

TESIS DOCTORAL

**MODULACION DE LA RESPUESTA
INMUNOLOGICA CON INTERLEUQUINA-1B
E IBUPROFEN EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE SHOCK ENDOTOXICO**

ALFONSO MANSILLA ROSELLO

**REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

GRANADA, 7 DE JUNIO DE 1995

CALIFICACION: APTO CUM LAUDE

INTRODUCCION

Alfonso Mansilla Roselló

1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS DEL FALLO ORGANICO MULTIPLE (FOM).

El desarrollo de modernas tecnologías para el tratamiento de pacientes graves ha determinado, a la vez que un aumento de su supervivencia, una nueva valoración de patologías consideradas anteriormente como entidades clínicas aisladas e independientes. El avance en nuestro conocimiento sobre la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento en este tipo de pacientes, tiene como consecuencia la aparición de nuevos problemas que aumentan progresivamente según se prolonga la vida del enfermo, del mismo modo que ensombrecen su pronóstico.

A lo largo de la Historia de la Medicina, los logros alcanzados en el tratamiento y atención de las víctimas de traumatismos o enfermedades graves han progresado en forma de saltos cuánticos cada vez que se identificaban y comprendían las causas que provocaban su muerte y se desarrollaban las medidas terapéuticas oportunas para cada una de ellas. Paradójicamente, estos progresos en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de pacientes se deben en gran manera a las demandas de las guerras.

Durante la I Guerra Mundial las transfusiones sanguíneas fueron una de las principales armas terapéuticas al realizarse por primera vez de forma masiva (Wangensteen y Wangenstein, 1979), pero no fue hasta 1930 cuando se estableció la relación causa-efecto entre la pérdida de sangre y las manifestaciones clínico-patológicas del shock hipovolémico posthemorrágico (Blalock, 1930). A lo largo de la II Guerra Mundial se hicieron patentes tanto la disfunción hepática (Bywaters, 1946) como la

renal (Bywaters, 1941), ambas provocadas por la hipovolemia y la lesión tisular. La mortalidad por trauma bélico disminuyó de forma espectacular durante la Guerra de Corea, en la que se produjeron grandes avances en las medidas de reanimación precoz y mejoras del transporte de los pacientes lesionados, convirtiéndose la insuficiencia renal en la principal causa de muerte de aquellos enfermos que en un principio se había practicado con éxito las oportunas medidas de resucitación precoz (Deitch, 1992; Marshall y Meakins, 1991). La fisiopatología de la insuficiencia renal post-traumática se convirtió, desde ese momento, en foco de estudio e investigación experimental. Fruto de esas investigaciones, se descubrió que el fracaso renal en pacientes traumatizados podía ser prevenido mediante la infusión de soluciones cristaloides durante la resucitación, ya que permitían mantener un volumen intravascular circulante efectivo y de esta forma una perfusión renal adecuada (Deitch, 1992). La frecuencia de esta patología descendió en el transcurso de la Guerra del Vietnam, gracias al mejor conocimiento sobre su fisiopatología, a la utilización de volumen como principal medida de reanimación y al uso de modernos sistemas de transporte, a la vez que mejoró su pronóstico debido a la puesta en práctica de nuevas modalidades de diálisis como medida terapéutica (Deitch, 1992; Marshall y Meakins, 1991). A partir de ese momento, comenzó a adquirir protagonismo en este tipo de pacientes la insuficiencia respiratoria postraumática, erigiéndose como principal reto por resolver en el enfermo quirúrgico (Ashbaugh et al., 1967; Marshall y Meakins, 1991). Nuevos problemas

surgieron durante la década de los años 60. Por un lado, comenzaron a describirse en pacientes quirúrgicos en estado crítico alteraciones derivadas del fracaso hematológico, representadas principalmente por el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID), y las hemorragias gastrointestinales provocadas por estrés (Burke et al., 1967; Marshall y Meakins, 1991), y por otro lado, con el advenimiento de potentes terapias antibióticas dirigidas fundamentalmente contra gérmenes Gram positivos, se evidenció un cambio en la etiología bacteriana de las infecciones letales de los pacientes en unidades de cuidados intensivos, siendo reemplazados los gérmenes clásicos hasta entonces responsables de este tipo de sepsis (neumococos y estreptococos) por bacterias Gram negativas (Altemeier et al., 1967; Carrico et al., 1986; Marshall y Meakins, 1991). El shock séptico por gérmenes Gram negativos se convirtió en una de las causas más frecuentes de mortalidad de los enfermos quirúrgicos ingresados en las unidades de cuidados intensivos, siendo el paradigma para el estudio de los efectos sistémicos de la bacteriemia Gram negativa, lo que proporcionó grandes avances en el conocimiento sobre el tratamiento de apoyo y mantenimiento de las funciones hemodinámicas en este tipo de enfermos.

Esta cadencia de hechos demuestra cómo según se prolonga en el tiempo la vida del paciente crítico gracias a la aparición progresiva de modernas técnicas de reanimación y tratamiento de apoyo de sus funciones biológicas, que a la vez nos facilitan el estudio y conocimiento de la fisiopatología del órgano o sistema

alterado, permiten la presentación de nuevos cuadros clínicos provocados por el fracaso de un nuevo órgano que, aparentemente, no muestra relación con la patología primaria que origina su estado de gravedad.

Sin embargo, a pesar de los importantes logros alcanzados por la medicina a lo largo de los años sobre el conocimiento de la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de este complejo cuadro clínico, el FOM continúa siendo la primera causa de muerte de los pacientes graves ingresados en las unidades de cuidados intensivos (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990).

1.2 DEFINICION Y CONCEPTO DEL FALLO ORGANICO MULTIPLE (FOM).

A principios de la década de los años 70 se hicieron las primeras descripciones clínicas del fracaso progresivo de múltiples sistemas orgánicos como desenlace común de los pacientes quirúrgicos en estado crítico (Tilney et al., 1973), pero no fue hasta 1975 cuando Baue definió a este síndrome en evolución como "fallo de sistemas múltiples, secuencial o progresivo" (Baue, 1975) y Fry, en 1980, estableció su letalidad y estrecha correlación con la presencia de infecciones no controladas (Fry et al., 1980).

Surge así el concepto de Fallo Orgánico Múltiple (FOM), cuya característica fundamental es el deterioro progresivo de las funciones fisiológicas de órganos y sistemas que se encuentran distantes del lugar donde se sitúa la patología primaria, en un proceso cuya gravedad varía desde la disfunción subclínica del

órgano hasta su insuficiencia franca e irreversible (Marshall y Meakins, 1991). Debemos considerar por tanto a estos enfermos como afectados por un proceso pluripatológico que es el que determina su estado de gravedad, consecuencia de la disfunción simultánea y progresiva de varios órganos y provocada por distintas etiologías que en un principio no guardan relación con el síndrome clínico en desarrollo.

El FOM es un proceso agudo, dinámico, progresivo y potencialmente reversible, en el cual distintas causas como infecciones graves, enfermos trasplantados, quemaduras extensas, politraumatismos, cirugías importantes, etc, actúan sobre un mecanismo gatillo común que desencadena un fallo secuencial de los distintos sistemas, agravándose el pronóstico del paciente según tenga un mayor número de órganos alterados (Marshall y Meakins, 1991).

1.3 MANIFESTACIONES CLINICAS Y PRONOSTICO DEL FOM.

Independientemente de la causa responsable del inicio de la cascada de acontecimientos que desencadenan el FOM, este síndrome, una vez establecido, sigue por lo general un curso predecible, comenzando por el fallo pulmonar al que le sigue, y por este orden, el fracaso hepático, intestinal y renal. El fallo hematológico y el miocárdico suelen ser manifestaciones tardías del FOM, mientras que las alteraciones del sistema nervioso central son más variables en su momento de presentación, pudiendo aparecer tanto al inicio del cuadro clínico como en fases más

avanzadas, cuando ya existen alteraciones de varios órganos (Deitch, 1992).

Este sería el patrón clásico del desarrollo secuencial del FOM, sin embargo, esta secuencia puede verse modificada por la presencia de enfermedades o alteraciones orgánicas previas o por la naturaleza de la causa desencadenante del cuadro clínico. Así, el fallo hepático o miocárdico puede ser la primera manifestación del síndrome en aquellos pacientes con cirrosis o cardiopatía previa, o la insuficiencia renal puede preceder incluso al fracaso del sistema respiratorio en aquellos casos en los que un paciente haya estado sometido a periodos prolongados de shock, lo que indica que la secuencia del fracaso orgánico puede verse influenciada por la presencia de patologías previas y/o por la reserva fisiológica del propio medio interno (Deitch, 1992).

De la misma manera, variaciones en la secuencia de presentación del fracaso de los distintos órganos puede servir de orientación sobre la etiología de la causa desencadenante. Por ejemplo, en un FOM establecido en un paciente grave con cuadro clínico de sepsis, es mucho más probable que una infección intrabdominal sea la causa del mismo cuando el síndrome séptico precede al fracaso pulmonar que si éste se desarrolla previamente a la sepsis (Baue, 1975; Fry, 1980).

Para llegar al diagnóstico de FOM hay que establecer previamente los criterios de disfunción o fracaso de cada órgano.

Estos criterios pueden variar según las series consultadas, lo que contribuye a crear todavía más confusión en este, ya de por sí, complejo síndrome clínico. Sin embargo, la mayoría de los

autores concluyen en que el pronóstico del FOM no depende de la causa que inició el proceso o de la alteración de un órgano en concreto, sino del número de sistemas que estén fracasando en un momento dado y de la duración de esta situación (Carrico et al., 1986; Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Marshall y Meakins, 1991; William et al., 1985).

1.3.1 Criterios de Disfunción/Fracaso Orgánico

Los criterios más utilizados actualmente para valorar el estado funcional de cada órgano en los pacientes en estado crítico se resumen de forma esquemática en la tabla 1 (Carrico et al., 1986; Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Knaus et al., 1985; Marshall et al., 1988; Marshall y Meakins, 1991).

Se especifican aquellos criterios y parámetros aplicados a cada órgano y sistema, según los cuales se considera que dicho órgano se encuentra en un estado de disfunción discreta o grave.

Como se ha comentado anteriormente, los parámetros utilizados para evaluar el estado funcional de cada órgano o sistema en concreto pueden variar según los autores consultados. Sin embargo, al considerar al FOM como la consecuencia de la alteración funcional de múltiples sistemas, las discrepancias con respecto a la evaluación de la función de un órgano en particular no suelen influir en la valoración global del estado del paciente, puesto que éste dependerá del mayor o menor número de órganos que se encuentren alterados.

Tabla 1
Criterios de Disfunción/Fracaso Orgánico

Sistema	Disfunción Discreta	Disfunción Grave
Respiratorio	Hipoxia que requiere ventilación asistida por al menos 3-5 días.	ARDS progresivo que requiere PEEP > 10 cm H ₂ O o FIO ₂ > 0,50.
Renal	Oliguria < 479 mL/24 hr, aumento de creatinina (> 2-3 mg/dL).	Necesidad de diálisis.
Hepático	Bilirrubina > 2-3 mg/dL o disminución de albúmina en suero.	Ictericia franca con bilirrubina > 8 mg/dL.
Gastrointestinal	Ileo con intolerancia a la nutrición enteral > 5 días.	Hemorragia por estrés que requiera transfusión. Colecistitis acalculosa.
Cardiovascular	Taquicardias supraventriculares, edema, descenso de la fracción de eyección.	Fallo ventricular derecho o biventricular, respuesta ionotrópica negativa.
Nervioso Central	Confusión, desorientación.	Coma progresivo.
Hematológico	Trombocitopenia, ascenso PT y PTT > 25%.	Trombocitopenia grave, CID.
Endocrino	Hiper glucemia.	Requerimientos altos de insulina.
Inmunológico	Alteración en la respuesta a las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada.	Infecciones recurrentes.
Cicatrización de las heridas	Alteración en la formación de tejido de granulación.	Ulceras por decúbito, dehiscencia de heridas.

