el Zymosan pero siguen siendo superiores al Simulado (Tabla XXIV y Gráfico 13).

Tabla XXIV.- Producción de nitritos.

SUERO	Nitritos
Sim	$3,8 \pm 0,5$
Zy 12h	$97,5 \pm 13,76$ (* $p < 0,001$)
Zy 24h	$115,4 \pm 20,15$ (* $p < 0,001$)
Ce 12h	$20,2 \pm 6,4$ (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)
Ce 24h	$18,9 \pm 9,9$ (** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$)

μM * vs Simulado. ** vs Zy.

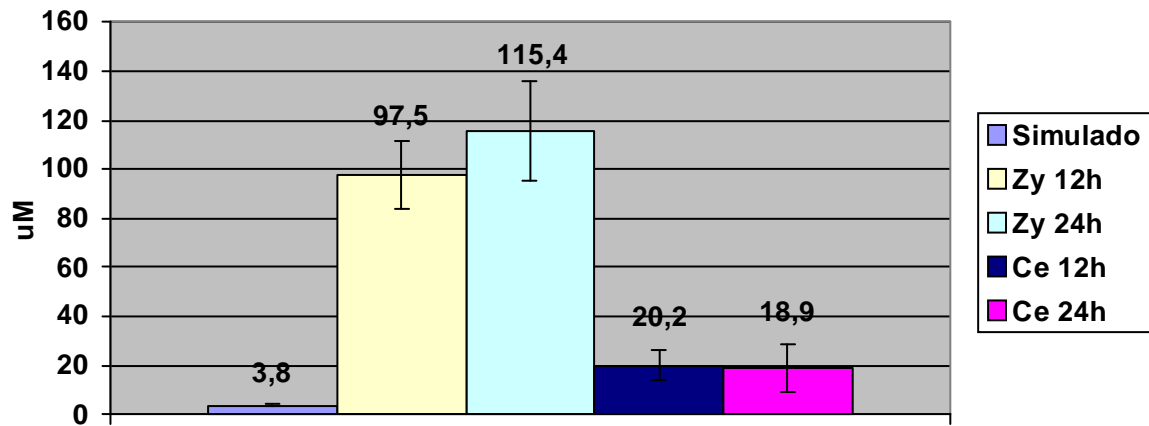


Gráfico 13.- Determinación de nitritos

7.2.- iNOS

La actividad de la iNOS se realizó a las 24 h observándose un significativo incremento de la misma en el Grupo Zymosan. En los Grupos Celecoxib[®] comprobamos una disminución de la iNOS pero siguen manteniendo valores superiores a los del Grupo Simulado (Figuras 13-15).

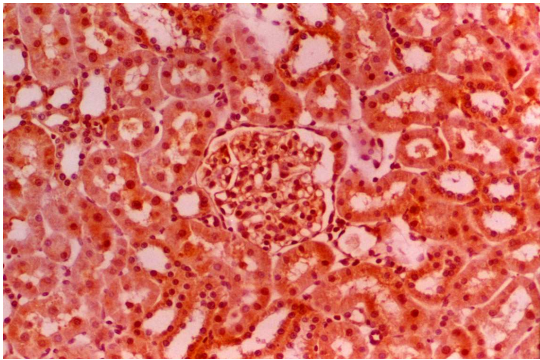


Figura 13.- iNOS Grupo Simulado

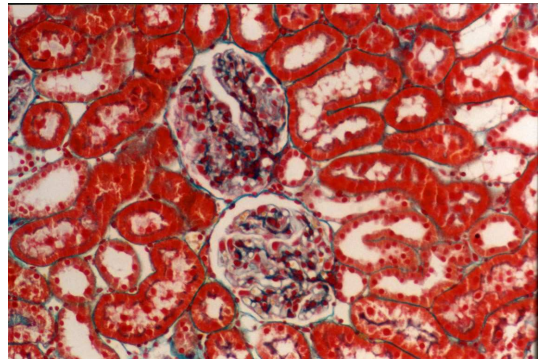


Figura 14.- iNOS Grupo Zymosan

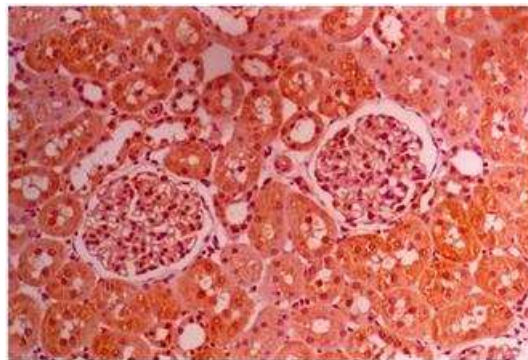


Figura 15.- iNOS Grupo Celecoxib

8.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CAMs

8.1.- ICAM-1

La expresión de ICAM-1, evaluada a las 24 h, se observa significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Zymosan con respecto al Simulado. En los animales tratados con Celecoxib[®] comprobamos una significativa disminución ($p < 0,001$) de dicha expresión con respecto al Grupo Zymosan (Tabla XXV).

Tabla XXV.- Cuantificación de la expresión de ICAM-1

	AU-Fondo T.	% vs Sim.
Sim.	53698 ± 8970	100
Zy 24h	149253 ± 17652	278 *
Ce 24h	88429 ± 21222	154 * #

* $p < 0,001$ vs Simulado; # $p < 0,001$ vs Zy

8.2.- VCAM-1

La expresión de VCAM-1, estudiada también a las 24 h, se valoró significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Zymosan con respecto al Simulado. En los animales tratados con Celecoxib[®] comprobamos una significativa disminución ($p < 0,01$) de dicha expresión aunque se siguen observando diferencias significativas ($p < 0,05$) con el Grupo Simulado (Tabla XXVI).

Tabla XXVI.- Cuantificación de la expresión de VCAM-1

	AU-Fondo T.	% vs Sim.
Sim.	64553 ± 10806	100
Zy 24h	198233 ± 29870	307 *
Ce 24h	97622 ± 24219	151 #

* $p < 0,001$ vs Simulado; # $p < 0,001$ vs Zy

8.3.- PECAM-1

La expresión de PECAM-1 no se pudo valorar en los tiempos ensayados no habiéndose obtenido resultado positivo de su expresión ni a las 12 ni a las 24 horas (Tabla XXVII).

Tabla XXVII.- Cuantificación de la expresión de PECAM-1

	AU-Fondo T.	% vs Sim.
Sim.		
Zy		
Ce		

8.4.- P-selectina

La expresión de P-selectina, estudiada a las 12 horas, se valoró significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Zymosan con respecto al Simulado. En los animales pertenecientes a los diferentes Grupos estudio comprobamos una significativa disminución ($p < 0,01$) de dicha expresión (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII.- Cuantificación de la expresión de P-selectina

	AU-Fondo T.	% vs Sim.
Sim.	34352 ± 6211	100
Zy 12h	96784 ± 21206	282 *
Ce 12h	77146 ± 19212	174 *

* $p < 0,001$ vs Simulado; # $p < 0,001$ vs Zy

9.- Valoración de la activación de NFκB

El estudio de la activación de NFκB, evaluada a las 12 horas, demostró un incremento altamente significativo ($p < 0,001$) en el Grupo Zymosan. Mientras que en el siguen observándose valores significativamente elevados (Tabla XXIX).

Tabla XXIX.- Cuantificación de la activación de NFκB

	AU-Fondo T.	% vs Sim.
Sim.	18332 ± 3146	100
Zy 12h	196350 ± 38721	1071 *
Ce 12h	100100 ± 25473	259 * #

* $p < 0,01$ vs Simulado; # $p < 0,01$ vs Zy

V.- DISCUSIÓN

1.- DISCUSIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Hemos elegido este modelo debido a la gran experiencia con la que cuenta nuestro grupo de trabajo en el mismo desde el año 1991. El Zymosan A inyectado intraperitonealmente da lugar a una inflamación intraperitoneal y sistémica aséptica e inespecífica. Diversos autores la han utilizado demostrándose la inducción de TB^(83, 186, 236, 333, 353). Hemos tenido en cuenta además, la facilidad de reproducción del modelo así como el control adecuado de las diversas variables que durante el estudio se pudiesen plantear. Este modelo confirma que se puede producir sepsis e incluso fallo multiorgánico en ausencia de infección microbiana (inicial) a diferencia de los modelos en los que se utiliza la inoculación de gérmenes como *E. coli* después de una descontaminación selectiva^(238, 390) o bien determinados fármacos^(8, 9, 182, 345). En el proyecto que nos ocupa es la respuesta inflamatoria sistémica el aspecto que más nos interesa, no sólo por ser la responsable del resto de acontecimientos fisio-patológicos de nuestro modelo experimental sino por su importancia en la clínica diaria de cualquier especialidad médica.

La dosis empleada de Zymosan y su vía de administración se han seleccionado basándonos en estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo^(73, 120, 123, 231, 239, 288, 293) y por las experiencias previas realizadas en este estudio y reseñadas en el apartado de Material y Método. El objetivo era utilizar una dosis de Zymosan que indujera una alta mortalidad, provocando un síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica y fallo multiorgánico.

A diferencia de los estudios anteriores, realizados por nuestro grupo de trabajo, donde utilizamos dosis de Zymosan mucho menores para conseguir TB sin fallo multiorgánico^(73, 120, 123, 231, 239, 288, 293), en este caso no observamos el fenómeno de aclaramiento de la TB a las 24 horas. En aquellos estudios comprobábamos una TB máxima a las 12 horas con una disminución significativa de la misma que se iniciaba a las 24 horas postinyección del Zymosan. En el presente trabajo, como veremos a continuación, no sólo la TB sigue siendo máxima a las 24 horas sino que los parámetros estudiados inducen a pensar que la respuesta inflamatoria sigue incrementándose en ese momento.

La revisión bibliográfica, sobre Celecoxib[®], y los estudios previos realizados en este trabajo nos hicieron decidir la dosis y el momento de administración respectivamente^(14, 23, 25, 29, 45, 49, 67, 102, 103, 105, 150, 166, 200, 218, 221, 227). En los estudios realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación, en diferentes modelos experimentales de respuesta inflamatoria⁽¹²⁴⁾, comprobamos como la administración del Celecoxib[®] en diferentes momentos presentaba resultados contradictorios, todo ello junto con la revisión bibliográfica, nos hizo decidir administrar los fármacos en la dosis y en el momento establecidos en este estudio.

A pesar de que en las experiencias previas recogimos un mayor número de órganos, para el desarrollo de este trabajo hemos utilizado los ganglios mesentéricos, el riñón y la sangre como muestras para desarrollar nuestro estudio.

Finalmente utilizamos las muestras de riñón y sangre para valorar la respuesta inflamatoria sistémica a través de los mediadores estudiados en el presente trabajo.

La selección de los grupos ensayados fue meticulosa en cuanto a los tiempos de estudio se refiere. Elegimos los tiempos ensayados teniendo en cuenta los siguientes factores: se ha descrito que en los modelos de TB inducidos por Zymosan la respuesta inflamatoria se inicia a las 2 horas de su administración^(124, 239), por otro lado estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación^(73, 120, 123, 231, 239, 288, 293) han comprobado cómo las 12 horas era el momento de máxima translocación y a las 24 horas eran patentes los fenómenos de aclaramiento del proceso.

Seleccionamos las variables estudiadas de forma meticulosa, teniendo en cuenta los medios de que disponemos y la información que podríamos obtener de cada una de ellas para intentar dar respuesta a los objetivos planteados y comprobar la plausibilidad de la hipótesis propuesta.

Supervivencia: El valor informativo que aporta esta variable es de vital importancia en nuestro modelo experimental, fallo multiorgánico con alta mortalidad (80-100 % a las 48 horas). Planteamos su estudio a lo largo de los siete primeros días después de la administración del Zymosan considerando que después de éstos, los animales supervivientes habrían superado la fase aguda del proceso inflamatorio-infeccioso.

Microbiología: Pone en evidencia la consecuencia de la respuesta inflamatoria sistémica (translocación bacteriana) y nos aportará importante información sobre las consecuencias de la modulación de la inflamación. Al ser una de las causas del fallo multiorgánico será de gran interés conocer su evolución en los tiempos ensayados.

Función renal: La respuesta renal en el intento de control interno de la homeostasis es de extraordinaria importancia, por ello decidimos valorar su función y planteamos gran parte de los estudios realizados en muestras de tejido de este órgano

Infiltración neutrofílica: Dentro del estudio de la respuesta inflamatoria hemos valorado la determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa, en tejido renal como marcador de la infiltración neutrofílica. La mieloperoxidasa es una enzima específica de los neutrófilos, contenida en los gránulos primarios (azurófilos) que son lisosomas que además contienen hidrolasas ácidas y muramidasa (lisozima). La comunidad científica está de acuerdo con la relación directamente proporcional entre el incremento de la infiltración neutrofílica y el grado de la lesión inflamatoria, así como el aumento de la lesión orgánica postperfusión en un modelo de isquemia-reperfusión. El método seleccionado para valorar este aspecto (determinación de la actividad de la mieloperoxidasa) ha demostrado ser uno de los más exactos, siendo ampliamente usado en la investigación^(44, 55, 135, 151, 178, 246, 260, 261, 263, 265, 280, 358, 403).

