

R.16.493 0

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

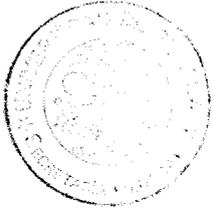
T.D
M/110

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 142 número 133 del libro
correspondiente. 3 SET. 1990

Sevilla:

El Jefe del Negociado de Tesis,

Elena Saffitte



ALTERACIONES INMUNITARIAS EN PACIENTES CRITICOS:

POLITRAUMATIZADOS Y QUEMADOS.



Tesis presentada por Dña. M^a DOLORES MALDONADO Y AIBAR
para optar al Grado de Doctora en Medicina por la
Universidad de Sevilla.

[Handwritten flourish]



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

D. DIEGO DE LOS SANTOS LOPEZ, Profesor Titular del Departamento de Cirugia de la Universidad de Sevilla y Jefe de Sección de Cirugia del Hospital Universitario Virgen del Rocio de Sevilla,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título "ALTERACIONES INMUNITARIAS EN PACIENTES CRITICOS: POLITRAUMATIZADOS Y QUEMADOS." , efectuado por la Licenciada Dña. M^a Dolores Maldonado y Aibar bajo mi dirección, reúne las condiciones para ser leído y defendido públicamente como Tesis Doctoral.

Sevilla 29 de Junio de 1990

Fdo: Prof. Dr. D. de los Santos Lopez



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

D. ANTONIO NUÑEZ ROLDAN, DOCTOR EN MEDICINA, PROFESOR ASOCIADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y JEFE DEL SERVICIO DE INMUNOLOGIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCIO DE SEVILLA,

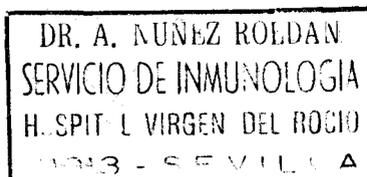
CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de Sevilla Dña. M^{ra} DOLORES MALDONADO Y AIBAR, sobre el tema: " ALTERACIONES INMUNITARIAS EN PACIENTES CRITICOS: POLITRAUMATIZADOS Y QUEMADOS", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedora al Grado de Doctor en Medicina, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Antonio Nuñez

Prof. Dr. D. Antonio Nuñez Roldan

Sevilla 29 de Junio de 1990





Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

D. FRANCISCO MURILLO CABEZAS, DOCTOR EN MEDICINA, PROFESOR ASOCIADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y JEFE DE LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCIO DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de Sevilla Dña. M^{ra} DOLORES MALDONADO Y AIBAR, sobre el tema: " ALTERACIONES INMUNITARIAS EN PACIENTES CRITICOS: POLITRAUMATIZADOS Y QUEMADOS", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedora al Grado de Doctor en Medicina, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Prof. Dr. D. Francisco Murillo Cabezas

Sevilla 29 Junio de 1990

" Nunca le falten a nadie bríos
suficientes para llevar a cabo
aquello de lo que está convencido."

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que directa o indirectamente, han contribuido a la realización de este trabajo, en particular a:

- Dr. D. Antonio Nuñez Roldan, Profesor Asociado de Inmunología y Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, Director de este trabajo que se presenta como Tesis, por saber crear el entorno cultural, de inquietud y estímulo tan necesarios en las tareas de investigación sin los cuales no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

- Dr. D. Francisco Murillo Cabezas, por la aportación de datos clínicos y por su gran experiencia y profesionalidad.

- D. Armando Venturoli Jaramillo, por su interés y seguimiento clínico de los pacientes quemados.

- Dr. D. Carlos Ortiz Leiba, que gentilmente ha suministrado los datos clínicos, anamnésticos y complementarios de los pacientes.

- Dña Francisca Gonzalez Escribano y Dña Berta Sanchez Sanchez por su excelente disposición.

- Dr. Julio Sanchez Roman y Dr. Florentino Sanchez Garcia por su ayuda en los trabajos de impresión y análisis de datos.

- Dña M^aPaz Bermudo Ruiz por su desinteresada ayuda.

Para finalizar, gracias a todos mis compañeros del Servicio de Inmunología, que día a día compartieron durante estos años, las satisfacciones y dificultades del trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCION.

1.1. UNA VISION ICONOCLASTA DE LA INMUNOLOGIA.

1.2. MECANISMO NORMAL DE DEFENSA DEL HUESPED.

1.2.1. SISTEMA INMUNE INESPECIFICO.

1.2.2. SISTEMA INMUNE ESPECIFICO.

1.3. ACCION DE LAS AGRESIONES EXTERNAS: TRAUMATISMOS Y

QUEMADURAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

1.3.1. SISTEMA INMUNE INESPECIFICO.

1.3.2. SISTEMA INMUNE ESPECIFICO.

1.3.3. CITOQUINAS: TNF E IL 1 β

1.4. EXPLORACION EN EL LABORATORIO, DE LAS MODIFICACIONES

INMUNOLOGICAS EN LOS PACIENTES CRITICOS.

1.4.1. COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE.

1.4.2. EXPLORACION DE LA FAGOCITOSIS.

1.4.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE RADICALES LIBRES POR LOS NEUTROFILOS.

1.4.4. REACTANTES DE FASE AGUDA.

2. OBJETIVOS.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1. MATERIAL.

4.1.1. ENFERMOS POLITRAUMATIZADOS.

4.1.2. ENFERMOS QUEMADOS.

4.2. METODOS.

4.2.1. EVALUACION CLINICA AL INGRESO DE LOS
PACIENTES.

4.2.2. OBTENCION DE CELULAS DE SANGRE PERIFERICA.

4.2.3. TECNICAS PARA EL ESTUDIO DEL FENOTIPO
CELULAR.

4.2.3.1. CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES
LINFOCITARIAS.

4.2.3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE
MARCADORES DE ADHESION Y ACTIVACION.

4.2.4. CUANTIFICACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE
LOS MONOCITOS FRENTE A PARTICULAS DE LATEX.

4.2.5. TEST DE REDUCCION DEL NBT.

4.2.6. DETERMINACION DE SUBCLASES DE IgG MEDIANTE
TECNICAS DE ELISA.

4.2.7. DETERMINACION DE REACTANTES DE FASE AGUDA, EN
SUERO, MEDIANTE TECNICAS DE NEFELOMETRIA.

4.2.8. ESTUDIOS ESTADISTICOS.

4.2.8.1. TEST DE REGRESION LINEAL.

4.2.8.2. TEST DE STUDENT.

5. RESULTADOS.

5.1. EL SISTEMA INMUNE TRAS LAS PRIMERAS 48 HORAS DEL
DEL ACCIDENTE.

5.2. VALORACION DEL SITEMA INMUNE A LO LARGO DE LA
EVOLUCION PATOLOGICA DEL TRAUMA Y LA QUEMADURA.

5.3. EL SISTEMA INMUNE DE LOS PACIENTES CON BUENA Y MALA
EVOLUCION.

5.4. MOLECULAS DE ACTIVACION Y ADHESION EN PACIENTES
CRITICOS.

5.5 PRESENCIA DE LINFOCITOS CD4+ CD8+ EN PACIENTES
CRITICOS.

6. DISCUSION.

7. CONCLUSIONES.

8. RESUMEN.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. INTRODUCCION.

1.1. UNA VISION ICONOCLASTA DE LA INMUNOLOGIA.

La función primordial del sistema inmune es la defensa del organismo mediante la eliminación de cualquier agente extraño que penetre en él. Para llevar a cabo su función, el sistema es capaz de discriminar entre lo propio y lo extraño y de poner en marcha los mecanismos para rechazar la agresión. Dichos mecanismos, constituyen genericamente lo que se denomina respuesta inmunitaria. Los diversos tipos de respuesta inmune pueden, en ocasiones, producir patologías. De hecho, los laboratorios de Inmunología de los Hospitales, dedican más esfuerzos al estudio de las enfermedades por mecanismos inmunológicos (Inmunopatología) que al de los defectos causados por deficiencias del sistema inmunitario (Inmunodeficiencias).

Algunos individuos reaccionan frente a sustancias inocuas como el polen de las plantas y ciertas proteínas que se encuentran en el pescado, apareciendo los denominados fenómenos de hipersensibilidad inmediata. En otros casos, por razones aún en discusión, el sistema inmune reacciona frente a componentes propios y se producen las enfermedades autoinmunes. De igual forma, la producción de anticuerpos y la posterior unión, del mismo, con el antígeno frente al que se hallan dirigidos, puede

acompañarse, en determinadas circunstancias, de una patología conocida como "por complejos inmunes".

Los mediadores intercelulares, monoquinas e interleuquinas, liberados por las células del sistema inmune son, a veces, responsables de cuadros de shock, trombosis, atrofia muscular e incluso fracaso multiorgánico. En efecto, la respuesta ante algunos agentes (microorganismos gram negativos, en particular) es a veces tan exacerbada que se convierte en agresiva contra el propio huésped, siendo más nocivos sus efectos que beneficiosos.

En consecuencia, un sistema dirigido a la conservación de la integridad del individuo, actúa de una manera tal, que cualquier desequilibrio, sea este cualitativo o cuantitativo, puede acarrear alteraciones que, en ocasiones, conducen a la muerte del sujeto.

1.2.MECANISMO NORMAL DE DEFENSA DEL HUESPED.

El organismo de los animales, está dotado de una serie de sistemas de defensa frente a la invasión, por elementos extraños, que le permiten preservar su integridad e individualidad. Estos mecanismos, que a lo largo de la

filogenia se han ido desarrollando y perfeccionando, han culminado en el hombre en un complejo sistema defensivo: el sistema inmunitario.

La misión fundamental de este sistema es la discriminación entre lo "propio" y lo "extraño", mediante un mecanismo de reconocimiento, procesamiento y ataque.

El sistema inmune se divide arbitrariamente en tres líneas de resistencia. La primera está constituida por la barrera mecánica producida por la piel y las mucosas. Las otras dos líneas de defensa son el sistema inmune inespecífico y el sistema inmune específico. Estos dos últimos no son entidades independientes sino que interaccionan entre sí continuamente para conseguir una respuesta inmune eficaz.

La piel y las mucosas, actúan como primera línea de defensa, y controlan a los agentes patógenos antes de que produzcan una infección franca ya que, la mayoría de las bacterias no pueden sobrevivir, durante mucho tiempo, en la piel debido a los efectos directos inhibidores del ácido láctico y de los ácidos grasos del sudor y de las secreciones sebáceas así como del pH bajo que generan.

Cuando estas primeras defensas son superadas, entra en

acción el sistema inmunitario inespecífico y específico, dando lugar a una reacción concreta ante cada agente infeccioso, lo que normalmente permite erradicarlo.

1.2.1. SISTEMA INMUNE INESPECIFICO.

El sistema inflamatorio inespecífico incluye los neutrófilos (PMN) y eosinófilos, el sistema del complemento, los sistemas de coagulación y fibrinolíticos, los macrófagos/monocitos, la fibronectina y otras proteínas del plasma que median respuestas inflamatorias a través de acciones quimiotácticas, pirógenas y opsonicas. Las defensas inflamatorias inespecíficas son respuestas generales y pueden ser activadas por cualquier agente lesivo.

Así pues, ante una agresión por un agente infeccioso se produce una respuesta inflamatoria caracterizada por: aumento sanguíneo del área infectada con el fin de elevar el flujo de sangre a la zona y de esta manera garantizar un incremento en el aporte de líquidos, proteínas y células. Aumento de la permeabilidad capilar permitiendo el paso de los mediadores solubles de la inmunidad al lugar del foco infeccioso, así como migración de PMN y macrófagos, mediante quimiotaxis, a esa misma área.

La quimiotaxis es la atracción de las células hacia los lugares donde se encuentran los tejidos dañados y los patógenos invasores. Los factores quimiotacticos son quimioatrayentes derivados de las proteínas séricas o del plasma, de la propia lesión hística, de la activación del complemento (C3a, C5a, C567), sistemas fibrinolítico y generador de cininas. Además, los linfocitos y macrófagos también producen factores quimiotacticos.

Una vez llegados al lugar de la inflamación, los fagocitos tienen que reconocer al agente infeccioso. Para ello, en su superficie, poseen receptores con los que se unen a una variedad de microorganismos, pero la unión se refuerza notablemente si el microorganismo ha sido previamente opsonizado.

La opsonización es el recubrimiento de microbios (u otras partículas) por factores séricos, en particular anticuerpos específicos y la fracción C3b del complemento, esto permite que los fagocitos reconozcan sus dianas y se unan a ellas.

Después de la unión, los fagocitos proceden a englobar el microorganismo, para lo cual extienden pseudópodos a su alrededor. Esos pseudópodos se funden y el microorganismo queda

interiorizado en un fagosoma, con la finalidad de destruir al elemento patógeno capturado.

La destrucción puede realizarse por dos mecanismos diferentes, uno oxígeno dependiente caracterizado por la activación de la enzima NADPH y la producción de radicales libres, el otro, es un mecanismo de destrucción oxígeno independiente, en donde entran en juego enzimas como la proteinasa neutra, lisozima y lactoferrina que son factores bactericidas o bacteriostáticos y que funcionan en circunstancias anaerobias.

1.2.2. SISTEMA INMUNE ESPECIFICO.

Además de los sistemas antes descritos, el Sistema Inmunitario pone en marcha reacciones que van dirigidas exclusivamente a la eliminación de un agente externo concreto.

El agresor se conoce de forma genérica como antígeno, y el sistema inmune fabrica sustancias específicas contra el mismo denominadas anticuerpos. De este modo, algunas células inmunitarias se diferencian con el fin de eliminar particularmente al agente. Este sistema específico depende fundamentalmente de los linfocitos, que se dividen en dos

grandes categorías: linfocitos T y linfocitos B.

La actividad funcional de los linfocitos se lleva a cabo gracias a la existencia de receptores en sus membranas a través de los cuales se unen específicamente a determinadas zonas del agente extraño conocidas con el nombre de determinantes antigénicos.

La naturaleza de los receptores para el antígeno, en la superficie de los linfocitos, es distinta según se trate de células T o B, y al conjunto de todos ellos se les conoce con el nombre de repertorio inmunológico.

En el caso de los linfocitos B, el receptor para el antígeno está constituido por las moléculas de inmunoglobulinas presentes en su superficie, que son sintetizadas por la propia célula y expresadas en su membrana como proteínas integrales de la misma. Son iguales en especificidad y afinidad al anticuerpo formado y segregado, como resultado de la estimulación de esta célula.

El receptor para el antígeno de las células T es de naturaleza diferente y se denomina receptor clonotípico o T_i . Se halla también en la membrana celular pero, a diferencia de lo que ocurre con las inmunoglobulinas, tras la activación

permanece en la membrana y no es secretado al exterior de la célula.

Antiguamente, existía la idea de que para cada antígeno, de los existentes en la naturaleza y por los que podíamos ser atacados, teníamos un número similar de receptores para poder defendernos. Esta idea fué desechada al entender que no habría material genético (ADN) suficiente que pudiese contener una cantidad tan elevada de genes. Existe en realidad un número limitado de genes que pueden, mediante combinaciones distintas, dar lugar a un número extraordinariamente elevado de inmunoglobulinas y de receptores de reconocimiento en los linfocitos T maduros.

El receptor de la célula T para el antígeno, está constituido por tres cadenas polipeptídicas diferentes (α , β y gamma) y pertenece a la misma familia supergénica que las inmunoglobulinas.

Los linfocitos T (las células inmunitarias responsables de lo que se ha denominado clásicamente inmunidad celular), no reconocen directamente los antígenos. En realidad, una vez en el organismo, las sustancias extrañas (antígenos naturales) son procesadas por células pertenecientes al sistema monocítico-macrofágico y expuestas en la superficie celular en combinación

con unas proteínas de la membrana. El complejo formado por el antígeno (previamente procesado) y la proteína de membrana es ya reconocido por los linfocitos T por medio de su receptor específico. A partir de este reconocimiento, se produce la respuesta inmune. Pues bien, las proteínas de la membrana que se combinan en la superficie celular con el antígeno natural son precisamente los antígenos de histocompatibilidad o moléculas HLA.

Según sea el subtipo de linfocito T (CD4 o CD8) intervendrán las moléculas de clase I o de clase II. En efecto, el receptor de los linfocitos CD4 reconoce al antígeno en combinación con las moléculas de clase II, mientras que los linfocitos T con fenotipo CD8, lo hacen en combinación con moléculas de clase I.

Los dos dominios externos de las moléculas HLA se encuentran plegados formando una especie de canal que constituyen el sitio de unión de los péptidos naturales. Es precisamente en dichos dominios donde reside la diversidad de las moléculas HLA.

El hecho de que los linfocitos T no reconozcan al antígeno en su forma natural sino en combinación con moléculas HLA, añade a la fase de reconocimiento inmunitario un grado adicional de complejidad que puede tener repercusiones funcionales. Las moléculas HLA, deben poseer la cualidad de

poder combinarse con cualquier péptido aunque la afinidad de esta combinación dependa de la estructura del péptido y de la molécula HLA correspondiente. Es decir, un mismo péptido puede combinarse con cualquier molécula HLA aunque su afinidad sea distinta con cada una de ellas. De este hecho se deriva que el que cada individuo posea varias moléculas de clase I y de clase II puede constituir una ventaja, pues permitirá al individuo combinar, más eficazmente, a un mayor número de péptidos. Por otro lado, la colección de moléculas HLA que cada individuo posee, le confieren un determinado carácter específico de individualidad para organizar la respuesta inmune.

1.3. ACCION DE LAS AGRESIONES EXTERNAS: TRAUMATISMOS Y QUEMADURAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Las infecciones son una de las causas principales de muerte tardía en sujetos traumatizados y quemados.

Los adelantos en los sistemas de cuidados de urgencias e intensivos en el tratamiento de estos pacientes, han contribuido a una disminución espectacular de la mortalidad inmediata. En la actualidad, el problema se ha extrapolado ahora a un aumento de la morbi-mortalidad tardía, cuya etiología es principalmente séptica. La naturaleza de la

lesión, el estado nutricional del paciente, los trastornos médicos preexistentes y la integridad de los mecanismos de defensa son determinantes importantes que afectan al pronóstico final de los pacientes críticos.

En este apartado, vamos a proporcionar una visión general sobre las modificaciones de los mecanismos de defensa del huésped causada por los traumatismos y quemaduras.

El traumatismo, incluyendo la lesión térmica, daña la piel y rompe la primera línea de defensa, lo cual permite la invasión microbiana. La piel coagulada y el exudado forman un medio de cultivo ideal para los microorganismos. Así pues, las escaras formadas son un reservorio avascular de infección con inaccesibilidad a los antibióticos sistémicos.

1.3.1. EL SISTEMA INMUNE INESPECIFICO.

El traumatismo y la quemadura provocan una reacción inflamatoria. Median esta reacción los productos químicos liberados de tejidos lesionados, de las células sanguíneas mononucleares activadas y de las propias células endoteliales de los vasos que ante la situación adquieren nuevas proteínas de superficie (activación y adhesión) que facilitan y potencian este estado de inflamación, liberando igualmente productos que

participan directamente en el estado protrombótico y de coagulación en el que se encuentran los pacientes que nos ocupan.

Las células monocíticas/macrofágicas (M/φ) constituyen la unión crucial entre los sistemas inflamatorio inespecífico e inmunitario específico (Unanue, E. 1980., Varesio, L. 1980). Las funciones específicas de M/φ son: a) síntesis de componentes del complemento; b) producción de activador de plasminógeno (PA); c) producción de tromboplastina tisular (TF); d) producción de monocinas como prostaglandina E₂, interleuquina 1 y TNF, y e) interacciones con células T.

Todas estas funciones afectan a la fagocitosis y quimiotaxis de los neutrófilos, a la inducción de la cascada del complemento, la fibrinólisis y la coagulación, la conservación del metabolismo basal y la termorregulación.

Los neutrófilos, una de las principales células fagocíticas en el hombre presentan cambios adversos significativos en su función tras un traumatismo o quemadura, esta adversidad se debe a una disminución en la quimiotaxis en el transcurso de 72 horas de la lesión (Warden, G. 1981 y Meakins, J. 1978). Los pacientes con deficiencia de la hipersensibilidad tardía (anergia) son los que presentan mayor disminución de la

quimiotaxis. El defecto de esta quimiotaxis, se correlacionó de manera inversa con el porcentaje de quemadura y se explicó, pensando en factores inmunosupresores circulantes como un posible mecanismo que altera las reacciones de hipersensibilidad tardía y la quimiotaxis de los neutrófilos después de un traumatismo.

El sistema del complemento es activado después de la lesión térmica o traumatismo, aparece en los pacientes una disminución en los niveles circulantes de C3A y C5A con un aumento del consumo de C3, properdina y factor B. Todo ello, puede tener como consecuencia una opsoninopatía por consumo y una disminución de uno de los estímulos para el desplazamiento celular, hacia zonas críticas de la inflamación.

Los sistemas fibrinolítico y de coagulación, tienen una importante participación en las respuestas inflamatorias inespecíficas (hemostasia, inflamación y reparación de tejidos) y en la inmunidad específica (Goeken N.E. 1989). Los macrófagos activados tras el trauma o lesión térmica, liberan gran cantidad de IL 1 y TNF (Dinarello 1984) lo que puede conducir al desarrollo de un cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID). Esta acción se ejerce directamente sobre las células endoteliales, que secretan un factor tisular responsable de la actividad procoagulante (PCA, "procoagulant

activity"). Este fenómeno, se acompaña de un aumento del poder de adhesividad del endotelio con respecto a leucocitos circulantes y un aumento de la agregación plaquetaria. Así, las células endoteliales, tras la acción de la IL 1 y TNF, secretan inhibidores de los activadores del plasminógeno. El marcado estado protrombótico de estos pacientes, se potencia finalmente por una inhibición de la acción de la proteína C-Trombomodulina ejercida por la IL 1 y TNF (Mantovani A. y Dejana E. 1989).

1.3.2. EL SISTEMA INMUNE ESPECIFICO.

La inmunocompetencia específica incluye la interacción cooperativa de células monocíticas/macrofágicas (M/ϕ), linfocitos T y linfocitos B. Tras el trauma y la quemadura, estas interacciones se ven alteradas.

Diversos autores han determinado la actividad de las células T después de traumatismos. En 1978, Bauer demostró que su número disminuía durante las primeras 24-48 horas y volvía a normalizarse hacia el quinto día, relacionándose el grado de la linfopenia con la gravedad de la lesión.

Otras de las observaciones efectuadas en este caso por Ninnemann 1980, fué la presencia de un número excesivo de

células T supresoras después de lesiones térmicas, haciéndolas responsables de la inmunodeficiencia reinante en estos pacientes. Autores como Stenson, W. en 1980 explican este fenómeno pensando que es el aumento de prostaglandina E2 acontecida tras el trauma, la que provoca elevación en la síntesis de células T supresoras, inhibición de la proliferación de las células T helper y depresión sostenida de IL 2 (FAIST, E. 1987).

Las células B y su progenie de células plasmáticas, producen cinco clases de inmunoglobulinas, las cuales también se ven afectadas por la acción de los traumatismos y quemaduras. Han podido comprobarse, cambios en los valores de IgG, IgA e IgM.

Munster, M. en 1984 comprobó una disminución importante de las concentraciones de IgG en el periodo posquemadura de los 50 pacientes que él estudió. Los valores de IgM e IgA no se afectaron significativamente. Ninnemann, J. 1980 demostró una disminución inicial de los valores de IgG e IgA en lesiones térmicas.

Faist E, en 1989 estudió 30 pacientes traumatizados y llegó a la conclusión de que aunque el número de linfocitos B, en sus pacientes, no sufrió modificaciones con respecto al grupo control, su función si se mostró afectada con disminuciones en

la síntesis de IgG, IgA e IgM. Esta disfunción fué interpretada como debida a las alteraciones existentes entre las interacciones M ϕ /células T.

1.3.3. CITOQUINAS: TNF E IL 1 β

Tras la invasión aguda, principalmente por bacterias gram negativas, puede desarrollarse en el huésped, un cuadro caracterizado por fiebre, hipercatabolismo (proteico y lipídico), hipermetabolismo con trastornos severos de la homeostasis (hiperglicemia, hipertrigliceridemia, elevación de la urea, acidosis metabólica, etc.), trastornos de la coagulación, etc. lo que lleva en multiples ocasiones a fracaso secuencial multiórgano y muerte. En las infecciones crónicas y neoplasias, son comunes un balance calórico y nitrogenado negativos que pueden llevar a la muerte por caquexia.

Durante mucho tiempo, se pensó que los responsables directos eran los propios agentes patógenos. Hoy en cambio, sabemos que todo este proceso está gobernado por el sistema inmune, y muy especialmente por el sistema macrofágico, el cual ejerce su influencia a través de mediadores denominados de forma genérica citoquinas. De hecho, la endotoxina bacteriana no es tóxica para la mayoría de los tejidos. En cambio, su administración

provoca la producción de monoquinas por parte del sistema macrofágico, cuya acción puede conducir al shock y la muerte.

La interleuquina I: Después de estudios realizados por diferentes grupos, hemos podido saber que una sola molécula, la interleuquina I (IL-I), producida por los macrófagos activados, es la responsable de la fiebre, de la síntesis hepática de los reactantes de fase aguda, de la degradación muscular, del estado de hipercoaguabilidad, y también, aunque por mecanismos más complejos, de la activación de los linfocitos T.

La experimentación en animales ha permitido concluir que el mecanismo por el que se produce la fiebre en gran número de enfermedades es debido a la capacidad que tienen algunas sustancias, principalmente de origen bacteriano, de estimular a los fagocitos para que sinteticen una proteína que fue denominada en un principio pirógeno endógeno (PE). Más tarde, se demostró que el pirógeno endógeno produce la fiebre, provocando un incremento en la síntesis de prostaglandinas E2 (PGE2) en el hipotálamo. Es por ello, por lo que los inhibidores de la síntesis de PGE2 (indometacina y aspirina a nivel de la ciclooxigenasa y glucocorticoides a nivel de la fosfolipasa) son antipiréticos.

En estudios sucesivos, se demostró que el pirógeno endógeno,

además de inducir fiebre, exhibía un gran número de otras actividades biológicas: estimulación de linfocitos T, aumento de la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado, activación de neutrófilos, etc. Por todo ello, el PE recibió el nombre de IL-I .

Muchas de las acciones de la IL-I son debidas también a la síntesis de PGE₂ por determinados sustratos sobre los que actúa dicha interleuquina. Así, la PGE₂ liberada por el músculo, en respuesta a la acción de la IL-I, provoca una considerable proteólisis lisosómica responsable de la pérdida de proteína corporal observada en los pacientes sépticos y traumatizados. A este efecto contribuye muy especialmente además, un péptido derivado de la IL-I (PIF, "proteólisis inducing factor"). Al igual que en el caso de la fiebre, el uso de inhibidores de la ciclooxigenasa (indometacina y aspirina) puede ser beneficioso para eliminar o suavizar el balance nitrogenado negativo observado en estos enfermos, así como las mialgias, atribuidas también al aumento de prostaglandinas E₂.

Consecuencia de la acción de la IL-I son también las alteraciones de la coagulación acompañantes de los estados que estamos revisando, y que consisten en muchas ocasiones en un cuadro de coagulación intravascular diseminada. Esta acción se ejerce directamente sobre las células endoteliales, que

secretan un factor tisular responsable de la actividad procoagulante (PCA, "procoagulant activity"). Este fenómeno se acompaña de un aumento del poder de adhesividad del endotelio con respecto a leucocitos polimorfosnucleares. Por último, las células endoteliales, tras la acción de la IL-1 secretan inhibidores de los activadores del plasminógeno. El marcado estado protrombótico se potencia finalmente por una inhibición de la acción de la proteína C-trombomodulina ejercida por la IL-1.

Dos hallazgos recientes pueden permitirnos aclarar cual es el papel fisiológico "positivo", no deletéreo, de la IL-1 en la inflamación y, concretamente, en la lesión cerebral. Por un lado, se ha demostrado que los astrocitos producen IL-1 en respuesta a una estimulación con lipopolisacáridos y que la misma IL-1 producida en el cerebro tras el daño cerebral, tiene un efecto reparador de la lesión cerebral al estimular la proliferación astrocitaria. En segundo lugar, en las lesiones del nervio periférico, los macrófagos invaden el lugar de la lesión y allí estimulan por medio de la IL-1, la síntesis del factor de crecimiento nervioso (NGF) por las células de Schwann y las células fibroblastoideas de los nervios periféricos.