1.3.2 Manifestaciones Clínicas y Estadíos del FOM.

Por la propia definición de FOM, la evaluación de la alteración por separado de distintos sistemas no sirve para hacer una valoración global del estado clínico del paciente. Más que de un simple órgano en concreto, se necesita describir de forma conjunta y en un momento dado la funcionalidad de todos los sistemas orgánicos y los cambios que acontecen en los mismos con el paso del tiempo, así como las manifestaciones clínicas derivadas del fracaso de cada uno de ellos. Según los cambios que se produzcan en el estado funcional de los distintos sistemas a través del tiempo, se puede clasificar el FOM por estadíos, cada uno de los cuales es fruto de la valoración conjunta de la funcionalidad de todos los sistemas orgánicos en un momento dado. Estos estadíos se pueden dividir en 4 (Carrico et al., 1986), que van progresando desde la mínima disfunción sin manifestaciones clínicas aparentes, hasta el fracaso irreversible manifestado clínicamente por la extrema gravedad del paciente.

Estadío 1

Aspecto general	No signos obvios
Función cardiovascular	Aumento en el requerimiento de volumen
Función respiratoria	Discreta alcalosis respiratoria
Función renal	Respuesta límite
Metabolismo	Aumento en el requerimiento de insulina
Función hepática	?
Hematología	?
Función neurológica	Estado confusional

En este estadio el paciente puede aparentar un estado general normal ante una exploración física grosera. Sin embargo, una exploración más minuciosa nos pondrá de manifiesto que sus requerimientos de volumen serán más altos que lo esperado, presentará una leve taquipnea, su función renal comenzará a ser anormal y, en definitiva, se comenzarán a evidenciar alteraciones en el funcionalismo de los demás sistemas.

Estadio 2

Aspecto general	"Enfermo", inestable
Función cardiovascular	Hiperdinámica, volumen-dependiente
Función respiratoria	Taquipnea, hipocapnia, hipoxia
Función renal	Descenso de respuesta, mínima azotemia
Metabolismo	Catabolismo severo
Función hepática	Hiperbilirrubinemia sin ictericia
Hematología	Plaquetopenia, leucocitosis, leucopenia
Función neurológica	Variable

En este estadio el paciente comienza a sentirse "enfermo" y en el examen detallado de los distintos sistemas se observan discretas disfunciones que pueden ser detectadas fácilmente.

Estadio 3

Aspecto general	Muy inestable
Función cardiovascular	Shock, descenso gasto cardíaco, edema
Función respiratoria	Hipoxia severa
Función renal	Azotemia
Metabolismo	Acidosis metabólica, hiperglucemia
Función hepática	Ictericia clínica
Hematología	Coagulopatía
Función neurológica	Alguna respuesta

Cuando el síndrome progresa hasta este estadio, cualquiera puede reconocer que el paciente se encuentra en estado grave. Cada sistema orgánico presenta evidentes alteraciones clínicas y precisa algún tipo de tratamiento de apoyo para mantener su funcionalismo.

Estadio 4

Aspecto general	Estado terminal
Función cardiovascular	Sobrecarga de volumen, necesidad de medicación ionotrópica
Función respiratoria	Hipercapnia
Función renal	Oliguria
Metabolismo	Acidosis severa
Función hepática	Encefalopatía
Hematología	Coagulopatía, células inmaduras
Función neurológica	Coma

En este estadio sobreviene la muerte del paciente por el fracaso de uno o más de sus sistemas orgánicos encargados del mantenimiento de la vida.

Por supuesto esta es una clasificación que suscita controversia, ya que generalmente no todos los órganos fracasan a la vez, pudiendo predominar unos sobre otros dependiendo del proceso inicial, ni describe en profundidad todas las alteraciones clínicas y fisiopatológicas que acontecen en cada sistema. Sin embargo, teniendo siempre presente las características particulares de cada paciente y la causa que originó el síndrome de FOM, nos permite, mediante la valoración

de unos pocos parámetros guía para cada órgano, evaluar en cualquier momento el funcionalismo global del paciente y, lo que es más importante, poder llegar al diagnóstico de FOM en sus fases iniciales, cuando todavía se pueden adoptar las medidas terapéuticas oportunas que eviten, en lo posible, su progresión hacia estadios más avanzados.

1.3.3 Pronóstico del FOM

Desde sus primeras descripciones, hace aproximadamente 20 años, y pese a los importantes avances en nuestro conocimiento acumulado a lo largo de estas décadas acerca de su fisiopatología, no se han conseguido logros significativos con respecto al descenso del índice de mortalidad en los pacientes en los cuales se desarrolla este síndrome (Deicht, 1992).

Se considera actualmente que el síndrome de FOM se desarrolla con una frecuencia que oscila entre el 7 y el 22% en aquellos pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas de urgencia. Esta frecuencia asciende hasta el 30-50% cuando la causa de la intervención quirúrgica es un cuadro séptico intrabdominal (Carrico et al., 1986).

En la mayoría de Unidades de Cuidados Intensivos este problema está alcanzando proporciones epidémicas, ya que a pesar de nuestros esfuerzos en su prevención y tratamiento el FOM continúa siendo la primera causa de mortalidad en las mismas, cuya tasa se sitúa entre el 30 y el 100% dependiendo del número de órganos afectados y siendo el responsable del 50 al 80% de las

muerdes de todos los pacientes quirúrgicos ingresados en estas Unidades (Carrico et al., 1986; Deicht, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990).

El pronóstico del FOM se relaciona de forma directa con los siguientes factores: el número de órganos alterados, la duración del fracaso funcional del órgano, la edad del paciente, la presencia de enfermedades crónicas preexistentes y el tipo de enfermedad que originó el estado de FOM (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Knaus et al., 1985; Marshall y Meakins, 1991).

En la mayoría de las series consultadas, el número de órganos que se encuentren en estado de fracaso funcional en un momento dado es el factor más influyente sobre el pronóstico del síndrome, por encima de cualquier otra variable (Deitch, 1992; Fry et al., 1980; Goris et al., 1985; Knaus et al., 1985; Marshall y Meakins, 1991).

Según se muestra en la Tabla 2, a mayor número de sistemas con disfunción los índices de mortalidad aumentan de forma progresiva.

Tabla 2

Número de Sistemas con Disfunción	Mortalidad (%)
0	3
1	30
2	50-60
3	85-100
4	72-100
5	100

Las combinaciones de insuficiencias de algunos órganos en concreto influyen sobre el pronóstico de la enfermedad. Se ha observado que el porcentaje más alto de mortalidad ocurre cuando se asocia el fracaso renal con el cardiovascular y digestivo, por contra la combinación del fracaso pulmonar con el hepático tiene mejor pronóstico ya que es la que provoca menor letalidad (Goris et al., 1985).

La duración del fracaso de cada sistema es otro factor de vital importancia en el pronóstico del FOM que siempre hay que valorarlo de forma conjunta con el factor comentado en el apartado anterior.

La mortalidad es prácticamente del 100% cuando existe disfunción de 3 sistemas durante 3 días o más, según se muestra en la Tabla 3 (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Knaus et al., 1985). Existe por tanto una correlación directa entre el número de sistemas afectados y el tiempo durante el cual se mantenga esta situación.

Tabla 3

Mortalidad en % según nº de sistemas y duración del M.O.F.

		Días de fracaso						
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Número de sistemas en fracaso	1	22%	31%	34%	35%	40%	42%	41%
	2	52%	67%	66%	62%	56%	64%	68%
	3	80%	95%	93%	96%	100%	100%	100%

Alfonso Mansilla Roselló

La edad del paciente es otro factor que influye de forma directa en el pronóstico del FOM, ya que se ha demostrado que en los enfermos mayores de 65 años con fracaso de uno o dos sistemas orgánicos el índice de mortalidad se duplica con respecto a los pacientes más jóvenes que se encuentren en el mismo estadio de desarrollo de FOM (Knaus et al, 1985).

Por último, tanto la presencia de patologías previas como la causa que originó el FOM pueden influir en el desenlace final de este síndrome. En aquellos pacientes previamente sanos que desarrollan el síndrome, la tasa de mortalidad es significativamente menor que en aquellos otros portadores enfermedades crónicas. Así mismo, la mortalidad aumenta de forma apreciable cuando la etiología que originó el proceso no requiere tratamiento quirúrgico, sobre todo si es de tipo infeccioso (Knaus et al., 1985).

1.4 FISIOPATOLOGIA DEL FOM

En este síndrome existen dos características fundamentales del fracaso orgánico que confieren al mismo una singular particularidad y que, por otro lado, son la base sobre la que se cimienta su propia definición y concepto. La primera de ellas es que los distintos sistemas orgánicos que se encuentran en disfunción no están aparentemente relacionados con el proceso patológico primitivo que inició el síndrome; y la segunda es que existe un periodo que puede variar desde días a semanas entre la agresión orgánica inicial y el desarrollo del fracaso

multisistémico a distancia (Deitch, 1992). De estas dos observaciones se deduce que el FOM es un proceso sistémico mediado por factores circulantes endógenos cuyos efectos no son aparentes hasta transcurrido un periodo de tiempo variable desde el comienzo de la actuación de la causa etiológica primaria, existiendo en la actualidad una opinión prácticamente unánime en el sentido de considerar a esta síndrome como una enfermedad de mediadores, de forma que una agresión orgánica importante provoca una respuesta endógena por parte del huésped a través de la liberación de sustancias producidas por células inmunológicas activadas que modifican la respuesta inmune y metabólica, cuyo resultado final es la lesión a nivel tisular (Deitch, 1992; Marshall y Meakins, 1991).

Tradicionalmente se ha considerado a la sepsis, y más concretamente a la inducida por gérmenes Gram -, como factor etiológico principal e indispensable para el desarrollo del FOM, y durante la década de los 70 se consideró que este síndrome era la manifestación externa de un foco infeccioso oculto (Baue, 1975; Fry et al., 1980). Sin embargo, observaciones clínicas y estudios posteriores demostraron que no todos los pacientes con un cuadro clínico séptico que desembocaba en un fracaso multisistémico eran portadores de infecciones no controladas (Goris et al., 1985), basándose en hechos aparentemente tan paradójicos como que en este tipo de pacientes no siempre existía evidencia microbiológica de infección, que en un 30% de los mismos que fallecían no se pudo demostrar clínicamente ni identificar en la autopsia ningún foco infeccioso que justificase

el desarrollo del síndrome clínico (hecho que cuestionaba seriamente la laparotomía empírica en este tipo de pacientes propuesta inicialmente por Polk y Shields (Polk et al., 1977), y que la identificación y tratamiento de procesos supurativos en estos casos no se traducían en una mejora de su evolución y supervivencia (Goris et al., 1985; Goris, 1990; Norton, 1985). Todas estas observaciones comenzaron a tener sentido cuando se pudo demostrar a nivel experimental que las manifestaciones clínicas del FOM (en todo equiparables a la sepsis por gérmenes Gram -) consecuencia de la respuesta del huésped ante una agresión, podían ser provocadas por otros gérmenes, incluyendo los Gram +, así como por virus y hongos, e incluso por otras sustancias, como el zymosan, capaces de inducir una respuesta inflamatoria excesiva y prolongada (Deitch, 1992; Marshall y Meakins, 1991).

Todos estos hechos y observaciones clínicas nos conducen inevitablemente a formularnos la pregunta de por qué causas tan dispares y diversas como infecciones, traumatismos, quemaduras o el propio tratamiento quirúrgico provocan la misma respuesta endógena manifestada clínicamente por un síndrome perfectamente descrito y aceptado por toda la comunidad científica como es el FOM.