Radicales libres del oxígeno: Para el estudio de los RLO, determinamos tres enzimas del sistema detoxificante: La superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa y el radical libre anión superóxido, todos ellos en tejido renal. Debemos tener en cuenta que los neutrófilos presentan entre 50-60 toxinas, incluido nicotamina adenina dinucleótido fosfato oxidasa en la membrana que puede dar lugar a la producción de RLO. La participación de los radicales libres del oxígeno en el proceso inflamatorio ha sido ampliamente estudiado y plasmado en la bibliografía^(8, 55, 111, 118, 119, 135, 159, 178, 241, 290, 295, 341, 403). El hecho conocido del daño causado por éstos en los tejidos nos decidió a incluir su estudio en este trabajo.

Citocinas: Como ya comentamos anteriormente, las citocinas más importantes implicadas en la modulación de las CAMs y por consiguiente de la respuesta inflamatoria son el TNF- α , la IL-1 y el IFN- γ ^(192, 251, 371). En nuestro estudio decidimos valorar también la respuesta de dos citocinas que en determinados momentos ejercen un importante papel de control de la respuesta inflamatoria intentando autolimitarla y controlarla la IL-6 y la IL-10⁽²²⁾.

Óxido nítrico: Uno de los mediadores más importantes y últimamente más estudiados de la respuesta inflamatoria es el NO^(12, 181, 234, 291, 314). En el modelo planteado la activación de la iNOS será decisiva, como comentaremos posteriormente, en el

desarrollo de la lesión panendotelial y la instauración del fallo multiorgánico⁽⁶⁾. Para su estudio hemos utilizado una técnica indirecta ampliamente refrendada en la bibliografía y también la valoración de la activación de la sintasa inducible del NO.

Expresión de CAMs: Como anteriormente comentamos, las moléculas de adhesión celular son las responsables en última instancia de la interacción leucocito-endotelio y por tanto de la migración leucocitaria^(4, 7, 11, 14, 21, 25, 30, 72, 74, 95, 126, 199, 212, 228, 262, 263, 326, 350, 395, 397). Su regulación es compleja y posiblemente el control de la misma aportará un arsenal terapéutico muy interesante. Por ello planteamos el estudio de cuatro CAMs: la P-selectina, muy importante en los primeros momentos de la respuesta inflamatoria y otras tres pertenecientes a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas de gran importancia en la respuesta inflamatoria y en el reconocimiento antigénico (ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1).

Activación de NFκB: El control molecular y genético de la respuesta inflamatoria es un aspecto de interés crucial⁽⁷⁸⁾, en este sentido uno de los factores transcripcionales que controlan esta respuesta es el que estudiamos en la presente Tesis Doctoral.

2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el modelo experimental que se ha desarrollado en el presente trabajo nos hemos planteado estudiar el síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica, sus consecuencias (translocación bacteriana y fallo multiorgánico) y su control con Celecoxib[®] con la doble intención de incrementar el conocimiento de la fisiopatología de estos procesos y profundizar en la comprensión de otros mecanismos de acción del fármaco empleado que puedan ayudar a su utilización convencional o incluso abrir nuevos campos terapéuticos^(104, 122).

Los resultados obtenidos, en la valoración de la mortalidad, en el Grupo Simulado (100% de supervivencia a los 7 días) demuestran la viabilidad funcional de las técnicas empleadas y la inocuidad de los vehículos utilizados para administrar los fármacos usados. Por otra parte la agresividad buscada en nuestro estudio queda patente en los resultados obtenidos con el Grupo Control Zymosan (una mortalidad del 100% a los 2 días post-Zymosan) los cuales se ajustan a los descritos en otros trabajos científicos con modelos experimentales similares^(144, 147, 203, 402). Al tratar a los animales con el tratamiento empleado, en las dosis y momentos descritos, observamos un incremento de la supervivencia significativo desde el primer día post-administración del Zymosan. Como veremos a continuación en el estudio de las diferentes variables planteadas se encuentra la causa de esta menor mortalidad.

El estudio microbiológico evidenció los siguientes aspectos: que el tipo de anestesia utilizado, el modelo quirúrgico empleado, la punción intraabdominal, los vehículos de los fármacos empleados y la agresión y estrés ocasionados al animal de experimentación no inducen TB. Que el Zymosan A administrado intraperitonealmente a la dosis de 600 mg/kg de peso induce el 100% de TB, a las 12 horas, no observándose el fenómeno de aclaramiento valorado en otros estudios con dosis menores de Zymosan a las 24 horas^(26, 120, 367). Estos datos corroboran estudios previos de nuestro grupo^(120, 123, 231, 239, 293) y de la comunidad científica^(83, 85, 186, 236, 353). Que en los grupos tratados con Celecoxib[®] existe una disminución significativa con respecto a los grupos controles, solamente en el estudio sistémico (riñón y sangre) permaneciendo el local (ganglios mesentéricos) sin diferencias.

Como veremos posteriormente la posible causa de esta disminución de TB es el control de la respuesta inflamatoria sistémica y una de las consecuencias derivadas será la menor inducción de sepsis y fallo multiorgánico y consecuentemente una menor mortalidad como ya hemos comprobado.

La valoración de la función renal es la segunda variable estudiada que nos termina por contestar a la pregunta: ¿es el Celecoxib® beneficioso en el modelo experimental planteado? Igualmente que en la variable anterior observamos la alta agresividad del modelo aplicado y un mantenimiento de la función orgánica en los animales tratados. Este mantenimiento de la función orgánica ha sido puesto de manifiesto por otros autores, en diferentes modelos experimentales^(24, 53, 60, 74, 90, 94, 124, 190, 274, 317, 332, 364, 379).

Los mecanismos, desarrollados localmente en el riñón y que influyen de manera esencial en la mejoría de la función renal podrían ser:

- Disminución del efecto de contracción mesangial inducida por los RLO⁽²⁶⁶⁾.
- Mantenimiento de una respuesta inflamatoria menor y ausencia de fallo multiorgánico.

Las causas que pueden conducir a esta significativa disminución de la morbimortalidad son muchas y dependientes de la regulación de la respuesta inflamatoria por parte de los fármacos empleados (disminución del rodamiento y adhesión leucocitaria, disminución del fenómeno de no reflujo postisquémico, modulación de la infiltración neutrofílica, disminución de producción de RLO y citocinas proinflamatorias, control de la transcripción nuclear, etc.), aspectos que desarrollaremos a continuación.

El estudio de la infiltración neutrofílica utilizando como marcador la determinación de la actividad de la mieloperoxidasa en tejido renal, reveló un incremento significativo en el Grupo Control Zymosan desde las 12 horas después de su administración que seguía incrementándose significativamente incluso a las 24 horas. Este incremento de la infiltración neutrofílica y su relación directamente proporcional con el daño ocasionado en la inflamación ha sido ampliamente demostrado y publicado^(11, 24, 44, 48, 55, 56, 60, 126, 150, 151, 174, 175, 197, 198, 202, 206, 215, 253, 312, 335, 339, 368).

La significativa disminución de la infiltración neutrofílica detectada en los grupos tratados con Celecoxib® nos revela la modulación que se induce en la activación

leucocitaria e interacción leucocito-endotelio. Varios autores ya han demostrado un descenso del rodamiento leucocitario postreperfusión o en otros fenómenos inflamatorios, de la adhesión leucocitaria de la infiltración neutrofílica y de otros fenómenos como el no reflujo postisquémico^(24, 51, 53, 60, 90, 94, 124, 187-188, 190, 259, 364).

El mecanismo podría ser debido a la reacción con los RLO originados localmente durante la respuesta inflamatoria^(2, 3). Los RLO, entre otros mediadores, son responsables de incrementar la llegada al foco de las células inflamatorias, de la activación de los leucocitos polinucleares neutrófilos y de la expresión de las moléculas de adhesión por parte del endotelio y de los leucocitos iniciándose de este modo la infiltración. Kurose⁽²⁰⁵⁾ y Farhood⁽¹⁰³⁾ muestran en sus trabajos sobre el daño en la I-R en riñón de rata, cómo la activación de los neutrófilos y posterior expresión de las CAM son claves para la migración, y en esa activación son los RLO los que juegan un papel esencial.

No descartamos que la propia regulación de la respuesta inflamatoria con la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias y la menor expresión de CAM, junto con la menor activación neutrofílica y de sus proteínas snare, o incluso la actuación directa sobre los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de las diferentes CAMs, sean también responsables del control de la infiltración neutrofílica.

La importancia del estado oxidativo en la respuesta inflamatoria es de vital importancia, por ello el estudio de los radicales libres del oxígeno en el fenómeno inflamatorio ha sido muy intenso y el consenso de la comunidad científica en cuanto a sus efectos unánime^(13, 55, 111, 124-126, 159, 178, 195, 241, 287, 295, 342, 403) (Figura 16).

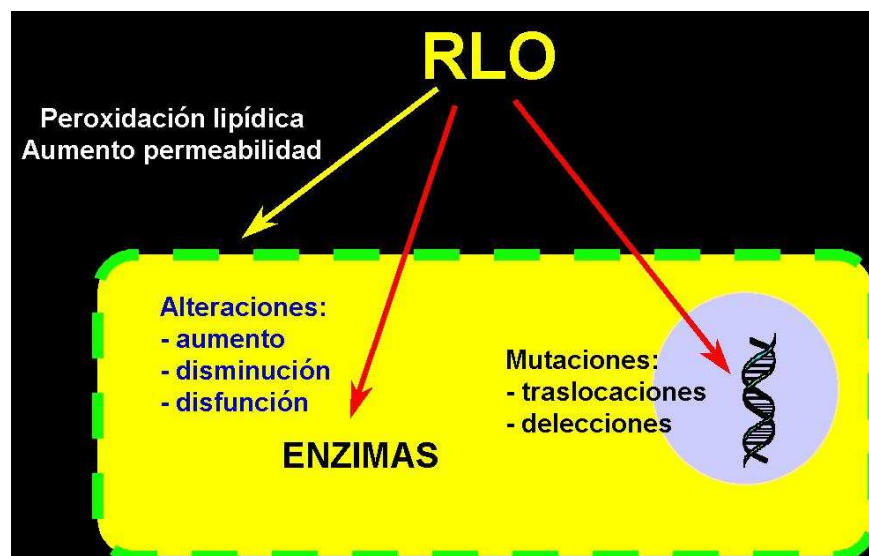


Figura 16.- Efectos de los radicales libres del oxígeno.

Según Von Ausmuth y cols.⁽³⁷⁸⁾ la respuesta inflamatoria sistémica tras la administración de Zymosan es muy precoz, pudiéndose encontrar niveles elevados de radicales libres del oxígeno de manera significativa a las 2 horas postagresión.

Nuestros resultados demuestran un fuerte incremento de la actividad enzimática del sistema defensivo (SOD, CAT y GPX) en los grupos Control Zymosan que se corrobora con la elevación de casi 200 veces en la producción de anión superóxido; en este sentido se demuestra, que a pesar de la puesta en marcha de los mecanismos detoxificantes, éstos son insuficientes para eliminar la explosión oxidativa de la respuesta inflamatoria originada en el modelo experimental utilizado.

La disminución significativa observada en los grupos Celecoxib[®] corrobora la menor morbi-mortalidad observada (mayor supervivencia, menor translocación bacteriana y la preservación de la función)^(124, 187, 274, 364, 379).

Probablemente las causas de la disminución de los RLO en el grupo tratados, sean por orden de importancia:

1. La disminución de la activación e infiltración neutrofílica; los neutrófilos son junto al endotelio los productores principales de estas moléculas. Bath demuestra en modelos *in vivo* una drástica disminución de la infiltración neutrofílica al bloqueo de RLO con NO⁽²³⁾. También Dagher comprueba una disminución de la producción de radicales libres del oxígeno usando un precursor de NO, L-arginina, en un modelo de isquemia reperusión renal⁽⁷⁷⁾.
2. Posiblemente también la menor producción de TNF- α y de otros mediadores de la respuesta inflamatoria y el control de la transcripción nuclear como veremos más adelante (Figura 17) sean también aspectos importantes en este control.