Recientemente, la atención sobre los mediadores solubles responsables de las alteraciones en la inflamación severa y el

daño cerebral grave se ha desplazado hacia la caquetina o TNF ("tumor necrosis factor"). El TNF se describió en un principio (y de ahí su nombre) como un factor secretado por los macrófagos activados, responsables de las necrosis hemorrágicas que sufren algunos tumores. Paralelamente se habían realizado otros trabajos tratando de hallar el mediador de las caquexias acompañante de las infecciones parasitarias en animales. Al igual que ocurre en las infecciones crónicas en el hombre, la caquexia se acompaña de una marcada hipertrigliceridemia. Ambos efectos se podían reproducir en animales a los que se inyectaban sobrenadantes de células macrofágicas estimuladas con endotoxina bacteriana y son debidos a la supresión de la actividad lipoprotein-lipasa (LPL). El factor responsable de esta actividad fué denominado caquectina como reconocimiento a su papel en la patogénesis de la caquexia. Estudios posteriores permitieron llegar a la conclusión de que ambas sustancias, la caquectina y el TNF, eran la misma molécula.

La disponibilidad de la sustancia pura producida por técnicas de ingeniería genética, ha permitido objetivizar las consecuencias de su administración en animales de experimentación: piloerección, fiebre, hipotensión, acidosis metabólica, taquipnea, parada respiratoria y muerte, observándose hemoconcentración y cambios bifásicos en la glucemia (una hiperglicemia transitoria seguida de

hipoglicemia). La necropsia revela leucocitosis pulmonar, necrosis tubular renal, y necrosis hemorrágica en las suprarrenales, pancreas, tracto gastrointestinal y otros órganos.

Al igual que ocurre con la IL-1, la acción de la caquectina/TNF se debe en gran parte a una estimulación de la síntesis de prostaglandinas y leukotrienes (responsables del acúmulo de polinucleares en los órganos y especialmente en el pulmón). La actividad procoagulante explica de un lado su poder necrotizante tumoral, por lo que fué originariamente descrita, y las alteraciones de la homeostasia en el shock séptico debida sobretodo a la acción sinérgica TNF/IL-1 sobre las células endoteliales. El endotelio constituye el centro de toda la inflamación produciendo colagenasas y PGE2. La primera digiere la matriz del colágeno extracelular, mientras que la segunda, además de las acciones discutidas anteriormente, es un estímulo importante para la producción de proteasas intracelulares. A través de la inducción de esta actividad procoagulante del endotelio, el TNF suprime los mecanismos anticoagulantes de la misma manera que lo hace la IL-1, convirtiéndose la pared endotelial en una superficie muy adecuada para la aparición de fenómenos trombóticos.

La lesión endotelial es también responsable de la secuestación de líquidos y electrolitos que acompañan invariablemente al shock endotóxico y que determinan la hemoconcentración y el shock. A todo ello, contribuye además una disminución del potencial de membrana, ejercido por el TNF, que puede ser el responsable de la entrada de líquido en el espacio intracelular por desbordamiento del gradiente electroquímico debido a la entrada de sodio en la célula.

Además de ejercer todos estos efectos de manera directa el TNF provoca la liberación de IL-I por los monocitos y las células endoteliales. De esta manera, se potencian todos los efectos que hemos discutido con anterioridad.

El laboratorio, tiene ahora un papel crucial en el estudio de todos estos fenómenos mediante el uso de TNF recombinante, lo que ha permitido comprender además, el papel antiinflamatorio de los glucocorticoides. Estas sustancias disminuyen la síntesis del TNF por dos mecanismos: mediante una disminución del ARNm-TNF, que es producido como respuesta a la endotoxina por el macrófago, y, en segundo lugar evitando la traducción del mensajero que se produzca en dicha célula.

En los últimos meses, hemos asistido a experimentos que pueden hacernos cambiar nuestra conducta terapéutica en los

estados de shock séptico y lesión cerebral, en un futuro no muy lejano. El uso de un anticuerpo monoclonal anti TNF administrados a monos dos horas antes de la inyección de dosis LD100 de E. Coli, protege totalmente a los animales de los efectos de dicha inyección, que provoca en los animales no tratados, la muerte por shock y fracaso multiórgano. Su futuro uso en clínica humana puede suponer un cambio revolucionario en el pronóstico de estos estados, hoy por hoy, mortales en su mayoría.

1.4. EXPLORACION EN EL LABORATORIO DE LAS MODIFICACIONES INMUNOLOGICAS EN LOS PACIENTES CRITICOS.

El estudio en el laboratorio, de las modificaciones inmunológicas que acontecen en pacientes politraumatizados y quemados, se hace mediante la evaluación de sus componentes (células, citoquinas, proteínas de membrana, proteínas del suero...etc) todo ello es estudiado tanto en número como en actividad funcional y empleando fundamentalmente técnicas analíticas basadas en la unión antígeno-anticuerpo.

1.4.1. COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNITARIO.

Las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfocitarias conocidas hasta ahora, han podido ser estudiadas en profundidad, gracias al empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos cuya expresión en la superficie celular corresponde a determinados estadios de diferenciación o a fases peculiares de activación de las células.

Su aplicación ha permitido avances insospechados en la diferenciación de los linfocitos T y B. No solamente permiten reconocer las dos grandes poblaciones, T y B de manera complementaria o alternativa a métodos clásicos, sino que hacen posible la identificación de subpoblaciones funcionalmente distintas y de estadios sucesivos en la diferenciación celular (antígenos de diferenciación).

En los apartados 4.2.3.1. y 4.2.3.2. de Material y Métodos, se relacionan los antígenos de diferenciación y los anticuerpos monoclonales que los reconocen, para cada grupo.

1.4.2. EXPLORACION DE LA FAGOCITOSIS.

Las células que tienen el importante papel de la fagocitosis

son los polimorfosnucleares (Neutrófilos) y los fagocitos mononucleares (Monocitos y Macrófagos). Una hipofunción de los fagocitos va a ser causa de infecciones piógenas recurrentes.

Las infecciones piógenas son combatidas por neutrófilos y monocitos en respuesta a una serie de factores quimiotácticos que atraen a estas células a la fuente de la inflamación, una vez allí, ingestan los microorganismos y los matan. Algunos microorganismos resisten la ingestión porque no han sido reconocidos por los fagocitos, los cuales necesitan una previa opsonización por las proteínas séricas (Inmunoglobulinas, complemento..etc.) para poder ejercer debidamente su función.

Durante la ingestión el microorganismo pasa al interior del fagocito en forma de vacuola a la que se van uniendo gránulos enzimáticos que vertirán su contenido al interior de la vacuola (degranulación). El contenido del gránulo incluye enzimas hidrolíticas, proteínas bactericidas, y, en el neutrófilo, mieloperoxidasa en combinación con peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno tales como el anión superóxido que es extremadamente activo en la matanza de los microorganismos infectados.

La susceptibilidad a la infección va a estar determinada, en gran parte, por el tipo de patógeno y el estado de las defensas

del huésped. La presentación clínica de pacientes con anomalías fagocíticas puede variar enormemente, y el análisis del laboratorio es esencial en la determinación del diagnóstico.

El estudio de la función fagocítica, puede realizarse a varios niveles:

- Movilidad.
- Reconocimiento.
- Ingestión.
- Degranulación.
- Evaluación de los metabolitos del oxígeno.
- Capacidad bactericida.

Algunos de los tests comúnmente usados para la evaluación de la función del neutrófilo han sido realizados de forma sucesiva para descartar desórdenes genéticos en la función del neutrófilo y no alteraciones transitorias de causa conocida.

La ingestión de los microorganismos por los neutrófilos es un proceso activo que requiere de la producción de energía por el fagocito.

La penetración de los microorganismos previamente opsonizados, ocurre con rapidez después de su contacto con la

superficie de los neutrófilos. Los pasos siguientes de la fagocitosis (degranulación y destrucción) van a depender del éxito de la ingestión.

Todas las pruebas del laboratorio para medir la capacidad de los neutrófilos de ingerir partículas (látex o bacterias), emplean dos enfoques generales, estimación directa de la captación celular de las partículas evaluando las células mismas o la eliminación de las partículas del líquido o del medio, este último caso es tomado como una evaluación indirecta de la captación celular.

Es preferible el método directo al indirecto o de desaparición de partículas del medio extracelular ya que en el método indirecto, se necesitan largos periodos de incubación y grandes cantidades de partículas a fagocitar, luego la dificultad de medir grandes cambios en grandes cantidades es mayor.

1.4.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE RADICALES LIBRES POR LOS NEUTROFILOS.

La función primordial de los neutrófilos en la resistencia del huésped es la de matar intracelularmente los

microorganismos. Esta etapa final de la fagocitosis depende de numerosos factores y sobretodo de la buena terminación de las etapas precedentes de fagocitosis: movilidad, reconocimiento, ingestión y degranulación.

A su vez, los neutrófilos poseen una gran diversidad de sistemas antimicrobianos (pH ácido de los fagolisosomas, lisozima, lactoferrina, proteínas catiónicas, sistemas de mieloperoxidasa-halogenación, peróxido de hidrógeno y radical superóxido), cualquier defecto en la destrucción intracelular, podría ser el resultado de déficit cuantitativos o cualitativos de estos sistemas.

En la actualidad, la cuantificación de la actividad metabólica de granulocitos y monocitos, se puede realizar de multiples maneras, mencionaremos los métodos más usuales y haremos incapie en el que nosotros hemos utilizado (reducción del NBT).

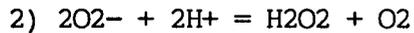
Una de las formas de medir la actividad metabólica de PMN y monocitos, es midiendo los niveles de diferentes enzimas en dichas células. La enzima que normalmente se cuantifica es la Glucosa-6 Fosfato-Deshidrogenasa.

También se puede evaluar, conociendo la cantidad de



radicales que aparecen como consecuencia de la actividad oxidativa durante la fagocitosis. Tras la ingestión de las partículas hay un aumento del consumo de O_2^- , H_2O_2 y $NADP^+$.

Las reacciones implicadas son:

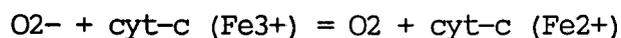


La primera reacción, está llevada a cabo por la enzima peroxidasa y la segunda por la superóxidomutasa.

La cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formada se puede medir mediante la reducción de la scopolatina, sustancia que en presencia de H_2O_2 se reduce y pierde su fluorescencia.

La cantidad de O_2^- (superóxido) se puede medir mediante la prueba del citocromo C (cyt-c) o el test de nitroazul de tetrazolio (NBT):

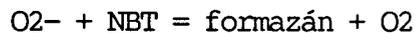
En presencia de cyt-c el anión O_2^- oxida al oxígeno molecular y el cyt-c se reduce según la siguiente reacción:



El cyt-c determina una disminución de la absorbancia que puede medirse y cuantificarse espectrofotométricamente.

La prueba que nosotros hemos elegido, mide igualmente, que la anterior, la producción de superóxido (O_2^-), utiliza una sustancia denominada (NBT), compuesto hidrosoluble de color amarillo claro que se transforma en formazán, sustancia no soluble que precipita en el interior de las células, y de color azul-violáceo intenso al ser reducido.

Los neutrófilos pueden reducir el colorante después de la ingestión de látex o de microorganismos o estimulación con TPA, subsiguientes a la explosión de energía generada a través de la derivación de la hexosamonofosfato. El colorante reducido (formazán) puede medirse con facilidad mediante un fotómetro, después de su extracción de los neutrófilos con un disolvente orgánico.



Las pruebas de reducción de NBT se comenzaron a usar con gran entusiasmo en los diagnósticos de infecciones bacterianas.

1.4.4. REACTANTES DE FASE AGUDA

Los reactantes de fase aguda son proteínas sintetizadas por el hígado, que en condiciones normales existen en determinadas concentraciones, no nocivas, para el organismo.

Ante cualquier agresión, séptica o aséptica (traumática quirúrgica etc), va a producirse un aumento en la concentración de proteínas plasmáticas procedentes del hígado (disproteïnemia parainflamatoria). Su hallazgo permite confirmar la existencia de un proceso inflamatorio, pero no sirve para el diagnóstico diferencial de las enfermedades inflamatorias, ya que se trata de un síndrome inespecífico común. Su valor clínico estriba en la discriminación de la organicidad ante un cuadro que pueda ser puramente funcional, sin lesión, y en el seguimiento de la progresión o regresión de la actividad del proceso.

Como ya hemos visto en apartados anteriores, en la inflamación se producen una serie de modificaciones humorales y citológicas generales y locales, en donde se ha podido comprobar existen numerosos mediadores solubles implicados. De todos ellos, la IL-1 y el TNF son los mayores responsables en la estimulación del hepatocito para la liberación y síntesis de proteínas de fase aguda.

Los principales reactantes de fase aguda son: la IgG, IgA, IgM, C3, C4, Ceruloplasmina, α_1 antitripsina, α_1 glicoproteina y α_2 macroglobulina. Todos ellos son analizados por nefelometria.

2. OBJETIVOS.

Las infecciones siguen constituyendo la principal causa de muerte tardía después de traumatismos graves y quemaduras severas. La razón de esta inmunodeficiencia sigue siendo desconocida.

En el presente trabajo nos hemos planteado estudiar la influencia directa de los traumatismos graves y las quemaduras sobre el sistema inmunitario, para poder conocer el mecanismo por el cual los pacientes son especialmente vulnerables a las infecciones.

Para ello, nos hemos marcado los siguientes objetivos:

1) Determinar el perfil inmunológico inicial, característico de los enfermos críticos y su relación con la gravedad clínica inicial.

2) Conocer el cortejo inmunológico que acompaña a los pacientes a lo largo de la evolución de su cuadro patológico y su posible relación con el pronóstico.

3) Por último, valorar la influencia que el estado inmunitario tiene sobre la existencia de pacientes clínicamente

muy graves, pero que sobreviven, así como de pacientes con altas posibilidades de sobrevivir, de acuerdo a criterios estrictamente clínicos, pero que sin embargo fallecen.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para tratar de cubrir los objetivos planteados en el presente trabajo, hemos elaborado el siguiente diseño experimental:

1) Selección de pacientes:

a) Los pacientes de nuestro estudio, serán enfermos politraumatizados y quemados que ingresen en las unidades de UCI del Hospital de Traumatología y Rehabilitación (HRT) y en la Unidad de Quemados del Hospital Universitario Virgen del Rocio de Sevilla.

b) La edad, deberá estar comprendida entre 15 y 75 años, ambas inclusives.

c) La gravedad clínica será evaluada al ingreso de la enfermedad de acuerdo al Trauma Score (politraumatizados) y al porcentaje de superficie corporal quemada (quemados).

2) Estudio Inmunológico:

Constará de tres controles separados en el tiempo, que corresponderán a la fecha del ingreso en todos los pacientes

y a los 7 y 15 días en los politraumatizados así como a los 15 y 30 días en los quemados.

En cada control, los pacientes serán sometidos a la extracción de sangre venosa periférica, en sus respectivas unidades de ingreso y enviadas al Servicio de Inmunología.

Los estudios consistirán en:

- a) Determinación de subpoblaciones celulares mediante el empleo de anticuerpos monoclonales: CD3, CD19, CD4, CD8, CD57, CD36 y Clase II que reconocen las diferentes células linfocitarias y monocitarias.
- b) Cuantificación de la expresión, en las membranas celulares, de marcadores de adhesión y activación: CD11c, CD49a, CD54, CD69 , CD71 y CD25.
- c) Estudio de la capacidad de ingestión de partículas de látex por los monocitos/macrófagos (Fagocitosis).
- d) Producción de radicales libres determinados por la técnica de reducción del NBT (Nitro-Azul de Tetrazolio).

e) Cuantificación de IgG total y sus correspondientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

f) Determinación de reactantes de fase aguda en suero.

Finalmente, los datos inmunológicos serán comparados con la gravedad clínica de los pacientes evaluada al ingreso, así como con la evolución que sigan.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

El material lo componen un total de 59 enfermos: 32 pacientes con traumatismo severo y 27 enfermos que habian sufrido quemaduras graves.

Como grupo control se emplearon 32 voluntarios sanos, con edades similares, a los que se les practicó el mismo protocolo analítico que a los enfermos.

4.1.1. PACIENTES POLITRAUMATIZADOS

1) Criterios de inclusión:

a) Politraumatizados o TCE (Traumatismos Craneoencefálicos) graves cuya estancia en UCI se prevea igual o superior a 15 días.

b) Edad comprendida entre 15 y 75 años.

c) Ausencia de cáncer, hepatopatía crónica, enfermedad autoinmune o hemopatías.

d) No haber sido transfundido en los 5 días previos al comienzo del estudio.

4.1.2. PACIENTES QUEMADOS

Los enfermos quemados, fueron estudiados en intervalos de tiempos más espaciados, dado que su proceso curativo y de recuperación suele ser mucho más largo. Así pues, se efectuaron controles, sobre ellos, en las primeras 24-48 horas de su ingreso, a las dos semanas y a los 30 días. En los tres momentos, se les practicó el mismo tipo de estudio.

1) Criterios de inclusión:

- a) Pacientes con más del 10% de superficie corporal quemada.
- b) Edad comprendida entre 15 y 75 años.
- c) Ausencia de enfermedad crónica anterior.
- d) No haber sido trasfundido previamente al estudio.

4.2. METODOS

4.2.1. EVALUACION CLINICA DE LOS PACIENTES A SU INGRESO.

La evaluación clínica de los pacientes, fué realizada en la Unidad de Cuidados Intensivos y Unidad de Quemados del Hospital Universitario Virgen del Rocio de Sevilla.

Para el establecimiento del grado de gravedad clínico de los enfermos, se siguieron criterios objetivos internacionales de Trauma Score (TS) y porcentajes de superficie corporal quemada (%Q). El Trauma Score es una escala numérica del 1 al 16, que indica la severidad del traumatismo y su relación con la supervivencia. Los parámetros que se estudian para asignar a cada enfermo traumatizado un valor de la escala son: frecuencia respiratoria, esfuerzo respiratorio, presión arterial sistólica, relleno capilar y escala de Glasgow. Está basado en los resultados obtenidos en 1.059 pacientes que sufrieron traumatismos diversos.

La tabla siguiente, nos muestra los valores de TS con su respectiva estimación de supervivencia y pronóstico (Champion HR 1981).

TRAUMA SCORE (TS)

SUPERVIVENCIA

1	0	
2	0	
3	1%	MAL
4	2%	PRONOSTICO
5	4%	
6	8%	
7	15%	
8	26%	
<hr/>		
9	42%	
10	60%	
11	76%	BUEN
12	87%	PRONOSTICO
13	93%	
14	96%	
15	98%	
16	99%	

4.2.2. OBTENCION DE CELULAS DE SANGRE PERIFERICA.

a. FUNDAMENTOS.

Las diversas poblaciones celulares de la sangre periférica pueden ser separadas mediante distintos gradientes de densidad, al ser esta diferente según se trate de células poli o mononucleares. Las células polinucleares flotan sobre un gradiente de 1.119, mientras que las mononucleares (monocitos y linfocitos) lo hacen sobre un gradiente de 1.077.

b. REACTIVOS.

Ficoll-Histopaque de densidad 1.077 (Sigma).

Ficoll-Histopaque de densidad 1.119 (Sigma).

Tampón fosfato PBS (Merieux).

c. PROCEDIMIENTO.

En un tubo cónico de centrifuga, de 50 mililitros, se depositan los dos gradientes de Ficoll-Histopaque de densidades diferentes, una que se coloca primero de densidad 1.119 y otra que se coloca lentamente sobre la anterior, de densidad 1.077.

Sobre estos dos colchones de Ficoll-Histopaque de 12'5 ml de volumen cada uno, se añaden muy suavemente otros 12'5 ml de sangre diluida 1:1 en PBS, que ha sido obtenida esterilmente por venopunción en tubos que contienen heparina litio como anticoagulante. La sangre diluida se deja resbalar por las paredes del tubo para que se deposite sobre el gradiente de Ficoll de densidad 1.077.

Los tubos se centrifugan a 2.500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se observan dos halos opacos: el superior correspondiente a las células mononucleares y el inferior a las polinucleares. Ambos halos se recogen por separado y se lavan las células tres veces con PBS.

4.2.3. TECNICAS PARA EL ESTUDIO DEL FENOTIPO CELULAR.

Se aplicó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), con anticuerpos monoclonales, para la detección de los antígenos de diferenciación celular. Una vez marcadas, las células fueron analizadas mediante citometria de flujo.

4.2.3.1. CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

a. FUNDAMENTO.

Se emplearon técnicas de IFI, que se basa en la medida del color (fluoresceína, ficoeritrina, biotina....) emitido por las células debidamente marcadas, así como también en el reconocimiento de otras propiedades diferenciales de las células en estudio, tales como tamaño, granularidad, densidad,...etc.

Las células así marcadas se hacen pasar por un citómetro de flujo, que dispone de elementos de reconocimiento y contaje de alta velocidad.

La suspensión celular se hace pasar en forma de gotas microscópicas, cada una de las cuales contiene una célula rodeada de su envoltura líquida. Estas células pasan por un campo de detección atravesado por un potente rayo láser que produce la dispersión de la luz y la activación del color.

b. REACTIVOS.

. Anticuerpo Monoclonal Leu4 marcado con fluoresceína, reconocedor de la molécula CD3, presente en los linfocitos T totales (Becton Dickinson).

. Anticuerpo Monoclonal Leu3a marcado con fluoresceína, reconocedor de la molécula CD4, presente en los linfocitos colaboradores (Becton Dickinson).

. Anticuerpo Monoclonal Leu2a marcado con ficoeritrina, reconocedor de la molécula CD8, presente en los linfocitos citotóxicos/supresores (Becton Dickinson).

. Anticuerpo Monoclonal Leu12 marcado con ficoeritrina, reconocedor de la molécula CD19, presente en los linfocitos B (Becton Dickinson).

. Anticuerpo Monoclonal Leu11c marcado con ficoeritrina, reconocedor de la molécula CD16, utilizado para la identificación de la población de células NK.

.Anticuerpo Monoclonal anti HLA-DR (Becton Dickinson), utilizado para reconocer a la población de células T activadas, células B y monocitos.

. Tampón fosfato PBS (Merieux).

. Solución lisante (Becton Dickinson).

c. PROCEDIMIENTO.

- Distribuir en tubos de plástico, previamente rotulados, 20 microlitros de los monoclonales a emplear.

- Sobre ellos, añadir 100 microlitros de la muestra de sangre, en cada tubo. Agitar suavemente e incubar 10 minutos a 4°C y protegidos de la luz.

- Terminada la incubación, añadir a cada tubo 2 ml de la solución lisante al 1/10 en agua destilada, agitar los tubos en el vortex e incubar 3 minutos más.

- Centrifugar los tubos 5 minutos a 2000 rpm.

- Tirar el sobrenadante y decantar el botón celular.

- Añadir 2ml de PBS a cada tubo y lavar centrifugando 5' a 2000 rpm.

- Tirar el sobrenadante del lavado y decantar el botón celular, resuspender este en 200 microlitros de PBS. En estas condiciones las muestras están listas para ser leídas en el citómetro de flujo.

4.2.3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE MARCADORES DE ADHESION Y ACTIVACION.

a. FUNDAMENTO:

En determinadas condiciones biológicas o experimentales, los linfocitos expresan moléculas denominadas de activación y de adhesión. Las primeras aparecen, como su nombre indica, durante la activación linfocitaria, y, las segundas, sirven para facilitar la adhesión de unas células con otras o con diferentes substratos. Al igual que en el caso anterior, se utilizó la técnica de IFI (Inmunofluorescencia Indirecta).

b. REACTIVOS:

. Anticuerpo Monoclonal HC 1/1, especificidad CD11c, cedido por el Dr. Fco Sanchez-Madrid.

. Anticuerpo Monoclonal TS 2/7, especificidad CD49a, cedido por el Dr. Fco Sanchez-Madrid .

. Anticuerpo Monoclonal RR 1/1, especificidad CD54, cedido por el Dr. Fco Sanchez-Madrid.

. Anticuerpo Monoclonal TP 1/55, especificidad CD69, cedido por el Dr. Fco Sanchez-Madrid.

. Anticuerpo Monoclonal anti-receptor de transferrina, especificidad CD71, cedido por el Dr. Fco Sanchez Madrid.

. Anticuerpo Monoclonal anti IL-2R, especificidad CD25, cedido por el Dr. Fco Sanchez-Madrid.

. Segundo anticuerpo, marcado con fluoresceina, anti-inmunoglobulina de ratón (Becton Dickinson).

. Tampón de dilución: PBS + BSA 10% .

. Tampón de lavado: PBS + BSA 10% + Azida Sódica 2% .

c. PROCEDIMIENTO:

- Resuspender las células mononucleares, obtenidas mediante doble gradiente, en tampón de dilución y ajustar a $3-5 \cdot 10^6$ células por mililitro.

- Distribuir 100 microlitros de esta suspensión celular en cada uno de los tubos previamente rotulados para tal fin, de

manera que cada uno contenga aproximadamente 300.000-500.000 células.

- Añadir 100 microlitros de los anticuerpos monoclonales a estudiar, a cada uno de los tubos anteriores con sus muestras correspondientes.

- Agitar cuidadosamente los tubos.

- Incubar 30'a 4° C.

- Lavar dos veces con tampón de lavado, durante 5' a 2000 rpm.

- Administrar 2 microlitros del segundo anticuerpo (Antiinmunoglobulinas de ratón fluoresceinado).

- Agitar cuidadosamente los tubos.

- Incubar 30'a 4° C.

- Lavar tres veces con tampón de lavado, durante 5'a 2000 rpm y leer en Facscan.

4.2.4. CUANTIFICACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE LOS MONOCITOS FRENTE A PARTICULAS DE LATEX.

a. FUNDAMENTO.

Esta técnica consta de dos partes, una en la que se pusieron en contacto las células mononucleares de sangre periférica con partículas de látex, las cuales mimetizan el efecto de bacterias en presencia de monocitos, induciendo a estos últimos, al englobamiento o fagocitosis de dichas partículas. Otra, en la que se utilizó la técnica de IFI (Inmunofluorescencia indirecta) con el anticuerpo monoclonal CD36, reconocedor de la serie monocítica-macrofágica, y anti-inmunoglobulinas de ratón fluoresceinada como segundo anticuerpo.

Las células se leyeron en microscopio de luz ultravioleta cuantificando las células CD36+ con látex en su interior y las células CD36+ sin látex en su interior, lo que permite calcular el porcentaje de células monocitarias con capacidad fagocítica.

b. REACTIVOS.

. Anticuerpo monoclonal antimonocitos humanos CD36, (ORTHO OKM5).

. Suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón fluoresceinado (KALLESTAR).

. Suero fetal puro descomplementado (COULTER).

. Látex líquido: DIFCO látex 0.81 (5ml).Ref.3102-56.

. Tampón de dilución: PBS + BSA 10%.

. Tampón de lavado: PBS + BSA 10% + Azida Sódica 2% .

c. PROCEDIMIENTO.

- Las células mononucleares obtenidas mediante doble Ficoll, se resuspenden en tampón de dilución y se ajustan a $8-10 \cdot 10^6$ células por mililitro.

- En un mililitro de la suspensión celular anterior, añadir 30 microlitros de látex líquido y 200 microlitros de suero fetal puro. Mezclar.

- Incubar a 37° C durante 30 minutos.

- Lavar dos veces con tampón de dilución y resuspender las células en 1ml del mismo.

- Distribuir 100 microlitros de esta suspensión celular en cada uno de los tubos previamente rotulados para tal fin, de manera que cada uno contenga aproximadamente $1 \cdot 10^6$ células.

- Añadir 20 microlitros de CD36 a cada uno de los tubos anteriores, con sus muestras correspondientes.

- Agitar cuidadosamente los tubos.

- Incubar 30 minutos a 4° C.

- Lavar dos veces con tampón de lavado, durante 5'a 2000 rpm.

- Administrar 100 microlitros de una dilución 1/8 de suero antiinmunoglobulinas de ratón fluoresceinado.

- Agitar cuidadosamente los tubos.

- Incubar 30' a 4° C.

- Lavar tres veces con tampón de lavado, durante 5' a 2000 rpm.

- Leer en microscopio de luz ultravioleta.

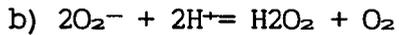
4.2.5. TEST DE REDUCCION DEL NBT.

a. FUNDAMENTO.

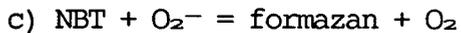
Con esta prueba, se midió de forma indirecta, la actividad metabólica de las células polimorfonucleares. Para ello, se valoró por espectrofotometria, la cantidad de radicales libres (ión superóxido) que aparecen como consecuencia de la actividad oxidativa durante la fagocitosis.

Efectivamente, con la fagocitosis se produce un incremento del consumo de oxígeno y una activación del metabolismo celular del fagocito, dando lugar a un aumento de la energía disponible y a la activación de la enzima NADPH presente en la membrana de los granulocitos.

La NADPH activada libera radicales superóxidos:



El NBT de color amarillo claro, es reducido a formazan de color azul violáceo, en presencia de O_2^- :



b. REACTIVOS.