Actualmente todos los autores coinciden al concluir que no tiene por qué ser necesaria la presencia de bacterias para desencadenar este tipo de respuesta por parte del huésped, ya que procesos patológicos similares tanto en su comportamiento clínico como a nivel de respuesta biológica pueden estar provocados por

etiologías diferentes (Goris et al., 1985; Goris, 1990). Este modo común de responder el medio interno ante distintas agresiones puede calificarse como una inflamación generalizada y autodestructiva por activación masiva de los mediadores humorales endógenos y de células inflamatorias, cuyas últimas consecuencias se traducen en un daño universal del endotelio vascular, edema por alteración de la permeabilidad capilar y disminución de la disponibilidad de oxígeno por la mitocondria a pesar de un adecuado transporte arterial del mismo (Goris et al., 1985; Goris, 1990).

Llegados a este punto nos podemos hacer la pregunta clave del problema que estamos tratando: **¿POR QUE SE DESENCADENA ESTA RESPUESTA INFLAMATORIA GENERALIZADA, DESCONTROLADA Y AUTODESTRUCTIVA POR PARTE DEL HUESPED ANTE AGRESIONES TAN DISPARES, Y CUALES SON LOS MECANISMOS INTIMOS QUE LA PROVOCAN Y AUTOPERPETUAN?**

Actualmente existen tres hipótesis principales, basadas tanto en evidencias clínicas como estudios experimentales, que intentan dar una respuesta a esta pregunta. Dichas hipótesis confluyen y coinciden en muchos de sus aspectos, por lo que muy probablemente en un futuro próximo tendrán que ser consideradas como una entidad única, no ya en el plano teórico, que implique, correlacione e integre a todos los sistemas y mecanismos fisiológicos responsables de desencadenar y modular la respuesta inflamatoria del organismo ante una agresión, sea del tipo que

sea, lo suficientemente intensa y continuada para que dicha respuesta inflamatoria sea capaz de desembocar en un estado de FOM.

Una característica fundamental común a todas ellas es el nuevo concepto sobre el papel que juega el huésped en este proceso, pasando de ser una simple víctima o espectador inocente cuyos tejidos están siendo directamente destruidos por los microorganismos invasores o por los productos derivados de la lesión tisular a ser un participante activo del proceso inflamatorio autodestructivo mediante la liberación de mediadores por él mismo en respuesta a la noxa agresora (Deitch, 1992).

1.4.1 Hipótesis del Macrófago.

En esta hipótesis, una intensa y continuada activación o estimulación de los macrófagos provoca una excesiva producción y liberación por parte de los mismos de citokinas y otros productos, los cuales, a través de un efecto en cascada que implica a otros sistemas efectores humorales y celulares, desencadenan una reacción por parte del huésped cuyos efectos locales y sistémicos se traducen en una respuesta inflamatoria descontrolada (Border, 1988; Deitch, 1992; Freudenberg et al., 1993, Waage y Steinshamn, 1993; Pinsky et al., 1993; Molloy et al., 1993).

La secuencia de acontecimientos que se suceden en un proceso inflamatorio local, p.e. tras un trauma tisular o una agresión endotóxica, comienza con la activación en cascada de distintos sistemas (complemento, coagulación, fibrinolítico) los cuales

generan proteínas circulantes que actúan como sustancias mediadoras. Algunos de estos mediadores, como las fracciones C3a y C5a derivadas de la activación del complemento, ejercen una potente acción quimiotáctica sobre las células inflamatorias circulantes, principalmente macrófagos y leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) (Dofferhoff et al., 1992). Los PMNs así activados liberan enzimas proteolíticos y radicales tóxicos de oxígeno, que en un principio, ejercen su efecto a nivel local lesionando el endotelio vascular (Deitch, 1992; Goris, 1990). Los macrófagos activados tanto por los productos liberados por los PMNs como directamente por la fracción C5a de complemento o los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), aumentan la síntesis y excreción de histamina, citokinas (TNF, IL-1, IL-2, IL-6, INF) (Deitch, 1992; Drabkova, 1992; Freudenberg et al., 1993; Friedlander et al., 1994; Furutani et al., 1994; Goris, 1990; Kang et al., 1992; Offenstadt et al., 1993; Schutt y Schumann, 1993; Smith et al., 1993; Tilders et al., 1994; Wright et al., 1993; Zapata-Sirvent et al., 1986) y PGE₂ (Friedlander et al., 1994; Goris, 1990; Kang et al., 1992; Miller-Graziano et al., 1988; Tilders et al., 1994;). Tanto el TNF como la IL-1 son dos mediadores necesarios e indispensables para que se produzca una adecuada respuesta inmunológica por parte del huésped ante una agresión (Cerami, 1992; Cross et al., 1989; Deitch, 1992; Fleer et al., 1990; Tracey y Cerami, 1990). Sin embargo, un estímulo potente y continuado provoca una liberación excesiva de TNF por parte del macrófago desencadenando un estado de shock y fracaso multisistémico (Cerami, 1992; Fleer et al., 1990; Tracey

y Cerami, 1990). El TNF esta considerado actualmente como el principal mediador en la respuesta del huesped ante la sepsis por gérmenes Gram - (Cross et al., 1989; Emerson et al., 1992; Walsh et al., 1992;).

Por otra parte, los macrófagos activados aumentan la síntesis y excreción de PGE₂ (Miller-Graziano et al., 1988; Tilders et al., 1994). Estudios experimentales sugieren la existencia de dos subpoblaciones de macrófagos: los productores de IL-1 y los productores de PGE₂. En pacientes quemados o politraumatizados los macrófagos productores de PGE₂ constituyen el 65-80 % del total de la población monocitaria, lo que determina un aumento de los niveles plásmaticos de PGE₂ con disminución de la producción de IL-1. La PGE₂ tiene potentes propiedades inmunosupresoras, ya que anula la función presentadora de antígeno por el monocito, disminuye la expresión de IL-2 por los linfocitos T helper, inhibe la proliferación y maduración de linfocitos T y B estimulando estas propiedades en los linfocitos T supresores (Miller-Graziano et al., 1988).

En condiciones normales, esta reacción inflamatoria se produce en un entorno restringido y localizado con el fin de eliminar los microorganismos y/o tejidos lesionados causantes de la misma. Igualmente, durante el proceso inflamatorio se producen inhibidores fisiológicos del TNF e IL-1, los cuales modulan su actividad biológica impidiendo que se produzcan los efectos indeseables derivados de su liberación excesiva (Moldawer, 1993). Sin embargo, una agresión persistente puede provocar que dicha

respuesta inflamatoria escape a los mecanismos de control local, produciéndose una respuesta sistémica resultado de la activación generalizada de macrófagos, PMNs y linfocitos así como de diversos sistemas humorales, principalmente el de complemento y el de coagulación, por el "desbordamiento" de los mediadores desde el foco inflamatorio primario hacia el torrente circulatorio, produciéndose un aumento exagerado de citokinas cuyos efectos sistémicos ya no pueden ser bloqueados por sus inhibidores fisiológicos (Moldawer, 1993). El resultado final de esta reacción inflamatoria generalizada y descontrolada sería la lesión universal del endotelio vascular con afectación de órganos distantes que se traduciría clínicamente con el desarrollo del FOM (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990).

Así mismo, estas alteraciones, tanto a nivel de la inmunidad humoral como celular, determinan un estado de inmunosupresión que agrava el estado de estos pacientes, ya de por sí deteriorado por su patología primaria, haciendolos más susceptibles de desarrollar infecciones lo que en último término también favorece la aparición del FOM.

Esta hipótesis está apoyada por estudios autópsicos que demuestran la asociación existente entre la presencia del síndrome clínico del fracaso multisistémico y la evidencia histológica de lesiones inflamatorias en los distintos órganos (Nuytinck et al., 1988).

Existe una correlación directa entre los niveles plasmáticos de citokinas y el pronóstico de estos enfermos. Diversos ensayos clínicos y trabajos en experimentación animal demuestran que

altas concentraciones en suero tanto de TNF como de IL-6 e IL-8 con disminución de IL-1 e IL-2 se correlacionan con una mayor severidad de la enfermedad y con un peor pronóstico de la misma (Abraham y Regan, 1985; Cannon et al., 1990; Casey et al., 1993; Damas et al., 1989; Damas et al., 1992; Girardin y Dayer, 1993; Guidet et al., 1990; Hack et al., 1989; Kelly y Cross, 1992; Luger et al., 1986; Pinsky et al., 1993; Van Zee et al., 1991; Waage y Steinshamn, 1993; Yoshimoto et al., 1992).

Por tanto, según esta hipótesis, el FOM no es más que la traducción clínica de la activación en cadena de los mecanismos de la inflamación de una forma masiva y descontrolada, que en su estadio final conduce a un estado de profunda inmunodepresión con las consecuencias que de ella se derivan, y en la cual el macrófago juega un papel primordial, tanto en su inicio como en su progresión, mediante la liberación por parte del mismo de sustancias mediadoras (principalmente citokinas y PGE₂) que activan, potencian o inhiben a otros sistemas humorales y celulares.

1.4.2 Hipótesis de la Microcirculación.

En su más amplio sentido, esta hipótesis propone que el desarrollo del FOM es debido a la lesión orgánica provocada por la isquemia o por las alteraciones lesivas a nivel del endotelio vascular. Dichas alteraciones pueden ser inducidas principalmente por tres mecanismos: una entrega inadecuada de oxígeno a los tejidos, las alteraciones celulares provocadas por el fenómeno de la isquemia-reperfusión y las lesiones tisulares debidas a la

interacción entre las células endoteliales y los leucocitos PMNs (Deitch, 1992).

Muchos de los aspectos fisiopatológicos de esta hipótesis coinciden con la del macrófago, lo que contribuye a que ambas se complementen respecto a los mismos, como lo demuestra el hecho de que una respuesta inflamatoria sistémica provoca alteraciones en la microcirculación, del mismo modo que un estado de isquemia exagera la respuesta inflamatoria del huesped por la activación generalizada de los macrófagos y leucocitos PMNs (Deitch, 1992).

El metabolismo celular y la producción de energía derivado del mismo es un proceso oxígeno-dependiente. Por tanto, durante un periodo de isquemia como puede ser un estado de shock, la disminución en la disponibilidad de oxígeno por parte de la célula provoca disfunción en la misma, si persiste este estado aparece la lesión que puede culminar en su estadio final con la muerte celular, siendo el resultado de todo este proceso a nivel tisular la disfunción y el fracaso de los órganos afectados (Deitch, 1992).

El estado de shock circulatorio provoca cambios en la microcirculación que afectan de forma adversa al intercambio de oxígeno a los tejidos. En estas situaciones, se favorece a nivel capilar un enlentecimiento del flujo sanguíneo que determina congestión vascular y la formación de agregados de leucocitos PMNs y de plaquetas (microembolismo) (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990; Maier, 1986). Estos agregados de leucocitos liberan localmente enzimas proteolíticos y radicales libres de oxígeno que lesionan el endotelio vascular provocando un aumento

de la permeabilidad capilar con el consiguiente edema intersticial, que interfiere el intercambio gaseoso fisiológico disminuyendo la disponibilidad de oxígeno por parte de la célula, lo que induce disfunción en la misma (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990; Maier, 1986). Este fenómeno de microembolismo capilar se evidencia inicialmente en el pulmón, expresado clínicamente como el síndrome de distress respiratorio del adulto (ARDS), pero en fases más avanzadas de isquemia prolongada puede aparecer en otros órganos, provocando el síndrome clínico de FOM (Goris et al., 1985; Maier, 1986).