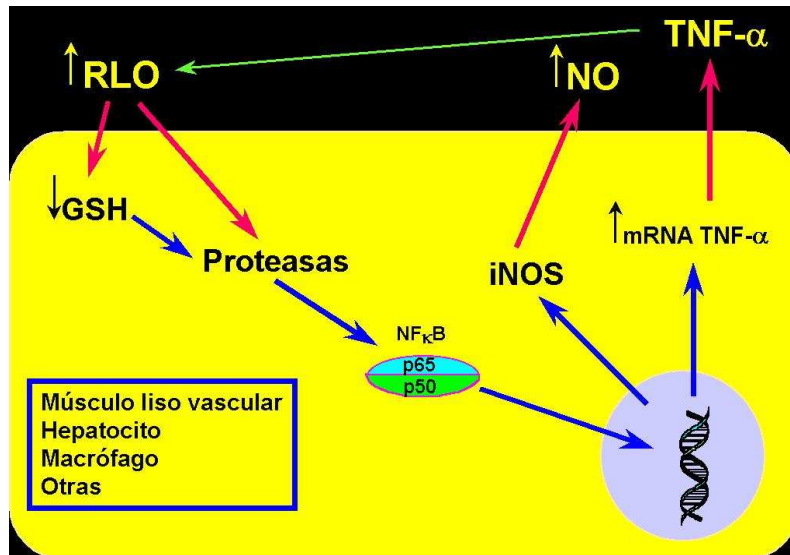


Figura 17.- RLO transcripción nuclear y TNF- α .

El óxido nítrico es uno de los más importantes mediadores de la respuesta inflamatoria; en nuestro estudio comprobamos como su producción se ve incrementada de forma significativa en los grupos control Zymosan, posiblemente esto sea debido a la activación de la iNOS, tal y como comprobamos en nuestros resultados, dependiente de múltiples factores como la producción de RLO, la liberación de citocinas proinflamatorias, la activación de NF κ B, etc. ^(113, 115, 205, 220, 244, 266).

La mayor producción de NO conllevará un incremento de la respuesta inflamatoria ya que de su reacción con los RLO se derivará una mayor peroxidación lipídica al mismo tiempo estimulará la activación de factores transcripcionales como NF κ B los cuales incrementarán la expresión de CAMs y la interacción leucocito-endotelio ocasionando como resultado final una mayor lesión inflamatoria (Figura 18).

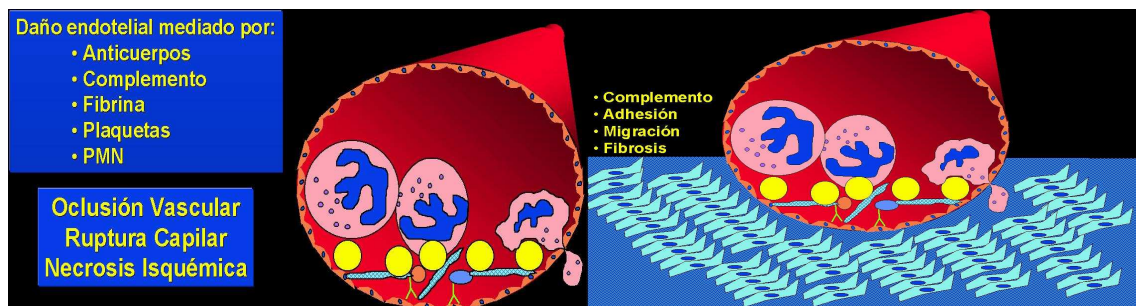


Figura 18.- Lesión endotelial y tisular post-inflamación.

La influencia de las citocinas proinflamatorias, entre ellas TNF- α , IL-1 e INF- γ , en la modulación de la expresión de las CAMs, induciéndolas como en el caso de ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 y E-selectina, o liberándolas como ocurre con la P-selectina, está demostrada^(107, 230, 277, 278, 327, 368, 371, 399). También conocemos la estimulación e incremento de la adhesividad en los neutrófilos por el TNF- α ^(192, 230, 251, 277, 327, 399) e incluso su efecto sobre la activación del factor transcripcional NF κ B^(22, 279). Por estos motivos sospechamos que un posible mecanismo de acción en el efecto beneficioso del fármaco estudiado podría ser la regulación de la producción de citocinas^(67, 124, 188, 259, 305, 361). Por estudios realizados anteriormente (en modelos menos agresivos de TB sin fallo multiorgánico), sabemos que existe un pico elevado de TNF- α a las 2 horas, existiendo un descenso de forma significativa a las 6 horas. Se piensa que este primer pico de TNF- α se debe más a la propia agresión del Zymosan, como ha demostrado Von Asmuth en su modelo⁽³⁷⁸⁾, que al estímulo producido por las bacterias ya translocadas en ese momento de la agresión. Los resultados observados en nuestro trabajo evidencian un incremento de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 e INF- γ) en los grupos Zymosan que disminuyen de forma altamente significativa al ser tratados con Celecoxib[®].

Los mecanismos implicados en el descenso de los niveles de las citocinas pudieran ser:

- Disminución de la activación neutrofílica: los neutrófilos son responsables de su síntesis y células diana de sus acciones. En relación con este razonamiento es interesante apuntar que el TNF- α liberado por neutrófilos induciría la liberación de RLO por otros neutrófilos, quienes a su vez, aumentarían el daño, entre otras, en las células endoteliales, favoreciéndose así el fenómeno de migración leucocitaria⁽²¹⁹⁾. El descenso en el TNF- α bloquearía este proceso de activación autocrina en neutrófilos.
- Por su parte el TNF- α activa el factor transcripcional NF κ B que estimula la expresión de las CAM. La disminución del TNF- α , podría conducir a una menor activación del factor transcripcional, y por tanto menor expresión de las CAM; esto último, conllevaría una disminución en la infiltración neutrofílica⁽¹⁾.
- El factor transcripcional NF κ B de localización citoplasmática, también está implicado en los mecanismos de síntesis de las citocinas que hemos estudiado en nuestro trabajo. Al disminuirse en el foco inflamatorio la

presencia de RLO (menor infiltración neutrofílica), disminuirá el ambiente oxidativo intracelular que favorece la activación del factor transcripcional NF κ B y de esta manera la producción de estas citocinas^(22, 282).

Al observar estos resultados, decidimos estudiar dos citocinas reguladoras de la respuesta inflamatoria como son la IL-6 y la IL-10.

Los Grupos Celecoxib[®] no presentaron ningún cambio, con respecto al Grupo Zymosan en la concentración de esta citocinas de gran importancia en el control de dicha respuesta (Figura 19).

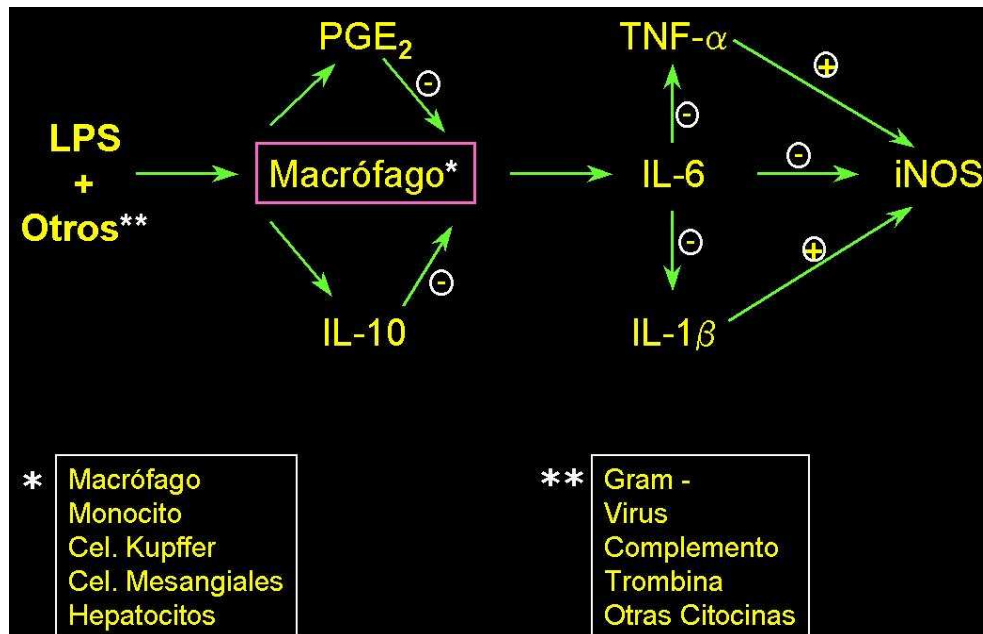


Figura 19.- Regulación de la inflamación por la IL-6 e IL-10.

La corroboración de la disminución de la expresión de las moléculas de adhesión celular estudiadas, aunque siguen siendo significativamente superiores a las detectadas en el grupo Simulado, unido a la menor infiltración neutrofílica se traduce en un efecto protector de primer orden en el síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica que pudiera ser la clave del efecto beneficioso del Celecoxib[®]. En nuestro estudio, la menor expresión detectada en ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina determinará una menor interacción leucocito-endotelio y consecuentemente una menor infiltración neutrofílica, aspecto éste directamente relacionado con el daño en la respuesta inflamatoria; a su vez la menor activación e infiltración neutrofílica conducirá a una menor producción de radicales libres del oxígeno causantes de lesión tisular, éstos a su vez, como mediadores

inflamatorios de primer orden, tienen la capacidad de activar factores transcripcionales como NF κ B responsable, como vimos en apartados anteriores, de la producción de diferentes citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 y el INF- γ responsables del incremento de la expresión de CAMs y en el caso del TNF- α del incremento de producción de RLO. Todo ello redundará en una menor lesión tisular con un mantenimiento de la función del órgano y consecuentemente una menor morbi-mortalidad. La no detección de expresión de la molécula PECAM-1 se debe, posiblemente, a que en el modelo experimental utilizado ésta sea más tardía (hacia las 48 horas) y en el momento que ha sido estudiada fuera ya inapreciable.

Teniendo en cuenta estos resultados, y para evaluar otros posibles mecanismos de acción, decidimos estudiar la activación del factor transcripcional nuclear κ B que como sabemos regula múltiples genes responsables de la producción de, por ejemplo, TNF- α , IL-2, VCAM-1, INF- γ , etc. A pesar de comprobar en nuestro estudio una disminución significativa de la activación de este factor nuclear en el caso de los Grupos Celecoxib[®], no tenemos elementos suficientes para asegurar una acción directa de este fármaco, pudiendo deberse a la modulación observada en la respuesta inflamatoria de forma global.

VI. CONCLUSIONES

1. El modelo y diseño experimentales desarrollados, han demostrado ser válidos para el estudio de la hipótesis y objetivos planteados. La dosis de Zymosan A empleada, induce un síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica que provoca una translocación bacteriana y un fallo multiorgánico con alta mortalidad.
2. El estudio de la respuesta inflamatoria evidencia una grave alteración que conduce a una disfunción orgánica severa y generalizada.
3. El Inhibidor de la COX₂ Celecoxib[®], a pesar de utilizarse a altas dosis, ha presentado una modesta regulación de la respuesta inflamatoria, esto unido a la ausencia de control de la expresión de CAMs y de activación del factor transcripcional κB nos hacen pensar que el modelo experimental empleado no sea el más correcto para la evaluación profiláctica del fármaco y por ello pensamos que se deben utilizar otros, menos agresivos, donde no aparezca el fallo multiorgánico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbot S.E., Kaul A., Stevens C.R., Blake D.R. Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells. Characterization and assessment of adhesion molecule expression. *Arthritis Rheum.*, 35: 401-406; 1992.
2. Abdala HA, Al-Sulaiman MH, Al-Kader AA: FK506 as an alternative in ciclosporin-induced hemolytic uremic syndrome on a kidney transplant recipient. *Transplant Int* 1994, 7:382-384
3. Abdih H, LRCS PI, Kelly CJ et al.: Nitric oxide (endothelium-derived relaxing factor) attenuates revascularization-induced lung injury. *J Surg Res* 1994, 57: 39-43.
4. Aebi H: Catalase in vitro. En: *Methods in enzymology*. Packer L (Ed). Londres. Academic Press Inc 1984, 105: 121-126.
5. Albelda SM, Smith W, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994, 8: 504-512.
6. Alcalde Delgado F: Infecciones urinarias complicadas. En: Jiménez Cruz F y Rioja Sanz L. *Tratado de Urología* 1993, I: 481-497.
7. Alican I and Kubes P: A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *American Physiological Society*. 1996, 270: G225-G237.
8. Alonso Ruiz A. Concepto y clasificación de las enfermedades reumáticas. *Manual SER de las enfermedades reumáticas*. Editores: Alonso Ruiz A y otros. Ed: Panamericana. Madrid 2001. pp: 2 - 7.
9. Altieri DC, Wiltse WL and Edgington TS: Signal transduction initiated by extra-cellular nucleotides regulates the high affinity ligand recognition of the adhesive receptor CD11b/CD18. *J Immunol* 1990, 145: 662-666.
10. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby MD, Korst RJ, Flieder DB, Ferrara CA and cols. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative Paclitaxel and Carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2645-2650.
11. Alvaro - Gracia Alvaro JM. Leflunamida: actualización sobre su eficacia y seguridad en la artritis reumatoide. *Rv. Esp Reumat.*2002; 1 (Supl): 36 – 43
12. Alvaro-Gracia Alvaro JM. Citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas. *Manual SER de las enfermedades reumáticas*. Editores: Alonso Ruiz A y otros. Ed: Panamericana. Madrid 2001. pp: 40 - 45.
13. Alverdy JC and Aoye E: The effect of dexamethasone and endotoxin administration on biliary IgA and bacterial adherence. *J Surg Res* 1992, 53: 450-454.
14. Alverdy JC and Aoye E: The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired mucosal immunodeficient state. *Ann. Surg* 1991, 214: 719-723.