. Nitro Azul de Tetrazolio (Sigma) N 6876, 0.8mg/ml PBS.

. Phorbol 12 Myristate 13 Acetate (Sigma) NP-8139, (TPA) stock 10 micromolar en DMSO 100% .

. N-Ethylmaleimide (Sigma) N E-3876, 1mM.

. Dioxano (Panreac).

c. PROCEDIMIENTOS.

- Colocar en baño con agitación a 37° centígrados, dos tubos de

vidrio con rosca (Pirex), administrar 0'5 cc de solución de NBT en cada uno de ellos.

- Añadir 0'5 cc de la suspensión celular (granulocitos), ajustada a $6 \cdot 10^6$ de células/ml, en cada uno de ellos.

- En uno de los tubos adicionar la estimulación con 10 microlitros de la solución de TPA previamente preparada a partir del stock, a una dilución 1/1000 en agua destilada.

- Incubar de 1 a 3 horas en baño con agitación a 37° C.

- Parar la reacción con 5 ml de N-Ethylmaleimide.

- Centrifugar 10' a 2000 rpm, tras lo cual se tira el sobrenadante y se añaden 2 ml, a cada tubo de Dioxano.

- Calentar los tubos con su contenido al baño de Maria 10' a 85 grados centígrados.

- Leer la densidad óptica, del contenido de los tubos, frente al dioxano entre 580-560 nm.

4.2.6. DETERMINACION DE SUBCLASES DE IgG MEDIANTE TECNICAS DE ELISA.

a. FUNDAMENTO.

La cuantificación de las subclases de IgG se realizó por técnicas de "sandwich" enzimoimmunoensayo, también conocidas como test de ELISA (Enzyme-Linked Immunospecific Assay).

La identificación de los complejos Ag-Ac, se efectúa mediante el empleo de enzimas, bien unidas al antígeno, o bien al anticuerpo. En nuestro caso la enzima que se utilizó fué la peroxidasa.

El complejo Ag-Ac se detecta cuando al administrar el sustrato (inoloro), este adquiere color por la acción de la enzima, los cambios de color que se producen son detectados por colorimetría.

b. REACTIVOS.

. Kits para IgG1 (The Binding site) No MK006.

. Kits para IgG2 (The Binding site) No MK007.

- . Kits para IgG3 (The Binding site) No MKO08.

- . Kits para IgG4 (The Binding site) No MKO09.

c. METODO.

- Diluir el suero standard en buffer de lavado dilución, para producir una dilución inicial de 1/100. Esta dilución inicial, va seguida de otras diluciones seriadas (hasta 7) para cada subclase (Según se indica en la hoja resumen de cada lote).

- Diluir el suero control en buffer de lavado dilución, para producir una dilución inicial de 1/300. Esta va seguida de una dilución para la determinación de IgG₁, y una dilución separada para la determinación de IgG_{2,3} y 4.

- Muestras a testar: Diluir las muestras a testar de acuerdo con la concentración de IgG total, para dar valores dentro de 60 veces el rango de la curva standar. Como guia, las muestras de suero con niveles normales de IgG total, deberán diluirse como el suero control.

- Las muestras previamente diluidas, los sueros controles y los standars, se colocarán en la placa según el registro previo que

se haya realizado en la planilla. Se recomienda, que sean colocados por duplicado y se administrarán 100 microlitros por pocillo, de cada una de ellas.

- Cubrir los pocillos con tiras de sellado para evitar que estos se resequen e incubar a 37° C durante 2 horas.

- Lavar la placa tres veces con buffer de lavado dilución. Una vez lavada, deberá dejarse invertida sobre papel absorbente, dando leves golpecitos.

- Diluir el conjugado en buffer de lavado dilución para producir una dilución inicial, esta va seguida de una segunda dilución para cada subclase y conseguir así, el reactivo de trabajo. (Ver hoja de cada lote). Dispensar 100 microlitros del conjugado a cada pocillo.

- Sellar la placa e incubar a 37° C durante 2 horas.

- Lavar la placa tres veces con buffer de lavado dilución y secar con papel absorbente.

- Dispensar 100 microlitros del sustrato, previamente preparado, a cada pocillo. El sustrato deberá administrarse

rapidamente, para evitar derivaciones en el ensayo.

- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Parar la reacción con 50 microlitros, de la solución de parada, a cada pocillo.
- Medida del color: la densidad óptica de cada pocillo deberá leerse a 450 nm. en un lector de microplacas en el intervalo de 2 horas.
- Calculo de los resultados: Se realizarán, extrapolando los valores de cada una de las muestras, a la curva standar obtenida, y más tarde se multiplicarán los valores por cada uno de los factores de dilución empleados en cada caso.

4.2.7. DETERMINACION DE REACTANTES DE FASE AGUDA, EN SUERO, MEDIANTE TECNICAS DE NEFELOMETRIA.

La determinación de reactantes de fase aguda se efectuó mediante técnicas de nefelometria y fué llevada a cabo por el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Virgen del Rocio de Sevilla.

4.2.8. ESTUDIOS ESTADISTICOS.

El análisis estadístico, de los resultados obtenidos, se llevó a cabo con el programa KWIKSTAT 2.00

4.2.8.1. TEST DE REGRESION LINEAL.

Para conocer la relación existente entre la linfopenia (CD3, CD4 y CD8) de los pacientes críticos (Traumatizados y Quemados) y su grado de gravedad clínico (TS y %Q) se utilizó el estudio de regresión lineal simple, que tiene como finalidad principal establecer un modelo de predicción del valor de la variable Y (en nuestro caso TS o %Q), según sea el valor específico de X (en nuestro caso valor absoluto de linfocitos CD3 ó CD4 ó CD8).

La ecuación de regresión lineal es: $Y = a + b.X$, donde:

- Y: TS ó %Q
- X: Valores absolutos de linfocitos CD3 ó CD4 ó CD8.
- a: Punto de intersección, es decir el valor de Y cuando X es 0.
- b: Es la pendiente de la recta , es decir, el cambio en Y resultante de un cambio en X de una unidad.

Para conocer la potencia o magnitud de asociación entre las variables X e Y (linfopenia y TS ó %Q), se empleó el coeficiente de correlación de Pearson (r), que puede adoptar valores entre 1 y -1, según la potencia de asociación, así:

Valores absolutos de r	Grado de asociación
0.8 - 1	Fuerte
0.5 - 0.8	Moderado
0.2 - 0.5	Debil
0 - 0.2	Insignificante
-1 - 0	No existe relación

La significación estadística de los resultados ("p") nos proporcionó información de la probabilidad de que la relación existente entre las variables X (linfopenia) e Y (TS o %Q) se debiesen única y exclusivamente al azar. Así, aquellos valores de $p < 0.05$ se interpretaron como estadísticamente significativos, mientras que valores de $p > 0.05$ se valoraron como no significativos.

4.2.8.2. TEST DE STUDENT.

El test de Student se empleó para comparar los parámetros inmunológicos obtenidos en diferentes grupos de enfermos o, entre un grupo de enfermos y el grupo control sano.

Elegimos esta prueba por tratarse de grupos independientes y ser las variables cuantitativas y numericamente distribuidas.

La significación estadística de los resultados ("p"), se calculó mediante el test para igualdad de varianzas, de tal forma que si las varianzas eran iguales $p > 0.05$ se tomaban directamente los valores de la "p" de la t de Student, mientras que si las varianzas eran desiguales $p < 0.05$, los valores de la "p" de la t de Student eran corregidos y modificados por el propio programa Kwikstat.

En resumen, aquellos valores de la "p" de la t de Student inferiores a 0,05 se interpretaron como estadísticamente significativos, mientras que valores de p superiores a 0,05 se valoraron como no estadísticamente significativos.

5.-RESULTADOS.

El estudio inmunológico de los 59 pacientes críticos (Traumatizados y Quemados), fué realizado de manera secuencial. Los enfermos politraumatizados fueron estudiados durante las primeras 48 horas posteriores al traumatismo, a los 7 días y a los 15 días. El estudio de los enfermos quemados fué realizado en las primeras 48 horas, a los 15 días y a los 30 días después de sufrir las quemaduras.

5.1. EL SISTEMA INMUNE EN LAS PRIMERAS 48 HORAS TRAS EL ACCIDENTE.

La exploración de los pacientes politraumatizados y quemados en las primeras horas del accidente, demostró la presencia de una profunda linfopenia en ambos grupos, que afectaba a las subpoblaciones CD3+, CD4+ y CD8+, correspondientes a los linfocitos T totales, T cooperadores y T citotóxicos respectivamente. Los valores hallados, que se expresan en la Tabla 1, mostraron diferencias altamente significativas cuando se compararon a los obtenidos en el grupo control.

Aplicando métodos de regresión lineal se observó que el grado de linfopenia inicial, y, más concretamente, los valores de linfocitos CD3 y CD4, guardaron relación con la gravedad clínica, medida según el TS (Trauma Score) de los pacientes traumatizados. En cambio, no se observó relación alguna entre el descenso de linfocitos y la extensión de las quemaduras en los pacientes quemados. Estos datos pueden ser observados en las Figuras 1,2 y 3 (traumatizados), y 4,5 y 6 (quemados).

	CONTROLES N=32	TRAUMATIZADOS N=32	QUEMADOS N=27
CD3+ céls/ μ l (media \pm d.s.)	1672 \pm 475	662 \pm 320*	1097 \pm 667*
CD4+ céls/ μ l (")	992 \pm 320	394 \pm 238*	698 \pm 381**
CD8+ céls/ μ l (")	722 \pm 211	275 \pm 146*	403 \pm 335*

* p< 0.001, **p= 0.002

Tabla 1.- Subpoblaciones de linfocitos T en pacientes politraumatizados y quemados, 48 horas después del accidente, se usaron anticuerpos monoclonales y citometria de flujo. Los valores son expresados en números absolutos de linfocitos positivos para cada anticuerpo monoclonal.

FIGURA 2.- Análisis de regresión lineal simple entre valores de Linfocitos CD4+ y T.S.

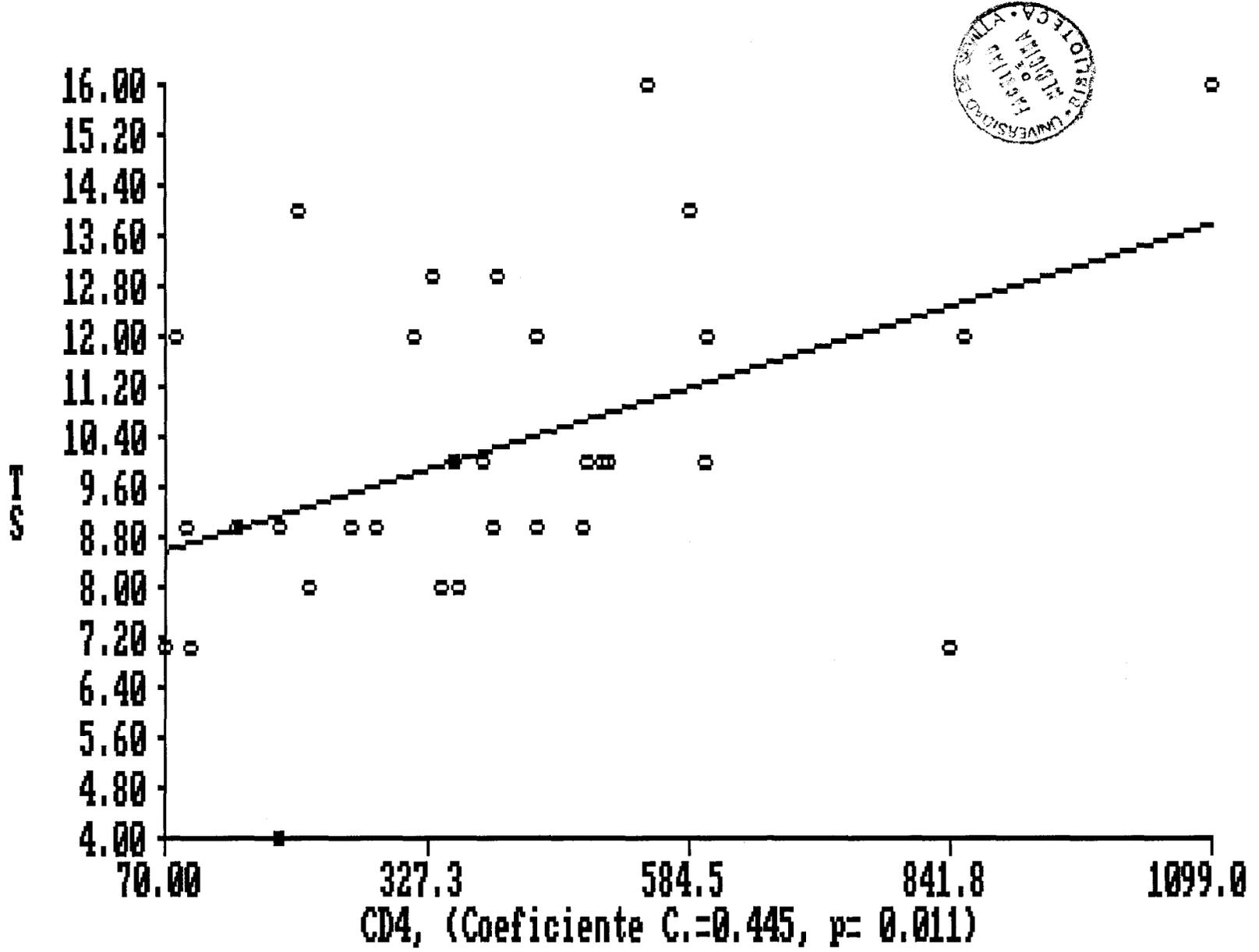


FIGURA 3.- Análisis de regresión lineal simple entre valores de linfocitos CD8+ y T.S.

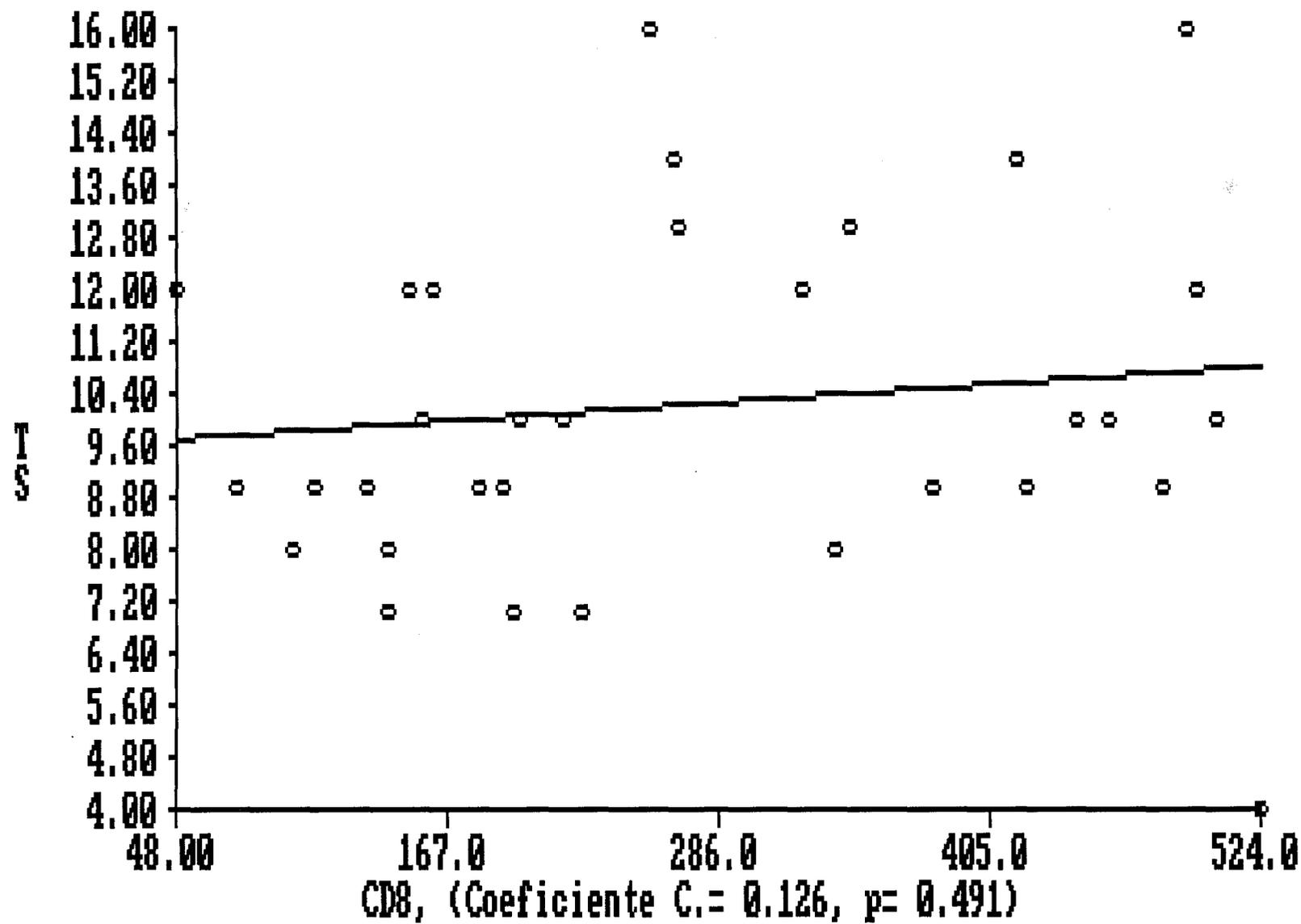


FIGURA 4.- Análisis de regresión lineal simple entre valores de linfocitos CD3+ y S.C.S.

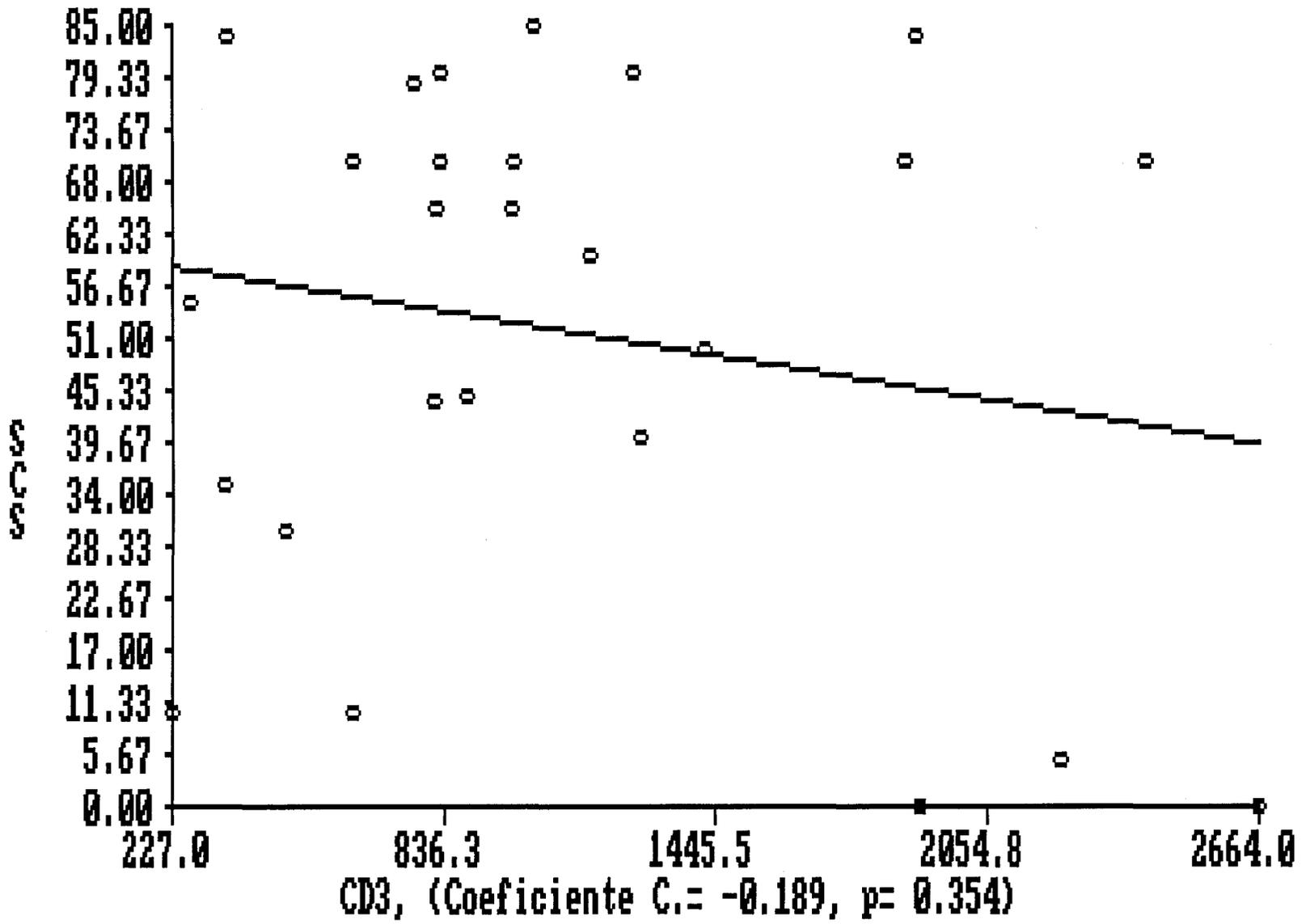


FIGURA 5.- Análisis de regresión lineal simple entre valores de linfocitos CD4+ y S.C.S.

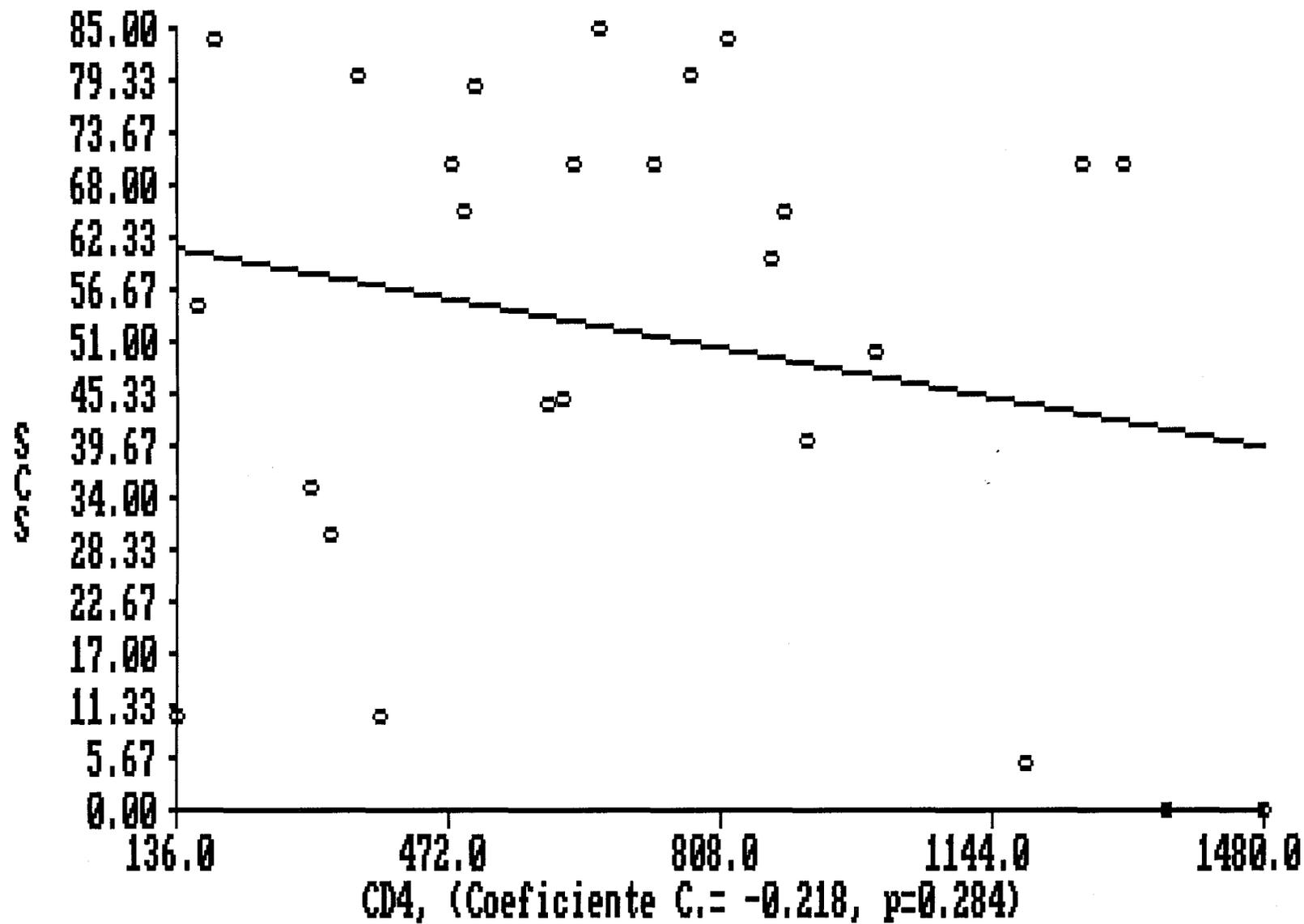
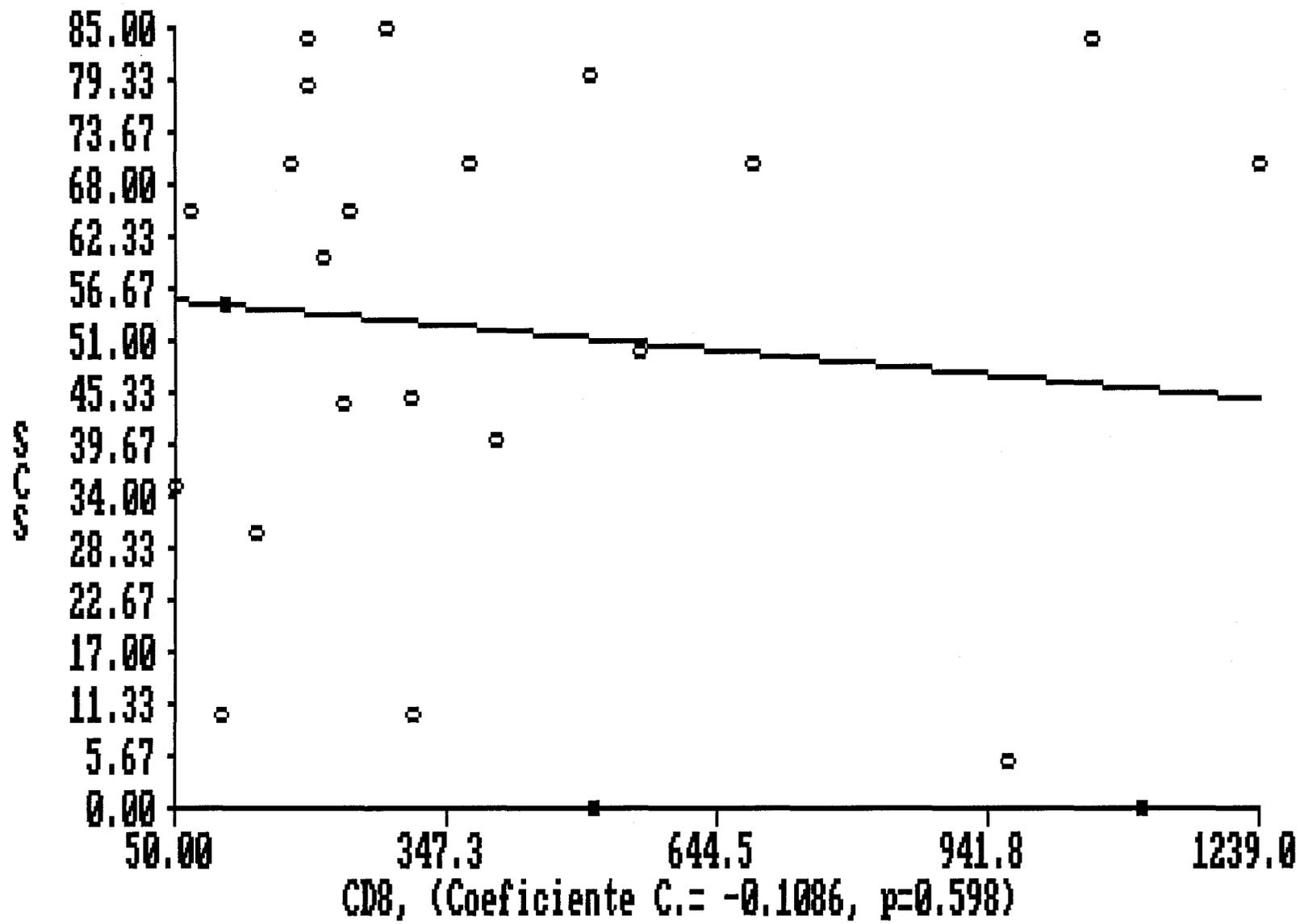


FIGURA 6.- Análisis de regresión lineal simple entre valores de Linfocitos CD8+ y S.C.S.