El segundo mecanismo por el cual las alteraciones en la microcirculación determinan lesión tisular a distancia postula que dichas lesiones son debidas al fenómeno de isquemia-reperfusión. Según este fenómeno, el restablecimiento del flujo sanguíneo tras un periodo de isquemia provoca, paradójicamente, un agravamiento de las lesiones tisulares y orgánicas inducidas inicialmente por la perfusión tisular inadecuada. Todo este proceso comienza con la producción por parte de la célula, durante el periodo de isquemia, de hipoxantina derivada del ATP y la conversión de la xantín-deshidrogenasa en xantín-oxidasa. Durante la fase de reperfusión se desencadena la formación de radicales libres de oxígeno por la acción enzimática de la enzima xantín-oxidasa sobre el oxígeno aportado (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990; Granger, 1988). Los radicales libres de oxígeno son potentes agentes inflamatorios a través de su efecto lesivo sobre las membranas celulares por el fenómeno de

peroxidación lipídica y por la acción inhibidora que ejercen sobre distintos enzimas (p.e. sobre la Ó1-antiproteasa, permitiendo la acción incontrolada de la elastasa) (Ertel et al., 1994; Goris, 1990; Maier, 1986). Existen otras vías de formación de radicales libres, como la auto-oxidación de catecolaminas, la prostaglandín-sintetasa o la mitocondria, pero en los estados a que nos estamos refiriendo las más importantes son la de la xantín-oxidasa y los leucocitos PMNs (Deitch, 1992; Granger, 1988). Por este fenómeno de isquemia-reperfusión se explicaría el empeoramiento de aquellos pacientes en estado de shock tras aplicar en los mismos las medidas terapéuticas oportunas destinadas a mantener un volumen circulante efectivo y una perfusión tisular adecuada.

Por último, el tercer mecanismo por el cual se altera el fisiologismo de la microcirculación desencadenando el estado de fracaso multisistémico se basa en el concepto de que la célula endotelial no es un ente pasivo, sino que participa activamente y de forma conjunta con los leucocitos PMNs en los procesos de regulación del flujo sanguíneo, de coagulación y en la modificación de la respuesta inflamatoria. De la interacción entre la célula endotelial y el leucocito PMN en respuesta ante estímulos tan diversos como endotoxinas, bacterias, citokinas o estados de isquemia, se derivan lesiones tisulares que pueden desembocar en el estado de FOM (Deitch, 1992; Maier, 1986).

Ante los estímulos citados, la célula endotelial puede expresar un cambio en su fenotipo (Pober y Cotran, 1990),

adquiriendo las propiedades de las células inflamatorias lo que la posibilita a producir y excretar agentes quimiotácticos y mediadores propios de las mismas, como sustancias procoagulantes, el factor activador de las plaquetas, IL-1, IL-8 y factores estimuladores de colonias de granulocitos y monocitos (Deitch, 1992; Maier, 1986). Otro aspecto interesante y fundamental es que este cambio en el fenotipo de la célula endotelial se traduce en la aparición en su membrana de nuevos receptores, cuya expresión es inducida tanto por el LPS como por el TNF e IL-1 (ELAM-1, ICAM-1) (Engelberts et al., 1992; Waage y Steinshamn, 1993) que promueven la adherencia a la misma de los leucocitos, los cuales provocan, mediante la liberación de radicales libres de oxígeno y enzimas proteolíticos, la lesión endotelial (Deitch, 1992; Maier, 1986).

Todos estos cambios en la funcionalidad de la célula endotelial y sus interacciones con los leucocitos PMNs provocan un aumento de la respuesta inflamatoria, aparición de trombosis microvascular y lesión del endotelio en el foco lesional. Si esta situación se mantiene, progresa hacia la isquemia tisular y disfunción orgánica, que puede afectar a otros sistemas orgánicos cuando esta respuesta por parte de la célula endotelial supera a los mecanismos de control local encargados de focalizarla (Maier, 1986).

La hipótesis de la microcirculación está apoyada por varias observaciones clínicas, como que en pacientes con síndrome clínico de FOM el shock circulatorio con isquemia tisular es uno de los cuadros clínicos que lo preceden con más frecuencia

(Deitch, 1992), que en estos casos hay evidencia autóptica de lesiones microvasculares (Nuytinck et al., 1988) y que en pacientes con ARDS se demuestran agregados de leucocitos y plaquetas en la microcirculación pulmonar (Blaisdell, 1974).

1.4.3 Hipótesis del Intestino.

Según esta hipótesis el tubo digestivo sería el "motor" del FOM. Dicha aseveración se fundamenta tanto en observaciones clínicas como en estudios experimentales, y basa sus postulados en dos principios fundamentales. El primero de ellos es que en pacientes en estado crítico el sistema digestivo puede actuar como reservorio de microorganismos (Meakins y Marshall, 1986; Marshall y Meakins, 1991); y el segundo es que dichos microorganismos pueden emigrar desde el intestino al torrente circulatorio, mediante el fenómeno llamado "traslocación bacteriana", y provocar una respuesta inflamatoria generalizada cuyas últimas consecuencias serían el desarrollo del síndrome de FOM (Deitch et al., 1985; Fukushima et al., 1994; Meakins y Marshall, 1986; Marshall y Meakins, 1991).

El uso profiláctico de antiácidos y de bloqueadores de los receptores H₂ de la histamina con el fin de prevenir las hemorragias digestivas en los pacientes graves, así como la utilización en los mismos de una terapia antibiótica empírica y muchas veces poco racional, favorece tanto la alteración en la microflora intestinal por la colonización del tubo digestivo por bacterias cuya ubicación no es propia de este órgano con el consiguiente sobrecrecimiento masivo de las mismas, como la

aparición de resistencias bacterianas que dificultan su tratamiento con las terapias antibióticas convencionales (Marshall y Meakins, 1991). Todo ello contribuye a que el intestino se comporte como "reservorio" de microorganismos desde el cual pueden emigrar y causar infecciones sistémicas (Deitch, 1992; Meakins y Marshall, 1986; Marshall y Meakins, 1991).

El mecanismo de propagación de gérmenes patógenos desde la luz intestinal hacia el torrente circulatorio se explica por el fenómeno de traslocación bacteriana. Para que ocurra este fenómeno es necesario que concurren uno o más de estas tres condiciones fisiopatológicas (Deitch, 1990):

1ª Alteración en el equilibrio ecológico de la microflora intestinal que provoque un sobrecrecimiento bacteriano, a expensas fundamentalmente de bacilos entéricos Gram -.

2ª Alteración en el sistema inmunológico del huésped.

3ª Pérdida de la barrera mucosa del intestino.

En los pacientes en estado crítico, bien sea por el proceso patológico que desencadenó ese estado o por las medidas terapéuticas adoptadas y destinadas en un principio a superar el mismo, es frecuente que se den una o varias de estas condiciones, lo que facilita la propagación de bacterias desde el intestino hacia el resto del organismo.

La traslocación bacteriana se ve facilitada por la pérdida de la función defensiva de la barrera mucosa intestinal (Meakins y Marshall, 1986; Marshall y Meakins, 1991). En situaciones p.e. de hipovolemia mantenida, la hipoperfusión tisular afecta a la mucosa intestinal provocando en la misma una pérdida de

vellosidades, disminución en la producción de moco y aumento de su permeabilidad. Igualmente se afecta su funcionalidad disminuyendo la respuesta local inmune mediada por células y la producción de anticuerpos específicos epiteliales del tipo IgA (Meakins y Marshall, 1986). En estas circunstancias las bacterias no encuentran obstáculo para emigrar hacia los ganglios linfáticos regionales, y desde ahí al sistema venoso portal hasta llegar al hígado y a la circulación sistémica (Meakins y Marshall, 1986; Fukushima et al., 1994). En el hígado se localiza la reserva orgánica más importante de macrófagos, puesto que las células de Kupffer constituyen el 70% del total de esta población celular. Estos macrófagos hepáticos estimulados por la agresión bacteriana iniciarían toda la secuencia de acontecimientos que culminaría con las consecuencias derivadas de una respuesta inflamatoria exagerada (Deitch, 1992; Meakins y Marshall, 1986; Marshall y Meakins, 1991), y que ya han sido comentadas anteriormente en su hipótesis correspondiente.

Por esta hipótesis se explicaría la aparente paradoja de por qué no existe evidencia clínica ni autopsica de foco infeccioso en más del 30% de los pacientes con síndrome de FOM de origen bacteriano y que fallecen en estado clínico de sepsis (Goris et al., 1985).

Se observa como los mecanismos fisiopatológicos de esta hipótesis implican y se enlazan con los comentados previamente en las anteriores, lo que aboga por el principio de considerar que el FOM es la consecuencia final de una respuesta inflamatoria exagerada, descontrolada y autodestructiva del propio huésped

ante agresiones diversas que puede ser desencadenada por distintos mecanismos cuyo objetivo común es provocar la activación de una misma vía: la vía inflamatoria.

1.5 TRATAMIENTO DEL FOM.

De lo dicho se desprende que actualmente el tratamiento más efectivo del FOM es la prevención del mismo, mediante la identificación de los pacientes susceptibles de desarrollarlo y la detección de las causas capaces de provocarlo, actuando tempranamente sobre ellas y proporcionando a este tipo de enfermos una adecuada terapia de sosten de sus funciones hemodinámicas, metabólicas e inmunológicas (Drabkova, 1992; Marshall y Meakins, 1991; Schaller, 1992).

El apoyo hemodinámico tiene como finalidad el mantener una oxigenación tisular adecuada, de forma que la célula disponga en todo momento del aporte suficiente de oxígeno, necesario para mantener sus funciones metabólicas, y de esta forma prevenir las consecuencias derivadas de la hipoxia tisular.

Las necesidades de aporte de oxígeno en este tipo de pacientes deben evaluarse mediante el control y vigilancia de tres parámetros principales: la concentración de hemoglobina en sangre, la presión arterial de oxígeno (PaO₂) y el gasto cardíaco. Trasfundir hasta lograr un hematocrito de al menos el 30%, mantener ventilación asistida hasta que la saturación de oxígeno sea mayor del 90% y mejorar, con medidas farmacológicas

si fuese necesario, el gasto cardíaco, son las principales medidas a adoptar para mantener una perfusión tisular adecuada.

Con el apoyo metabólico se pretende revertir el estado catabólico de estos pacientes y proporcionar el aporte calórico apropiado a sus mayores requerimientos energéticos.

La detección y tratamiento precoz de las causas que desencadenan un estado de hipermetabolismo, como la fijación temprana de fracturas, el drenaje de un foco infeccioso intraabdominal o el desbridamiento de tejidos desvitalizados, son medidas fundamentales para prevenir y revertir en estos pacientes la respuesta neuroendocrina que provoca su estado catabólico.

Igualmente es necesario mantener un aporte nutricional temprano y agresivo adecuado a los mayores requerimientos energéticos de estos enfermos. Deben realizarse balances nitrogenados periódicos para ajustar el aporte calórico a las demandas energéticas en todo momento, corrigiéndolo siempre que fuese necesario. Es preferible utilizar la vía enteral para la administración de nutrientes, pues es más fisiológica y previene la atrofia de la mucosa intestinal, siempre que el sistema digestivo no presente un grado importante de disfunción. Si no se puede usar esta vía, como en casos de íleo, deberá iniciarse un protocolo de nutrición parenteral total adecuado a cada tipo de pacientes, que asegure un aporte calórico suficiente hasta que se recupere la función intestinal.

El apoyo inmunológico tiene como principales objetivos

mejorar la respuesta inmune del huésped y evitar el desarrollo de infecciones locales o sistémicas.

Actualmente, la forma más efectiva de alcanzar estos objetivos se consigue aplicando los principios quirúrgicos clásicos: tratamiento temprano y agresivo de la infección, desbridamiento de los tejidos desvitalizados y adecuado soporte hemodinámico y nutricional.

Es fundamental seguir una política antibiótica racional, ya que la administración indiscriminada de estos agentes puede alterar el equilibrio en la ecología bacteriana, desencadenando sobrecrecimiento de microorganismos patógenos que producen superinfecciones de difícil tratamiento.