15. Alverdy JC, Aoyo E and Moss GS: Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1988, 104: 185-190.
16. Arnaout MA: Leukocyte adhesion molecules deficiency: Its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev* 1990, 114: 145-147.
17. Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY and Moncada S: Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993, 108: 833-837.
18. Atalla S, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH et al.: Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1985, 40: 584-589.
19. Baeuerle P and Baltimore D: Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NFkB transcription factor. *Cell* 1988, 53: 211-217.
20. Balibrea JL: Factor de necrosis tumoral alfa y shock séptico. *Cir Esp* 1992, 52: 379-381.
21. Balk R and Bone RC: *Septic shock. Critical Care Clinics. Philadelphia. Saunders Company* 1989.
22. Banmann G, Zenkle G, Wenger R et al.: Molecular mechanism of immunosuppression. *Autoimmun* 1992, 5: 67-77.
23. Barber AE, Jones WG II, Minei JP et al.: Bacterial overgrowth and intestinal atrophy in the etiology of gut barrier failure in the rat. *Am J Surg* 1991, 161: 300-304.
24. Barbotin-Larrieu F, Mazmanian M, Baudet B et al.: Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by inhaled nitric oxide in neonatal piglets. *J Appl Physiol* 1996, 80: 782-788.
25. Barton RG, Cerra FB and Wells CL: Effect of a diet deficient in essential fatty acids on the translocation of intestinal bacteria. *JPEN* 1992, 16: 122-128.
26. Barton RW, Rothlein R, Ksiazek J et al.: The effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 on phorbol-ester-induced rabbit lung inflammation. *J Immunol* 1989, 143: 1278-81.
27. Baruch AB, Michiel DF and Oppenheim JJ: Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995, 270: 11703 -11706.
28. Bath PMW, Hassall DG, Gladwin A-M et al.: Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991, 11: 254-260.
29. Becker G, Witzke O, Baltés A et al.: Diltiazem minimizes tubular damage to FK506-mediated nephrotoxicity following ischemia and reperfusion in rats. *Transpl Immunol* 1996, 4: 68-71.
30. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1620-1624; 1990.

31. Beg A, Ruben S, Scheinman R et al.: I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF κ B; a mechanism of cytoplasmic retention. *Genes Dev* 1992, 6: 1728-1739.
32. Berg RD and Garlington AW: 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.
33. Bertin P, Behier JM, Noel E, Leroux JL, Herman H, Jolchine I. Efficacy of celecoxib in patients with acute shoulder pain : Randomized double-blind comparison with naproxen. *Ann Eur Cong Rheumatol* 2001; Abstr. SAT0115.
34. Bessman AN and Sapico FL: Infections in the diabetic patient: The role of immune dysfunction and pathogen virulence factors. *J Diabetes Complications* 1992, 6: 258-262.
35. Beutler B and Cerami AC: Tumor necrosis factor, cachexia, shock, and inflammation: A common mediator. *Ann Rev Biochem* 1988, 57: 505-518.
36. Beutler B, Milsork IW, Cerami AC et al.: Passive immunization against tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985, 229: 869-873.
37. Bevilacqua MP and Pober JS: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci* 1987, 84: 9238-9242.
38. Blank V, Kourilsky P and Israel A: NF κ B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* 1992, 24:135-140.
39. Bone HG and Traber DL: Nitric oxide inhibition in the treatment of septic shock. *Crit Care Med* 1996, 24:1422-1423.
40. Bone RC and Fisher CJ: Sepsis syndrome a valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989, 17: 389-393.
41. Bone RC, Fisher ChJ, Clemmer TP et al.: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987, 317:653-657.
42. Bone RC: A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. *Journal of the American Medical Association* 1991, 266:1686-1691.
43. Bone RC: Let's agree on terminology: Definitions of sepsis. *Crit Care Med* 1991, 19: 973-976.
44. Bone RC: Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Archives of Internal Medicine* 1992, 152:1381-1389.
45. Bone RC: Sepsis syndrome and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *JAMA* 1995, 273:155-156.
46. Bone RC: Sepsis syndrome. Part 2: Coping with the therapeutic challenge. *Journal of Critical Illness* 1991, 6:650-664.

47. Bone RC: Sepsis, the sepsis syndrome, multiple organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med* 1991, 114: 332-333.
48. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991, 115: 457-469.
49. Bounous DI, Enright FM, Gossett KA et al.: Comparison of oxidant production by bovine neutrophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Brucella abortus* strain 2308. *Inflammation* 1992, 16: 215-225.
50. Bradley B, Stuart J and Robbins P: Carbohydrate ligands to LEC cell adhesion molecule. *Cell* 1990, 63: 861-864.
51. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD et al.: Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982, 78: 206-209.
52. Brady AB, Warren JB, Poole-Wilson PA et al.: Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993, 265: H176-182.
53. Brooks SG, May J, Sedman P et al.: Translocation of enteric bacteria in humans. *Br J Surg* 1993, 80: 901-902.
54. Browne BJ, Johnson CP, Edmiston CE et al.: Small bowel transplantation promotes bacterial overgrowth and translocation. *J Surg Res* 1991, 51: 512-517.
55. Buerke M, Weyrich AS, Zheng Z et al: Sialyl Lewisx-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest* 1994, 93: 1140-1148.
56. Burke DJ, Alverdy JC, Aoye E et al.: Glutamine supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch Surg* 1989, 124: 1396-1399.
57. Burke GW, Alejandro R, Roth D et al.: FK506 in simultaneous pancreas/kidney transplantation: lack of impairment of glycemic or lipid metabolism. *Transplant Proc* 1995, 27:3119-3120.
58. Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y et al.: Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J-Neurosci*. 1997; 17:6939-46.
59. Buttrum SM, Hatton R and Nash GB: Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993, 82: 1165-1174.
60. Cacciarelli TV, Sumrani NB, Hong JH et al.: Influence of the timing of FK506 (Tacrolimus) administration on recovery of renal function from warm ischemic injury in rats. *ASAIO J* 1994, 40:964-967.
61. Cakmakci M, Tirnaksiz B, Belek S et al.: Obstructive jaundice and bacterial translocation in rats. *Surgical Infection Society-Europe. & Annual Meeting. Varese, Italy* 1993.
62. Caplan MS and MacKendrick W: Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994, 21: 235-246.

63. Carden DL, Young JA, and Granger DN: Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion: Role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993, 75: 2529-2534.
64. Carey C, Seigfried M and Ma XL: Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Cir Shock* 1992, 38: 109.
65. Cattell V, Cook T and Moncada S: Glomeruli synthesize nitrite in experimental nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 1990, 38: 1056-1060.
66. Cazveielle C., Muller A., Meynier F., Bonne C. Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation-induced neuron injury. *Free Radic. Bio. Med.*, 14: 389-95; 1993.
67. Cerra F: Hypermetabolism, organ failure and metabolic support. *Surgery* 1987, 101:1-14.
68. Cetinkale O, Sengul R, Bilgic L et al.: Involvement of neutrophils in ischemic injury. I Biochemical and histopathological investigation of the effect of FK506 on dorsal skin flaps in rats. *Ann Plast Surg* 1997, 39:505-515.
69. Cheung WY: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980, 207: 19.
70. Chintala M.s., Chiu P.J.S., Vemulapalli S., et al. The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Naunyn-Schmiedes Arch. Pharmacol.*, 348: 305; 1993.
71. Chuan JH, Shien CS, Chang NK et al.: Role of parenteral nutrition in preventing malnutrition and decreasing bacterial translocation to liver in obstructive jaundice. *World J Surg* 1993, 17: 580-586.
72. Ciuffetti G, Mercury M, OTTC et al.: Use of pentoxifylline as an inhibitor of free radical generation in peripheral vascular disease. *Eur J Clin Pharmacol* 1991, 41: 511-515.
73. Clancy R.M., Leszczynska-Piziak J., Abramson, S.B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide production via a direct action on the NADPH-oxidase. *J. Clin. Invest.*, 90: 1116-1121; 1992.
74. Clavien PA, Harvey PR and Strasberg SM: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation* 1992, 53: 957-978.
75. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T lymphocyte activation. *Nature* 1992, 357: 695-697.
76. Cohen J and Carlet J: INTERSEPT: An international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med* 1996, 24:1431-1440.
77. Cohen SB, Parry SL, Feldman M et al.: Autocrine and paracrine regulation of human T cell IL-10 production. *J Immunol* 1997 Jun 15, 158: 596-602.

78. Collantes Estévez E, Gonzalez Fernández C. Infliximab en spondiloartropatías, ¿ el primer fármaco realmente modificador de la enfermedad?. *Rv. Esp. Reumat.* 2002; 1 (Supl): 21 – 25.
79. Colleti LM, Kinkel SL, Walz A et al.: The role of cytokine in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996, 23: 506-511.
80. Collier J and Vallance P: Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci* 1989, 10: 427.
81. Conforti A, Donini M, Brocco G et al.: Acute anti-inflammatory activity and gastrointestinal tolerability of diclofenac and nitrofenac. *Agents Actions* 1993, 40: 176-180.
82. Cooke JP and Tsao PS: Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 1993, 88: 2451-2454.
83. Cooper D, Butcher CM, Berndt MC et al.: P-selectin interacts with a β_2 -integrin to enhance phagocytosis. *J Immunol* 1994, 153: 3199-3209.
84. Cordero Castro JL: La translocación bacteriana como fuente de contaminación e infección de prótesis vasculares. Estudio etiopatogénico. Tesis Doctoral 1995. Universidad de Salamanca.
85. Cosimi AB, Conti D, Delmonico FL et al.: In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in non-human primates with renal allografts. *J Immunol* 1990, 144: 4604.
86. Cristol JP, Thiernemann C, Mitchell JA et al.: Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br J Pharmacol* 1993, 109: 188-194.
87. Culotta E and Koshland DE: NO news is good news. *Science* 1992, 258: 1862.
88. Dagher F, Pollina RM, Rogers DM et al.: The value and limitations of L-arginine infusion on glomerular and tubular function in the ischemic/reperfused kidney. *J Vasc Surg* 1995, 21: 453-459.
89. Davis N, Ghosh S, Simmons DL et al.: Rel associated pp40: An inhibitor of the Rel family of transcriptional factors. *Science* 1991, 253: 1268-1271.
90. Deitch EA and Bridges RM: Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J Surg Res* 1987, 42: 536-542.
91. Deitch EA, Berg RD and Specian RD: Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987, 122: 185-190.
92. Deitch EA, Bridges W, Baker J et al.: Hemorrhagic shock induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation. *Surgery* 1988, 104: 191-198.
93. Deitch EA, Bridges W, Ma L et al.: Hemorrhagic shock induced bacterial translocation. *J Trauma* 1990, 30: 942-947.

94. Deitch EA, Kemper AC, Berg RD et al: A study of relationship among survival, gut-origin sepsis, and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *J Trauma* 1991, 32: 141-147.
95. Deitch EA, Specian RD, Grisham MB et al.: Zymosan-induced bacterial translocation: A study of mechanisms. *Crit Care Med* 1992, 20: 782-788.
96. Deitch EA, Winterton J, Ma L et al.: The gut as a portal of entry for bacteriemia. Role of protein malnutrition. *Ann Surg* 1987, 205: 681-690.
97. Deitch EA, Xu Dz, Qi I et al.: Protein malnutrition alone and in combination with endotoxin impairs systemic and gut associated immunity. *J Parent Enteral Nutr* 1992, 16: 25-31.
98. Deitch EA: Simple intestinal obstruction cause bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989, 124: 699-701.
99. 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: 403-404.
100. Demetris AJ: Transplantation 1992, 53: 1056. US Multicenter FK.506 liver Study Group, *Transplant Proc* 1993, 25: 679
101. Dhar DK, Takemoto Y, Nagasue N et al.: FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. *J Surg Res* 1996, 60:142-146.
102. Díaz M and Menezo L: Cyclosporin for Behsets disease; a long-term study. *Curr Eye Res* 1990, 9: 17-20.
103. Dinarello C.A: Interleukin-1. *The cytokine handbook*. Angus Thomson 31-57. Ed Academic Press LD.London 1994.
104. Dinarello CA: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 1989, 44: 153-205.
105. Dougados M, Behier JM, Jolchine I and cols. Efficacy of celecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, in the treatment of ankylosing spondylitis: A six-week controlled study with comparison against placebo and against a conventional nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Arthritis Rheum* 2001;44 (1): 180-185.
106. Drake M, Friberg H, Boris-Moller F et al.:The immunosuppresant FK506 ameliorates ischaemic damage in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 1996, 158:155-159.
107. Dustin M, Springer TA.: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultures endothelial cells. *J Cell Biol* 1988, 107: 321.
108. Dustin ML and Springer TA: T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989, 341: 619.