En las Tablas 2 y 3, se detallan los resultados obtenidos en ambos grupos de pacientes al estudiar otras subpoblaciones linfocitarias, así como el estado de la fagocitosis, la producción de radicales libres, los reactantes de fase aguda y los valores de IgG.

La población de células NK, se encontró disminuida en los traumatizados y quemados, aunque dicha disminución sólo fue estadísticamente significativa en el grupo de pacientes politraumatizados ($p = 0.001$).

Las cifras de linfocitos B así como la de linfocitos T que expresaban moléculas HLA de clase II no presentaron modificaciones con respecto al grupo control.

En el análisis del sistema monocítico-macrofágico, se encontró una reducción en la ingestión de partículas de látex tanto en pacientes traumatizados como en quemados. En ambos casos, las diferencias con respecto a los valores observados en el grupo control fueron estadísticamente significativas ($p = 0.01$ y $p = 0.009$) respectivamente.

La producción de radicales libres, medida por el método de reducción del NBT, no mostró alteraciones con respecto al grupo control. Por el contrario, los valores de Proteína C Reactiva

(PCR) se hallaron significativamente aumentados en ambos grupos de pacientes ($p < 0.001$).

Por último, los valores de IgG total se encontraron descendidos significativamente tanto en los enfermos traumatizados como en los quemados ($p < 0.001$). Esta disminución, se llevó a cabo a expensas fundamentalmente de una reducción en las subclases IgG2 e IgG3 para los traumatizados e IgG1, IgG2 e IgG3 para los quemados, siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo control sano. Estos datos pueden ser observados en la tabla 4.

	CONTROLES N=32	TRAUMATIZADOS N=32	P-STUDENT
CD3+ cels/ μ l (media \pm d.s.)	1672 \pm 475	662 \pm 320	< 0.001
CD4+ cels/ μ l (")	992 \pm 320	394 \pm 238	< 0.001
CD8+ cels/ μ l (")	722 \pm 211	275 \pm 146	< 0.001
CD19+ cels/ μ l (")	291 \pm 191	300 \pm 318	0.681
CD16+ cels/ μ l (")	261 \pm 148	115 \pm 151	0.001
HLA-claseII " (")	125 \pm 97	133 \pm 132	0.786
FAGOCITOSIS (% cels/latex +)	99%	84%	0.010
RADICALES LIBRES (Absv media \pm d.s.)	0.168 \pm 0.09	0.157 \pm 0.11	0.738
PROTEINA C R. mg/l (media \pm d.s.)	0	131 \pm 97	< 0.001
IgG TOTAL mg/dl (media \pm d.s.)	1148 \pm 356	818 \pm 283	< 0.001

Tabla 2.- Comparación, sistema inmune, controles con politraumatizados tras las 48 horas del traumatismo.

	CONTROLES N=32	QUEMADOS N=27	P-STUDENT
CD3+ cels/ μ l (media \pm d.s.)	1672 \pm 475	1097 \pm 667	< 0.001
CD4+ cels/ μ l (")	992 \pm 320	698 \pm 381	0.002
CD8+ cels/ μ l (")	722 \pm 211	403 \pm 335	0.002
CD19+ cels/ μ l (")	291 \pm 191	296 \pm 360	0.874
CD16+ cels/ μ l (")	261 \pm 148	195 \pm 211	0.206
HLA-claseII " (")	125 \pm 97	149 \pm 288	0.685
FAGOCITOSIS (% cels/latex +)	99%	85%	0.009
RADICALES LIBRES (Absv media \pm d.s.)	0.168 \pm 0.09	0.193 \pm 0.01	0.526
PROTEINA C R. mg/l (media \pm d.s.)	0	138 \pm 178	< 0.001
IgG TOTAL mg/dl (media \pm d.s.)	1148 \pm 356	895 \pm 963	< 0.001

Tabla 3.- Comparación, sistema inmune, controles con quemados tras las 48 horas de la lesión térmica.

	CONTROL N=10	TRAUMATIZADOS N=16	QUEMADOS N=13
IgG1 g/l (media ± d.s.)	5.6 ± 0.67	5.5 ± 2.6*	3.4 ± 2.6***
IgG2 g/l (")	3 ± 0.47	1.7 ± 1.5**	0.8 ± 1***
IgG3 g/l (")	0.4 ± 0.11	0.1 ± 0.2***	0.1 ± 0.1***
IgG4 g/l (")	0.1 ± 0.09	0.1 ± 0.26*	0.06 ± 0.03*

*NS, **P<0.05, ***P<0.005.

Tabla 4.- Valores medios y desviación standar de las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) en pacientes traumatizados y quemados comparados con el grupo control, 48 horas tras el traumatismo.

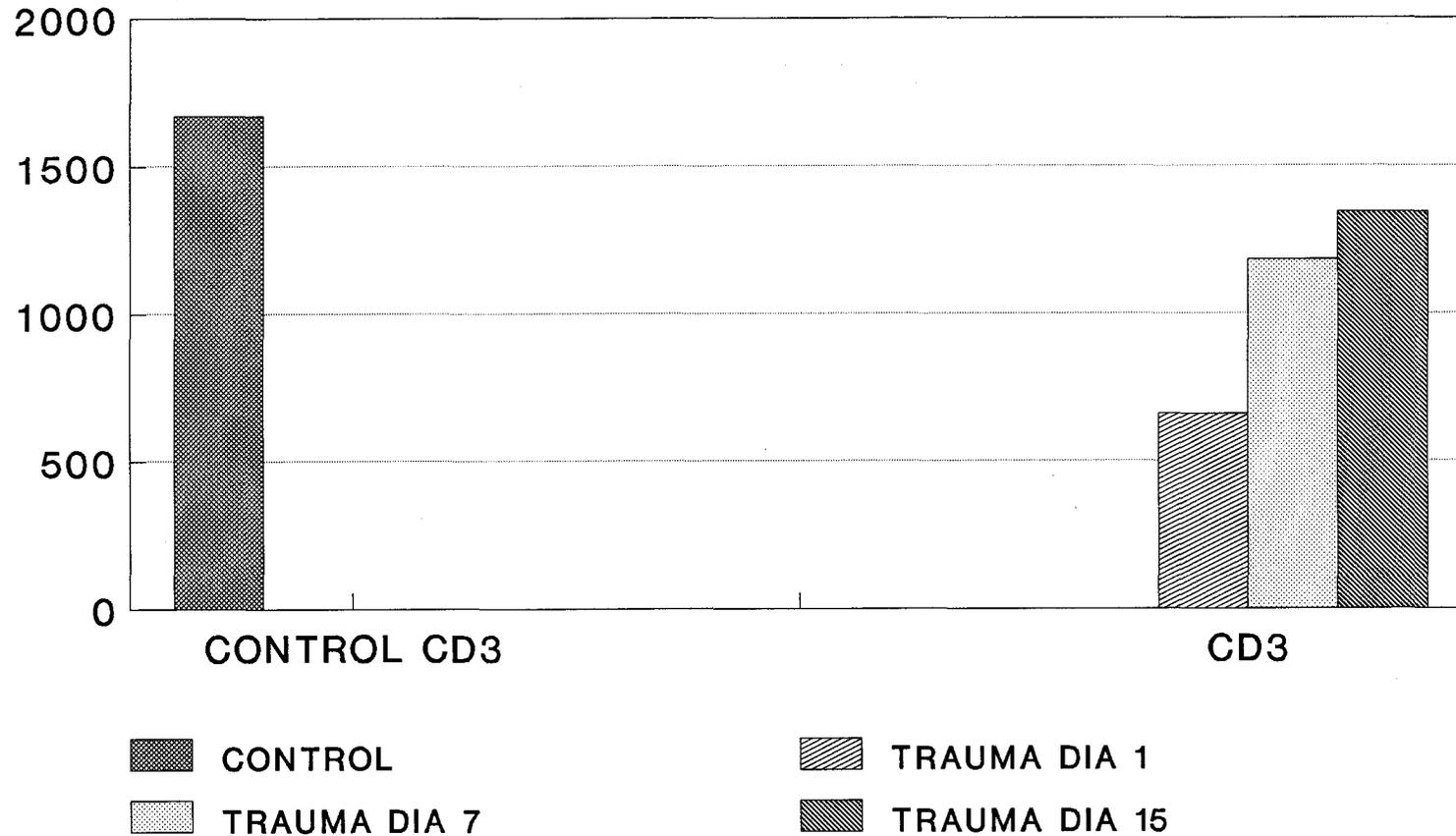
5.2. VALORACION DEL SISTEMA INMUNE A LO LARGO DE LA EVOLUCION PATOLOGICA DEL TRAUMA Y LA QUEMADURA.

Los gráficos que a continuación se exponen, recogen los resultados que se obtuvieron al efectuar el estudio secuencial, de los diferentes parámetros del sistema inmune, de los pacientes traumatizados y quemados, en distintos momentos de su proceso patológico, comparándolos con los del grupo control.

Para los traumatizados el estudio se realizó a las 48 horas, a los 7 días y a los 15 días tras el accidente. Para los quemados, los resultados se obtuvieron a las 48 horas, a los 15 días y a los 30 días tras la lesión térmica.

Como puede observarse en las figuras 7, 8, y 9 para politraumatizados y 10, 11 y 12 para quemados, la linfopenia inicial tras el accidente, que afectó a linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ fué desapareciendo con el tiempo a medida que el paciente mejoró y fué adquiriendo cifras similares a los del grupo control sano, cuyos valores estan expresados en forma de columna única a la izquierda de las figuras, mientras que los valores secuenciales del grupo politraumatizado o quemado son expresados por tres columnas consecutivas seperadas en el tiempo según dibujo.

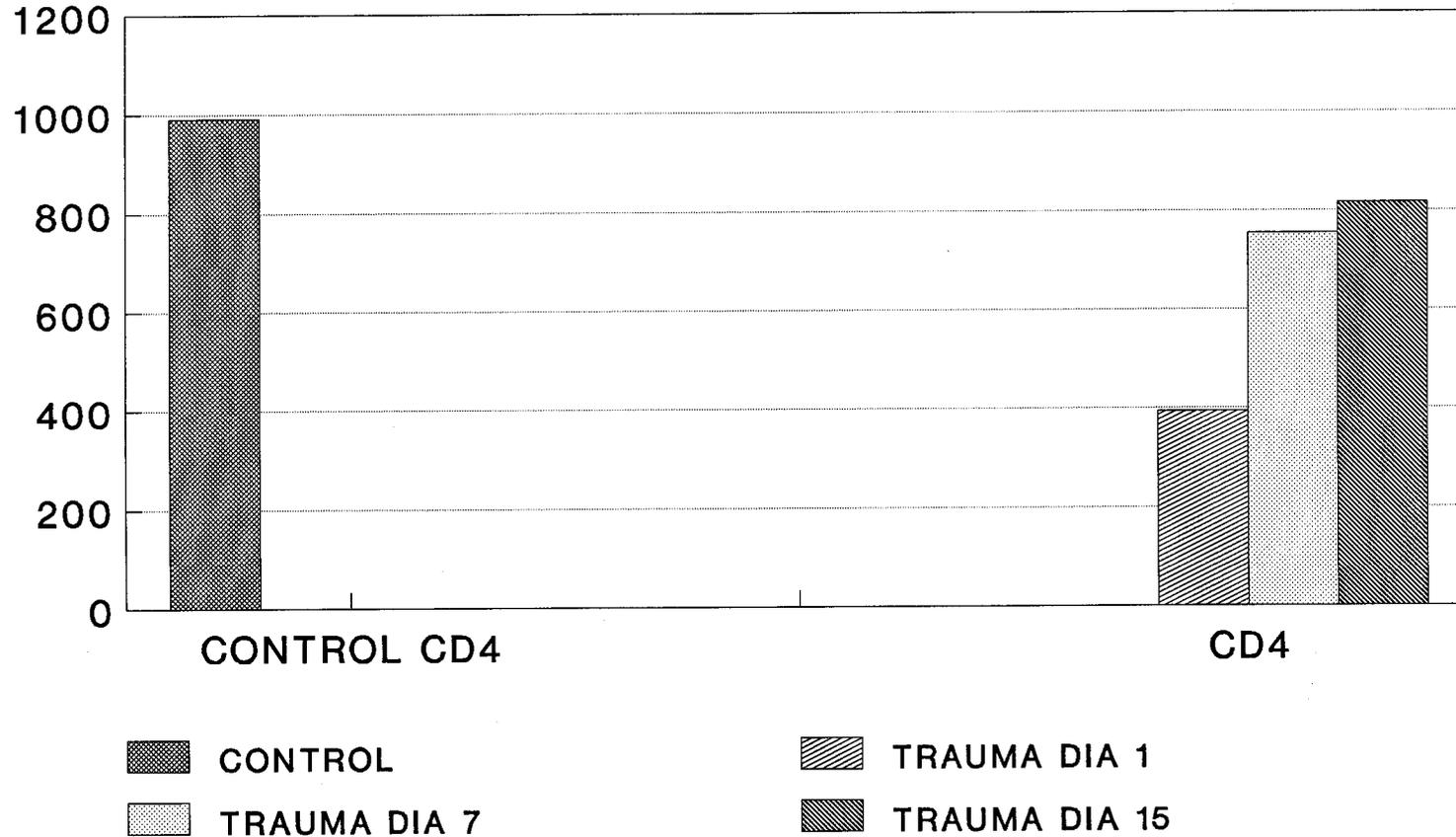
MEDIA DE LINFOCITOS CD3 EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 7.

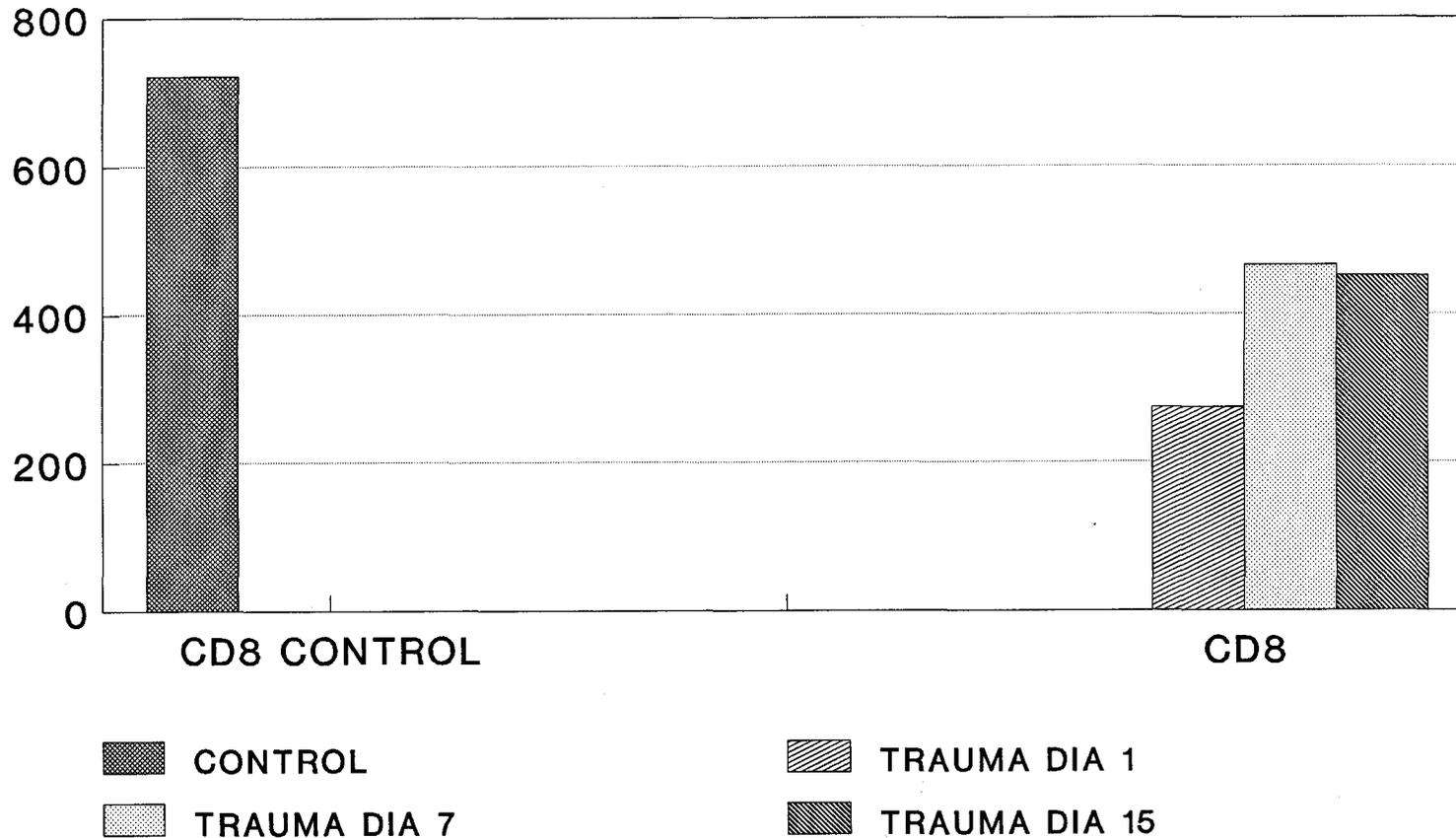
MEDIA DE LINFOCITOS CD4 EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 8.

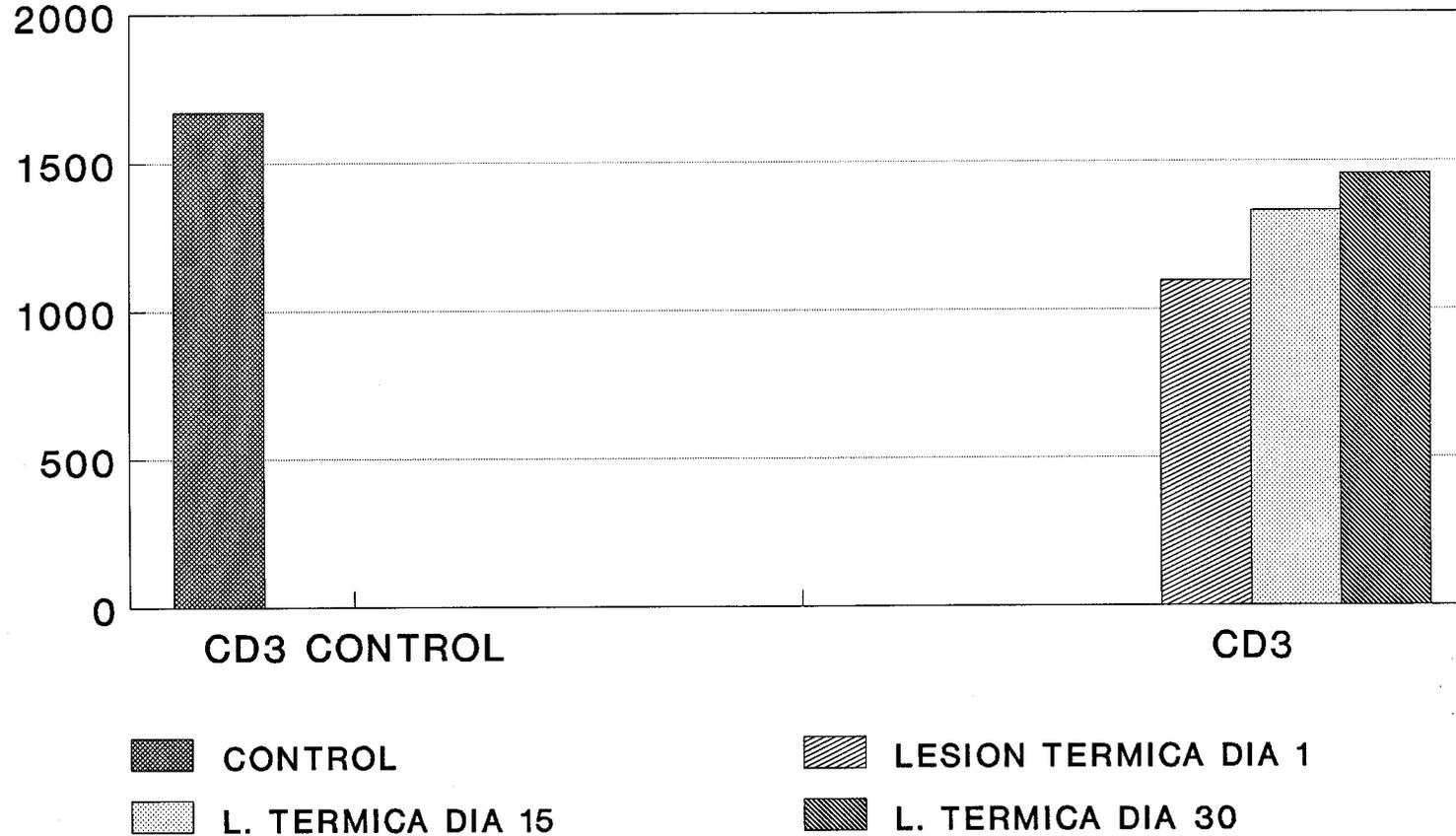
MEDIA DE LINFOCITOS CD8 EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 9.

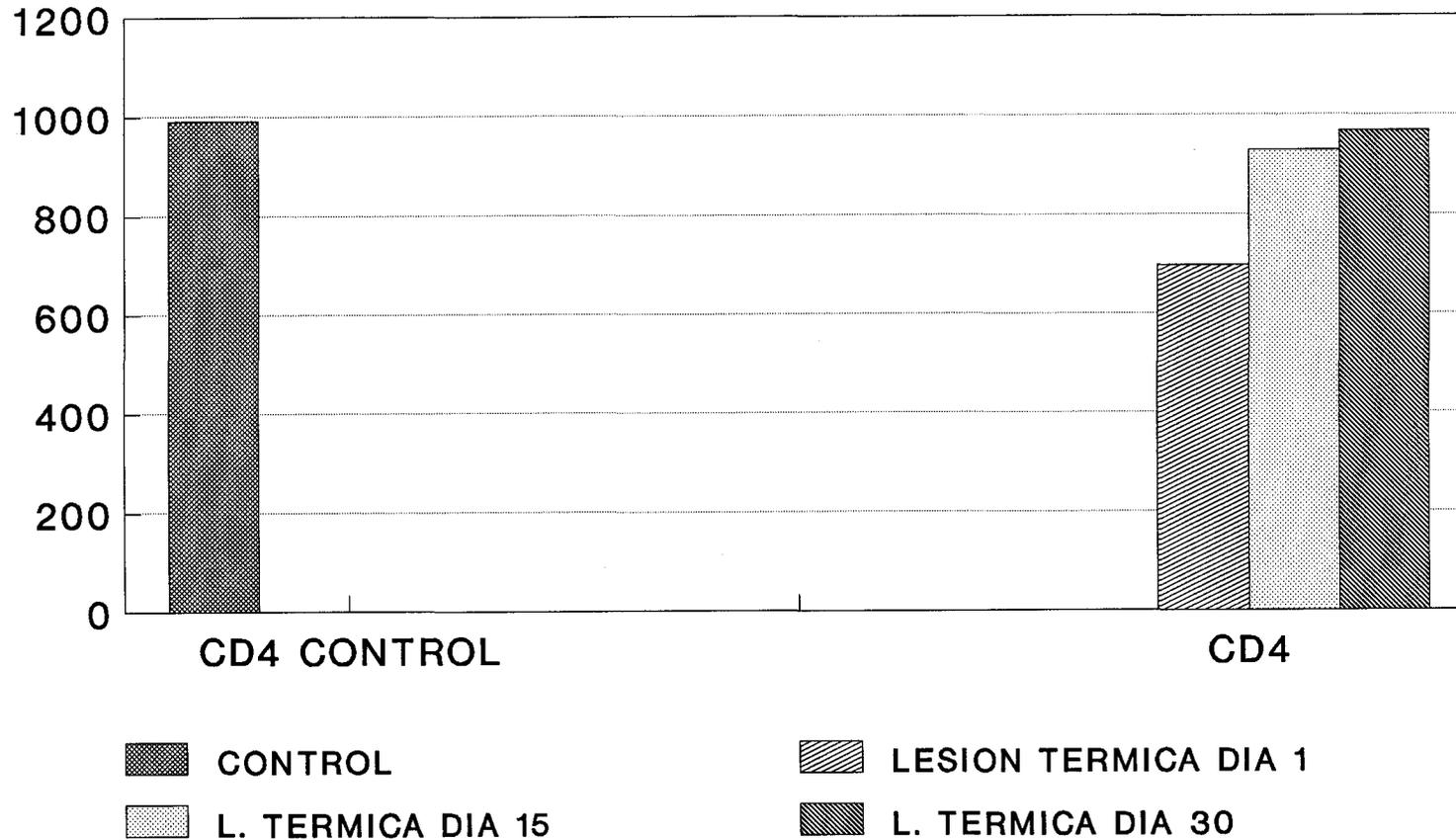
MEDIA DE LINFOCITOS CD3 EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 10

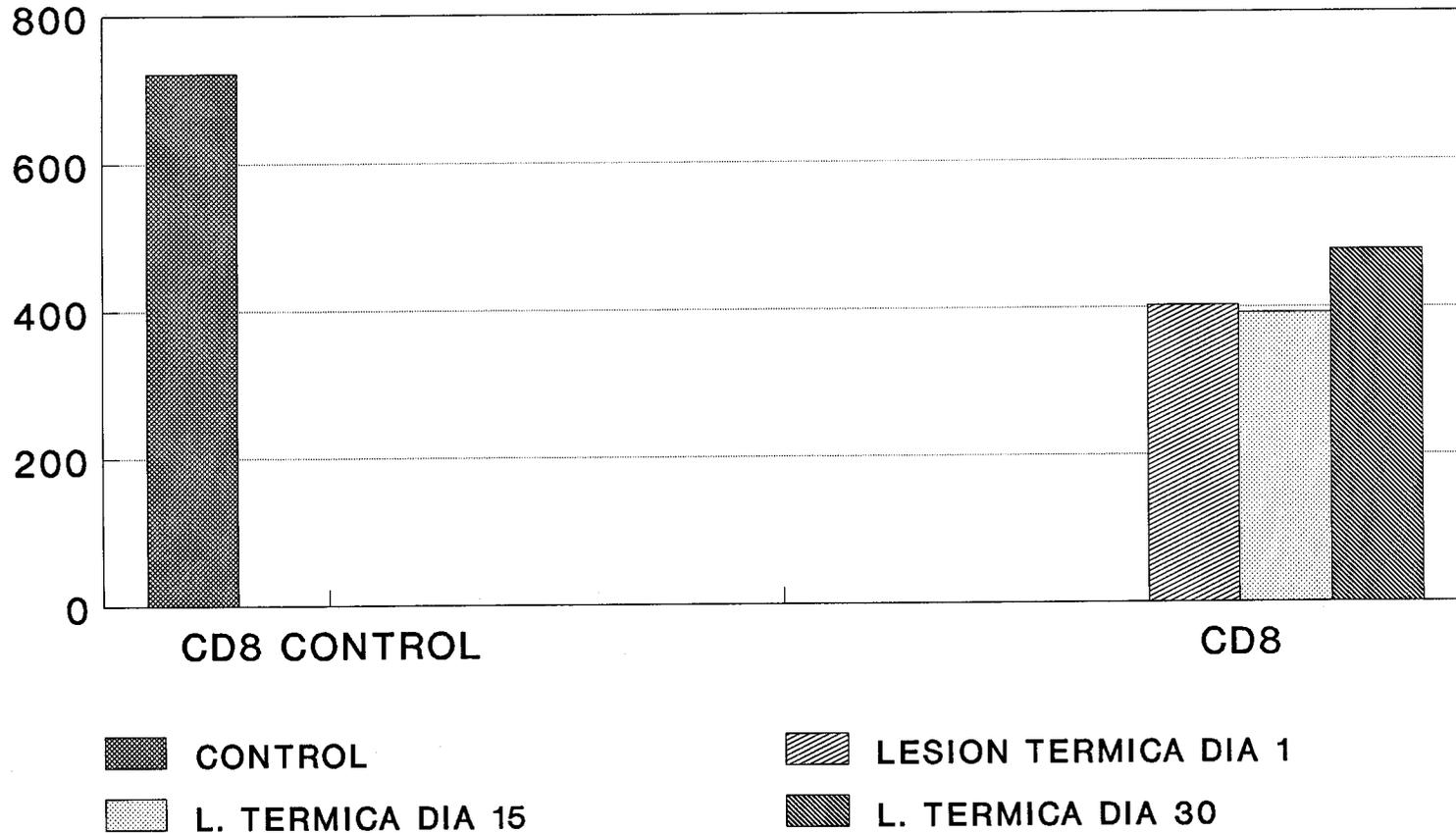
MEDIA DE LINFOCITOS CD4 EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 11.