Del mismo modo, debe evitarse el uso de agentes que aumenten el pH gástrico con el fin de prevenir el úlcus de estrés, pues favorecen la colonización bacteriana del tubo digestivo, y siempre que sea posible se administrará la nutrición por vía enteral, ya que, como se ha mencionado anteriormente, de esta manera se pretende mantener la integridad de la barrera mucosa intestinal.

El estado de inmunodepresión depende en gran manera del estado nutricional del paciente, por lo que es de gran importancia en estos casos proporcionar los suplementos nutricionales necesarios que permitan mantener al enfermo en una óptima situación inmunológica.

Sin embargo, actualmente sigue siendo válido el aforismo según el cual "el buen juicio quirúrgico y la aplicación cuidadosa de una buena técnica son aún los métodos más potentes

de inmunomodulación de que dispone el cirujano".

A pesar de nuestros esfuerzos en su prevención y tratamiento, el FOM continúa siendo la primera causa de muerte de los pacientes graves ingresados en las unidades de cuidados intensivos (Deitch, 1992; Goris et al., 1985; Goris, 1990).

1.6 NUEVAS EXPECTATIVAS EN EL TRATAMIENTO DEL FOM.

Basándonos en las distintas hipótesis comentadas anteriormente según las cuales se explican los mecanismos fisiopatológicos por los que se desarrolla el estado de fracaso multisistémico, y que todas ellas tienen en común la activación por distintos vías del sistema que provoca por parte del huésped una respuesta inflamatoria descontrolada y autodestructiva, parece lógico pensar que de la manipulación en alguno de los eslabones de esta compleja cadena de acontecimientos que se suceden en el medio interno ante una agresión pueda derivarse una modificación de dicha respuesta inflamatoria ante la noxa agresora.

Actualmente se está investigando en este sentido, y todas las estrategias terapéuticas experimentales están enfocadas hacia la modulación de la respuesta del huésped actuando sobre los tres niveles de la cascada inflamatoria: 1º Agente agresor inicial (p.e. endotoxina). 2º Mediadores de la inflamación (p.e. TNF e IL-1). 3º Células efectoras (p.e. neutrófilos) (John y Dorinsky, 1993).

A nivel de los mecanismos que inician la respuesta inflamatoria, como puede ser la agresión endotóxica, estudios randomizados han demostrado que la administración exógena de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la endotoxina provoca un aumento de la supervivencia en pacientes con sepsis (Ziegler et al., 1991).

Uno de los campos más prometedores en la modulación con fines terapéuticos de esta respuesta inflamatoria, es la actuación a nivel de los agentes mediadores de la inflamación. A nivel experimental, la utilización de anticuerpos monoclonales contra el TNF y la IL-1 en modelos de shock endotóxico letal, se traduce en un aumento significativo de la supervivencia (Emerson et al., 1992; Fischer et al., 1992; Girardin y Dayer, 1993; Hinshaw et al., 1990; McNamara et al., 1993; Tracey y Cerami, 1990; Walsh et al., 1992). Resultados similares se obtienen con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL-6 (Starnes et al., 1992). Igualmente, la administración de dosis subletales de TNF e IL-1 en modelos experimentales de shock endotóxico provoca una mejora de las tasas de supervivencia, tanto si el estado séptico ha sido provocado por una infección bacteriana como por una dosis letal de TNF (Cross et al., 1989; Sheppard et al., 1989; Sheppard et al., 1991). Efectos parecidos se obtienen en el shock endotóxico con el bloqueo de los receptores celulares de las citokinas, y más concretamente con la administración del antagonista de receptor de la IL-1 (IL-1ra) (Ohlsson et al., 1990). La utilización de fármacos inmunomoduladores, como la ciclofosfamida (Hansbrough et al., 1984, Zapata-Sirvent et al.,

1986), o agentes antiinflamatorios inhibidores del enzima ciclo-oxigenasa, como el ibuprofén, la indometacina (Ertel et al., 1990; Ertel et al., 1992; Pinsky, 1992; Zapata-Sirvent et al., 1985;) o el SK&F 105809 (Olivera et al., 1992), tanto en modelos experimentales de shock séptico, hemorrágico o traumático, potencian la respuesta inmune celular del huesped y disminuyen la producción de prostaglandinas, lo que se traduce en un aumento de la supervivencia del animal de experimentación.

Por último, las estrategias de intervención a nivel de efectores y de sus mecanismos lesionales tisulares, van dirigidas por un lado a evitar la adhesión del leucocito PMN a la célula endotelial mediante la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al complejo proteínico de la membrana del leucocito (anticuerpos anti CD-11/CD-18) (Vedder et al., 1988) y frente a las moléculas de adhesión de la célula endotelial (anticuerpos anti ELAM-1/ICAM-1) (Carlos et al., 1990; Mulligan et al., 1991), y por otro lado a impedir la formación de radicales libres de oxígeno mediante la inhibición de la vía de la xantín-oxidasa o a eliminar los ya formados mediante la administración de sustancias barredoras de los mismos (Deitch, 1992).

Profundizando algo más en alguno de estos atractivos y prometedores aspectos terapéuticos, con la inhibición de la ciclo-oxigenasa de la vía del ácido araquidónico con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos se consigue una disminución de la síntesis de PGE₂ por parte del macrófago (Zapata-Sirvent et al., 1986). En modelos experimentales, tanto de shock endotóxico

como hemorrágico, el ibuprofén ha demostrado tener efectos beneficiosos ya que, por una parte evita la formación de peróxidos y metabolitos tóxicos del oxígeno generados en el metabolismo del ácido araquidónico, y por otra disminuye la síntesis de PGE₂, potente agente inmunosupresor, restaurando así las funciones inmunológicas normales del macrófago que recobra su capacidad para presentar el antígeno y aumenta la síntesis y liberación en un grado fisiológico de IL-1 y TNF, citokinas necesarias e indispensables para que se produzca una respuesta inmunológica adecuada; también se aumenta la expresión de IL-2 por los linfocitos T helper y se anula el efecto estimulador que la PGE₂ tiene sobre los linfocitos T supresores (Ayala et al., 1992; Coran et al., 1992; Ertel et al., 1991; Ertel et al., 1992; Fletcher et al., 1993; Haupt et al., 1991; Spinass et al., 1991; Zapata-Sirvent y Hansbroug, 1985; Zapata-Sirvent et al., 1986). Todo esto se traduce en una mejora de la respuesta inmunológica por parte del huésped con un aumento de la supervivencia.

Otro aspecto interesante demostrado en experimentación animal es que la administración exógena tanto de IL-1 como de TNF produce una respuesta variable que es tiempo y dosis dependiente (Butler et al., 1989; Cross et al., 1989). Altas dosis de estas citokinas provocan un cuadro clínico-biológico equiparable al shock endotóxico que conduce a la muerte en la mayoría de los casos (Butler et al., 1989; Damas et al., 1989; Damas et al., 1992; Fleer et al., 1990; Hack et al., 1989; Okusawa et al., 1988; Tracey y Cerami, 1990; Waage y Steinshamn, 1993). Sin embargo, dosis subletales de estas sustancias protegen a animales de

experimentación frente a infecciones bacterianas letales (Cross et al., 1989; Sheppard y Norton, 1991). Respecto a la IL-1, estudios experimentales demuestran que su administración a bajas dosis entre 2 y 24 horas antes de provocar un estado séptico experimental, crea un grado de tolerancia a la endotoxina que se traduce en un aumento de la supervivencia (Cross et al., 1989; Czuprynski et al., 1988; Kupper et al., 1985; León et al., 1992; Van Der Mer et al., 1988; Vogels et al., 1993). El mecanismo por el cual se produce este efecto no está del todo aclarado, aunque parece ser que la IL-1 restaura en el macrófago su capacidad para presentar el antígeno (Kupper et al., 1985), activa directamente los mecanismos de defensa celulares antibacterianos (Czuprynski et al., 1988), aumenta la capacidad bactericida de los PMNs (Shi et al., 1994), induce la secreción por parte del hepatocito de proteínas de fase aguda que tienen efectos antitóxicos (Vogels et al., 1993) y disminuye el número de receptores para el TNF (Sheppard y Norton, 1991). Todos estos efectos se traducen en una potenciación de la respuesta inmune inespecífica que provoca una atenuación de la severidad de la infección.

De estas últimas consideraciones se puede concluir que la IL-1 y el ibuprofén son dos eficaces y seguros agentes terapéuticos en modelos experimentales de shock endotóxico, con un futuro prometedor como terapia alternativa en pacientes con síndrome de FOM.

HIPOTESIS

Tesis Doctoral

A la vista de los antecedentes comentados en el apartado de la introducción, la hipótesis de trabajo planteada en esta tesis doctoral es la siguiente:

" La respuesta inflamatoria e inmunológica del huésped ante una agresión endotóxica puede ser modulada farmacológicamente con la finalidad de prevenir los efectos adversos que se derivan de dicha respuesta, traducidos clínicamente en una disfunción progresiva de los distintos sistemas orgánicos que provocan la muerte del huésped. La inhibición del enzima ciclo-oxigenasa de la vía del ácido araquidónico mediante la administración de ibuprofén provoca una disminución de la síntesis de PGE₂, previniendo su acción inmunosupresora, y restaura la capacidad de respuesta fisiológica por parte de los macrófagos ante una agresión endotóxica. Por otra parte, el tratamiento profiláctico con dosis subletales de IL-1 β induce un efecto de tolerancia del huésped ante la endotoxina por mecanismos no del todo aclarados. Por tanto, la administración, tanto aislada como conjunta, de estos dos fármacos deben modular la respuesta inflamatoria e inmunológica del huésped ante la agresión endotóxica, actuando sobre distintos mediadores capaces de provocar un estado de disfunción orgánica, previniendo el deterioro funcional de dichos sistemas, cuya traducción clínica final debe de ser un aumento de la supervivencia."

OBJETIVOS

La principal finalidad de este trabajo experimental es modular la respuesta inflamatoria e inmunológica en un modelo experimental de shock endotóxico en ratón inducido por LPS mediante la administración de ibuprofén, con el fin de obtener una inhibición de la ciclo-oxigenasa que conduce a una disminución de la síntesis de PGE₂, y de IL-1 β murina para desarrollar un efecto de tolerancia del huésped frente a la endotoxina. En base a este proyecto se han planteado los siguientes objetivos:

1^o- Comprobar la respuesta biológica e inmunológica que se deriva de la administración, tanto por separado como conjuntamente, de cada una de estas sustancias.

2^o- Realizar un estudio comparativo entre IL-1 β murina e ibuprofén con el fin de establecer cual de estos dos fármacos tiene mayor eficacia terapéutica en el shock endotóxico experimental.

3^o- Administrar en estas circunstancias conjuntamente IL-1 e ibuprofén, con el objetivo de conseguir una potenciación de sus efectos terapéuticos, y evaluar las modificaciones en la respuesta biológica e inmunológica derivadas de dicha administración.

MATERIAL Y METODOS

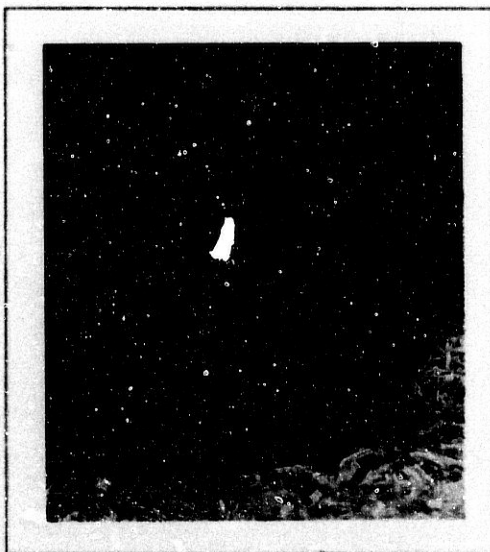
Tesis Doctoral

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización de la experiencia se han utilizado ratones hembras de la cepa CBA/H. A partir de la misma, los animales se criaron en el animalario de la Unidad Experimental del Hospital Virgen de las Nieves de Granada (España), donde permanecieron en un medioambiente controlado con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas y una temperatura media de 20° C, teniendo libre acceso a la comida y el agua hasta finalizada la experiencia.