109. Edmiston CE and Condon RE: Bacterial translocation. *Surg Gynecol Obstet.*1991, 173: 73-83.
110. El Sayed AA, Haylor J and El Nahas AM: Differential effects of amino acids on the isolated perfused rat kidney. *Clin Sci* 1990, 79: 381-386.
111. Elsner D and Muntze A: Inhibition of synthesis of endothelium-derived nitric oxide in dogs. *Am J Hyp* 1992, 5: 288-291.
112. Emery P, Zeidler H, Kvien TK and cols. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: Randomized double-blind comparison. *Lancet* 1999; 354: 2106-2111.
113. European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. Multicentre randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in the prevention of renal allograft rejection: A report of the European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. *Transplantation* 1997, 64: 436-443.
114. Evangelista V, Piccardoni P, White JG et al.: Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases: Role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 1993, 81: 2947-2957.
115. Exley AR, Cohen J, Buurman W et al.: Monoclonal antibody to TNF in severe septic shock. *Lancet* 1990, 335:1275-1277.
116. Farhood A, McGuire GM, Manning AM et al: Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol* 1995, 57: 368-374.
117. Fernández Regalado J: Regulación de la respuesta inflamatoria por el inmunosupresor FK506 (Tacrolimus) en un modelo de isquemia-reperfusión hepática total. Tesis Doctoral 1998. Universidad de Salamanca.
118. Fiddian-Green RG and Baker S: Nosocomial pneumonia in the critically ill: Product of aspiration or translocation?. *Crit Care Med* 1991, 19: 763-769.
119. Figdor CG and Van Kooyk Y: Regulation of cell adhesion in adhesion: Its role in inflammatory disease. Harlan and Liu Eds. Freeman and Company. New York 1992, 117-150..
120. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD et al.: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992, 257: 387-389.
121. Fisher CJ: Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. The soluble TNF receptor Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996, 27.334:1697-1702
122. Forman HJ and Boveris A: Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. En: *Free Radicals in Biology*. Pryor WA Ed. New York Academic Press 1982, 5: 65-90.

123. Forsyth KD, Simpson AC and Levinsky RJ: CD 15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1 dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1998, 19: 1331.
124. Fradet G, Nechet ar, Huguenin H, Chifoleau A. Hypersensitivity to celecoxib. *Ann Med Inter* 2003; 154 (3): 181-182.
125. Franceschi D, Graham D, Sarasua M et al.: Mechanisms of oxygen free radical-induced calcium overload in endothelial cells. *Surgery* 1990, 108: 292-297.
126. Frank MM: Complement in the pathophysiology of human disease. *N Engl J Med* 1987,1525-1530.
127. Fujino A, Nakaya S, Wakatsuki T et al.: Effets of nitroglycerin on ATP-induced Ca-mobilization, Ca-activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1991, 256: 371-377.
128. Fung JJ, Alessiani K, Abu-Elmagel S et Al. Adverse effects associated with use of FK-506. *Transplant Proc* 1991, 23:3105-3108.
129. Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ et al.: Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987, 90: 687-692.
130. Gaobury J, Woodman RC and Granger DN: NO prevents leukocyte adherence: Role of superoxide. *Am J Physiol* 1993, 265: H 862.
131. García Berreno P, Balibrea JL et al.: Blood coagulation changes in shock. *Surg Gynecol Obstet* 1976, 539-545.
132. García Criado FJ, Eleno N, Santos Benito F et al.: Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation* 1998, 66: 982-990.
133. García Criado FJ, Lozano Sánchez F, Gómez-Alonso A et al.: Possible Tacrolimus action mechanisms in its protector effects on ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1998, 66: 942-943.
134. García Criado FJ, Muñoz Espada B, Martín V et al.: Mortalidad inducida por Zymosan y reducción de la misma por mitridatismo. IX Reun Nac AEC 1993.
135. García Criado FJ, Palma Vargas JM et al.: Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997, 64: 594-598.
136. García Criado FJ, Palma Vargas JM, Gómez-Alonso A et al.: Sulpho-Lewisx diminishes neutrophil infiltration and free radicals with minimal effect on serum cytokines after liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1997, 70: 187-194.
137. García Criado FJ, Toledo Pereyra LH, López Neblina F et al: Role of P-selectin in total hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg* 1995, 181: 327-334.

138. García García J, García Criado FJ, Gómez Alonso A et al.: Radicales libres del oxígeno y sistemas neutralizadores endógenos en la isquemia-reperfusión intestinal. *Cirugía Española* 1995, 57: 412-415.
139. García García J, Martín Rollán C, Ludeña de la Cruz MD et al.: The protective effect of superoxide dismutase (SOD) in intestinal ischemia. *Research in Surgery* 1991, 3: 184-187.
140. García I, Lozano F, García E et al.: Translocación bacteriana. Estudio microbiológico. *Cir Esp* 1992, 52: 221-222.
141. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG et al: Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol*.1991 Aug 1, 147:874-882
142. Gauthier TW, Davenpeck KL and Lefer AM: Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994, 267: G562-G568.
143. Geis S, Hubbard RC, Woods EM, Lefkowitz JB, Yu SS,Zhao W. Efficacy of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, in osteoarthritis of the hip. 14 th Eur Leag Against Rheum Congr, Glasgow 1999; Abstr. 848.
144. Geng JG, Bevilacqua KL, Moore TM et al.: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990, 343: 757-760.
145. Gibbs LS and Lai L: Tumor necrosis factor enhances the neutrophil-dependent increase in endothelial permeability. *J Cell Physiol* 1990, 145: 496-500.
146. Gimbel JS, Brugger A, Zhao W, Verburg KM, Geis GS. Efficacy and tolerability of celecoxib versus hydrocodone/acetaminophen in the treatment of pain after ambulatory orthopedic surgery in adults.*Clin Ther* 2001; 23 (2): 228-241.
147. Glauser MP and Zanetti G: Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991, 338: 732-736.
148. Glauser MP: The inflammatory cytokines: New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 1996, 52:9-17.
149. Gleckman R and Hibert D: Afebrile bacteraemia: A phenomenon in geriatric patients. *Journal of the American Medical Association* 1982, 248:1478-1481.
150. Goldsmith M.: Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor. *The cytokine handbook*. Angus Thomson Ed. Academic Press LD.London 1994, 57-80.
151. Goldstein JL, Correa P, Zhao WW and cols. Reduced incidence of gastroduodenal ulcers with celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor, compared to naproxen in patients with arthritis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (4) : 1019-1027.
152. Gómez Alonso A y García García J: Isquemia-Reperfusión Intestinal: Nuevos Aspectos. *Transtornos circulatorios en Cirugía. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. IV Curso de Avances en Cirugía* 5-9 Julio de 1993. 1994, 323-333.

153. Goris RJ, Van Bebber IP, Mollen RM et al.: Does selective decontamination of the gastrointestinal tract prevent multiple organ failure? An experimental study. *Arch Surg* 1991, 126: 561-565.
154. Goto T, Kino T, Hatanaka H et al.: FK-506: Historical perspectives. *Transplant Proc* 1991, 23: 2713-2719.
155. Gould IM and Wise R: *Pseudomonas aeruginosa*: Manifestaciones clínicas y tratamiento. *Lancet* 1986, 266
156. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988, 255: H1269-H1275.
157. Greenstein SM, Tellis VA and Corey H: Improved paediatric renal transplant graft survival with FK506 rescue therapy. 14th Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians, Chicago, USA 1995, Abstract 51.
158. Grilli M, Chiu J and Lenaro M: NFκB and Rel participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993, 143: 1-62.
159. Griscavage J.M., Rogers E.N., Sherman M.P., Ignarro L.J. Inducible nitric oxide synthase from rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol* 151: 6329-37; 1993.
160. Gruessner RWG for the FK506 Pancreas Transplant Cooperative Study Group. FK506 for induction or rescue therapy after pancreas transplantation: A multicentre analysis. International Congress of the Transplantation Society. Barcelona, Spain 1996, Abstract 187.
161. Grumont RJ, Richardson IB, Gaff C et al.: Rel/NFκB nuclear complexes that bind κB sites in the murine c-rel promoter are required for constitutive c-rel transcription in B-cells. *Cell Growth Differ* 1993, 4: 731-743.
162. Guo W, Andersson R, Ljungh A et al.: Enteric bacterial translocation after peritoneal implantation of rubber drain pieces. *Scand J Gastroenterol* 1993, 28:393-400.
163. Guo W, Andersson R, Wang X et al.: Effect of intraperitoneal prosthetic materials on reticuloendothelial function in the rat. *J Surg Res* 1993, 55: 80-86.
164. Guo W, Andersson R, Willen R et al.: Bacterial translocation after intraperitoneal implantation rubber fragments in the splenectomized rat. *J Surg Res* 1994, 57: 408-415.
165. Guo W, Soltesz V, Ding JW et al.: Abdominal rubber drain pieces aggravates intraabdominal sepsis in the rat. *Eur J Clin Invest* 1994, 24: 540-547.
166. Guzman-Stein G, Bonsack M, Liberty J et al.: Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res* 1989, 46: 104-107.

167. Gyllfors P, Bochenec G, Overholt J, Druppka D, Kumlin D, Sheller J, Nizankowska. Biochemical and clinical evidence that aspirine-intolerant asthmatic subjects tolerate the cyclooxygenase-2-selective analgetic drug celecoxib. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (5): 1116-1121.
168. Han J, Thompson P and Beutler B: Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med* 1990, 172: 391-394.
169. Han KT, Sharar SR, Phillips ML et al.: Sialyl Lewis(x) oligosaccharide reduces ischemia-reperfusion injury in the rabbit ear. *J Immunol* 1995, 155: 4011-4015.
170. Harlan J, Winn R, Vedder N et al.: In vivo models of leukocyte adherence to endothelium. En: Harlan and Liu Eds. *Adhesion: Its role in inflammatory disease*. Freeman and Company, New York 1992, 117-150.
171. Hattori R and Hamilton K: Stimulated secretion of endothelial cell von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989, 264: 7768-7771.
172. Häyry P and Yilmaz S: Chronic allograft rejection: An update. *Transplant Proc* 1994, 26:3159-3160.
173. Heinrich PC, Castell JV and Andus T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990, 265:621-636.
174. Helton WS and García R: Oral prostaglandin E2 prevents gut atrophy during intravenous feeding but not bacterial translocation. *Arch Surg* 1993, 128: 178-183.
175. Herndon DN and Zeigler ST: Bacterial translocation after thermal injury. *Crit Care Med* 1993, 21: S50-54.
176. Hession C, Osborn L, Goff D et al.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: Direct expression cloning and functional interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 1673.
177. Hession C, Tizard R, Vassallo C et al.: Cloning of an alternate form of vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 1991, 266: 6682.
178. Hogg N and Darley : Production of OH radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992, 281: 419-424.
179. Horton JW: Alterations in intestinal permeability and blood flow in a new model of mesenteric ischemia. *Circ Shock* 1992, 36: 134-139.
180. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song XQ, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 2000; 275 (15):11397- 11403.
181. Hsueh W and Sun X: The role of the complement system in shock. *Immunology* 1990, 70: 309-314.

182. Hunter T and Karin M: The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 1994, 70: 375-387.
183. Hutchinson IV, Bagnall W, Bryce P et al.: Differences in the mode of action of cyclosporine and FK 506. *Transplantation proceedings*. Elsevier Science Inc. Stony Brook, New York 1998, vol 130, n°4.
184. Hwang TL: Preservation of the small bowel mucosa using glutamine-enriched parenteral nutrition. *Surg Forum* 1986, 37: 56-58.
185. Hynes RO: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987, 48: 549.
186. Ignarro A: Presented at the "NO: Advances in therapeutic application and commercial development" on March 17-18, IBC Symposiums, Philadelphia PA 1994.
187. Inoue T, Fukuo K, Morimoto S et al.: Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E2 production by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 194: 420-426.
188. Insky DJ, Naka Y, Chowdhury N P et al.: The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation. Critical role in successful lung preservation. *Proc Natl Sci USA* 1992, 91: 12086-12090.
189. Isajji S, Suzuki M, Frey CF et al.: Role of bacterial infection in diet induced acute pancreatitis in mice. *Int J Pancreatol* 1992, 11: 49-57.
190. Ischiropoulos H, Chen J, Tsai et al.: Peroxynitrite (ONOO) reacts with superoxide dismutase to give the reactive nitronium ion. *Free Rad Biol Med* 1990, 9: 131-136.
191. Jacobs DE: Trophic effects of glutamine-enriched parenteral nutrition on colonic mucosa. *Journal Parenter Enter Nutr* 1988, 6-9.
192. Jaconi ME, Theler JM, Schlegel W et al.: Multiple elevations of cytosolic-free Ca^{2+} in human neutrophils: Initiation by adherence receptors of the integrin family. *J Cell Bio* 1991, 112: 1249-1255.
193. Jaeschke H and Farhood A: Neutrophil and kupffer self-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991, 260: G355-362.
194. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP et al.: Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993, 17: 915-923.
195. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP et al: Complement activates kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993, 264: 801-809.
196. Jean T and Bodinier MC: Mediators involved in inflammation: Effects of Daflon 500 mg on their release. *Angiology* 1994, 45: 554-559.