MEDIA DE LINFOCITOS CD8 EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

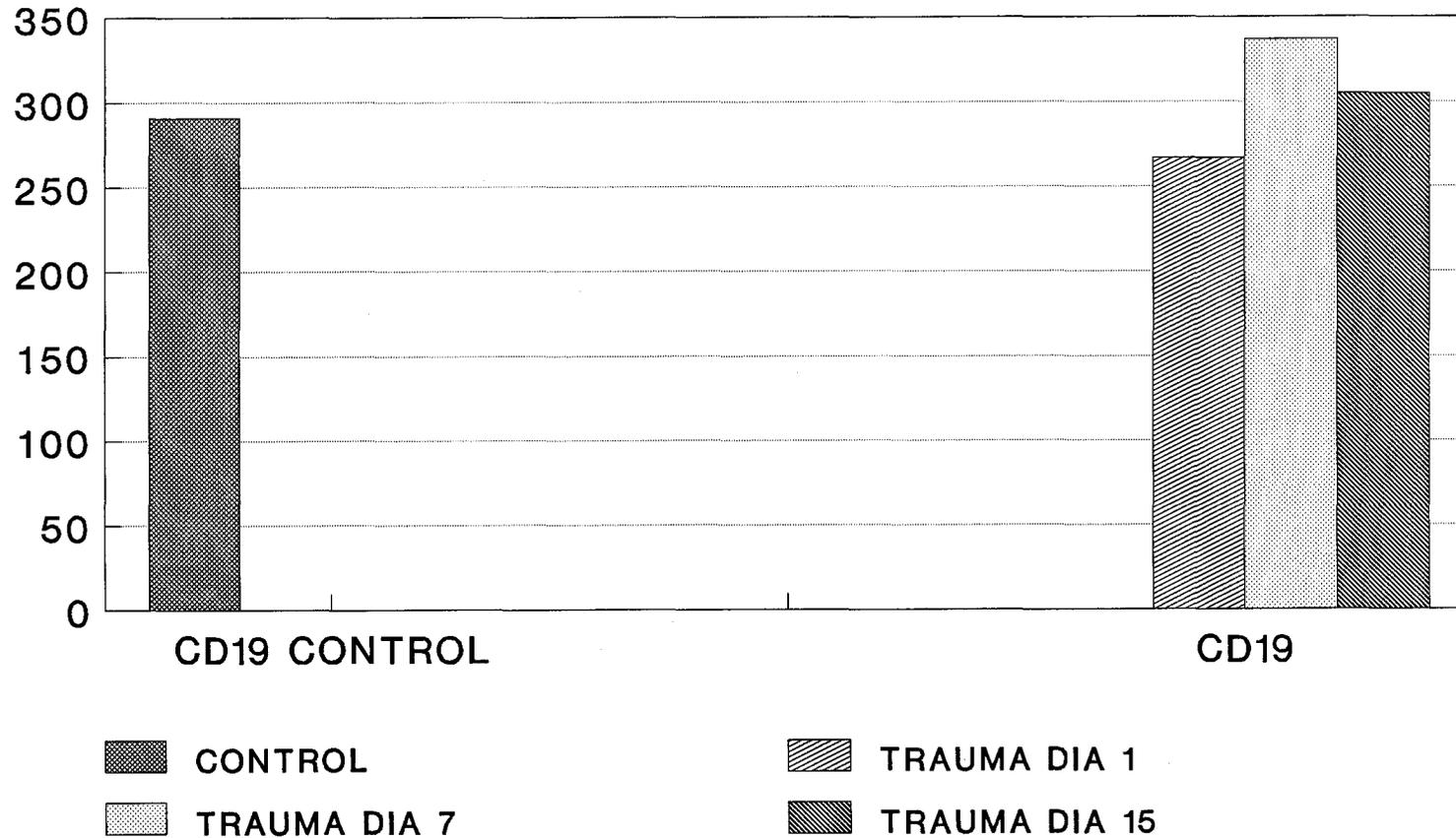
Figura 12.

La evolución de los linfocitos B (CD19+), esquematizados en las figuras 13 y 14 para politraumatizados y quemados respectivamente, no sufrieron modificaciones importantes, con respecto al grupo control sano, en el caso de los politraumatizados. Sin embargo, el grupo quemado presentó un descenso progresivo a lo largo de su evolución, como indican las tres barras del gráfico.

Las células NK (CD16+), representadas en las figuras 15 y 16 para politraumatizados y quemados respectivamente, mostraron un descenso importante con respecto al grupo control sano, en los tres estudios secuenciales del grupo politraumatizado, pero el grupo quemado, a pesar de que mostró los dos primeros estudios con descensos importantes, al tercer estudio (un mes tras el accidente), presentó ya cifras similares al grupo de los sanos.

La expresión de HLA-Clase II, por linfocitos T, para politraumatizados y quemados, que puede observarse en las figuras 17 y 18 respectivamente, mostró en los politraumatizados un aumento progresivo desde el primer día hasta el día 15 después del traumatismo. El grupo quemado, por su parte, presentó fluctuaciones con respecto al grupo control sano, destacando elevaciones en el primer y tercer estudio y descenso en el segundo.

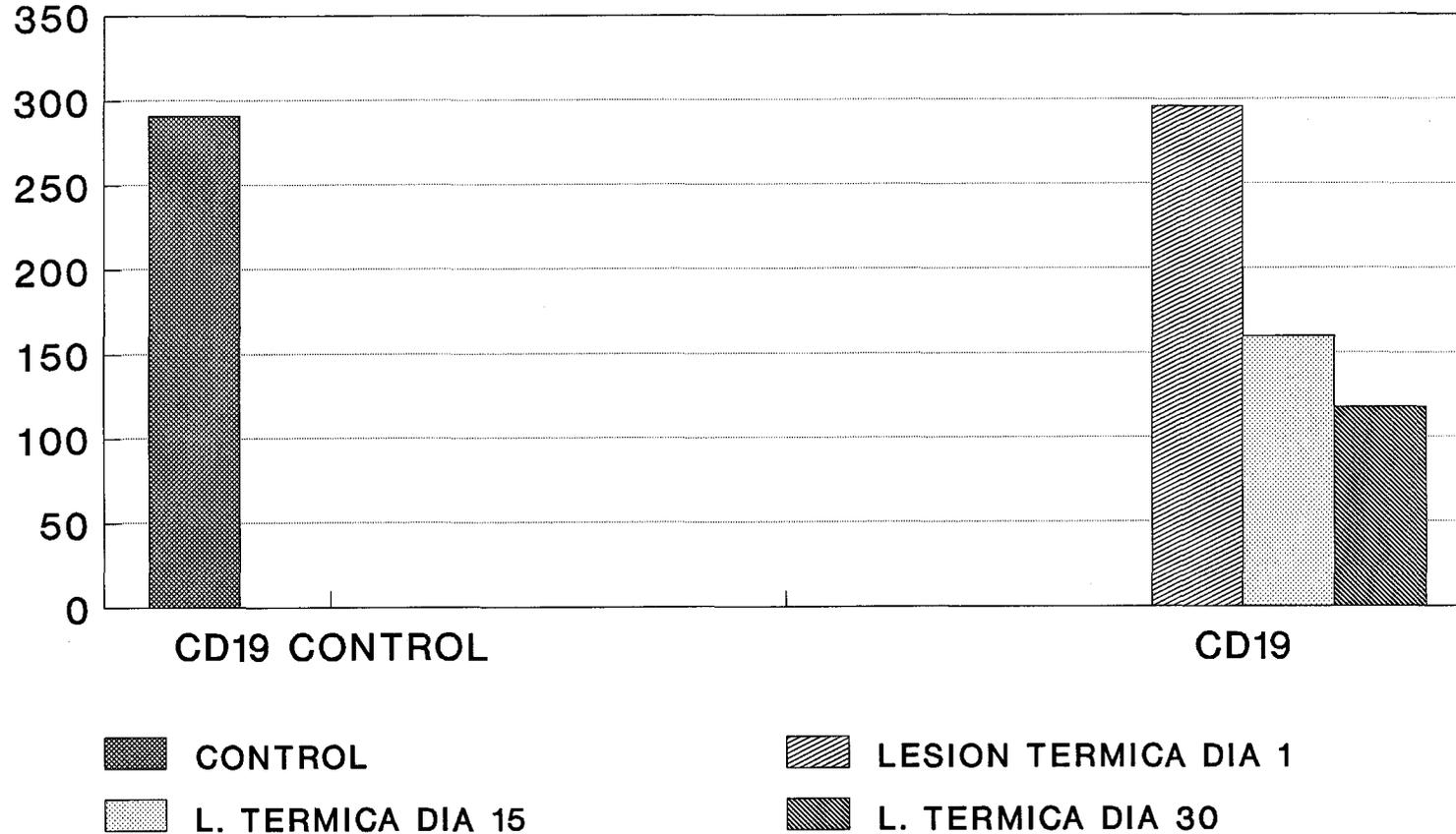
MEDIA DE LINFOCITOS CD19 EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 13.

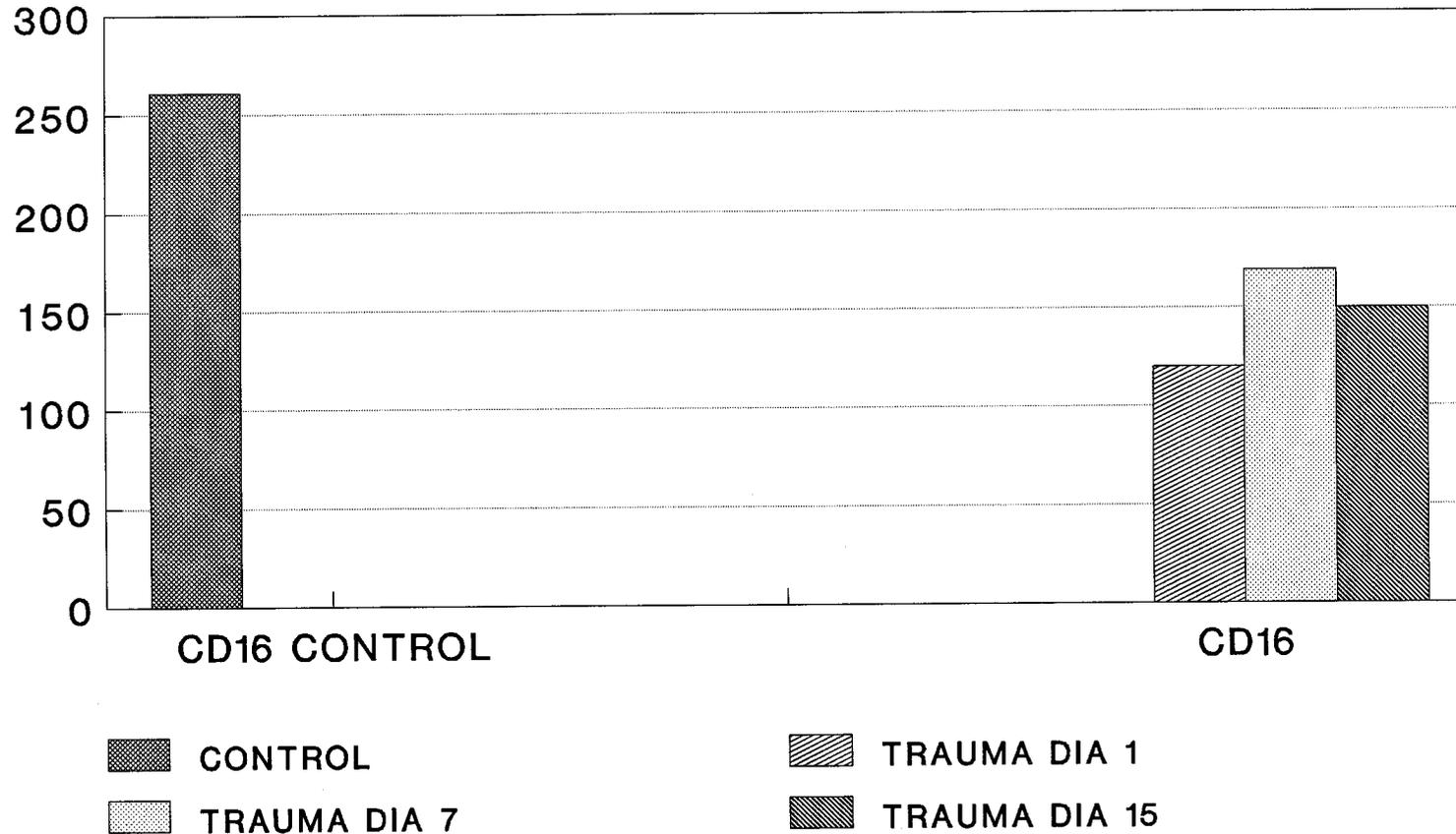
MEDIA DE LINFOCITOS CD19 EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 14.

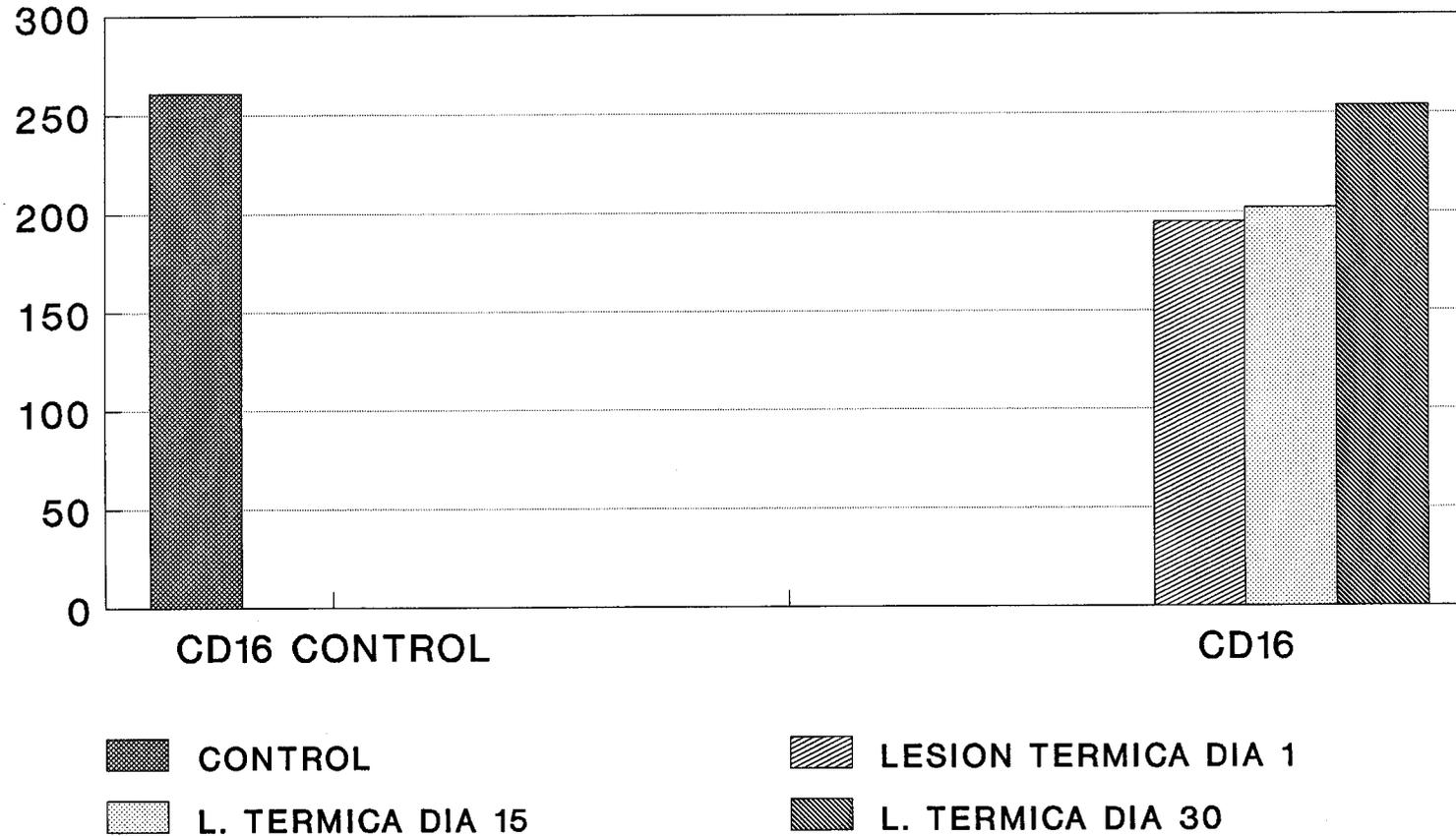
MEDIA DE LINFOCITOS CD16 EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 15.

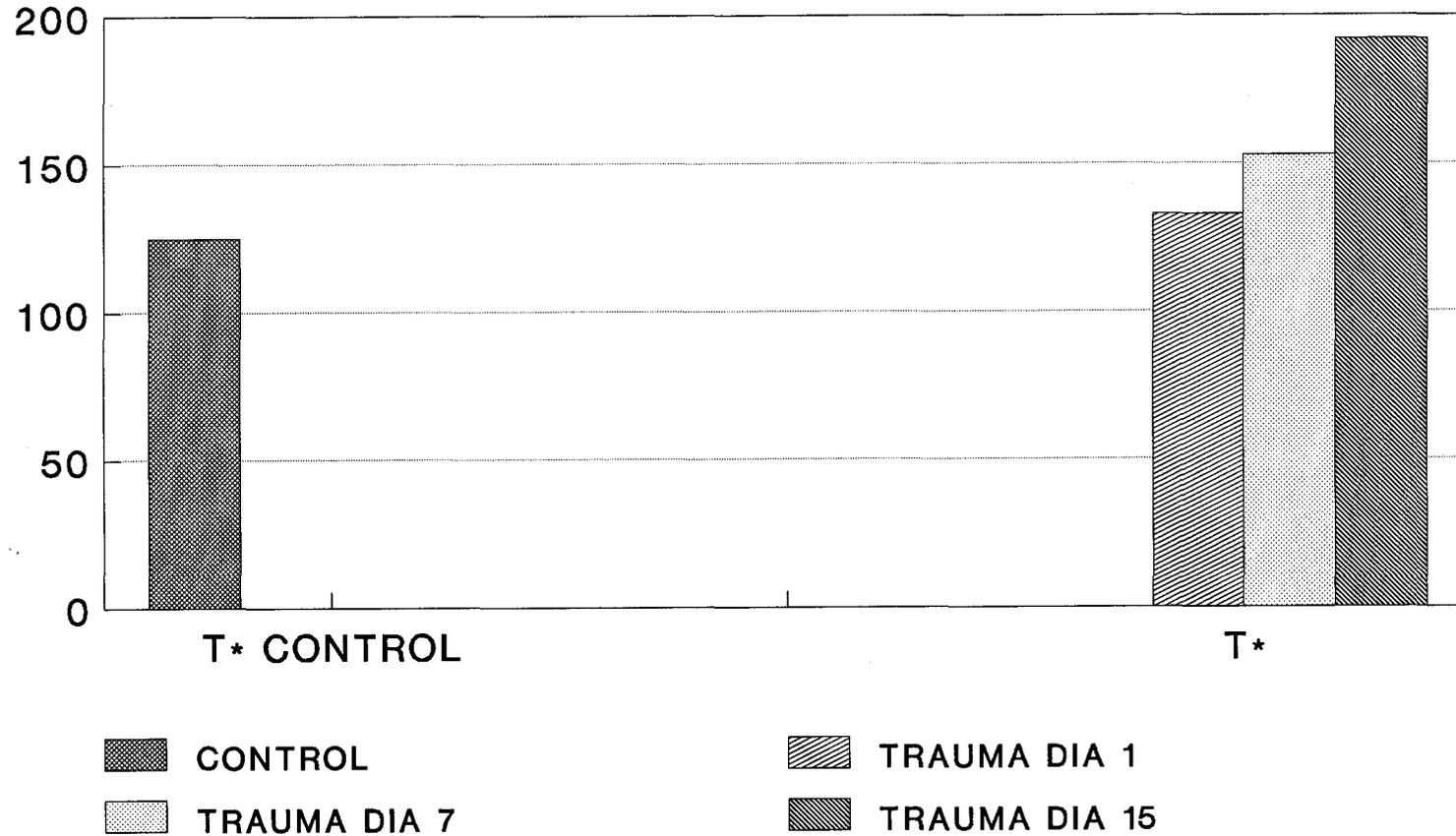
MEDIA DE LINFOCITOS CD16 EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 16.

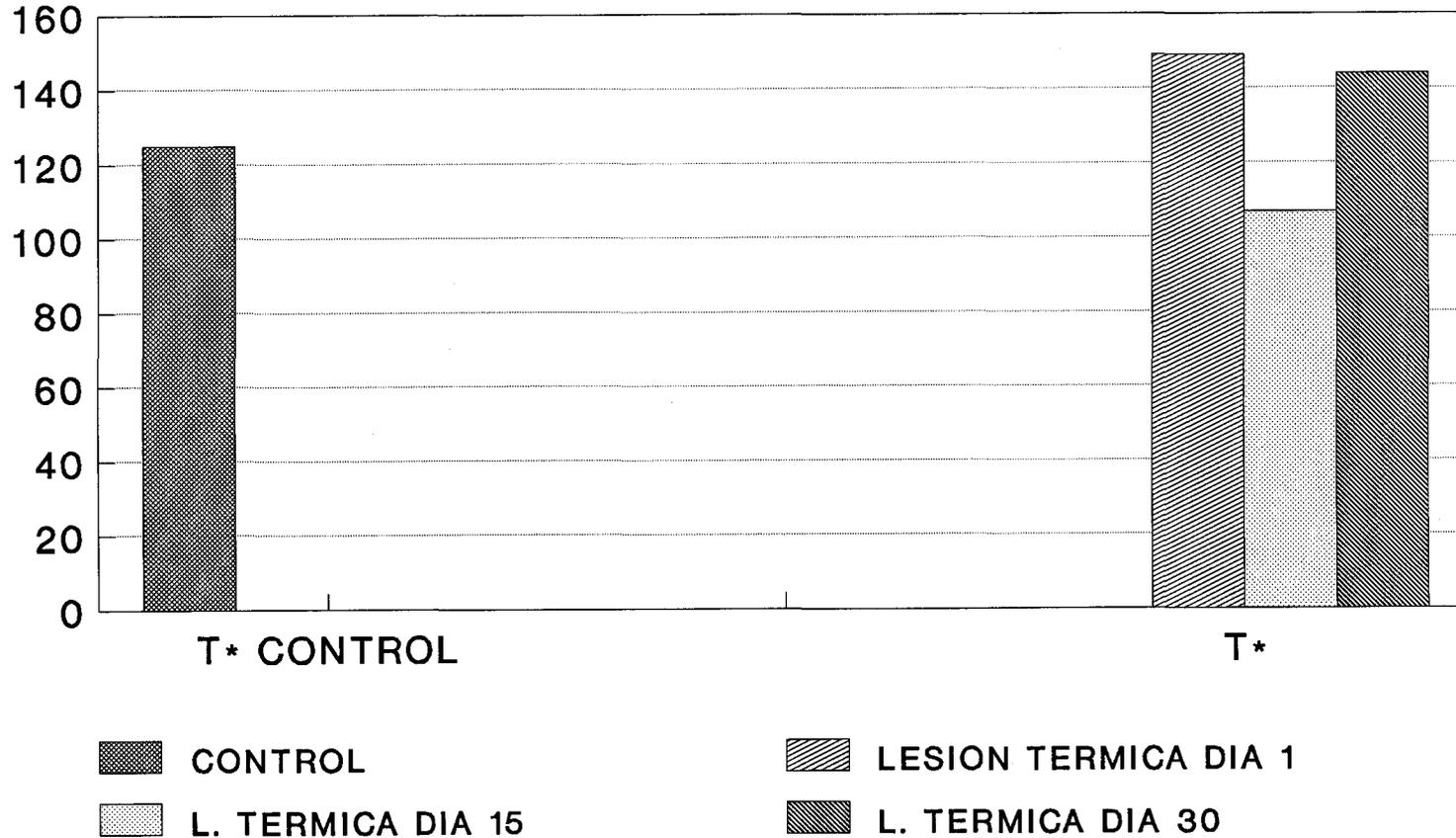
MEDIA DE T* HLA CLASE II EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 17.

MEDIA DE T* HLA CLASE II EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 18.

La evolución de la fagocitosis o ingestión de partículas látex por el sistema monocítico-macrofágico, fué similar en los grupos politraumatizados y quemados (figuras 19 y 20), con disminución en los dos primeros estudios tras el accidente y posterior normalización como indican las columnas respectivas.

La producción de radicales libres, observada en las figuras 21 y 22, fué diferente según se tratase de politraumatizados o quemados, así, los primeros produjeron un aumento en radicales libres (ión superóxido) sólo en el segundo estudio (7 días tras el accidente), mientras que el grupo quemado presentó cifras elevadas desde el inicio de la lesión térmica para ir disminuyendo con posterioridad a medida que pasó el tiempo.

La proteína C reactiva disminuida en el grupo control sano, tuvo cifras elevadas tras el trauma (figura 23) y la quemadura (figura 24) manteniéndose elevada en el segundo estudio, en ambos grupos, y con descensos importantes al final del proceso, indicativo de la mejoría del paciente.

La evolución de la IgG total fué similar en ambos grupos politraumatizados y quemados, así, pudo comprobarse como tras el trauma o quemadura las cifras de IgG total descendieron por debajo de los valores del grupo control sano, para más tarde, coincidiendo con la mejoría de los pacientes, ir aumentando

hasta rebasar los valores del grupo control sano (figuras 25 y 26).

Las modificaciones de las subclases de IgG a lo largo del tiempo, en nuestros pacientes, pueden ser observadas en las figuras de ciclogramas 27 (controles), 28, 29 y 30 (politraumatizados) y 31, 32 y 33 (quemados).

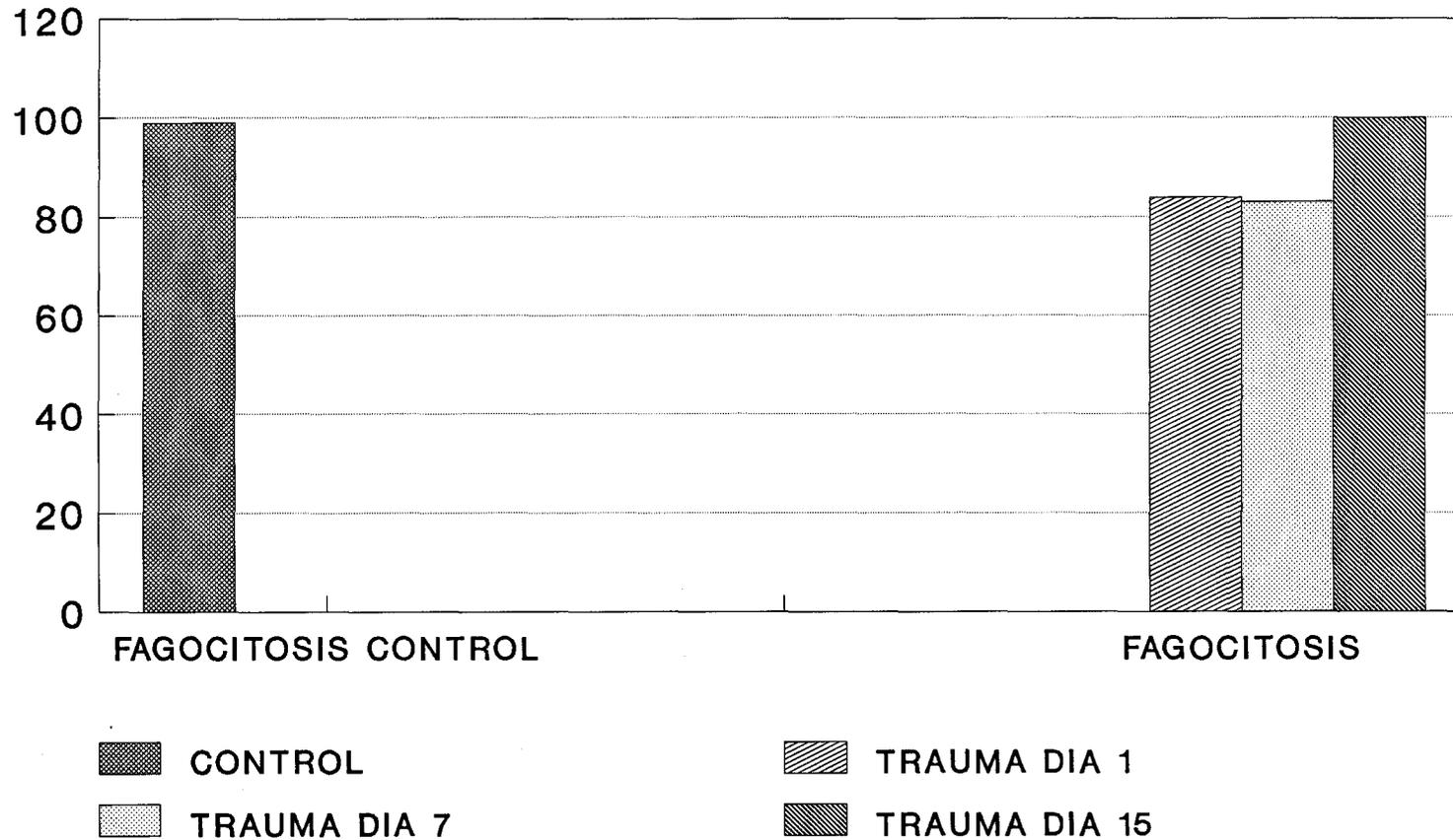
Estas modificaciones, se caracterizaron por una tendencia a la normalización de los valores, tanto para los politraumatizados como para los quemados, destacando como en el último estudio (15 días tras el trauma), la IgG3 permaneció aún disminuida en el grupo de politraumatizados, mientras que la IgG1, se elevó incluso por encima de las cifras de los controles.