Los animales objeto de estudio tuvieron una edad comprendida entre 10 y 12 semanas que se correspondió con un peso entre 19 y 21 grs.

CEPA CBA/H



Alfonso Mansilla Roselló

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización de la experiencia se han utilizado ratones hembras de la cepa CBA/H. A partir de la misma, los animales se criaron en el animalario de la Unidad Experimental del Hospital Virgen de las Nieves de Granada (España), donde permanecieron en un medioambiente controlado con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas y una temperatura media de 20° C, teniendo libre acceso a la comida y el agua hasta finalizada la experiencia.

Los animales objeto de estudio tuvieron una edad comprendida entre 10 y 12 semanas que se correspondió con un peso entre 19 y 21 grs.

CEPA CBA/H



4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE SHOCK ENDOTOXICO.

El shock endotóxico letal se provocó mediante la inyección intraperitoneal de LPS de Escherichia coli serotipo 055:B5 (Sigma Chemical Company), a dosis de 125mg/kg de peso. Dicha dosis se administró disuelta en 0,1 ml de suero salino fisiológico.

Para el cálculo de la Dosis Letal 100 (DL100), se realizó una experiencia previa con 50 ratones de la cepa comentada anteriormente. Estos ratones fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos de 10, a los cuales se les administraron dosis crecientes de LPS del serotipo citado y se valoró la supervivencia en cada grupo a las 96 horas.

Se comenzó con una dosis de 50 mgr/kg de peso (ya utilizada por otros autores como DL100 en otras cepas de ratones (León et al., 1992)) con lo que se obtuvo un 0% de mortalidad; ésta aumento hasta el 80% cuando se incrementó la dosis de LPS tanto a 75 como a 100 mgr/kg de peso, con 115 mgr/kg de peso ascendió hasta el 90%, y por último, con 125 mgr/kg de peso la mortalidad fue del 100% a las 96 horas. Esta última dosis se ensayó de nuevo en 10 ratones más, obteniendo los mismos resultados.

4.3 FARMACOS EMPLEADOS Y MODO DE ADMINISTRACION.

4.3.1 IBUPROFEN.

El Ibuprofén (Ibuprofén en solución de metanol, código I

0386, Sigma Chemical Company) se ha administrado por vía intraperitoneal a dosis de 2 mgr/kg de peso. A su vez esta dosis se ha dividido en dos de 1mgr/kg de peso diluída cada una de ellas en 0,1 ml de suero salino fisiológico, administrando la primera dosis 1 hora antes de provocar el estado séptico y la segunda media hora después de inducido el mismo.

Cada vial de Ibuprofén tenía un contenido de 1 ml de solución a una concentración de 1,01 mg de Ibuprofén/ml, el cual fue diluído en un total de 3,8 ml de suero salino fisiológico. El fármaco así diluído se alicuotó en cantidades de 1 ml en tubos Eppendorf almacenándose en frigorífico a una temperatura entre 0-5°C hasta su posterior utilización..

Tanto la dosificación como el momento de administración del Ibuprofén están basados en experiencias previas realizadas por otros autores (Coran et al., 1992; Ertel et al., 1992; Zapata Sirvent et al., 1985; Zapata Sirvent et al., 1986) las cuales demuestran el efecto beneficioso que ejerce este fármaco en distintos modelos experimentales de shock (fundamentalmente séptico y hemorrágico), así como en investigaciones preliminares llevadas a cabo en nuestro Laboratorio, y cuyos resultados concuerdan con los publicados por los autores de los citados trabajos.

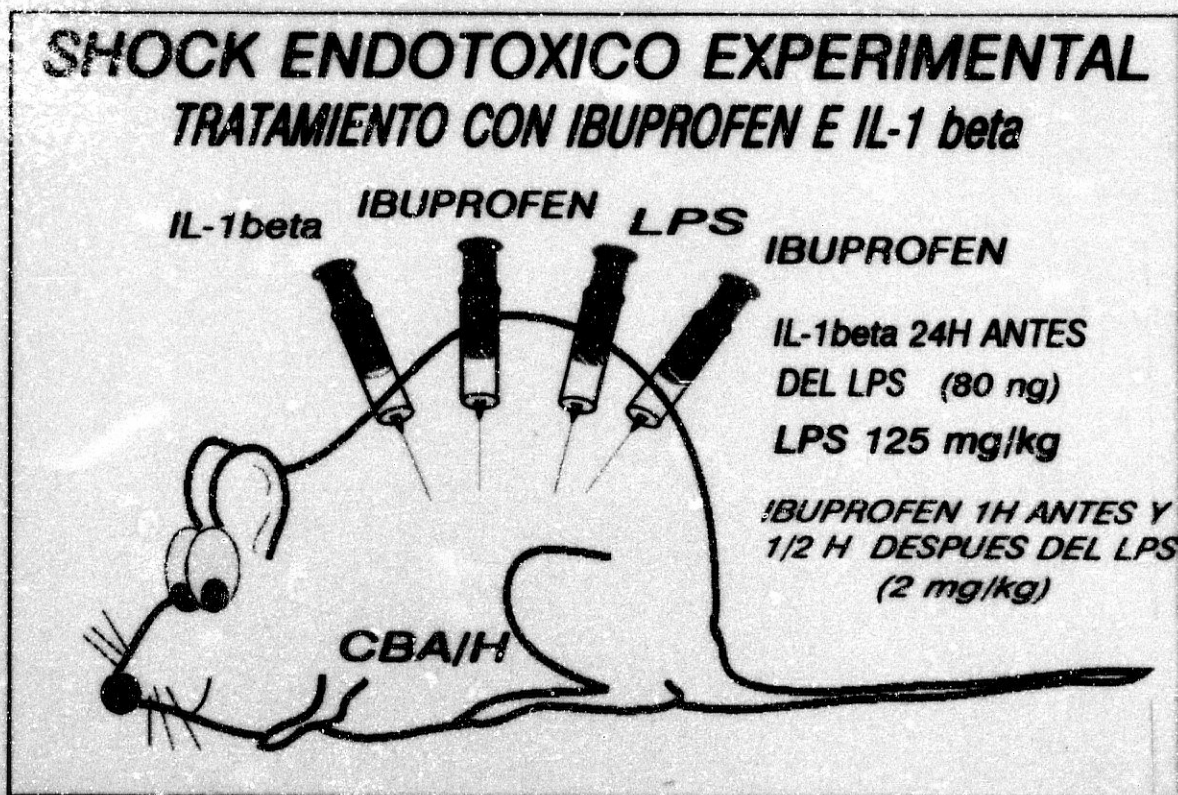
4.3.2 IL-1 β RECOMBINANTE MURINA.

La IL-1 β recombinante murina (código 1921-01, Genzyme

Inmunobiologicals) ha sido administrada por vía intraperitoneal a dosis de 80 ng por ratón disuelta en 0,1 ml de suero salino fisiológico a las 24 horas previas de inducir el shock endotóxico experimental.

El vial de presentación del fármaco contenía de 5 μ g de IL-1 β recombinante murina en un volumen de 200 μ g de PBS, y se diluyó en un total de 6,3 ml de suero salino fisiológico, alicuotándose en cantidades de 1 ml en tubos Eppendorf para su almacenamiento a -70°C hasta su posterior uso.

Esta dosis y el momento de su administración está basada en los trabajos de Ozaki et al., 1987, y de Vande Meer et al., 1988, que demuestran el efecto protector de este fármaco en modelos de experimentación animal frente a infecciones por gérmenes Gram -.



4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

250 ratones se han distribuido aleatoriamente en 5 grupos de 50 cada uno.

- Grupo 1: Grupo sham o simulado al que se le administraron 4 dosis de 0,1 ml de suero salino fisiológico por vía intraperitoneal y ningún tratamiento, a las horas -24, -1, 0 y +30 minutos.

- Grupo 2: Grupo control al que se le provocó el shock endotóxico mediante la administración de LPS de E. coli serotipo 055:B5 por vía intraperitoneal a las dosis antes descritas (125 mgr/kg). Así mismo, se le inyectó 0,1 ml de suero salino fisiológico por la misma vía 24 y 1 hora antes de la endotoxina así como 30 minutos después de la inyección de la misma.

- Grupo 3: Grupo de tratamiento con IL-1 β recombinante murina que se administró a dosis de 80 ng por ratón por vía intraperitoneal 24 horas antes de inyectar el LPS. Una hora antes, así como 30 minutos después de inyectar la endotoxina, se administró 0,1 ml de suero salino fisiológico.

- Grupo 4: Grupo de tratamiento con Ibuprofén administrado en dos dosis de 0,1 mg/kg de peso por vía intraperitoneal 1 hora antes y 30 minutos después de la endotoxina. 24 horas previas a la provocación de la endotoxemia, se inyectó 0,1 ml de suero salino fisiológico por vía intraperitoneal.

- Grupo 5: Grupo de tratamiento con Ibuprofén e IL-1 beta recombinante murina a las dosis y tiempos comentados.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL



GRUPO 1

GRUPO 2

GRUPO 3

GRUPO 4

GRUPO 5

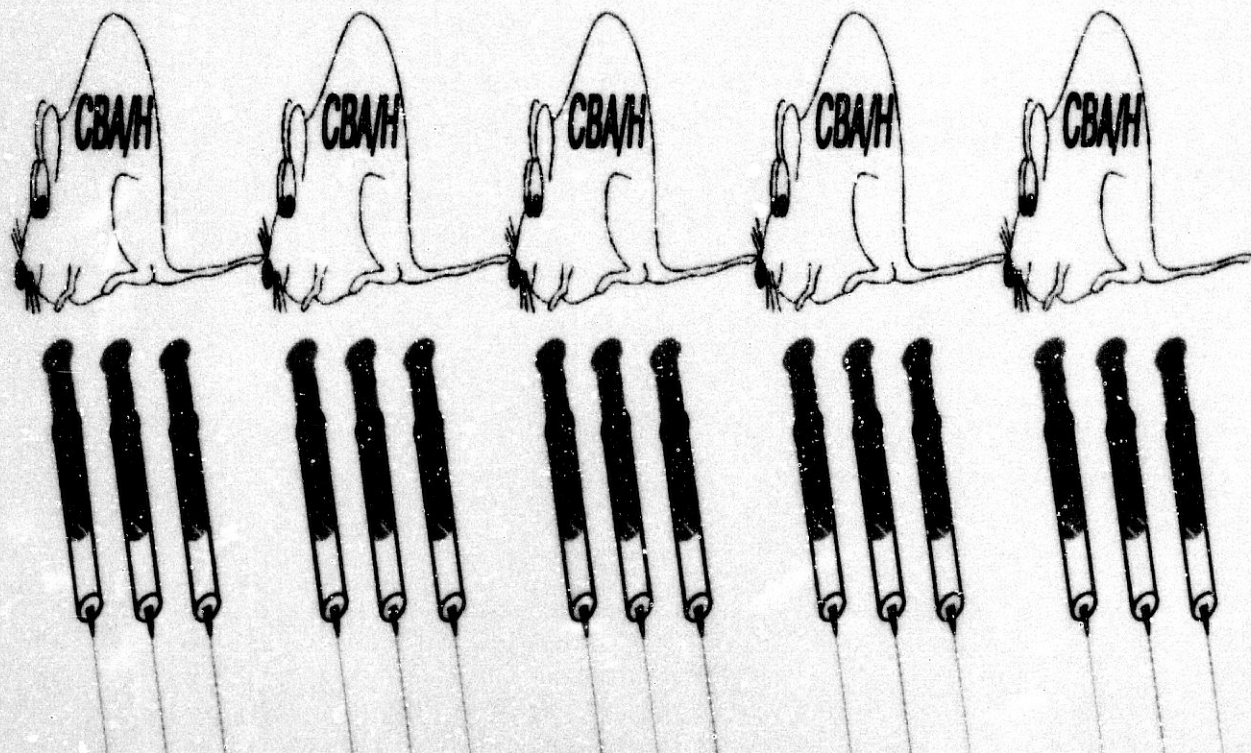
50

50

50

50

50



4.5 VALORACION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA.

La respuesta inmunológica se ha valorado en 10 ratones de cada grupo mediante la determinación de los siguientes parámetros:

- Recuento y fórmula hematológica en sangre periférica a las 24 horas de provocado el estado séptico experimental (recuento de hematíes y leucocitos por μ l, valor hematocrito y fórmula leucocitaria en % y por μ l).