197. Jerome S, Dore M, Paulson J et al.: P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: Role in the genesis of postischemic no-reflow. *Am J Physiol* 1994, 266: H1316-H1321.
198. Jiménez Vaquero I, García Criado FJ, García García J et al.: Modelo experimental de isquemia-reperfusión en el perro. Valoración de lesiones y efecto profiláctico del alopurinol. *Cirugía Española* 1995, 58: 516-520.
199. Johanson A and Moller E: Evidente that the inmunosupresive effects of: FK-506 and ciclosporine are identical. *Trasplantation* 1990, 50:1001-1007.
200. Johnson G III, Tsao PS, Mullory D et al.: Cardioprotective effects of acidified sodium nitrate in myocardial ischemia with reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 252: 35-41.
201. Johnson III G, Tsao PS and Lefer AM: Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Critical Care Medicine* 1991, 19: 244-252.
202. Jones MK, Wang H, Peskar BM and cols. Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999; 5 (12): 1418- 1423.
203. Jones WG II, Barber AE, Minei JP et al.: Splanchnic vasoconstriction and bacterial translocation after thermal injury. *Am J Physiol* 1991, 261: H1190-1196.
204. Jones WG II, Barber AE, Kapur S et al.: Pathophysiologic glucocorticoid levels and survival of translocating bacteria. *Arch Surg.*1991, 126: 50-55.
205. Jones WG II, Minei JP, Barber AE et al.: Differential pathophysiology of bacterial translocation after thermal injury and sepsis. *Ann Surg* 1991, 214: 24-30.
206. Joyce ChD and Fiscus RR: Calcitonin gene-related peptide levels in sepsis. *Surgery*, 1990, 108: 1097-1100
207. Joyce LD, Hau T, Hoftman R et al.: Evaluation of the mecanism of zymosan induced resistance to experimental peritonitis. *Surgery* 1978, 83: 717-725.
208. Kawano K, Kim Yi, Kai T et al.: Evidence that FK506 alleviates ischemia/reperfusion, injury to the rat liver: in vivo demostration for supression of TNF-a production in response to endotoxemia.*Eur Surg Res* 1994, 26: 108-115.
209. Kawano K, Bowers JL, Kim Yi et al.:FK506 reduces oxitative hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation.*Transplant Proc* 1996, 28:1902-1903.
210. Keithley JK: The significance of enteral nutrition in the intensive care unit patient. *Crit Care Nurs Clin North Am* 1993, 5: 23.
211. Kim Yi, Akizuki S, Kawano K et al.:FK506 prevents critical warm ischemia damage to the pig liver and improves hepatic microcirculation.*Transplant Proc* 1994, 26: 2384-2387.
212. Kitamura M, Hiraga S, Kobayashi T et al.: Clinical experience of FK506 for renal allograft transplantation. *Transplant Proc* 1994, 26:1924-1926

213. Kluger M.J and Liu DY: Interleukin 1, tumor necrosis factor, and ischemic injury. In Zelenock GB, D'Alecy LG, Fantone JC Eds. *Clinical ischemic syndromes: mechanisms and consequences of tissue injury*. Philadelphia: Mosby 1990, 287-302.
214. Kobayashi T, Ohmori T, Yanai M et al.: The analysis of the defense mechanism against indigenous bacterial translocation in X-irradiated mice. *Microbiol Immunol* 1991, 35: 315-324.
215. Koide M., Kawahara Y., Nakayama I., Tsuda T., Yokoyama M. Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*, 268: 21959-66; 1993.
216. Koopman G, Van Kooyk Y, De Graaff M et al.: Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J Immunol* 1990, 145: 3589-3594.
217. Korthuis RJ, Smith JK and Carden DL: Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989, 256: H315-319.
218. Kreger BE, Craven DE, Carling PC et al.: Gramnegative bacteriemia. III. reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980, 68: 332-343.
219. Kubes P, Hunter A and Granger DN: Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterology* 1992, 103: 807-812.
220. Kubes P, Ibbotson G, Russell J et al.: Role of platelet-activating factor in ischemia-reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990, 259: 286-292.
221. Kubes P, Julita M and Payne D: Therapeutic potential of inhibiting rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995, 95: 2510-2519.
222. Kubes P, Kanawar S, Niu XF et al.: NO synthesis inhibition induced leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J* 1993, 7: 1293-1298.
223. Kubes P, Suzuki M and Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 4651-4655.
224. Kubes P, Suzuki M and Granger DN: Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: the role of adherent leukocytes. *Am J Physiol* 1990, 258: G158-G160.
225. Kueppers PM, Miller TA, Chen CY et al.: Effect of total parenteral nutrition plus morphine on bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1993, 217: 286-292.
226. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M et al.: Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994, 74: 336-343.
227. Kurose I, Wolf R, Grisham MB et al.: Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994, 74: 376-382.

228. La Rosa CA, Rohrer MJ, Benoit SE et al.: Human neutrophil cathepsin G is a potent platelet activator. *J Vasc Surg* 1994, 19: 306-319.
229. Laffineur G, Lescut D, Vicent et al.: Bacterial translocation in Crohn disease: *Gastroent Clin Biol* 1992, 16: 777-781.
230. Lange JR, Alexander HR, Merino MJ et al.: Interleukin 1 alpha prevention of the lethality of *Escherichia coli* peritonitis. *J Surg Research* 1992, 52: 555-559.
231. Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR et al.: Nitric oxide: A new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993, 55: 1205-1208.
232. Larsen E, Palabrica T, Sajer S et al.: PADGEM dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 1990, 63: 467-471.
233. Laskow D, Vincenti F, Neylan J et al.: Phase II FK506 multicenter concentration control study: one-year follow-up. *Transplant Proc* 1995, 27:809-811.
234. Lasky L.A: Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992, 258: 964-969.
235. Latta K, Offner G, Oldhafer K et al.: Tacrolimus nach nierentransplantation bei kinders. *transplantations medizin* 1994, Suppl S19.
236. Laudanno OM, Cesolari JA, Esnarriaga J and cols. Gastrointestinal damage induced by celecoxib and rofecoxib in rats. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2000; 30 (1): 27-33.
237. Lee WP, Gribling P, De Guzman L et al.: A P-selectin - immunoglobulin G chimera is protective in a rabbit ear model of ischemia-reperfusion. *Surgery* 1995, 117: 458-565.
238. Leese PT, Hubbard RC, Karim A, Isakson PC, Yu SS, Geis GS. Effects of celecoxib, a novel cyclooxygenase inhibitor, on platelet function in healthy adults: A randomised , controlled trial. *J Clin Pharmacol* 2000; 38 (3): 225-242.
239. Lefer AM and Xin-Liang MA: PMN adherence to cat ischemic-reperfused mesenteric vascular endothelium under flow: Role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1994, 76: 33-38.
240. Lefer AM, Weyrich AS and Buerke M: Role of selectins, a new family of molecules in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1994, 28: 289-294.
241. Lefer AM: Role of selectins in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995, 60: 773-777.
242. Lefer D.J: Anti-neutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor following acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1993, 88: 2337-2350.
243. Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML et al.: A novel sialyl Lewis x analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994, 90: 2390-2401.

244. Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE et al.: Antineutrophil and myocardial protection actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1993, 88: 2337-50.
245. Lefer DJ: The role of NO in the modulation leukocyte adhesion to the endothelium. Presented at the "NO: Advances in therapeutic application and commercial development" on March 17-18, IBC Symposiums. Philadelphia PA 1994.
246. León C, Jiménez P, Sánchez MA et al.: Nuevos conceptos de sepsis y síndrome séptico. Correlato etiológico. *Vev Cli Esp* 1996, 196:27-31.
247. Leturcq DJ, Moriarty AM, Talbott GA et al.: Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced Shock *J Clin Invest* 1996, 98:1533-1538.
248. Li JT, Li JS, Zhan XB, Cui ZM, Nei SN. Experimental study of the safety of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, for gastric mucosa. *Chinese J Digest Dis* 2003; 4: 53-56.
249. Liang L, Hu DP, Liu WM, Williams JP, Okunieff JP, Ding I. Celecoxib reduces skin damage after radiation. *Am J Clin Oncol-Canc* 2003; 26 (4 suppl 2): 114-121.
250. Linas S, Whittenburg D and Repine JE: Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol* 1997, 272: F48-54.
251. Lisse J, Espinoza L, Zhao SZ, Dedhiya SD, Osterhaus JT. Functional status and health related quality of life of elderly osteoarthritic patients treated with celecoxib. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 2001; 56 (3): 167-175.
252. Lobb R, Chi-Rosso G, Leone D et al.: Expression and functional characterization of a soluble form on vascular cell adhesion molecule 1. *Biochem Biophys Res Comm* 1991, 178: 1498-1504.
253. Lonehampt M, Guardiola ., Sicot N et al.: Protective effect of a purified flavonoid fraction against reactive oxigen radicals. In vivo and in vitro study. *Arzeim-Forsch/ Drugnes* 1989, 39: 882-885.
254. López Neblina F, Páez Rollys A, García Criado FJ et al.: El óxido nítrico exógeno previene el rodamiento y la adhesión leucocitaria en la isquemia mesentérica en la rata. *Cirujano General* 1995, 17: 90-93.
255. Lorant DE, Topham M, Whatley RE et al.: Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993, 92: 559-570.
256. Lowendthal J, Ballard D, Bohnlein E et al.: TNF induces proteins that bind specifically to kB-like enhanced elements and regulate interleukin 2 receptor a chain gene expression in primary T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2331-2335.
257. Lowry SF: Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993, 128: 1235-1241.

258. Lozano-Sánchez F, García-Criado FJ, García-García I et al.: Modelo experimental sobre translocación bacteriana: *Nutr Hosp* 1993, 8: 405-410.
259. Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM et al.: Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- α -inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1994, 152: 5883-5889.
260. Ma X.L, Weyrich AS, Lefer DJ et al.: Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Cir Res* 1993, 72: 403-412.
261. MacKendrick W, Caplan M and Hsueh W: Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. *Pediatr Res* 1993, 34: 222-228.
262. Maggi E, Parronchi P, Manetti R et al.: Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992, 148:2142-2147.
263. Mainous MR, Tso P, Berg RD et al.: Studies of the route, magnitude and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 1991, 126: 33-37.
264. Malmstrom K, Daniels S, Kotey P, Seidenberg BC, Desjardins PJ. Comparison of rofecoxib and celecoxib, two cyclooxygenase inhibitors, in postoperative dental pain: A randomised, placebo and active-comparator-controlled clinical trial. *Clin Ther* 1999; 21 (10): 1653-1663.
265. Mantry PS, Shan A, Sundaram U. Celecoxib associated esophagitis: Review of gastrointestinal side effects of COX-2 inhibitors. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37 : 61-63.
266. Marletta MA, Tayeh MA and Hevel JM: Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors* 1990, 2: 219-223.
267. Marshall JC: The ecology and immunology of gastrointestinal tract in health and critical illness. *J Hosp Infect* 1991, 19: 7-17.
268. Martín García C, Hinojosa M, Berges P, Camacho E, García Rodríguez R, Alfaya T. Celecoxib, a highly selective COX-2 inhibitor, is safe in aspirine induced asthma. *J Invest Allerg Clin* 2003; 13 (1): 20-25.
269. Martín Mola E, Cantalejo Moreiro M. Terapia biológica de las enfermedades reumáticas. Manual SER de las enfermedades reumáticas. Editores: Alonso Ruiz A y otros. Ed: Panamericana. Madrid 2001. pp: 210 – 219.
270. Martín Vicente V: Modelo experimental de TB (Zymosan IP). Tesis Doctoral 1994. Universidad de Salamanca.
271. Martínez Luengas F y Grupo Colaborador Estudio septicemias. Bacteriemia en seis hospitales españoles. Monografía SEIMC nº2, Ruan Ed. Madrid 1985, 117-161.

272. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K and Kawasaki T: Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 1986, 99: 184-191.
273. Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD et al.: Role of L-arginine-nitric pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* 1992, H616-H620.
274. Mathew NT, Kailasam J, Fischer A. Responsiveness to celecoxib in chronic paroxysmal hemicrania. *Neurology* 2000; 55 : 316.
275. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H et al.: Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin deficient mice. *Cell* 1993, 74: 541-554.
276. McAdam BF, Catella LF, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX-2) :The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 96 (1): 272-277.
277. McCall T, Whittle BJR, Broughton-Smith NK et al.: Inhibition of FMLP induced aggregation of rabbit neutrophils by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1988, 95: 617-20.
278. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985, 312: 159-163.
279. McEver RP. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1992, 4: 840-849.
280. McEver RP: Selectins: Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *thromb. Haemost* 1991, 65: 223-228.
281. Meakins JL, Micklund B, Forse RA et al.: The surgical intensive care unit: Current concepts in infection. *Surg Clin North Am* 1980, 60:117
282. Medich DS, Lee TK, Melhem MF et al.: Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg* 1993, 165: 46-52.
283. Michie HR, Manogne KR, Springs DR et al: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988, 318:1481-1485.
284. Ming WJ, Bersani L and Mantovani A: Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987, 138: 1469-1473.
285. Minnard EA, Show JA, Naama H et al.: Inhibition of NO synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* 1994, 129: 142-146.
286. Misawa K, Toledo-Pereyra LH, Phillips ML et al.: Role of sialyl-Lewisx in total hepatic ischemia and reperfusion. *J. Am.Coll.Surg.* 1996, 182: 251-256.
287. Misra HP and Fridovich Y: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972, 247: 3170-3175.
288. Moncada RM, Palmer MJ and Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43: 109-116.