El grupo quemado, al final del estudio (30 días tras la lesión térmica) restableció todas las subclases hasta valores normales, salvo la IgG1 que se mostró elevada.

Como resumen resaltar que fueron la IgG2 y la IgG3, en los politraumatizados, las subclases que descendieron más drásticamente después del traumatismo, recuperandose a lo largo de la evolución del paciente, hasta la normalidad o rebasandola. En los pacientes quemados, fueron la IgG1, la

IgG2 y la IgG3 las que sufrieron disminuciones mayores, tras las quemaduras, para posteriormente ir normalizándose.

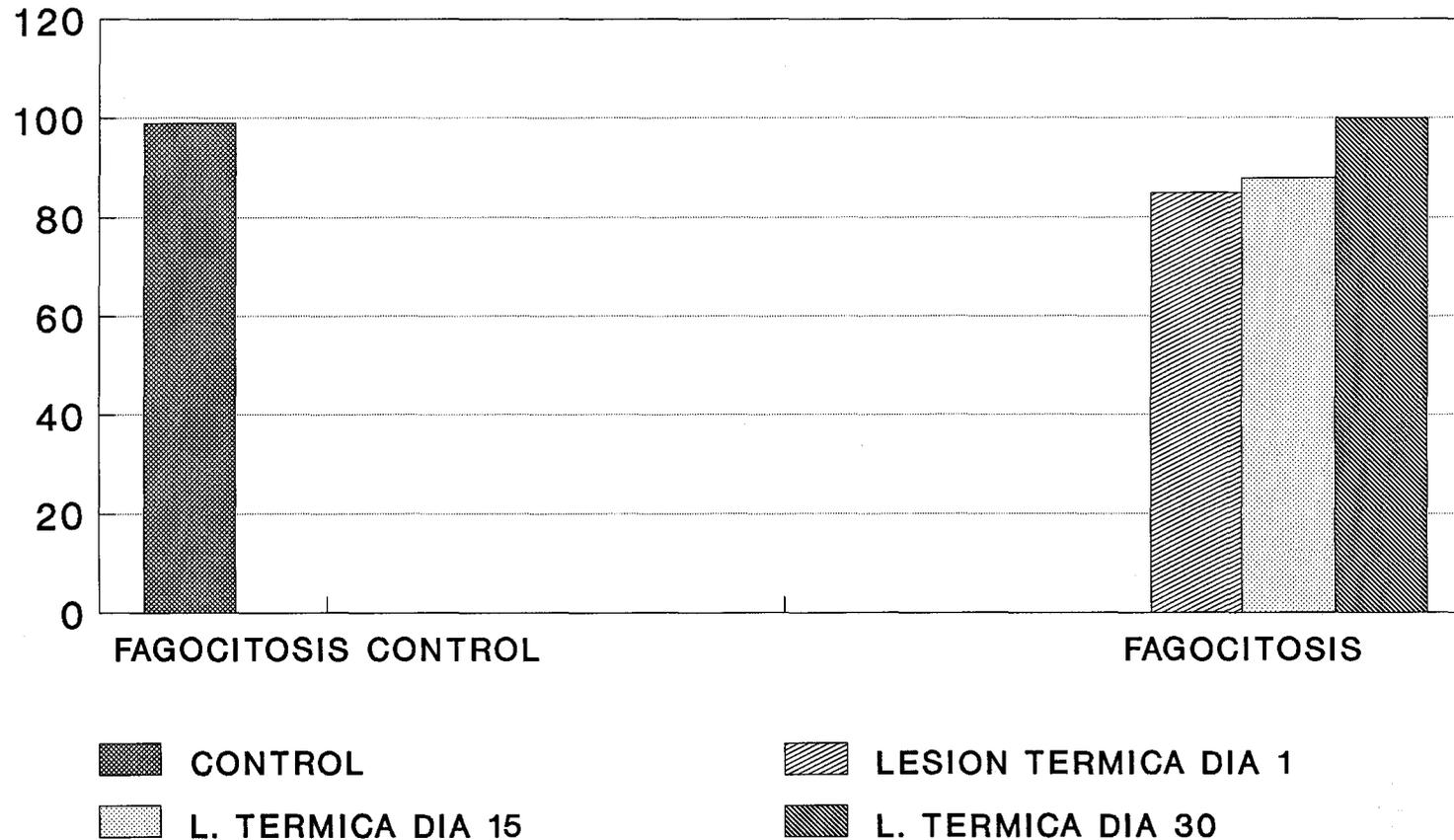
FAGOCITOSIS MEDIA EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 19.

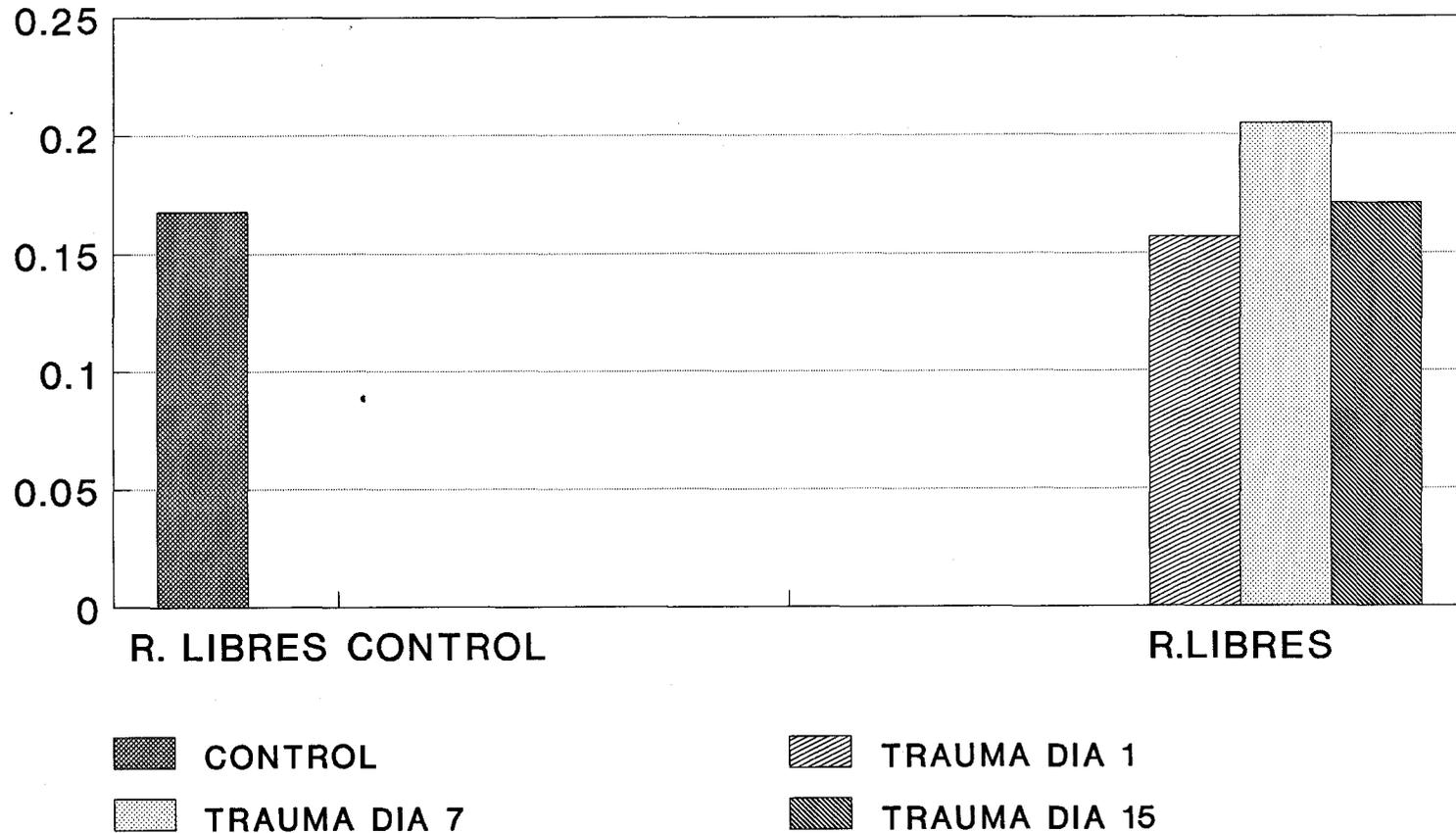
FAGOCITOSIS MEDIA EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 20.

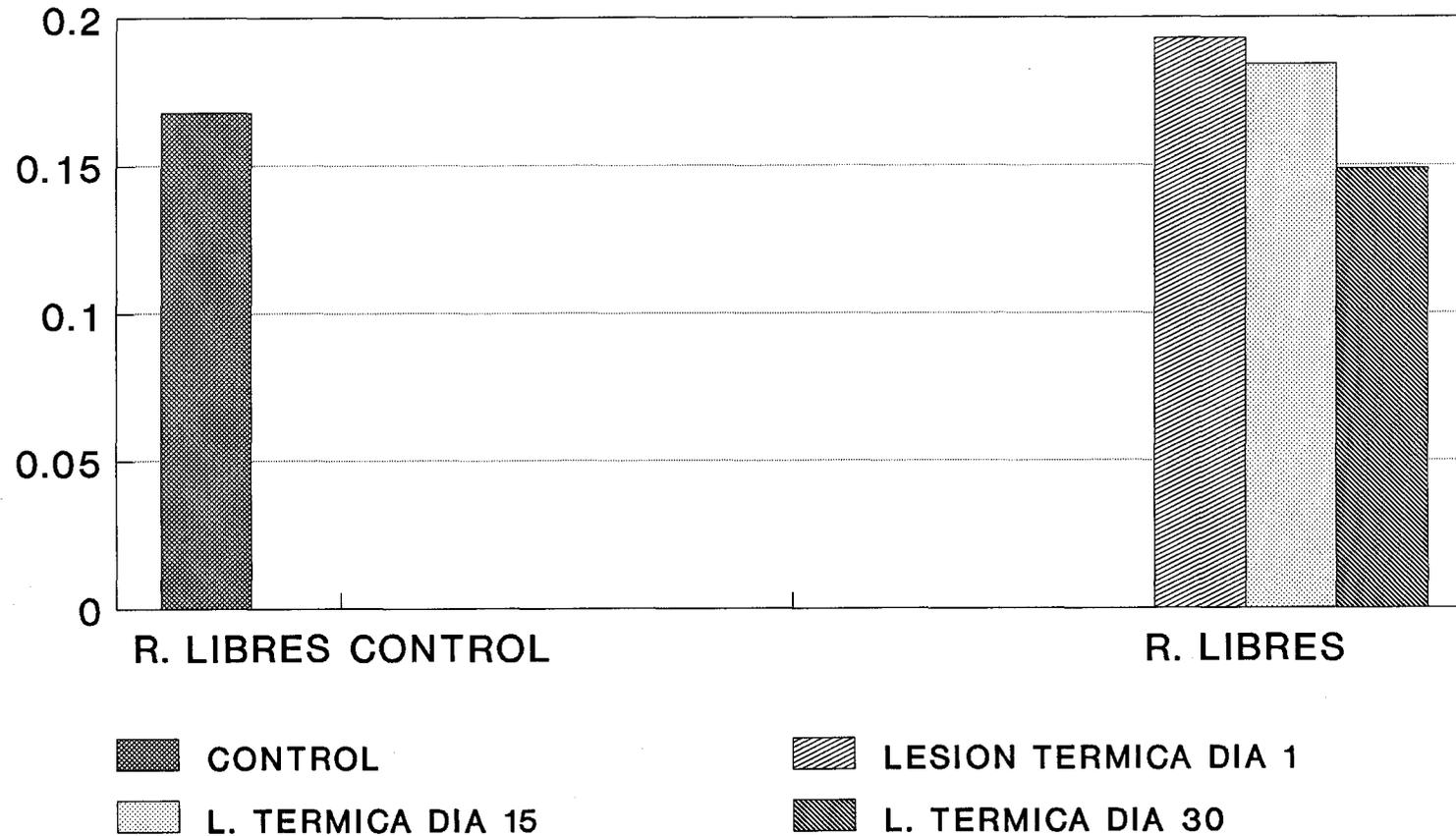
MEDIA DE RADICALES LIBRES EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 21.

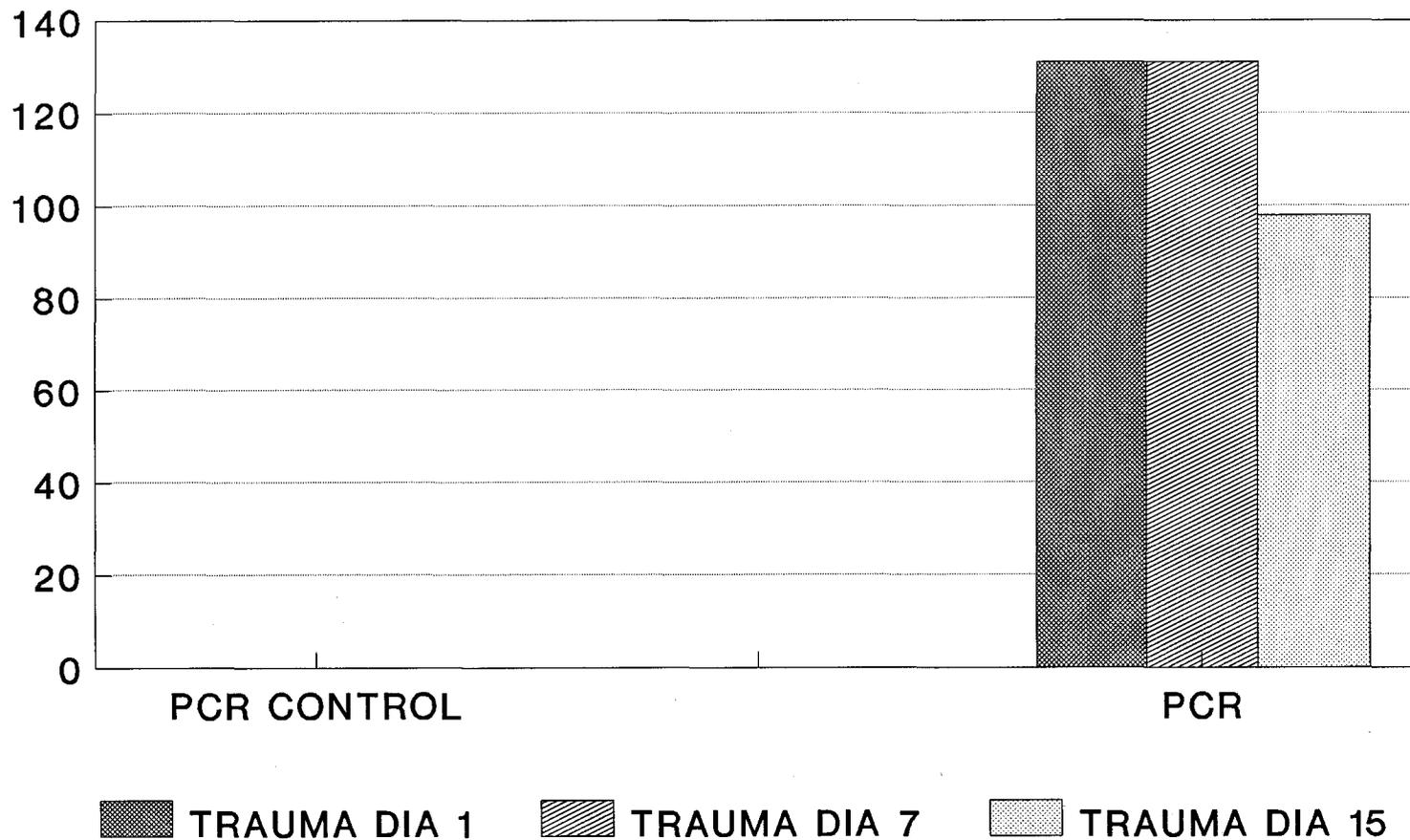
MEDIA RADICALES LIBRES EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 22.

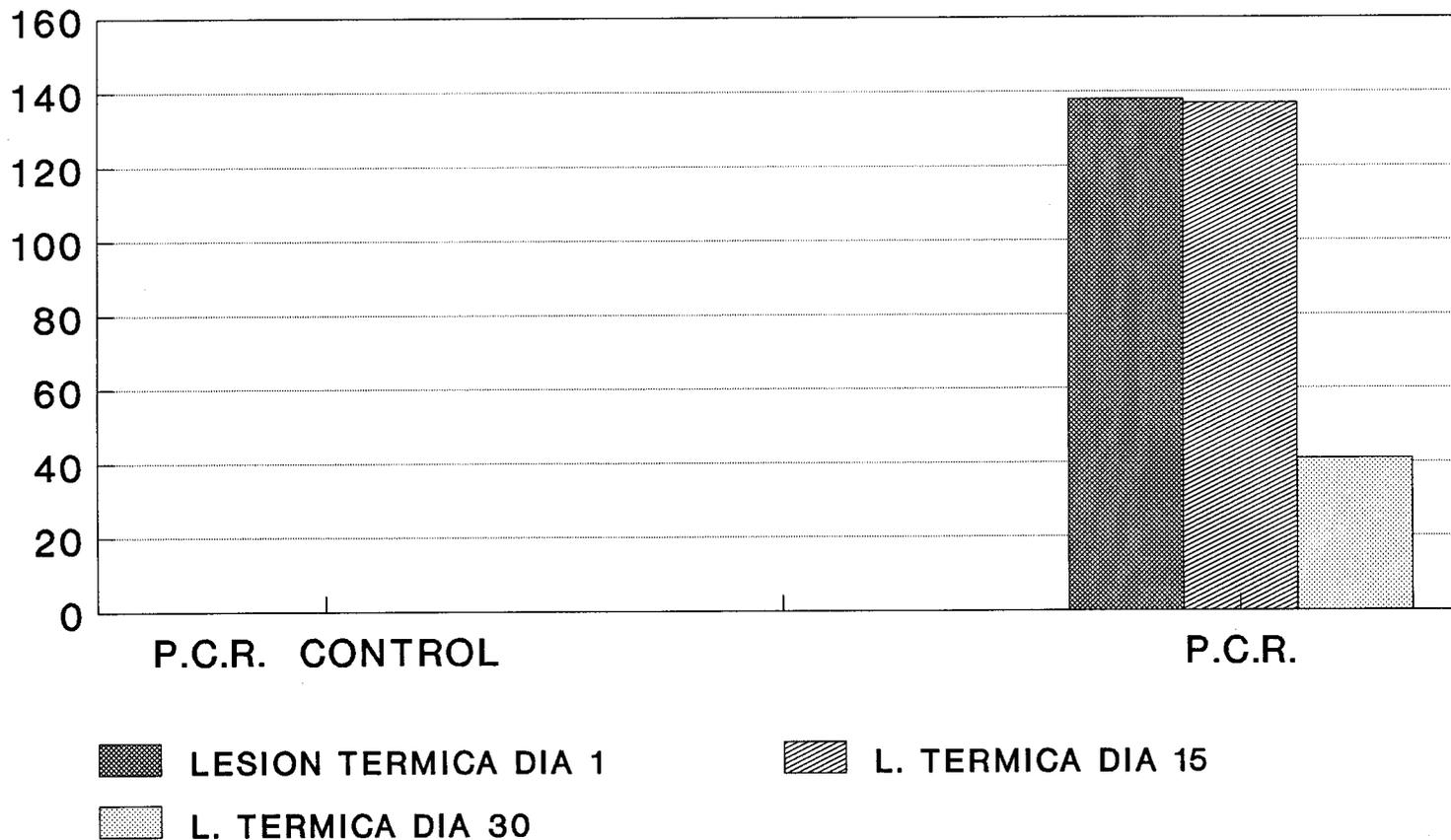
PROTEINA C REACTIVA MEDIA EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 23.

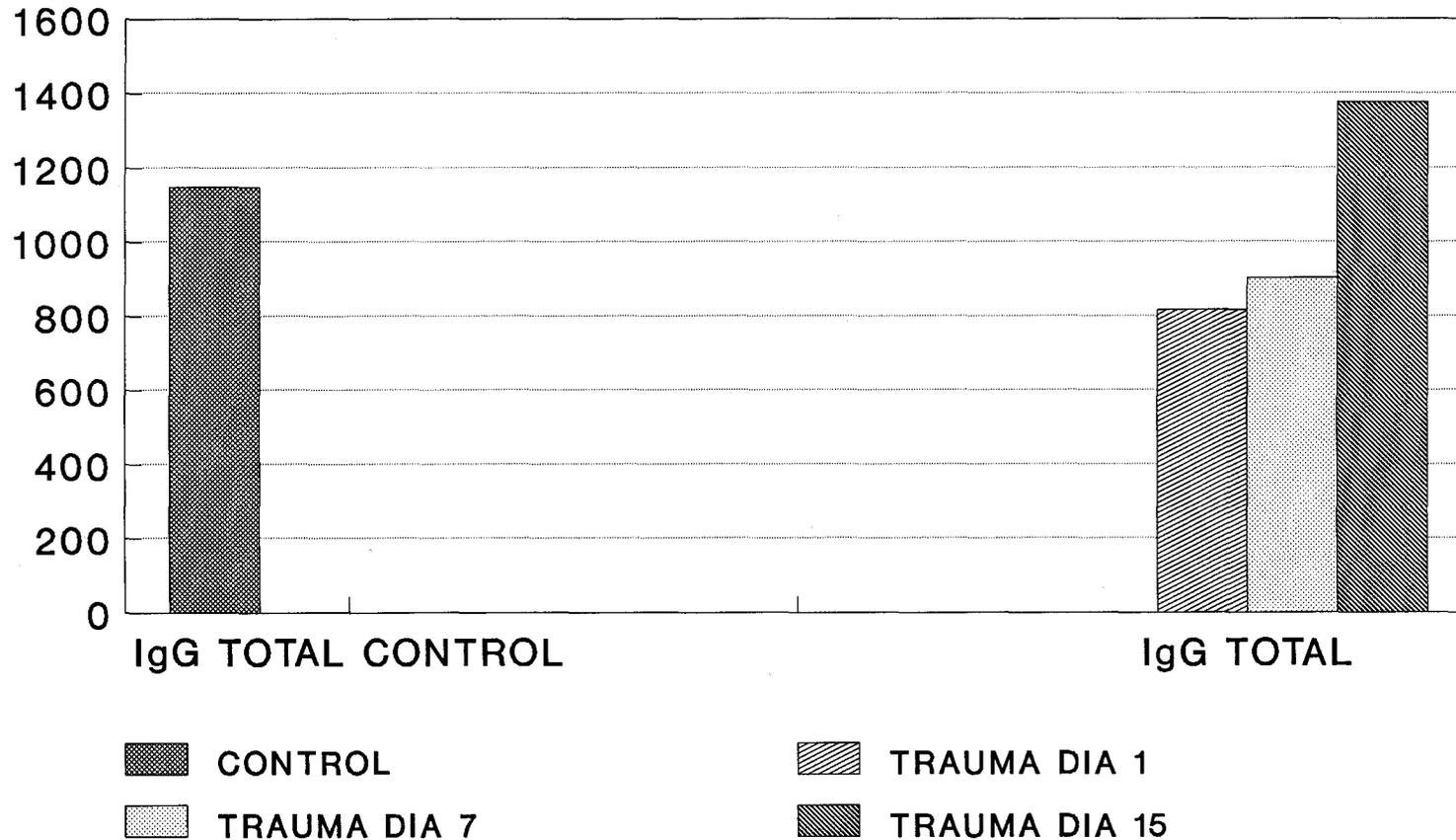
PROTEINA C REACTIVA MEDIA EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 24.

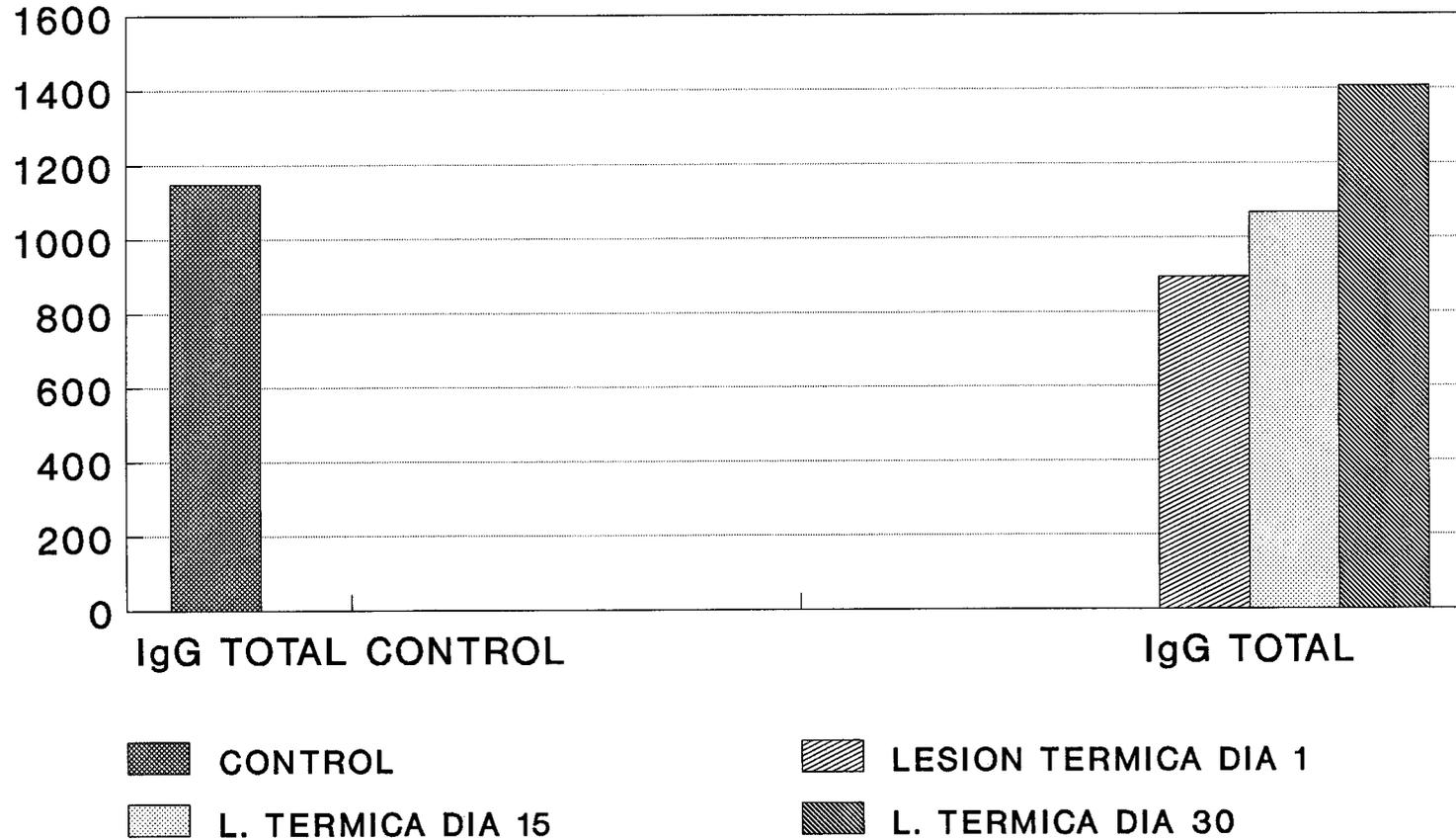
MEDIA DE IgG TOTAL EN PACIENTES POLITRAUMATIZADOS



EVOLUCION TRAUMA

Figura 25.

IgG TOTAL MEDIA EN PACIENTES QUEMADOS



EVOLUCION LESION TERMICA

Figura 26.