- Determinación en suero de los niveles de citokinas (IL-1 α , IL-2, IL-6 y TNF α) medidos 1, 2 y 4 horas después de provocado el estado séptico experimental.

- Determinación en sangre total de las subpoblaciones linfocitarias (linfocitos CD4, linfocitos CD8 e índice CD4/CD8) a las 24 horas de la inyección del LPS.

- Determinación de los niveles en orina de PGE₂ medidos a las 4, 8 y 12 horas después de inducir el shock séptico.

4.6 ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

Los 10 ratones restantes por grupo se han utilizado para valorar la supervivencia a las 24, 48, 72 y 96 horas de provocar el shock endotóxico experimental.

4.7 OBTENCION, PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

4.7.1 MUESTRAS DE SUERO.

Las muestras de suero para la determinación seriada de citokinas se obtuvieron a partir de la sangre total conseguida mediante punción de la órbita ocular del ratón, previa anestesia del mismo con éter etílico al 8, con capilares de cristal. Todos los ratones fueron desangrados hasta su fallecimiento.

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos estériles con separadores del suero modelo Vacutainer Brand SST (Ref 367784, Becton Dickinson), centrifugándose inmediatamente a 3000 R.P.M. durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, utilizando una centrífuga refrigerada modelo Medifriger (Selecta).

El suero obtenido se alicuotó en tubos Eppendorf en las cantidades apropiadas para la determinación de cada citocina (25 µl para la IL-1α y TNFα, 100 µl para la IL-2 y 50 µl para la IL-6), congelándose inmediatamente a -70°C en un congelador modelo -86°C Freezer (modelo 925, Forma Scientific, Inc.), permaneciendo almacenadas en estas condiciones hasta su posterior análisis.

4.7.2 MUESTRAS DE SANGRE.

Para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8, así como para la realización del recuento y fórmula

hematológica de cada ratón, se utilizó sangre total obtenida por el mismo procedimiento anterior, es decir, por punción de la órbita ocular con capilar de cristal previa anestesia del animal con éter etílico hasta el fallecimiento del mismo por sangrado.

La sangre para la realización del recuento y fórmula hematológica se recolectó en tubos de hemograma con EDTA modelo Microtainer Brand (Ref 5973, Becton Dickinson) almacenándose en frigorífico a 8°C hasta un máximo de 8 horas.

De dicha sangre se extrajeron, inmediatamente después de su recolección, 50 µl para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8, cuyo método se especifica más adelante.

4.7.3 MUESTRAS DE ORINA.

La PGE₂ se determinó en la orina de cada ratón a las 4, 8 y 12 horas de provocado el shock séptico experimental.

En el momento de inyectar por vía intraperitoneal la DL100 de LPS, se provocó una micción refleja del animal mediante una hiperextensión dorsal del mismo, con lo que se consideró que desde ese momento la vejiga urinaria del ratón estaba vacía, con lo cual no existía orina residual previa a la administración de LPS que pudiese alterar la determinación de PGE₂ posterior a la provocación del estado séptico experimental.

La recolección de orina se realizó en tubos universales estériles. Dicha orina fue obtenida por micción espontánea del ratón en jaulas metabólicas (Tecniplast, código 3700MO-000) a las

horas mencionadas anteriormente, alicuotándose para cada determinación 50 μ l en tubos Eppendorf. Las muestras de orina se congelaron a -20°C permaneciendo en estas condiciones hasta su posterior análisis.

4.8 DETERMINACION DE CITOKINAS.

4.8.1 CONSIDERACIONES INICIALES.

4.8.1.1 PROCEDIMIENTO.

Los niveles en suero de ratón de las distintas citokinas (IL-1 α , IL-2, TNF α e IL-6) a las distintas horas de inducido el estado séptico experimental se han medido mediante kits comerciales de detección de las mismas mediante una técnica de ELISA. Para la lectura de la absorbancia se ha utilizado un lector de ELISA modelo Menarini Sucart (Menarini Diagnostics) con filtro de 450 nm. Las medidas de las absorbancia resultantes serán directamente proporcionales a la concentración en pg/ml de las distintas citokinas presentes en las muestras.

4.8.1.2 MATERIAL REQUERIDO.

- Lector de placas a 450 nm.
- Pipetas de precisión entre 20-1000 μ l.
- Pipetas desechables de 5 o 10 ml.

- *Probeta graduada.*
- *Botella de plástico para la distribución del buffer de lavado o lavador automático.*
- *Toallas para secar las placas.*
- *Tubos de plástico o vidrio con tapón para la preparación de las muestras y dilución de la citokina estandar.*
- *Incubador a 37°C.*

4.8.1.3 MANEJO Y RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.

Los sobrenadantes de cultivo o muestras de suero pueden ser analizadas por este procedimiento. Las muestras objeto de estudio deben estar claras y no hemolizadas con el fin de optimizar los resultados. Para cualquier tipo de muestra, las partículas presentes en las mismas deben eliminarse por centrifugación. Si las muestras no son analizadas dentro de las 8 horas siguientes a su extracción, deben alicuotarse y congelarse a -70°C hasta su posterior análisis. Deben evitarse los procesos de congelación-descongelación de las mismas.

4.8.1.4 ALMACENAMIENTO DEL KIT.

Debe almacenarse entre 2-8°C. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad. Todos los reactivos deben mantenerse a temperatura ambiente antes de su uso y posteriormente a su utilización volver a almacenarlos a 2-8°C. No se deben congelar

los reactivos.

4.8.1.5 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

Las muestras con valores de absorbancia por encima o por debajo de la curva estandar no deben extrapolarse. Las muestras con valores de absorbancia por encima de la curva estandar deben diluirse y volver a analizarse. Los valores resultantes de en las muestras diluidas se multiplican por el factor de dilución.

4.8.2 DETERMINACION DE IL-1 α

Para la determinación de los niveles en suero de ratón de IL-1 α a las distintas horas de inducido el estado séptico experimental se ha utilizado el Inter Test-1 α XTM Mouse IL-1 α ELISA Kit (código #1900-01, Genzyme Immunobiologicals).

4.8.2.1 PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El principio de dicha técnica es un enzimo-inmunoensayo de fase sólida empleando el principio del sandwich de un anticuerpo múltiple. Una placa de 96 pocillos precubierta con anti-mIL-1 α monoclonal se bloquea primero y después se usa para capturar la IL-1 α presente en las muestras.

Después de lavar para eliminar el material no ligado, se

añade a la placa un anticuerpo policlonal biotinilado el cual se liga a la IL-1 α capturada. Tras un nuevo lavado, se añade a cada pocillo peroxidasa conjugada con avidina que liga los inmunocomplejos con biotina capturados en la placa.

La adición de un sustrato inicia un cambio de coloración catalizado por la peroxidasa que se detiene por acidificación. La absorbancia medida a 450 nm es proporcional a la concentración de IL-1 α presente en cada una de las muestras.

Se obtiene una curva estandar representando la concentración de las muestras estandar de IL-1 α frente a la absorbancia obtenida para cada una de ellas.

4.8.2.2 REACTIVOS Y MATERIALES.

Material proporcionado por el kit.

- Placa de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-IL-1 α de ratón.
- 50 ml de solución buffer de lavado concentrado (x20).
- 20 ml de reactivo de bloqueo (proteína tampón).
- 15 ml de diluyente del suero (suero tampón).
- IL-1 α estándar recombinante de ratón.
- 10 ml de anticuerpo policlonal biotinilado anti-IL-1 α de ratón.
- 10 ml de conjugado avidina-peroxidasa.
- 6 ml de sustrato. Reactivo de color A (peróxido de hidrógeno en solución buffer).

- 6 ml de cromógeno. Reactivo de color B (tetrametil bencidina (TMB) en disolvente orgánico).
- 10 ml de solución stop (ácido sulfúrico 1M).
- Cubiertas de plástico adhesivo para la placa.

4.8.2.3 PROCEDIMIENTO.

A. Equilibrar el kit a la temperatura de la habitación. Debe sacarse de la nevera 30 minutos antes de ser utilizado.

B. Determinación del tamaño del ensayo (la placa entera, media...) según el número de pocillos requeridos. Se asignan 10 pocillos para las muestras estándar (5 valores por duplicado) y el número apropiado de pocillos para las muestras objeto de estudio. Se debe hacer una curva estándar con cada ensayo.

C. Preparación del buffer de lavado.

Se prepara de acuerdo a la tabla 1 haciendo una dilución 1/20 del buffer de lavado (que viene 20 veces concentrado) con agua desionizada. Se mezcla fuertemente.

Tabla 1: dilución del buffer de lavado.

TAMAÑO DEL ENSAYO	CONCENTRACION	AGUA
Placa entera	50 ml	950 ml
Media placa	25 ml	475 ml
Un cuarto de placa	12.5 ml	235.5 ml

D. Preparación del mL-1 α estándar.

El mL-1 α sin diluir es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit mientras se almacene a 2-8°C. Cuando se testan sobrenadantes de cultivos, las diluciones se deben hacer en buffer de lavado. Para muestras de suero, se usa el diluyente de suero.

Como se muestra en la tabla 2, se marcan los tubos (paso 1), se pipetea la cantidad de diluyente apropiado en los tubos (paso 2) y se realizan diluciones seriadas del estándar (paso 3).

E. Organización de la placa.

Se saca la placa de la bolsa sellada. Los pocillos y tiras que no vayan a emplearse en el ensayo deben ser guardados en la bolsa con desecante a 2-8°C. Se deben numerar las tiras.

Tabla 2: Diluciones seriadas del estándar.

PASO 1	PASO 2	PASO 3
TUBOS MARCADOS	ADICION DE DILUYENTE	ESTANDAR DILUIDO
405 pg/ml	500 μ l	127 μ l mL-1
135 pg/ml	500 μ l	250 μ l del de 405
45 pg/ml	500 μ l	250 μ l del de 135
15 pg/ml	500 μ l	250 μ l del de 45
0 pg/ml	500 μ l	—

F. Bloqueo de la placa.

1- Se añaden 200 μ l de reactivo de bloqueo por pocillo.

2- Se sella la placa con adhesivo, se introduce en la bolsa de incubación y se incuba a 37+/-2°C durante 40+/-2 minutos.

3- Se quita el líquido de los pocillos por aspiración o invirtiendo la placa y agitando con cuidado para no descolocar las tiras. Ahora no se requiere ningún lavado.

G. Incubación de las muestras.

1- Añadir las muestras y las 5 estándar por duplicado a la placa de microtitulación.

2- Los pocillos con la muestra recibirán un volumen total de 100 μ l. Las muestras de suero requieren dilución con diluyente de suero como se indica en la tabla 3. Las diluciones se pueden hacer directamente en los pocillos.

Tabla 3: Requerimiento de diluciones de las muestras.