289. Mora EM, Cardona MA and Simmons RL: Enteric bacteria and ingested inert particles translocate to intraperitoneal prosthetic materials. *Arch Surg* 1991, 126: 157-163.
290. Morehouse JL, Specian RD, Stewart JJ et al.: Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment. *Gastroenterology* 1986, 91: 673-682.
291. Moreno-Sierra J, Carro-Rubias C, Chicharro-Almarza J et al.: Shock séptico de origen urológico. En: *Infecciones urinarias y shock séptico* Resel Estévez L Ed Servicio de Publicaciones Universidad Complutense. Madrid 1997, 343-363.
292. Mori A, Suko M, Nishizaki Y et al.: Regulation of interleukin-5 production by peripheral blood mononuclear cells from atopic patients with FK506, cyclosporin A and glucocorticoid. *Int Arch Allergy Immunol* 1994, 104: 32-35.
293. Mullane KM, Kraemer R and Smith B: Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Meth* 1985, 14: 157-167.
294. Mullane KM: Myocardial ischemia-reperfusion injury. Role of neutrophils and neutrophil derived mediators. In: *Current Concepts in Immunology. Clinical Immunology. Vol 1. Human Inflammatory Disease.* Marone G DE. Burlington ON Canada BC Decker 1988, 143-159.
295. Mulligan MS, Paulson JC, Frees SD et al.: Protective effect of oligosaccharides in P-selectin-dependent lung injury. *Nature* 1993, 364: 149-151.
296. Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ et al.: Neutrophil-dependent acute lung injury: Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest* 1992, 90: 1600-1607.
297. Murakami M and Suzuki H: Effect of L-arginine on systemic and renal hemodynamics in conscious dogs. *Clin Sci* 1991, 81: 727-732.
298. Murohara T, Buerke M and Lefer AM: Polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction: Role of selectins. *Arterioscler Thromb* 1994, 14: 1509-1519.
299. Murr D, Bocquet H, Lelouet H, Fischer RM, Revuz J, Cosnes A. Adverse cutaneous reaction to celecoxib: 6 cases. *Ann Dermatol Vener* 2003; 130: 519-521.
300. Muscara MN, Mcnight W, Asfaha S, Wallace JL. Wound collagen deposition I rats: Effects of a NO- NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Brit J Pharmacol* 2000; 129 (4): 681-686.
301. Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F and cols. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Brit J Pharmacol* 2000; 129 (7): 1423-1430.
302. Myers SI, Hernandez R and Castaneda A: Possible role for oxygen free radicals in the regulation of renal nitric oxide synthesis and blood flow. *Am J Surg* 1995, 169: 604-608.

303. Nakanishi K, Binten-Johansen J, Lefer DJ et al.: Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992, 263: H-1650-1658.
304. Napolitano LM, Koruda MJ, Meyer AA et al.: The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and gut permeability. *Surgical Infection Society: 12 Annual Meeting*. Los Angeles, California 1992.
305. Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatology* 1997, 24 (Suppl. 49): 6-8.
306. Nishiyama R, Nakamura S, Suzuki S et al.: Platelet-activating factor in hepatic ischemia/reperfusion injury. The effect of a PAF antagonist combined with a prostaglandin I2 analogue. *Transplantation* 1993, 55: 1261-1265.
307. O'Donnell FT, Clowes GA et al.: Kinin activation in the blood of patients with sepsis. *Surg Gynecol Obstet* 1976, 539-545.
308. Ognibene FP: Pathogenesis and innovative treatment of septic shock. *Adv Intern Med* 1997, 42:313-338.
309. Oka Y, Chowdhury NC, Liao H et al.: Enhanced preservation of photoperically transplanted rat lungs by nitroglycerin but not hidralazine. *Circ Res* 1995, 76: 900-906.
310. Okada Y, Copeland BR, Mori E et al.: P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *stroke* 1994, 25: 202-211.
311. Okano K, Hamamoto I, Izuishi K et al.: Ameliorative effect of FK506 on cold ischemia reperfusion injury of the rat liver. *Transplant Proc* 1994 Aug, 26: 2367-2369.
312. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T et al.: Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits: Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Inves* 1988, 81:1162-1172.
313. Olivier C, Carballido J and Hernández Lao A: Sepsis y shock séptico genitourinario. En: *Patología infecciosa en Urología*. Joaquín Carballido y Miguel Gobernado. Ed Ergon S.A. Madrid 1998, 147-179.
314. Oppenheim JJ and Neta R: Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. *FASEB J* 1994, 8: 158-162.
315. Osborn L, Hession C, Tizard R et al.: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecules-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989, 59: 1203-1207.
316. Osborn L, Kunkel S and Nabel G: TNF and IL-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of nuclear factor kB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2336-2340.
317. Osborn L: Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990, 62: 3-17.

318. Padmaja S, Huie RE: The reaction of nitric oxide with organic peroxil radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 195: 539-544.
319. Páez-Rollys A, Toledo-Pereyra LH, López-Neblina F et al.: Endothelial cell adhesion molecules and kidney transplantation. *Transplantation* 1995, 6: 134-138.
320. Paglia DE, and Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1957, 70: 158-164.
321. Pape HC, Dwenger A, Gollub F and Sturm JA: Intestinal permeability and multiple organ failure after polytrauma. *Surgical Infection Society. 12 Annual Meeting. Los Angeles. California* 1992.
322. Parekh RB and Edge CJ: Selectins - glycoprotein targets for therapeutic intervention in inflammation. *Focus* 1994, 12: 339-345.
323. Parker MM and Parrilo JE: Septic Soc.: Hemodynamics and patogénesis. *JAMA* 1983, 250:3324-3328
324. Parks DA and Granger DN: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986, 250: G749-752.
325. Parreño Manchado F : Modulación de la interacción leucocito endotelio con GM 1998-016 en un modelo inflamatorio de translocación bacteriana inducido por Zymosan A. Tesis Doctoral 1997. Universidad de Salamanca.
326. Parrillo JE: Septic shock in humans. *Ann Inter Med* 1990, 113: 227-242.
327. Pasqui AJ, and Capechi PI: Nitroprusside in vitro inhibits platelet aggregation and intracellular calcium translocation: Effect of hemoglobin. *Thromb Res* 1994, 61:113-122.
328. Payne D and Kubes P: Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 1993, 265: G189-G195.
329. Peitzman AB, Udekwu AO, Ochoa J et al.: Bacterial translocation in trauma patients. *J Trauma* 1991, 31: 1083-1087.
330. Peña Pérez A: Translocación bacteriana y radicales libres del oxígeno: Estudios cuali-cuantitativos tiempo-dependientes del proceso y de los efectos de la pentoxifilina sobre el mismo. Tesis Doctoral 1995. Universidad de Salamanca.
331. Penning TD, Talley JD, Bertenshaw SR and cols. Synthesis and biological evaluation of the 1,5- diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: Identification of 4-(5- (4-methylphenyl)-3- (trifluoromethyl)1H- pyrazol-1-yl) benzenesulfonamide. *J Med Chem* 1997; 40 (9): 1347- 1365.
332. Peracaula R: Fisiopatología del shock séptico. *Barcelona Edit MCR* 1991,19-23.
333. Perez- Garcia C, Maymó-Guarch J, Benito- Ruiz P. Inluencia del infliximab en la resistencia antimicrobiana. *Rev. Esp. Remat.* 2002; 1(Supl): 61 – 69.

334. Perry MA and Wadhwa SS: Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1988, 254: G366-368.
335. Peters DH, Fitton A, Plosker GL et al.: Tacrolimus: A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993, 46:746-794
336. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC et al.: ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. *Science* 1990, 250: 1130-1132.
337. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS.: A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporin for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1997, 63:977-983.
338. Pober JS and Gimrone MA: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J Immunol* 1986, 137: 1893-1896.
339. Pober JS, and Lapierre LA: Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: Comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 1987, 138: 3319-3324.
340. Poole GV: Spontaneous bacterial peritonitis during bowel preparation: An example of clinical translocation. *South Med J* 1991, 84: 1412-1413.
341. Preston R, Ball S, Cairns T et al.: FK506 as primary immunosuppressive therapy in renal transplantation. *Transplant Proc* 1998, 30:1214-1216.
342. Radomski MW, Palmer RMJ and Moncada S: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987, 92: 181-187.
343. Radomski MW, Palmer RMJ, and Moncada S: The antiaggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 1987, 92: 639-646.
344. Recart A, Issioui T, white PF, Klein K, Watcha MF, Stool L, Shah M. The efficacy of celecoxib premedication on postoperative pain and recovery times after ambulatory surgery: a dose ranging-study. *Anesth Analg* 2003; 96 (6):1631- 1635.
345. Redrup AC, Howard BP, MacGlasham DW Jr et al.: Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by human basophils: Their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures. *J Immunol* 1998 Feb 15, 160: 1957-1964.
346. Rees DD, Palmer RMJ and Moncada S: Role of endothelium derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 3375-3379.
347. Reese RE and Douglas RG: A practical approach to infectious diseases. Segunda edición. Boston Little Brown 1986.

348. Reinhart K: Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal antitumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195 F, in patients with sepsis and septic shock: A multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med* 1996, 24:727-729.
349. Rettori V, Gimero M, Lyson K et al.: Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E-2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 11543-11546.
350. Reuter B., Cirino G and Wallace JL: Markedly reduced intestinal toxicity of a diclofenac derivative. *Life Sci* 1994, PL1-PL8.
351. Ridings PC, Julita MA, Fisher BJ et al.: Sepsis-induced acute lung injury is attenuated by selectin blockade following the onset of sepsis. *SIS 15 Annual Meeting*. Louisville, Kentucky 1995.
352. Riendeau D, Charleson S, Cromlish W, Mancini JA, Wong E, Guay J. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75 (9): 1088-1095.
353. Risueño JC, Gómez Alonso A, García Criado FJ et al.: Effect of anaesthesia and acute intestinal ischemia on serum β -N acetylhexosaminidase activity in rabbit as biological model. *Clinica Chimica Acta* 1992, 208:127-131.
354. Roberstson FM, Oggner PJ, Ciceri D et al.: Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg* 1994, 129: 149-156.
355. Rogers NF and Ignarro LJ: Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem: Biophys Res Commun* 1992, 189: 242-249.
356. Rothenbach, R., Turnage, R.H., Riva, A., Bartula, L., Myers, S.L. Downstream effects of splanchnic ischemia/reperfusion injury on renal function and eicosanoid release. *J. Appl. Physiol.*, 253: 1173-1175, 1997.
357. Runkel NS, Moody F., Smith GS et al.: The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res* 1991, 51: 18-23.
358. Saadia R, MacFarlane MS and Boffard D: Gut barrier function and surgeon. *Br J Surg* 1990, 77: 487-492.
359. Sakr M, Zetti G, McClain C et al.: The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1992, 53:987-991.
360. Sánchez-Cantú L, Rode HN and Christou NV: Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch Surg* 1989, 124: 1432-1436.

361. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM et al.: Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992, 80: 795-800.
362. Saran M: Reaction of NO with O₂. Implication for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Rad Res Commun* 1990, 10: 221-226.
363. Scales WE, Campbell JR, Green ME et al.: Hepatic ischemia/reperfusion injury: Importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions. *Am J Physiol* 1994, 267: G1122-1127.
364. Scheler MH, Banmann G and Zenke G: Inhibition of T-cell signaling pathways by immunophilin drug complexes: Are side effects inherent to immunosuppressive properties. *Transplant Proc* 1993, 25: 502-507.
365. Schneeberger H, Zanker B, Hillebrand G et al.: Tacrolimus as a primary immunosuppressive therapy in cadaveric renal transplantation: Five year's experience at a single center. *Transplant Proc* 1998, 30:1598-1600.
366. Schreiber SL: Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991, 251: 283-287.
367. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO et al.: Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1993, 142: 1217-1226.
368. Seekamp A, Till GO, Mulligan MS et al.: Role of selectins in local and remote tissue injury following ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1994, 144: 592-598.
369. Seekamp A, Warren JS, Remick DG et al.: Requirements for tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol* 1993, 143: 453-463.
370. Senkal M, Kemen M, Homann HH et al.: Postoperative modulation of cellular immunity and the acute phase reaction by enteral nutrition supplemented with arginine, RNA, and omega-3 fatty acids: A double blind, prospective trial in 42 patients with cancer. *Surgical Infection Society-Europe. 6 Annual Meeting. Varese, Italy* 1993.
371. Shalaby MR, Waage A, Aarden L et al.: Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1989, 53:488-498.
372. Shapiro R, Jordan ML, Scantlebury VP et al.: Outcome after steroid withdrawal in renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression *Transplant. Proc* 1998, 30:1375-1378.
373. Sharar SR, Sasaki SS, Flaherty L et al.: P-selectin blockade does not impair leukocyte host defense against bacterial peritonitis and soft tissue infection in rabbits. *J Immunol* 1993, 151: 4982-4988.
374. Sharkey J and Butcher SP: Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature* 1994, 371: 336-339.