SUBCLASES IgG.

IgG1,2,3 Y 4

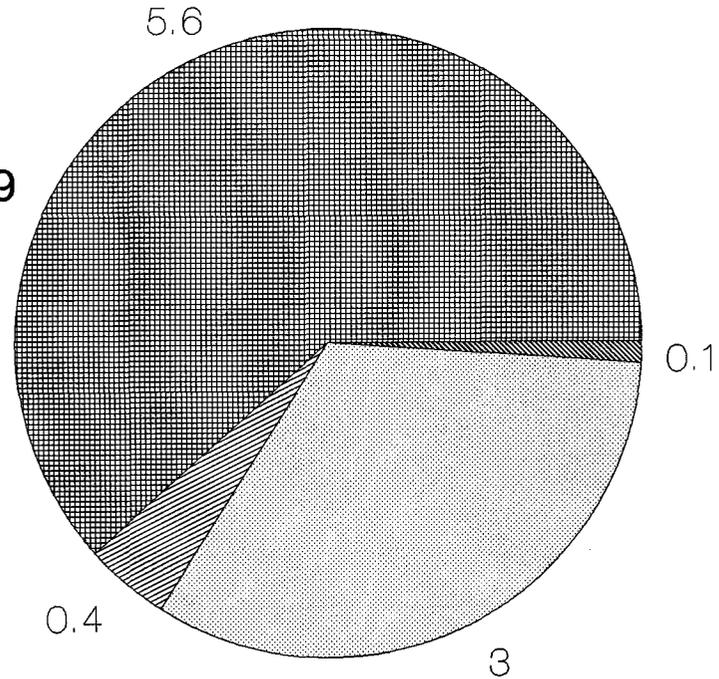
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l= 5.6+/-0.6

IgG2 g/l= 3.0+/-0.4

IgG3 g/l= 0.4+/-0.1

IgG4 g/l= 0.1+/-0.09



GRUPO CONTROL

Figura 27.

SUBCLASES IgG

IgG1,2,3 Y 4

48 HORAS TRAS EL TRAUMA

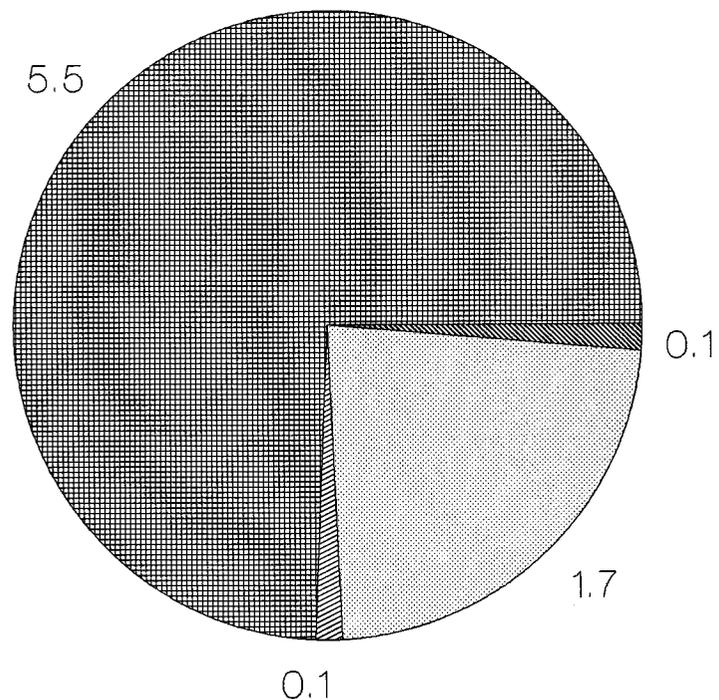
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l=5.5+/-2.6*

IgG2 g/l=1.7+/-1.5**

IgG3 g/l=0.1+/-0.2***

IgG4 g/l=0.1+/-0.2*



GRUPO POLITRAUMATIZADOS *NS, **P<0.05, ***P<0.005

Figura 28.

SUBCLASES IgG

IgG1,2,3 Y 4

7 DIAS TRAS EL TRAUMA

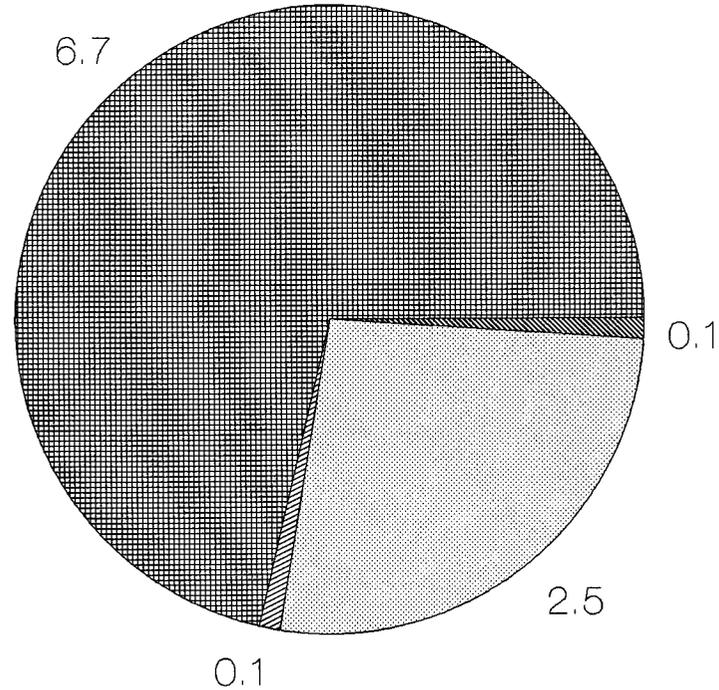
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l=6.7+/-2.6*

IgG2 g/l =2.5+/-1.7*

IgG3 g/l=0.1+/-0.1***

IgG4 g/l=0.2+/-0.3*



GRUPO POLITRAUMATIZADOS *NS, **P<0.05, ***P<0.005

Figura 29.

SUBCLASES IgG

IgG1,2,3 Y 4

15 DIAS TRAS EL TRAUMATISMO

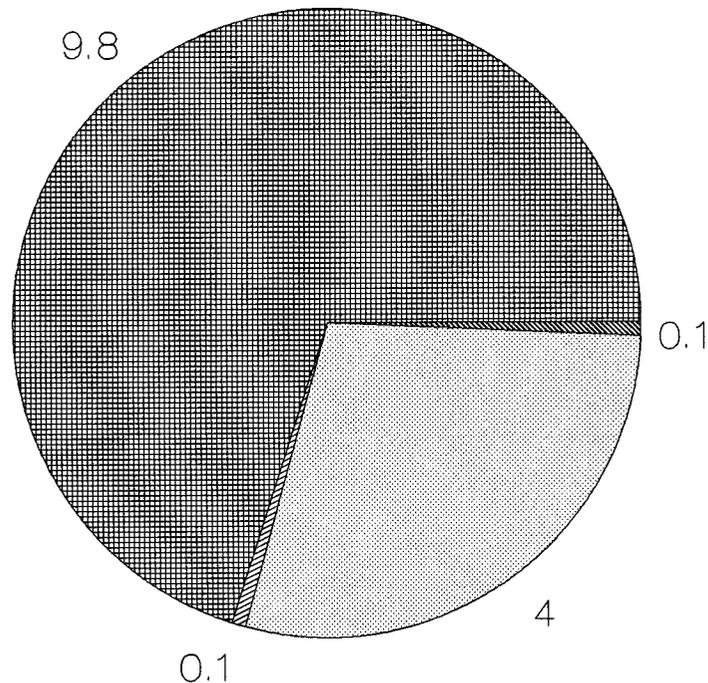
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l=9.8+/-5.3**

IgG2 g/l=4.0+/-1.9*

IgG3 g/l=0.1+/-0.1***

IgG4 g/l=0.4+/-0.4*



GRUPO POLITRAUMATIZADOS *NS, **P<0.05, ***P<0.005

Figura 30.

SUBCLASES IgG

IgG1,2,3 Y 4

48 HORAS TRAS LA QUEMADURA

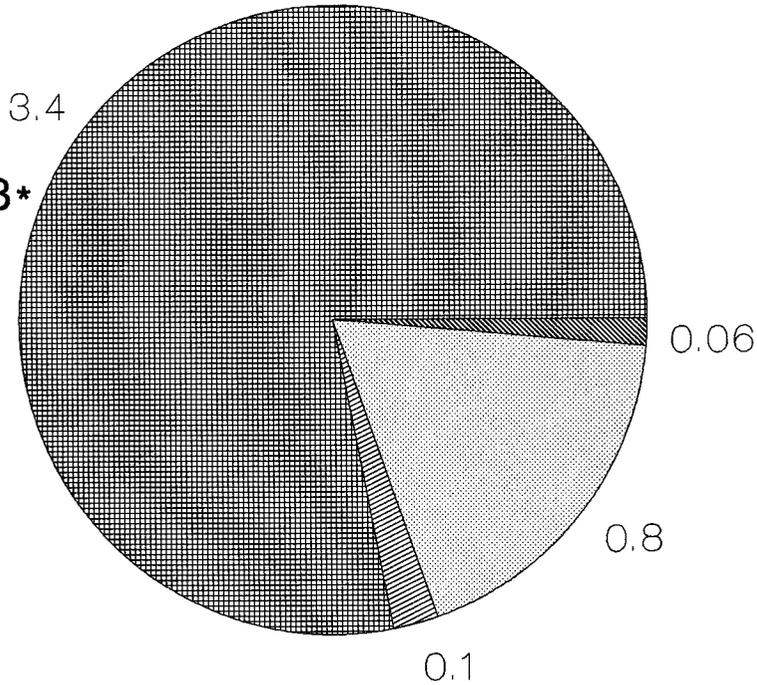
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l=3.4+/-2.6***

IgG2 g/l=0.8+/-1.0***

IgG3 g/l=0.1+/-0.1***

IgG4 g/l=0.06+/-0.03*



GRUPO QUEMADOS

Figura 31.

*NS, **P<0.05, ***P<0.005

SUBCLASES IgG

Ig1,2,3 Y 4

15 DIAS TRAS LA QUEMADURA

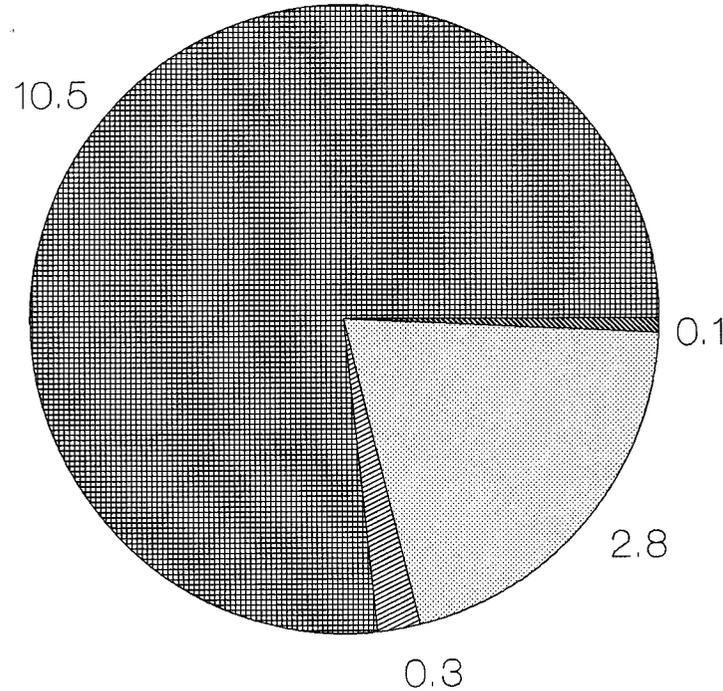
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l=10.5+/-5.7**

IgG2 g/l=2.8+/-2.9*

IgG3 g/l=0.3+/-0.1*

IgG4 g/l=0.1+/-0.06*



GRUPO QUEMADOS

Figura 32.

*NS, **P<0.05, ***P<0.005

SUBCLASES IgG

IgG1,2,3 Y 4

30 DIAS TRAS LA QUEMADURA

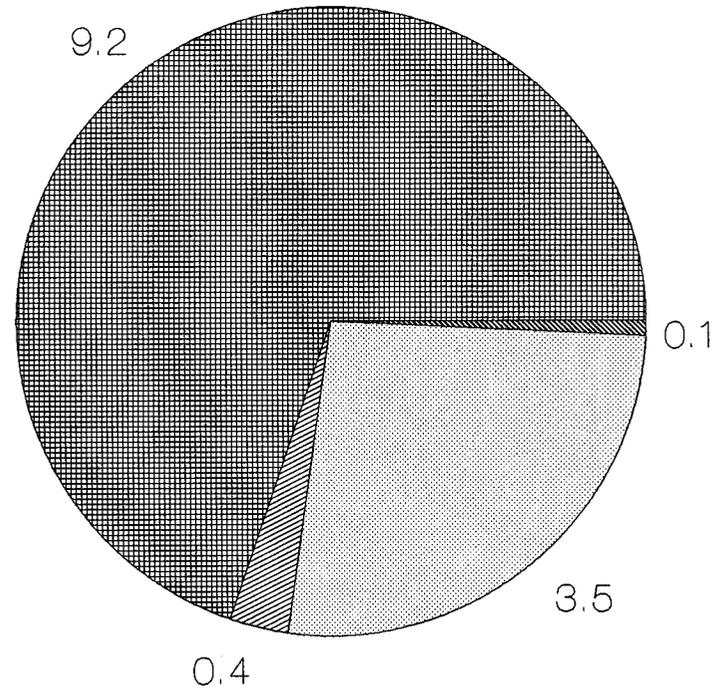
MEDIA +/- D.S.

IgG1 g/l=9.2+/-2.8*

IgG2 g/l=3.5+/-3.7*

IgG3 g/l=0.4+/-0.2*

IgG4 g/l=0.1+/-0.2*



GRUPO QUEMADOS

*NS, **P<0.05, ***P<0.005

Figura 33.

5.3. EL SISTEMA INMUNE DE LOS PACIENTES CON BUENA Y MALA EVOLUCION.

Los resultados del estudio, del sistema inmune, en pacientes críticos con buena y mala evolución se hallan esquematizados en las tablas 5 y 6.

Como puede comprobarse, la linfopenia inicial que muestran los pacientes traumatizados, es mayor en los pacientes con mala evolución que en aquellos traumatizados con buena evolución. Las diferencias cuando se comparan los datos de ambos grupos alcanzan un nivel estadísticamente significativo en lo que respecta a las subpoblaciones CD3+ y CD4+. Sin embargo, en los quemados, la linfopenia inicial fué de intensidad similar en quemados con buena y mala evolución.

Asimismo, llamó la atención los valores de IgG total, siendo estos más bajos en los pacientes con mala evolución que en los que la tenían buena, alcanzando cifras estadísticamente significativas sólo en el caso de los pacientes quemados.

Como puede verse en las citadas tablas, el resto de los marcadores, aunque presentaron diferencias con la evolución de los pacientes, estas fluctuaciones, no llegaron a ser estadísticamente significativas.

	T. BUENA EVL. N=19	T. MALA EVL. N=12	P-STUDENT
CD3+ cels/ μ l (media \pm d.s.)	767 \pm 298	472 \pm 278	0.010
CD4+ cels/ μ l (")	476 \pm 217	255 \pm 220	0.010
CD8+ cels/ μ l (")	299 \pm 147	221 \pm 129	0.144
CD19+ cels/ μ l (")	323 \pm 303	189 \pm 118	0.096
CD16+ cels/ μ l (")	137 \pm 0	78 \pm 30	0.233
HLA-claseII " (")	143 \pm 137	121 \pm 134	0.657
FAGOCITOSIS (% cels/latex +)	91%	70%	0.061
RADICALES LIBRES (Absv media \pm d.s.)	0.154 \pm 0.119	0.154 \pm 0.128	0.991
PROTEINA C R. mg/l (media \pm d.s.)	133 \pm 96	138 \pm 103	0.890
IgG TOTAL mg/dl (media \pm d.s.)	859 \pm 283	713 \pm 276	0.181

Tabla 5.- Significación estadística de las modificaciones del sistema inmune en relación con la buena o mala evolución clínica de los pacientes traumatizados.



	Q. BUENA EVL. N=19	Q. MALA EVL. N=8	P-STUDENT
CD3+ cels/ μ l (media \pm d.s.)	1024 \pm 227	1270 \pm 693	0.392
CD4+ cels/ μ l (")	637 \pm 338	844 \pm 458	0.202
CD8+ cels/ μ l (")	389 \pm 352	438 \pm 310	0.732
CD19+ cels/ μ l (")	248 \pm 228	454 \pm 583	0.394
CD16+ cels/ μ l (")	229 \pm 229	107 \pm 124	0.198
HLA-claseII " (")	83 \pm 83	303 \pm 502	0.258
FAGOCITOSIS (% cels/latex +)	90%	77%	0.190
RADICALES LIBRES (Absv media \pm d.s.)	0.214 \pm 0.148	0.139 \pm 0.063	0.098
PROTEINA C R. mg/l (media \pm d.s.)	131 \pm 165	171 \pm 222	0.678
IgG TOTAL mg/dl (media \pm d.s.)	1075 \pm 1077	412 \pm 175	0.029

Tabla 6.- Significación estadística de las modificaciones del sistema inmune en relación con la buena o mala evolución clínica de los pacientes quemados.

5.4. MOLECULAS DE ACTIVACION Y ADHESION EN LOS PACIENTES CRITICOS.

El estudio de las moléculas de activación fué realizado sobre 10 pacientes quemados y 12 traumatizados en las 48 horas tras el accidente, comparandose a su vez con 10 sujetos sanos controles.

Como moléculas de activación se estudiaron los antígenos CD25, CD69 y CD71, y como moléculas de adhesión los antígenos CD11c, CD49a y CD54.

Estos marcadores fueron calculados por citometria de flujo, usando anticuerpos monoclonales específicos y considerandose positivas, aquellas células que expresaban dichos marcadores entre los canales 520 y 1024.

La tabla 7 nos muestra la expresión de los antígenos de activación en los pacientes traumatizados y quemados en comparación con el grupo sano control y su relevancia estadística mediante los valores de p.

La tabla 8 a su vez, muestra los resultados obtenidos cuando se estudiaron los marcadores de adhesión en estos mismos pacientes e igualmente comparados con el grupo sano control.

Puede apreciarse que existe un significativo aumento de células que expresan moléculas de activación y adhesión, y ello, a pesar de que, como antes se explicó, sólo fueron consideradas las células con intensa positividad.

	CONTROLES N=10	TRAUMATIZADOS N=12	QUEMADOS N=10
CD25 (% ± d.s.)	0.7 ± 1	3.1 ± 3.9*	2.7 ± 2.4**
CD69 (")	1.2 ± 1	7.9 ± 6.5***	4.9 ± 4.7**
CD71 (")	1.1 ± 1	6.2 ± 6.8**	4.1 ± 4.8*

* p = NS, ** p < 0.05, *** p < 0.005.

Tabla 7.- Esta tabla muestra los linfocitos que expresan marcadores de activación CD25, CD69 y CD71, fueron calculados por citometria de flujo usando anticuerpos monoclonales específicos, los valores aquí representados son los porcentajes del total de los linfocitos contados tras las 48 horas del accidente. Las células positivas fueron calculadas entre los canales 520 a 1024.

	CONTROLES N=10	TRAUMATIZADOS N=12	QUEMADOS N=10
CD11c (% ± d.s.)	0.1 ± 0.3	1.4 ± 1.3**	3.5 ± 3.4***
CD49a (")	1.0 ± 0.5	5.5 ± 6.2**	5.0 ± 5.0**
CD54 (")	2.7 ± 3.0	10.6 ± 10.0**	7.3 ± 8.0*

* p = NS, ** p< 0.05, *** p< 0.005.

Tabla 8.- Esta tabla muestra los linfocitos que expresan marcadores de adhesión CD11c, CD49a y CD54, fueron calculados por citometria de flujo usando anticuerpos monoclonales específicos, los valores aquí representados son los porcentajes del total de los linfocitos contados tras las 48 horas del accidente. Las células positivas fueron calculadas entre los canales 520 a 1024.

5.5. PRESENCIA DE LINFOCITOS CD4+ CD8+ EN PACIENTES CRITICOS.

El estudio simultáneo de las moléculas CD4 y CD8 demostró la presencia de células que exhibían ambos marcadores en su superficie. Este hallazgo fué muy evidente en dos pacientes quemados y se describe en la Tabla 9. Dicha tabla nos muestra la evolución de los valores de linfocitos CD4+CD8+ a lo largo del cuadro patológico.

Destacó, la disminución hasta la normalidad de los linfocitos CD4+CD8+ a medida que los enfermos mejoraron y aumentaron sus cifras de linfocitos totales.

PACIENTES	DIA 1 LINFOCITOS/ μ l		DIA 15 LINFOCITOS/ μ l		DIA 30 LINFOCITOS/ μ l	
	TOTAL	CD4+/CD8+	TOTAL	CD4+/CD8+	TOTAL	CD4+/CD8+
CR	1673	184 (11%)	2300	23 (1%)	2510	25 (1%)
JNB	1100	121 (11%)	1700	85 (5%)	2700	27 (1%)

Tabla 9.- Historia natural de los linfocitos CD4+/CD8+ en dos pacientes quemados, que fueron doblemente estudiados usando simultaneamente dos anticuerpos monoclonales, el anti-CD4 conjugado a fluoresceina y el anti-CD8 conjugado a ficoeritrina.

6 DISCUSION

La aparición de infecciones contribuye a la frecuencia elevada de muerte tardía en pacientes politraumatizados y quemados. El origen de las mismas parece estar relacionado con la depresión en las defensas inmunológicas de los pacientes críticos, de causa aún por resolver (Wood y cols. 1978., Polk y cols. 1979 y 1986., Sing H. 1988).

Miller y Trunkey en 1981 estimaron que el 78% de las muertes no neurológicas tardías en el Hospital General de San Francisco, consecutivas a traumatismos, fueron por sepsis. Polk, en 1979 calculó que el 75% de las muertes después de lesiones térmicas se relacionó con una infección.

Uno de los hallazgos más generalmente observados, en estos pacientes, es la disminución de los linfocitos de sangre periférica, en las primeras 24 a 48 horas tras el accidente traumático o térmico. Esta linfopenia, cuya intensidad parece estar en relación estrecha con la gravedad clínica, ha sido considerada como la causa fundamental del estado de inmunodeficiencia.

Gran cantidad de teorías e investigadores han tratado de dar respuesta a esta linfopenia precoz que acontece inmediatamente

después de la quemadura o el trauma, achacando este déficit a la inducción de una respuesta inmune supresora mediada por un aumento de células T, CD8+ (Ninnemann, 1981., Miller, C. 1979), o a la presencia de sustancias inmunosupresoras circulantes en el suero de los pacientes accidentados (Constantian, M.B. 1977 y 1978, McLoughlin, G.A.1979 y Warden, G.D. 1975), o a una disfunción en la población T cooperadora para liberar interleuquina 2 (IL 2) y dar una respuesta eficaz (Antonacci, 1984 y 1986).

Las células T, constituyen aproximadamente el 80% de los linfocitos de sangre periférica, son una población que incluye dos subgrupos, T cooperadores (CD4+) y T citotóxicas, cada una de ellas con funciones precisas. Las células T cooperadoras (CD4+) constituyen aproximadamente el 60 a 70% de las células T en sangre periférica del hombre y son necesarias para la inducción de la respuesta inmune específica. Las células T citotóxicas-supresoras (CD8+) constituyen el 20% de las células T de sangre periférica y median la respuesta citotóxica celular, así como la regulación del sistema inmune específico.

La exploración del sistema inmunitario en los pacientes críticos, ha permitido detectar otras alteraciones, relacionadas con lo que se ha dado en denominar clásicamente respuesta humoral y respuesta inmune inespecífica.

Faist, en 1989, al determinar los valores de linfocitos B en sangre periférica, comprobó que estos, no sufren modificaciones en números absolutos, pero su funcionalidad se ve alterada, mostrando un descenso de IgG, IgM e IgA, el primer día tras el traumatismo o lesión térmica. Autores como Van Dijk (1982) han relacionado la disminución de los niveles de IgG con el trastorno de la actividad opsónica, asegurando que la IgG es la inmunoglobulina de mayor poder opsónico. Otros como Moran y Munster (1987) explican la disminución inicial de IgG en sujetos politraumatizados y quemados, alegando la existencia de factores supresores en el suero de los accidentados.

Scovill en 1979, al analizar los valores de un factor opsónico, alfa-2-glicoproteína, observó una disminución temprana de la actividad opsónica sérica después de traumatismos. Saba (1979) ha identificado este factor opsónico como una alfa-2-SB glucoproteína idéntica a la globulina insoluble en frío o fibronectina del plasma.

También los experimentos en animales (Rittenbury, M.S. 1967) han demostrado que ocurre depresión grave en la actividad fagocitaria de macrófagos y neutrófilos, en sangre, cuando se produce una quemadura grave.

A pesar del importante número de grupos que se han interesado por este problema, no existe un consenso acerca de la auténtica causa de la inmunodeficiencia. En los últimos años, el descubrimiento de una serie de sustancias que son producidas fundamentalmente por células del sistema inmune y que sirven de señales durante la respuesta inmunitaria, ha modificado muchos conceptos acerca del sistema y, fundamentalmente de su funcionamiento integrado en coordinación con otros sistemas fisiológicos del organismo. Dichas sustancias, se denominan citoquinas y constituyen una familia de sustancias muy semejantes en su función a las hormonas del sistema endocrino.

Las citoquinas, son factores solubles, secretados por las células activadas que van a ser denominadas como monoquinas o linfoquinas dependiendo de las células concretas de donde se liberan, destacando en este sentido TNF, IL 1 y PGE2 como monoquinas e IL 2 y gamma interferón como linfoquinas.

Estos mediadores solubles afectan a las reacciones inflamatorias inespecíficas e inmunitaria específica, actuando como mensajeros de señales intercelulares y exhibiendo un gran número de otras actividades biológicas, como estimulación de linfocitos T, aumento de la síntesis de proteínas de la fase aguda por el hígado, activación de neutrófilos etc. etc.

Para el funcionamiento normal del sistema inmunitario, se precisa de un gran equilibrio en la producción de citoquinas, tanto en lo relacionado con el tipo de citoquina producido como en la cantidad de la misma. Algunos experimentos en animales han demostrado que un exceso en la producción de algunas citoquinas puede ser nefasto para el organismo. Tal es el caso del factor de necrosis tumoral. Cuando se inyecta TNF-recombinante a animales, se observan cambios muy similares a los que ocurren durante la sepsis por gérmenes gram-negativos (fiebre, hipercatabolismo, hipermetabolismo, hiperglicemia, aumentos de la acidosis metabólica, trastornos de la coagulación etc.).

Durante mucho tiempo se pensó, que los responsables directos de todo ello eran los propios agentes patógenos. Hoy en cambio sabemos, que es el sistema macrofágico el que ejerce su influencia a través de citoquinas, ya que los experimentos en animales (Tracey, K.J. 1986) han demostrado que la endotoxina bacteriana, por sí sola, no es tóxica para la mayoría de los tejidos. En cambio, su administración provoca la producción de citoquinas (TNF e IL 1), por parte del sistema macrofágico, cuya acción puede conducir al shock y la muerte. A la vez, el uso de un anticuerpo monoclonal contra TNF administrado a monos dos horas antes de la inyección de dosis LD 100 de *Escherichia coli*, protege totalmente a los animales de los efectos de dicha

inyección, que provoca en los animales no tratados, la muerte por shock y fracaso multiórgano.

Una de las propiedades de las citoquinas es que producen una modificación en el fenotipo de las células del sistema inmunitario para adecuarlo a la función que deben ejercer durante la fase de respuesta (Poher y cols. 1986 y 1987., Dustin y cols. 1986., Cotran y cols. 1987). La IL-1 es capaz de provocar la aparición de receptores de IL-2 (CD25), de transferrina (CD71) y de moléculas inductoras de activación M.I.A. (CD69). Del mismo modo, las células inmunitarias y endoteliales exhiben durante la fase de respuesta unas moléculas de superficie que les facilitan su adhesión a otros sustratos o células.

Las moléculas de adhesión, pertenecen a una familia de receptores celulares, cuyos miembros son proteínas heterodímeras, con una cadena β fija que se combina con una única cadena α variable, creando así, distintos receptores funcionales (Larson, R.S. y Springer, T.A. 1990., Hemler, M. 1990). Estas moléculas, son conocidas con el nombre genérico de integrinas y se caracterizan por estar implicadas en una gran variedad de funciones biológicas de las células, entre las que destacamos: vigilancia y control de células neoplásicas (Gregory, C. 1988), aumento de adhesión y reactividad de las

células T memoria (Sanders, M. 1988., Pitzalis, C. 1988), adhesiones celulares específicas receptor-ligando (CD2-CD58) (Springer, T.A. 1987., Krensky, A. 1983), activación de linfocitos T, B y monocitos (Dougherty y cols. 1988), interacciones no específicas entre células efectoras y sus dianas (Spits y cols. 1986, Shaw y cols. 1986 y 1987), procesos antigénicos no específicos que facilitan la migración de las células T hacia su lugar específico de reconocimiento y adhesión (Makgoba, W. 1989., Jalkanen, S. 1987), etc.