375. Sheiner P, Marshall J, Sudsbury R et al.: Modulation of kupffer cell cytokine production in response to an inflammatory stimulus. 12 Annual Meeting. Los Angeles, California 1992.
376. Shimizu Y and Shaw S: Mucins in the mainstream. *Nature* 1993, 16: 630-631.
377. Shinohara M, Kayashima K and Konomi K: Protective effects of verapamil on ischemia-induced hepatic damage in the rat. *Eur Surg Res* 1990, 22: 256-262.
378. Shirihama T. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2000; 6 (6): 2424-2430.
379. Siegfried MR, Erhardt J, Rider T et al.: Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992, 260: 668-675.
380. Silver MJ, Sutton JM, Hook S et al.: Adjunctive selectin blockade successfully reduces infarct size beyond thrombolysis in the electrolytic canine coronary artery model. *Circulation* 1995, 92: 492-499.
381. Simmons D, Makgoba MW and Seed B: ICAM and adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 1988, 331: 624-628.
382. Simon LS, Wever AL, Graham DY and cols. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: A randomised controlled trial. *J Am Med Assoc* 1999; 282 (20): 1921- 1928.
383. Simpson PJ, Fantone JC and Lucchesi BR: Myocardial ischemia and reperfusion injury: Oxygen radicals and the role of the neutrophil. In: *Oxygen Radicals and Tissue Injury, Proceedings of an Upjohn Symposium*. Halliwell B Kalamazoo MI 1988, 63-77.
384. Simpson SQ and Casey LC: Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. *Crit Care Clin* 1989, 5: 27-43.
385. Singh G, Goldstein J, Bensen W and cols. SUCCESS-1 in osteoarthritis trial: Celecoxib significantly reduces risk of serious upper gastrointestinal complications compared to NSAIDs while providing similar efficacy in 13,274 randomized patients. *Ann Eur Cong Rheumatol* 2001; Abstr. OP0053.
386. Slocum MM and Granger DN: Early mucosal and microvascular changes in feline intestinal transplant. *Gastroenterology* 1993, 105: 1761-1768.
387. Slocum MM, Sittig KM, Specian RD et al.: Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992, 58: 305-310.
388. Snyder SH: Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitter. *Science* 1992, 257: 494-496.

389. Spath G: Fiebre, an essential ingredient in enteral diets to prevent bacterial translocation to mesenteric lymph nodes in rats. Surgical Infection Society-Europe. 6 Annual Meeting. Varese, Italy 1993.
390. Spitz J, Hecht G, Taveras M et al.: Glucocorticoid regulation of intestinal permeability. The role of bacterial adherence. Surgical Infection Society 12 Annual Meeting. Los Angeles, California 1992.
391. Spooner CE and Markowitz NP: The role of tumor necrosis factor in sepsis. Clin Immunol Immunopathol 1992, 62: 11-17.
392. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990, 346: 425-434.
393. Stamler JS and Singel DJ: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 1992, 258: 1898-1902.
394. Staunton DE, Dustin ML and Springer TA: Functional cloning of ICAM-1, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. Nature 1989, 339: 61-64.
395. Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP et al.: The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. Cell 1990, 61: 243-247.
396. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C et al.: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. Cell 1988, 52: 925-929.
397. Steffan EK, Berg RD and Deitch EA: Comparison of translocation rate of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. J Infect Dis 1988, 157: 1011-1018.
398. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK and cols. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 2000; 342 (26): 1946-1952.
399. Steinberg S, Flynn W, Kelley K et al.: Development of a bacterial independent model of the multiple organ failure syndrome. Arch Surg 1989, 124: 1390-1395.
400. Stelzner F: Bowel preparation for surgery of the anus, rectum and colon. Chirug 1993, 64: 48-52.
401. Stevens L.: Gauging the severity of surgical sepsis. Arch Surg 1983, 118:190-194.
402. Subramaniam M, Saffaripour S, Watson SR et al.: Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. J Exp Med 1995, 181: 2277-2282.
403. Suffredini AF, Harpel PC and Parrillo JE: Endotoxin administration produces abnormal cardiovascular responses in normal humans. Clin Res 1987, 35:386-388.
404. Suzuki S and Toledo-Pereyra LH: Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1 as an effective protection for liver ischemia and reperfusion injury. Transplant Proc 1993, 25: 3325-3327.

405. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ et al.: Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993, 55: 1265-1272.
406. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ et al.: Physiopathological advantages of portosystemic shunting for studies of total hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 1992, 3: 96-101.
407. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH: Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994, 57: 253-258.
408. Taga K and Tosato G: IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992, 148:1143-1148.
409. Takahashi Y, Roman C, Chemtob S and cols. Cyclooxygenase-2 inhibitors constrict the fetal lamb ductus arteriosus both in vitro and in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278 (6): 1496- 1505.
410. Tanaka K, Fukuuchi Y, Nokazi H et al.: Calcineurin inhibitor, FK506, prevents reduction in the binding capacity of cycling AMP-dependent protein kinase in ischemic gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997, 17: 412-420.
411. Tanaka S, Kamiike W, Kosaka H et al.: Detection of nitric oxide production and its role in pancreatic ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol*. 1996, 271: G405-G409.
412. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, and Engel P: The selectins: Vascular adhesion molecules. *Faseb* 1995, 9: 866-873.
413. Thanos D and Maniatis T: NFkB: A lesson in family values. *Cell* 1995, 80: 529-532.
414. Tindall EA. Celecoxib is associated with significant ACR 50/70 responses in rheumatoid arthritis. *Annu Eur Cong Rheumatol* 2001; Abstr. THU0176.
415. Tokyay R, Zeigler ST, Loick HM et al.: Mesenteric lymphadenectomy prevents postburn systemic spread of translocated bacteria: *Arch Surg* 1992, 127: 384-388.
416. Toledo-Pereyra LH and Suzuki S: Neutrophils, cytokines and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 1994, 179: 758-762.
417. Tracey KJ: TNF in the biology of septic shock syndrome. *Circ Shock* 1991, 35: 123-128.
418. Turner CD, Bruce DS, Cronin DC et al.: Tacrolimus therapy for refractory acute renal allograft rejection: A 4-year experience with an aggressive approach. *Transplant Proc* 1998, 30:1234-1236.
419. Vadas M and Gamble J: Regulation of myeloid blood cell-endothelial interaction by cytokines. in *adhesion: Its role in inflammatory disease*. Harlan and Liu Eds. Freeman and Company, New York 1992, 65-81.

420. Valduciel-García JJ: Valoración de la inhibición de la P-selectina con PB 1.3, CY-1503 (Slex) y gm 1998-016 en un modelo experimental de isquemia-reperfusión hepática total. Tesis Doctoral 1996. Universidad de Salamanca.
421. Van der Linden CG: Tumor necrosis factor during sepsis. *Yearbook of intensive care and emergency medicine* 1992, 44-48.
422. Van Kooyk Y, Van de Wiel-Van, Kemenade P et al.: Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 1989, 342: 811.
423. Vela R and Ales JM: Infección urinaria de alto riesgo. Salvat Ed. Barcelona 1982, 8:127-142.
424. Venkataramanan ANR, Jain A, Wortv Vs et al. Pharmacokinetics of τ , FK-506 in transplants patients. *Transplant Proc* 1991, 23:2736-2740.
425. Vollmar B, Menger MD, Glasz J et al.: Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994, 267: G786-G793.
426. Von Asmuth EJ, Maessen JG and Van der Linden CJ: Tumor necrosis factor and interleukin 6 in a zymosan-induced shock model. *Scand J Immunol* 1990, 32: 313-319.
427. Wakabayashi H, Karasawa Y, Tanaka S et al.: The effect of FK506 on warm ischemia and reperfusion injury in the rat liver. *Surg Today* 1994, 24: 994-1002.
428. Wallace JL, Arfors KE and McKnight GW: A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology* 1991, 100: 878-883.
429. Wang R: CD28 ligation prevents bacterial toxin-induced septic shock in mice by inducing IL-10 expression. *J Immunol* 1997 Mar 15, 158:2856-2861.
430. Wang X, Soltesz V, Andersson R et al.: Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 per cent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 1993, 80: 66-71.
431. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR., Non-steroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96 (13): 7563- 7568.
432. Wegner CD, Gundel RH, Reilly P et al: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990, 247: 456-459.
433. Well CL, Maddaus MA, Reynolds CM et al.: Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria. *Infect Immun* 1987, 55: 2689-2694.
434. Weller A, Isenmann S and Vestweber D: Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1992, 267: 15176-15183.

435. Wells CL and Erlandesen SL: Localization of translocating *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Enterococcus faecalis* within cecal and colonic tissues of monoassociated mice. *Infect Immun* 1991, 59: 4693-4697.
436. Wells CL, Jechorek RP and Gilligham KJ: Relative contributions of host and microbial factors in bacterial translocation. *Arch Surg* 1991, 126: 247-252.
437. Wells CL, Jechorek RP and Maddaus MA: The translocation of intestinal facultative and anaerobic bacteria in defined flora mice. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1988, 1: 227-235.
438. Wells CL, Maddaus MA and Simmons R.: Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. *Arch Surg* 1987, 122: 48-53.
439. Wells CL, Maddaus MA and Simmons RL: Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988, 10: 958-979.
440. Welply JK, Keene JL, Schmuke JJ et al.: Selectins as potential targets of therapeutic intervention in inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994, 1197: 215-226.
441. Wenger FA, Kilian M, Bisevac M, Khodadayan C, Von Sheebach M, Schimke I. Effects of Celebrex and Zylflo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Clin Exp Metastas* 2003; 19: 681-687.
442. Weyrich AS, MA XL and Lefer AM: The role of L-Arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992, 86: 279-288.
443. Weyrich AS, Xin-liang MA, Lefer DJ et al.: In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993, 91: 2620-2629.
444. Whelton A, Fort JG, Puma A, Norman-din D, Bello AE, Verburg KM. Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function: R randomised, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients. *Am J Ther* 2001; 8: 85-95.
445. Windmueller HG: Glutamine utilization by small intestine. *Adv Enzymol* 1982, 53: 202-205.
446. Winn RK, Mihelcic D, Vedder NB et al.: Monoclonal antibodies to leukocyte and endothelial adhesion molecules attenuate ischemia-reperfusion injury. *Behring Inst Mitt* 1993, 92: 229-237.
447. Winn RK, Sharar SR, Vedder NB et al.: Leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia/reperfusion injuries. *Ciba Found. Symp* 1995, 189: 63-71.
448. Winn RK, Vedder NB, Mihelcic D et al.: The role of adhesion molecules in reperfusion injury. *agents actions* 1993, 41: 113-126.
449. Won Suzanne YS, Wong Kenneth YK, Wie Lie, Ogston Simon, McDonald Thomas M. Randomized, crossover study comparing celecoxib with nonselective NSAIDs on

- ambulatory blood pressure of treated hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2003; 16: Abstract. 65A.
450. Wood JG, Zhang Q, Yan ZY et al.: Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction in canine stomach. *Am J Physiol.* 1996, 271: G27-G35.
451. Yee J and Christou NV: The local role of tumor necrosis factor α in the modulation of neutrophil function at sites of inflammation. *Arch Surg* 1994, 129: 1249-1255.
452. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M et al.: Nitric oxide: A mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 1691-1695.
453. Yukimura T and Yamashita Y: Renal effect of nitric oxide synthase inhibitor, LNNA, in dogs. *Am J Hyp* 1992, 5: 484-487.
454. Zapata-Sirvent RL, Marzullo-Monaco V, Pinate S et al.: Translocación bacteriana en un modelo de obstrucción intestinal. II Estudio bacteriológico y papel de la inmunidad celular. *GEN* 1991, 45: 273-280.
455. Zhao SZ, Fiechtner JL, Tindall EA and cols. Evaluation of health-related quality of life of rheumatoid arthritis patients treated with celecoxib. *Arthrit Care Res* 2000; 13 (2): 112-121.
456. Zhao SZ, McMillen JI, Markenson JA and cols. Evaluation of the functional status aspects of health-related quality of life of patients with osteoarthritis treated with celecoxib. *Pharmacotherapy* 1999; 19 (11): 1269- 1278.
457. Zimmerman BJ and Granger DN: Lesión por reperfusión. *Clínica Quirúrgica NY* 1992, 120: 61-78.