Los ligandos de estos receptores, contienen en su secuencia peptídica la presencia del tripeptido Arg-Gly-Asp (R-G-D). Esta secuencia de aminoácidos dentro de los ligandos, es la responsable directa de la propiedad de adhesión; su falta daría lugar a la pérdida de la capacidad de unir (Sousa, S.E. 1988).

En el presente trabajo, hemos observado, una disminución en los porcentajes y valores absolutos de la población celular de linfocitos T, en las primeras 24-48 horas después del traumatismo y la quemadura ($p < 0.001$), afectando tanto a la subpoblación T cooperadora como a la T citotóxica-supresora, en comparación con el grupo control sano.

El grado de linfopenia se encontró relacionado ($p = 0.024$) con la gravedad (TS) del traumatismo, lo que no ocurrió ($p =$

0.07) en el caso de los quemados.

Los valores absolutos de linfocitos B, no sufrieron modificaciones ($p = 0.7$ y $p = 0.9$), en los primeros momentos tras el accidente (traumático o térmico), aunque pudo observarse un descenso de los niveles de IgG estadísticamente significativo ($p < 0.001$).

El sistema monocito/macrofágico, mostró una disminución de la capacidad fagocítica, medida en ingestión de partículas látex, tanto para pacientes politraumatizados como en quemados ($p = 0.01$ y $p = 0.009$) respectivamente.

La capacidad bactericida de las células polimorfosnucleares, medida por producción de radicales libres, no tuvo alteraciones de mención ni en traumatizados ni en quemados.

La determinación de los valores de la proteína C reactiva, exhibió en todo momento, cifras elevadas en ambos grupos de pacientes e inmediatamente después de la agresión.

Nuestros resultados coincidían por consiguiente con los descritos en la literatura y nos proporcionaban una visión general sobre el conocimiento actual de las alteraciones de las defensas del huésped causadas por las agresiones



(traumáticas o térmicas).

Posteriormente, nos propusimos investigar otros factores que pudiesen permitirnos conocer mejor la situación real del sistema inmunitario, en las primeras horas, después del trauma o la quemadura.

Fué así, como decidimos estudiar los antígenos de activación, en los linfocitos de sangre periférica, ya que sí el trauma y la quemadura son estímulos suficientemente fuertes como para provocar la liberación de citoquinas TNF e IL 1 (Dinarelo, 1984) y estas, a su vez, son capaces de inducir cambios importantes en el fenotipo celular (Cavender y cols. 1986; Bevilacqua y cols. 1987 y 1984), lógico era pensar que nuestros pacientes, que habian tenido agresiones importantes, debian de exhibir en las membranas de sus linfocitos estas modificaciones y, el estudio de moléculas de activación como CD25, CD71 y CD69, nos darian información sobre la especificidad, magnitud y duración de la respuesta inmune.

Así, en las primeras 24-48 horas del accidente, los pacientes traumatizados mostraron cifras de CD69 y CD71 elevadas, estadísticamente significativas con respecto al grupo control sano ($p < 0.005$ y $p < 0.05$ respectivamente). Los pacientes quemados, por su parte, presentaron cifras elevadas

de CD25 y CD69, estadísticamente significativas ($p < 0.05$ para ambas moléculas).

Concluimos por tanto que si bien se observa una linfopenia importante, los linfocitos están activados. Nuestro interés se centró posteriormente en el estudio de las moléculas de adhesión en la superficie linfocitaria. Empleamos para ello los anticuerpos que reconocen las moléculas de adhesión CD11c, CD49a y CD54. Otras moléculas de adhesión aparecen de forma más generalizada y la comparación entre el estado de activación y el de reposo, hubiese resultado difícil.

Los pacientes traumatizados, en las primeras horas tras el accidente, mostraron un aumento de linfocitos que exhibían las tres moléculas de adhesión estudiadas (CD11c, CD49a y CD54). Las diferencias frente al grupo control fueron estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0.05$). Los enfermos quemados, tuvieron elevaciones de linfocitos positivos para CD11c y CD49a siendo estadísticamente significativo ($p < 0.005$ y $p < 0.05$ respectivamente).

Un hallazgo de interés fué la observación de la existencia de linfocitos que mostraron el fenotipo CD4 y CD8 de manera simultánea. Estos linfocitos, aparecen en un momento del desarrollo ontogénico de las células T en el timo, las cuales,

atraviesan por una fase de inmadurez, en la corteza tímica, donde el timocito expresa concomitadamente los antígenos CD4+CD8+. Asimismo, habían sido descritos en el individuo adulto normal (Blue y cols. 1985,1986) la presencia de hasta un 3% de este tipo de células. La interpretación que habían hecho los autores, era que se trataba de linfocitos activados, pues aparecieron en gran número, cuando se les estimuló, in vitro, con mitógenos. Por tanto, la procedencia de las células con fenotipo simultaneo CD4+CD8+ sólo puede explicarse de dos lugares: el timo y la activación (Janet 1989).

Los pacientes politraumatizados y quemados, en las 24-48 horas tras la agresión, manifestaron un aumento en el número de células CD4+CD8+, y aunque, en conjunto la elevación no fué estadísticamente significativa, destacaron dos pacientes quemados con un 11% de esta población celular. Para valorar el grado de activación, en estos dos casos, procedimos a un triple marcaje con diversos colorantes, empleando los anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 y, bien anti-CD25, o anti-CD71. Con esta técnica, pudo comprobarse que las células CD4+CD8+ de nuestros dos pacientes, no eran CD25+ ni CD71+. No podemos descartar que estas células sean linfocitos activados aunque se trataría de un estadio de activación donde no se expresan aún, o han dejado de expresarse otros marcadores de activación tales como CD25 o CD71.

Así pues, el traumatismo o las quemaduras se acompañan de una activación de los linfocitos que podría guardar relación con la intensidad de aquellos. La evolución de las cifras de linfocitos periféricos, en las semanas posteriores al accidente, depende de la evolución clínica de los pacientes. Observamos que los pacientes que experimentan una mejoría clínica, muestran un incremento en las cifras de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+, estos resultados pueden ser fácilmente observados en las figuras 7,8 y 9 para traumatizados y 10, 11 y 12 para quemados.

La mejoría clínica se acompañó asimismo de un reestablecimiento de la función fagocítica, de un ascenso de los niveles de IgG y de una disminución de los valores de la proteína C reactiva. Por el contrario, en quienes evolucionaron mal o no sobrevivieron, se observó una disminución sostenida de las cifras de IgG en suero y valores elevados de proteína C reactiva.

Las células CD4+CD8+, en principio aumentadas, fueron disminuyendo hasta desaparecer, a medida que los enfermos mejoraron y aumentaron sus cifras de linfocitos totales.

Teniendo en cuenta, los datos aportados en el presente trabajo, en su totalidad, nos confirman la existencia de una

profunda linfopenia que se acompaña de otras alteraciones del sistema inmune: aparición o aumento de expresión de moléculas de activación - adhesión, presencia de células CD4+CD8+, alteraciones en la capacidad fagocítica de los monocitos, aumentos importantes de la proteína C reactiva y disminución de los niveles de IgG en suero con modificaciones en los valores usuales de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Dichas alteraciones van desapareciendo a medida que la gravedad clínica remite con recuperación de la linfopenia hasta cifras normales y consiguiéndolo gracias a las elevaciones de CD3+, CD4+ y CD8+, descenso en la expresión de moléculas de activación y adhesión, pérdida de las células CD4+CD8+, recuperación de la función fagocítica, normalización de los niveles de la proteína C reactiva, elevación de los índices de IgG en suero y reestablecimiento, a cifras normales, de las subclases de IgG.

Nosotros pensamos que todos estos cambios, están producidos por una liberación excesiva de citoquinas, motivada por el propio accidente. Lamentablemente, hoy día, es difícil realizar la cuantificación de estas sustancias. El estudio que realizamos empleando uno de los pocos equipos de detección, nos dió unos resultados difíciles de interpretar. En un primer momento, la cuantificación en suero de TNF e IL 1 β , fué indetectable tanto para politraumatizados como para quemados.

Procedimos a la cuantificación, de estas mismas citoquinas, en el sobrenadante de células mononucleares cultivadas durante 24 horas, con medio de cultivo RPMI, en estufa a 37°C, en atmosfera de CO₂ al 5% y en condiciones saturantes de humedad. Los resultados obtenidos en sobrenadantes, fueron elevados y similares tanto para TNF como para IL 1 β , estos datos corroboraban nuestras hipótesis, pero al estudiar al grupo control sano, también aparecían cifras ascendidas de TNF e IL 1 β . Experimentos diseñados en nuestro propio laboratorio, nos han permitido saber que el suero fetal bovino (FCS) empleado en el medio de cultivo y el plástico del material usual de trabajo (tubos de centrífuga, botellas de cultivo....etc) provocan alteraciones en la detección de estas citoquinas, debidas probablemente a activación de los monocitos. Nuestras investigaciones en este sentido no han terminado, y esperamos en breve obtener los primeros resultados interpretables.

Así pues, parece razonable concluir que la linfopenia es motivada por un secuestro de las células en el endotelio vascular y en otros tejidos inflamados y dañados, debido a la alta densidad de moléculas de adhesión exhibidas por las membranas celulares de los enfermos, que hacen, que los linfocitos se adhieran a estos lugares y sólo más tarde, con la recuperación del sujeto, y la posible disminución de citoquinas, la densidad de estas moléculas vaya disminuyendo y

los linfocitos pasen nuevamente al torrente circulatorio.

La linfopenia, no es por consiguiente la causa de la inmunodeficiencia, sino más bien el resultado o la consecuencia de cambios en la concentración de citoquinas, que son genuinamente, el origen de la depresión en las defensas orgánicas y del fracaso multiórgano.

Si nuestra interpretación es correcta, podrían sentar las bases concretas de la depresión del sistema inmune tras el trauma o la quemadura y nos colocan en buena posición para investigar nuevas modalidades terapéuticas (Stefan Endres, M.D. 1989) centradas en la inhibición de la acción de las citoquinas en estas situaciones patológicas.

7 CONCLUSIONES

El análisis de los datos aportados en los precedentes capítulos nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1) El trauma y la quemadura provocan una linfopenia que afecta a todas las subpoblaciones de linfocitos T (linfocitos T totales CD3+, cooperadores CD4+ y citotóxicos-supresores CD8+).

2) Las células NK se ven igualmente disminuidas por el trauma y la quemadura, siendo su descenso estadísticamente significativo al compararlos con el grupo control sano ($p=0.001$).

3) La linfopenia inicial que acontece en los pacientes politraumatizados, guarda relación estadísticamente significativa, con la gravedad del traumatismo medido según "Trauma Score". Así, a mayor gravedad mayor linfopenia y viceversa.

4) En los pacientes quemados, la gravedad clínica, medida en porcentaje de superficie corporal afectada, no guarda relación con la linfopenia inicial que estos enfermos presentan.

5) La supervivencia de los pacientes politraumatizados guarda estrecha relación con las cifras, en valores absolutos, de linfocitos totales, comprobándose que por debajo de 400 linfocitos totales/microlitros, los enfermos mueren víctimas de complicaciones sépticas.

6) El trauma y la quemadura se acompañan asimismo de la aparición de linfocitos que exhiben moléculas de activación (CD25, CD69 y CD71).

7) El clima de activación linfocitaria que acontece tras la lesión térmica y traumatismo favorece igualmente la aparición de moléculas de adhesión (CD11c, CD49a y CD54).

8) El incremento de moléculas de adhesión en la superficie linfocitaria puede ser el origen de la linfopenia debida al secuestro de células que se adhieren y escapan del torrente circulatorio.

9) La tendencia al alza de las cifras de linfocitos T, a lo largo del proceso evolutivo del sujeto, quemado o politraumatizado, es un signo de buen pronóstico, mientras que la tendencia a la baja es un signo de empeoramiento y mal pronóstico.

10) Hemos observado asimismo, la presencia de células CD4+CD8+ en los enfermos que nos ocupan. La buena evolución de los enfermos se acompaña de una disminución de estas células hasta cifras consideradas normales.

11) Tras el trauma o la quemadura, aparece una disminución, estadísticamente significativa $p < 0.001$, de los niveles de IgG en suero.

12) La tendencia a elevar los niveles de IgG a lo largo del proceso patológico, desde valores iniciales muy bajos, a cifras mayores hasta la normalidad, es un signo de buen pronóstico, mientras que una evolución, a la baja, desde las cifras iniciales ya descendidas, es un signo de mal pronóstico tanto para pacientes quemados como para politraumatizados.

13) La proteína C reactiva, se eleva como consecuencia del trauma y la quemadura.

14) La proteína C reactiva se mantiene elevada durante todo el proceso patológico de los pacientes, pero la inclinación al descenso, en los valores de la misma, es indicativo de un buen pronóstico y viceversa.

15) Como resumen de todo lo anterior, podemos concluir que, el síndrome de inmunodeficiencia inducido por el trauma o la quemadura es la consecuencia de una respuesta inmune desmesurada (activación, adhesión, reactantes de fase aguda...etc) y no el origen del síndrome.

16) Si, como nosotros postulamos, todos los cambios observados se deben a una liberación desmedida de citoquinas, el tratamiento de estos enfermos, deberá en el futuro tener en cuenta la forma de neutralizar estas moléculas. La experimentación en animales son altamente prometedoras en este sentido.

8 RESUMEN

Hemos estudiado un total de 59 pacientes críticos, (32 politraumatizados y 27 quemados), así como una población sana control de 32 sujetos. Las edades oscilaban entre 15 y 75 años y la gravedad clínica estaba medida en Trauma Score y porcentaje de superficie corporal quemada. Ninguno de los pacientes recibió transfusión sanguínea previa al estudio ni drogas esteroideas.

Las infecciones, eran con frecuencia la causa de muerte tardía en pacientes politraumatizados y quemados. El origen de las mismas, parecía relacionarse con la depresión de las defensas inmunitarias, en estos pacientes, a las pocas horas del accidente.

Los enfermos, presentaban una linfopenia inicial en las primeras 24-48 horas del trauma o lesión térmica, al compararlos con los individuos sanos controles.

La linfopenia, afectaba en números absolutos a las subpoblaciones linfocitarias CD3, CD4 y CD8 siendo proporcional a la gravedad del traumatismo y no relacionada con la extensión de la quemadura.

Los valores absolutos de linfocitos B, no sufrían modificaciones, en los primeros momentos tras el accidente, aunque se observaba un descenso de los niveles de IgG estadísticamente significativo ($p = 0.001$).

El sistema monocítico/macrofágico, mostraba una disminución de la capacidad fagocítica en ambos grupos de pacientes y estadísticamente significativo con respecto al grupo sano control.

La determinación de los valores de la proteína C reactiva, exhibía en todo momento, cifras elevadas en ambos grupos de pacientes inmediatamente después de la agresión (traumática o térmica).

El descubrimiento de las citoquinas (TNF, IL 1β , gamma interferon...etc), como factores solubles, secretados por las células activadas y sus funciones en las reacciones inflamatorias inespecíficas e inmunitaria específica, nos llevaba a pensar, en el importante papel que estos factores solubles jugaban en el normal funcionamiento del sistema inmune, de tal manera, que un desequilibrio en la producción de citoquinas o en el tipo de la misma, podía conducir a alteraciones metabólicas, de la coagulación, del sistema termoregulator y del sistema inmune entre otros.

El trauma y la quemadura, eran estímulos suficientemente fuertes como para provocar la liberación de citoquinas TNF e IL 1, y estas, a su vez, eran capaces de inducir cambios importantes en el fenotipo celular, fué así como encontramos que aunque existía linfopenia en las primeras 24-48 horas tras el trauma y lesión térmica, los linfocitos estaban activados y esto se ponía de manifiesto, con la presencia o aumento de expresión de marcadores de activación-adhesión (CD25, CD69 y CD71; CD11c, CD49a y CD54 respectivamente) en sus membranas.

Concomitantemente a estos marcadores de activación, se observaba un moderado incremento de linfocitos que mostraban simultáneamente los antígenos CD4+ y CD8+, sobretodo en los pacientes quemados. Dichas células CD4+CD8+ a pesar de estar relacionadas con la activación, no expresaban los antígenos CD25 ni CD71.

Así pues, el traumatismo y las quemaduras se acompañaban de una activación de los linfocitos que podría guardar relación con la intensidad de aquellos. La evolución de las cifras de linfocitos periféricos, en las semanas posteriores al accidente, dependía de la evolución clínica de los pacientes. Observábamos que los pacientes que experimentaban una mejoría clínica, mostraban un incremento en las cifras de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+. La mejoría clínica, se acompañaba asimismo

de un reestablecimiento de la función fagocítica, de un ascenso de los niveles de IgG y de una disminución de los valores de proteína C reactiva. Por el contrario, en quienes evolucionaban mal o no sobrevivían, se observaba una disminución sostenida de las cifras de IgG en suero y valores elevados de proteína C reactiva.

Nosotros pensamos que todos estos cambios, estaban producidos por una liberación excesiva de citoquinas. Luego, parece razonable concluir que la linfopenia es motivada por un secuestro de las células en el endotelio vascular y otros tejidos inflamados y dañados, debido a la alta densidad de moléculas de adhesión exhibidas por las membranas celulares de los enfermos, que hacen, que los linfocitos se adhieran a estos lugares y sólo más tarde, con la recuperación del sujeto, y la posible disminución de citoquinas, la densidad de estas moléculas vaya disminuyendo y los linfocitos pasen nuevamente al torrente circulatorio.

La linfopenia, no es por consiguiente la causa de la inmunodeficiencia, sino más bien el resultado o la consecuencia de cambios en la concentración de citoquinas, que son genuinamente, el origen de la depresión en las defensas orgánicas y del fracaso multiórgano.

Creemos que en un futuro, no muy lejano, se diagnosticaran en cada paciente individual las alteraciones de defensa específicas, lo que facilitará el conocimiento de su situación inmunológica actual y pronóstico. De este modo, estaremos en mejor disposición de instaurar modalidades profilácticas y terapéuticas que podrían contribuir a la mejora de la respuesta inmune en aquellos sujetos víctimas de accidentes.

9 BIBLIOGRAFIA

Antonacci, A.C., Reaves, L.E., Calvano, S.E., Amand, R., Riesthal, H.F. and Shires, T. (1984). Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations after thermal injury in human beings. *Surg. Gyne. Obst.* 1(159), 1.

Antonacci, A.C. (1986). Immune dysfunction and immunomodulation following trauma. In *Advances in host defense mechanism vol. 6. Host defenses in trauma and surgery* (ed. by John I. Gallin and Anthony S. Fauci) p. 81. Raven Press, New York.

Bauer, A.R., McNeil, C., Trentelman, E. (1978). The depression of T lymphocytes after trauma. *Am. J. Surg.* 136,674.

Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Cotran, R.S. & Gimbrone, A.M. (1984). Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 160, 618.

Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Fiers, W., Mendrick, D.L., Cotran, R.S. & Gimbrone, M.A. (1987). Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion;

regulation by IL-1 and TNF. In: Leucocyte Emigration and its sequelae (ed. by H.Z. Movat). p. 79. Karger, Basel.

Blue, M.L., Daley, J.F., Levine, H. & Schlossman, S.F. (1985). Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.* 134, 2281.

Blue, M.L., Daley, J.F., Levine, H., Craig, K.A. & Schlossman, S.F. (1986). Biosynthesis and surface expression of T8 by peripheral blood T4+ cells in vitro. *J. Immunol.* 137, 1202.

Cavender, D.E., Haskard, D.O., Joseph, B. & Ziff, M. (1986). Interleukin 1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers. *J. Immunol.* 136, 203.

Constantian, M.B., Menzoian, J.O., Nimberg, R.B., et al. (1977). Association of a circulating immunosuppressive polypeptide with operative and accidental trauma. *Ann. Surg.* 185, 73.

Constantian, M.B. (1978). Association of sepsis with an immunosuppressive polypeptide in the serum of burn patients. *Ann. Surg.* 188, 209.

Cotran, R.S., Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Springer, T.A., Wiebke, E.A., Gaspari, A.A., Rosenberg, S.A. & Lotze, M.T. (1987). Endothelial activation during interleukin 2 immunotherapy. *J.Immunol.* 139, 1883.

Champion, H.R., Sacco, W.J., Carnazzo, A.J., et al. (1981). The trauma Score. *Crit. Care Med.* 9, 672.

Dinarello, C.A. (1984). Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6, 51.

Dougherty, G.J., Murdoch, S. & Hogg, N. (1988). The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur. J. Immunol.* 18,35.

Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. & Springer, T.A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 137, 245.

Faist, E., Mewes, A., Baker, C.C., Strasser, T., Alkan, S.S., Rieber, P. and Heberer, G. (1987). Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin α (IL2) production in patients with major trauma. *The Journal of Trauma* 8(27), 837.

Faist, E., Ertel, W., Baker, C.C. and Heberer, G. (1989). Terminal B-cell maturation and immunoglobulin (Ig) synthesis in vitro in patients with major injury. *The Journal of Trauma* 1(29), 2.

Goeken, N.E., Staggs, T.S. and Ballas, Z.K. (1989). Monocyte suppressor factor is plasminogen activator inhibitor of membrane bound but not soluble IL-1. *The Journal of Immunology* 143, 603.

Gregory, C.D., Murray, R.J., Edwards, C.F. & Rickinson A.B. (1988). Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cells surveillance. *J. Exp. Med.* 167, 1811.

Hemler, M.E. (1990). VLA proteins in the integrin family: Structures, Functions and their Role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 365.

Jalkanen, S., Wu, N., Bargatze, R.F. and Butcher, E.C. (1987). Human lymphocyte and lymphoma homing receptors. *Annu. Rev. Med* 38, 467.

Janet, K.A., Nicholson, P.D. (1989). Use of Flow Cytometry in the Evaluation and Diagnosis of Primary and Secondary Immunodeficiency Diseases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113, 598.

Krensky, A.M., Sanchez-Madrid, F., Robbins, E., Nagy, J., Springer, T.A. & Burakoff, S.J. (1983). The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol.* 131, 611.

Larson, R.S and Springer, T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunological Reviews* 114, 181.

Mantovani, A. & Dejana, E. (1989). Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol. Today.* 10, 370.

Makgoba, M.W., Sanders, M.E. & Shaw S. (1989). The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunol. Today.* 10, 417.

McLoughlin, G.A., Wu, A.V., Saporoschetz, I. et al. (1979). Correlation between anergy and a circulating immunosuppressive factor following major surgical trauma. *Ann. Surg.* 190, 297.

Meakins, J.L., McLean, A.P., Kelly, R. et al. (1978). Delayed hypersensitivity and neutrophil chemotaxis: Effect of trauma. J. Trauma. 18, 240.

Miller, C.L. and Chaudry, B.J. (1979). Suppressor T-cell activity induced as a result of thermal injury. Cell Immunol, 44, 201.

Miller, S.E., Miller, C.L. and Trunkey, D.D. (1981). The Immune Consequences of Trauma. Clínicas Quirúrgicas de Norteamérica. 169.

Moran Kevin, M.D. and Munster, M.D. (1987). Alteraciones de los mecanismos de defensa del huésped en pacientes quemados. Clínicas quirúrgicas de Norteamérica 1.

Munster, M.A. (1984). Immunologic Response of Trauma and Burns. The American Journal of Medicine. 142.

Ninnemann, J.L. (1980). Immunosuppression following thermal injury through B cell activation of suppressor T cells. J. Trauma. 20, 206.

Ninnemann, J.L. (1981). The Immune Consequences of Thermal Injury. Baltimore, Williams and Wilkins.

Pitzalis, C., Kingsley, G., Haskard, D. & Panayi, G. (1988). The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur. J. Immunol.* 18, 1397.

Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothelein, R. & Springer, T.A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J. Immunol.* 137, 1983.

Pober, J.S., Lapierre, L.A., Stolpen, A.H., Brock, T.A., Springer, T.A., Fiers, W., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L. & Gimbrone, M.A. (1987). Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J. Immunol.* 138, 3319.

Polk, H.C. (1979). Concensus summary on infection. *J. Trauma.* 19, 894.

Polk, H.C., George, C.D., Wellhausen, S.R., Cost, K., Davidson, P.R., Regan, M.A. & Borzotta, A.P. (1986). A systematic study of host defense processes in badly injured patients. *Ann. Surg.* 204, 282.

Rittenburu, M.S. and Hanback, L.D. (1967). Phagocytic depression in thermal injuries. *J. Trauma* 7, 523.

Sanchez-Madrid, F., Cebrian, M., Lanzaduri, M.O., Serra, C., Engel, P., Vives, J., Cabrera, T., Sampalo, A. and Garrido, F. (1989). Report of the IV International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigens. *Immunology* 2(8), 35.

Sanders, M.E., Makgoba, M.W., Sharrow, S.O., Stepfany, D., Springer, T.A., Young, H.A. & Shaw, S. (1988). Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J. Immunol.* 140, 1401.

Scovill, W.A., Annet, S.J., Saba, T.M. et al. (1979). Cardiovascular hemodynamics after opsonic alpha-2-surface binding glycoprotein therapy in injured patients. *Surgery* 86, 284.

Shaw, S., Luce, G.E., Quinones, R., Gress, R.E., Springer, T.A. & Sanders, M.E. (1986). Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* 323, 262.

Shaw, S. & Luce, G.E.G. (1987). The lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J. Immunol.* 139, 1037.

Singh, H., Herndon, D.N. and Stein, M.D. (1988). Changes in the population of active rosette-forming cells: a sensitive index for mortality among thermal injury patients. *Burns Incl. Therm. Inj.* 14(2), 85.

Sousa, E.S., Ginsberg, M.H., Burke, T.A., Lam, S.C. and Plow, E.F. (1988). Localization of an Arg- Gly- Asp Recognition Site within an Integrin Adhesion Receptor. *Science* 242, 91.

Spits, H., Schooten, W.V., Keizer, H., Seventer, G.V., Rijn, M.V., Terhorst, C. & Vries, J.E. (1986). Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells. *Science* 232, 403.

Springer, T.A., Dustin, M. L., Kishimoto, T. K. & Marlin, S. D. (1987). The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 5, 223.

Stefan Endres, M.D., Reza Ghorbani, B.S., Vicki, E.K., Kostis, M.D., Gerhard, M.D., Jos, W.M., Joseph? G.C., Tina, S.R., Mark, S.K., Peter, C.W., Ernst, J.S., Sheldon, M.W. and Dinarello, C.A. (1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *The New England Journal of Medicine*. 5(320), 265.

Stenson, W.F. and Parker, C.W. (1980). Prostaglandins, macrophages, and immunity. *J. Immunol.* 125, 2.

Teodorczyk-Injeyan, J.A., Sparkes, B.G., Falk, R.E. and Peters, W.J. (1986). Polyclonal immunoglobulin production in burned patients—kinetics and correlations with T-cell activity. *The Journal of Trauma* 9(26), 834.

Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey III, T.J., Zentella, A., Albert, J.D., Shires, G.T. and Cerami, A. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470.

Unanue, E.R. and Rosenthal, A.S. (1980). *Macrophage Regulation of Immunity*. New York, Academic Press.

Van Dijk, W.C., Verbrugh, H.A. and Van Rijswijk, R. (1982). Neutrophil function, serum opsonic activity and delayed hypersensitivity in surgical patients. *Surg* 92, 21.

Varesio, L., Landolfo, S., Giovarelli, M. et al. (1980). The macrophage as the social interconnection within the immune system. *Devel. Comp. Immunol.* 4, 11.

Warden, G.D., Major, M.C., Mason, A. D., et al. (1975). Suppression of leukocyte chemotaxis in vitro by chemotherapeutic agents used in the management of thermal injuries. *Ann. Surg.* 181, 363.

Warden, G.D. (1981). Leucocyte chemotaxis in thermally injured patients. In Ninneman J.L. (ed.): *The Immune Consequences of Thermal Injury*. Baltimore, Williams and Wilkins. 316.

Wood, G.W., Volenec, F.J., Mani, M.M. & Humphrey, L.J. (1978). Dynamics of T-lymphocyte subpopulations and T-lymphocyte function following thermal injury. *Clin. Exp. Immunol.* 31, 291.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D.^a M.^a Dolores Maldonado y Aibar
titulada Alteraciones inmunitarias en Pacientes
críticos: Politraumatizados y quemados
acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 11 de octubre 1990

El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



El Presidente,



El Secretario,



El Doctorado,



321
10/10