TIPO DE MUESTRA	DILUCION	DILUENTE DE SUERO	MUESTRA
Suero	1:4	75 μ l	125 μ l
Medio de cultivo	—	—	100 μ l

3- Para la curva estándar, añadir 100 μ l/pocillo de cada estándar por duplicado (10 pocillos en total).

4- Sellar la placa con adhesivo e introducir en la bolsa de incubación. Incubar durante 40 \pm 2 minutos a 37 \pm 2°C.

H. Incubación con el anticuerpo biotinilado.

- 1- Quitar el líquido de los pocillos como siempre.
- 2- Lavar 4 veces con fuerza con el buffer de lavado cada pocillo. Llenar los pocillos completamente y decantar.
- 3- Secar la placa con toallitas.
- 4- Pipetear 100 μ l de anticuerpo biotinilado en cada pocillo.

5- Sellar la placa con adhesivo y poner en la bolsa de incubación. Incubar durante 40+/-2 minutos a 37+/-2°C.

I. Incubación con avidina-peroxidasa.

1- Quitar el líquido de los pocillos como siempre.

2- Lavar 4 veces con fuerza con el buffer de lavado cada pocillo. Llenar los pocillos y decantar.

3- Secar la placa con toallitas.

4- Pipetear 100µl de avidina-peroxidasa en cada pocillo.

5- Sellar la placa con adhesivo y poner en la bolsa de incubación. Incubar durante 25+/-1 minutos a 37+/-2°C.

J. Reacción del sustrato.

1- Preparar la solución de sustrato mezclando volúmenes iguales de los reactivos A y B para producir la solución de sustrato de acuerdo a la tabla 4.

NOTAS: En el momento de preparar esta solución no debe tener color. Se debe usar inmediatamente.

Tabla 4: Preparación de la solución de sustrato.

TAMAÑO ENSAYO	REACTIVO A	REACTIVO B
Placa entera	6.0 ml	6.0 ml
Media placa	3.0 ml	3.0 ml
Un cuarto de placa	1.5 ml	1.5 ml

- 2- Quitar el líquido de los pocillos por aspiración o invirtiendo la placa y agitando con cuidado.
- 3- Lavar 4 veces con fuerza cada pocillo con buffer de lavado como se ha descrito anteriormente.
- 4- Secar la placa con papel.
- 5- Añadir 100 μ l de la solución de sustrato preparada en cada pocillo.
- 6- Incubar a temperatura de la habitación durante 4-5 minutos.
- 7- Parar el desarrollo de color añadiendo 100 μ l de solución de parada por pocillo. El color azul de los pocillos se torna amarillo.
- 8- Ajustar el blanco del lector de ELISA en los pocillos con 0 pg/ml estándar, entonces leer la absorbancia a 450 nm en los pocillos restantes. Para exactitud, leer dentro de los 30 minutos siguientes.
- 9- Almacenamiento para uso múltiple. Se debe guardar la cubierta exterior de la placa de microtitulación para futuros ensayos. Se debe almacenar todo a 2-8°C con papel desecante.

4.8.2.4 RESULTADOS.

Este ensayo se ha optimizado para medir cantidades relativamente pequeñas de IL-1 α de ratón. Sin embargo este ensayo permite también la medida de grandes cantidades de IL-1 α de ratón

aumentando la curva por encima de 405 pg/ml.

A. Procedimiento para curvas estándar desde 15 hasta 135 pg/ml. Se construye una curva estándar poniendo la absorbancia significativa para cada estándar en el eje Y frente a la correspondiente concentración de IL-1 α de ratón en el eje X. Sigue una regresión lineal.

B. Procedimiento para curvas estándar hasta 405 pg/ml. Se construye una curva estándar poniendo la absorbancia significativa para cada estándar en el eje Y frente a la correspondiente concentración de IL-1 α de ratón en el eje X.

C. Determinación de la concentración de IL-1 α de ratón en las muestras.

1- Calcular la absorbancia significativa.

2- Determinar la concentración correspondiente usando una regresión lineal o una interpolación punto por punto con las curvas generadas en A y B.

3- Multiplicar la cantidad calculada de IL-1 α de ratón por el factor de dilución.

4.8.2.5 CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.

A. Calibración estándar.

La cantidad de IL-1 α contenida en el estándar fue calibrada comparando del kit con una referencia estándar de mIL-1 α .

B. Sensibilidad.

Los límites de detección de este ensayo son 15 pg/ml después de los análisis estadísticos de los resultados.

C. Especificidad.

Soluciones conteniendo 0.5-1.0mg/ml de las diferentes citokinas fueron ensayadas con este kit: hIL-1 α , hIL-1 β , mIL-1 β , mIL-2, mIL-3, mIL-4, mIL-5, mIL-6, mIL-7, mTNF α , mIFN β , mGM-CSF. Estas soluciones no produjeron absorbancias por encima de las producidas por el 0 pg/ml estándar.

D. Linearidad.

Regresión lineal entre 15 y 405 pg/ml debe dar como resultado un coeficiente de correlación de >0.97.

4.8.3 DETERMINACION DE IL-2.

Para la determinación de los niveles en suero de ratón de IL-2 a las distintas horas de inducido el estado séptico se ha utilizado el Inter Test-2XTM Mouse IL-2 ELISA Kit (código #2122-0, Genzyme Immunobiologicals).

4.8.3.1 PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El principio de este método es un inmunoensayo de fase sólida empleando el principio del sandwich de múltiple anticuerpo. En placas de microtitulación de 96 pocillos (procuradas con anticuerpo monoclonal anti-mIL-2) se usa para capturar la IL-2 de ratón presente en las muestras estándar y en las muestras problema.

Después de lavar para eliminar el material no ligado, se añade un anticuerpo policlonal biotinilado que se une a la IL-2 capturada. Tras un nuevo lavado, se añade a cada pocillo estreptavidin-peroxidasa conjugada que se une a los inmunocomplejos marcados con biotina capturados en los pocillos de la placa.

Después de lavar nuevamente, la adición de una solución con el substrato inicia un cambio de coloración catalizado por la peroxidasa, el cual se detiene por acidificación. La absorbancia medida a 450 nm es proporcional a la concentración de IL-2 presente en las muestras.

Se obtiene una curva estándar mediante el enfrentamiento de las concentraciones estándar de IL-2 de ratón con las absorbancias resultantes. Las concentraciones de IL-2 de ratón en las muestras experimentales se determinan a través de la curva estándar.

4.8.3.2 MATERIALES Y REACTIVOS.

Material proporcionado por el kit.

- Placa de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-IL-2 de ratón.
- 50 ml de solución buffer de lavado concentrado (x20).
- 15 ml de diluyente estándar (suero tampón).
- 2 ml de IL-2 recombinante estándar de ratón.
- 10 ml de IL-2 policlonal anti-ratón biotinilada.
- 10 ml de estreptavidin-peroxidasa.
- 12 ml de reactivo sustrato (tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno en solución tamponada).
- 10 ml de solución stop (ácido sulfúrico 1M).
- Cubiertas de plástico adhesivo para la placa.

4.8.3.3 PROCEDIMIENTO.

A. Equilibrar los reactivos del kit.

Sacar los componentes del kit del frigorífico 30 minutos antes para que los reactivos y la placa de microtitulación alcancen la temperatura ambiente.

B. Determinación del tamaño del ensayo y proyecto del ensayo.

Determinar el tamaño del ensayo (entero, medio o un cuarto) para saber el nº total de pocillos requeridos.

Se asignan 10 pocillos para los estándar (5 en duplicado) y un número apropiado de pocillos para las muestras. Debe hacerse una curva estándar en cada ensayo. Se sugiere un control negativo (p.e. medio de cultivo).

C. Preparación del buffer de lavado.

1- Se prepara por dilución al 1/20 de buffer de lavado concentrado con agua desionizada. Se agita con fuerza para mezclar completamente. Se requiere una completa y exhaustiva técnica de lavado. El buffer debe ser dispensado con fuerza y retirado completamente de los pocillos, aspirando o decantando.

Tabla 1

Tamaño del ensayo	Concentrado	Agua
Placa entera	50 ml	950 ml
" media	25 ml	475 ml
" un cuarto	12,5 ml	237,5 ml

D. Preparación de los estándar de IL-2.

1- La IL-2 estándar es estable a 2-8 C° hasta la fecha de caducidad.

2- Como se ve en la tabla 2, tubos marcados (pase 1),

se pipetea en los tubos el diluyente estándar apropiado (pase 2) y se realiza la dilución seriada del estándar (pase 3).

E. La placa.

Se quita la bolsa de plástico de la placa. Las tiras y pocillos que no vayan a usarse, se meten en la bolsa de plástico con desecante para el almacenamiento a 2-8 C°. Numerar los pocillos.

Tabla 2: Diluciones seriadas del Estándar.

Pase 1	Pase 2	Pase 3
Tubos marcados	Añadir diluyente estándar	Estándar diluido
960 pg/ml	300 μ l	100 μ l mIL-2 estándar
240 "	300 "	100 μ l del de 960 μ l/ml
60 "	300 "	100 μ l del de 240 μ l/ml
15 "	300 "	100 μ l del de 60 μ l/ml
0 "	300 "	—

F. Incubación de la placa.

Se añaden las muestras y 5 estándar a la placa de microtitulación por duplicado.

1- Los pocillos con la muestra deben recibir un volumen total de 100 μ l/pocillo. Los sobrenadantes de

cultivo y las muestras de suero no requieren ser diluidas pues se supone que se van a obtener valores menores o iguales a 960 pg/ml.

2- Para la curva estándar, se añaden 100 μ l por pocillo de cada estándar por duplicado (10 pocillos en total).

3- Se sella la placa con adhesivo y se incuba 40+/-2 minutos a 37°C+/-2°C.

G. Incubación del anticuerpo biotilnado.

1- Se quita el líquido de los pocillos por aspiración o invirtiendo la placa agitando con cuidado para no desbloquear los pocillos.

2- Se lavan los pocillos 4 veces con el buffer de lavado; se llena cada pocillo completamente; entonces se decantan completamente.

3- La placa se seca con papel.

4- Se pipetea 100 μ l del anticuerpo policlonal biotilnado frente a IL-2 en cada pocillo.

5- Se sella la placa con un cubre adhesivo y se incuba durante 40+/-2 minutos a 37+/-2°C.

H. Incubación con Streptoavidin-peroxidasa.

1- Se quita el líquido de los pocillos por aspiración o invirtiendo la placa y agitando con cuidado.

2- Se lava cada pocillo 4 veces con buffer de lavado.

- 3- Se seca la placa con papel.
- 4- Se ponen 100 μ l de streptoavidin-peroxidasa en cada pocillo.
- 5- Se sella la placa con un cubre adhesivo y se incuba 25 +/- 1 minutos a 37 +/- 2°C.

I. Sustrato de reacción.

- 1- Si se realiza un ensayo en el que no se gasta la placa entera, se vierte el volumen requerido de sustrato de reacción en un tubo limpio antes de su uso. El volumen necesario para una placa entera es de 12 ml. La solución de sustrato no debe ser coloreada.
- 2- Se quita el líquido de los pocillos por aspiración o por inversión de la placa.
- 3- Se lava cada pocillo 4 veces.
- 4- La placa se seca con toallitas de papel.
- 5- Se pipetea 100 μ l de reactivo de sustrato en cada pocillo.
- 6- Se incuba a temperatura ambiente (18-25°C) durante 10 +/- 1 minutos.
- 7- Se para el desarrollo de color añadiendo 100 μ l de solución stop por pocillo. El color azul de los pocillos se vuelve amarillo.
- 8- Se marca el blanco en el lector de ELISA con un pocillo con 0 pg/ml de estándar. Los pocillos restantes se leen a 450 nm de absorbancia. Para evitar

la pérdida de datos debido a la decoloración, se mide la absorbancia en 5 minutos.

9- Se salvan los pocillos vacios y la estructura de la placa de microtitulación para ensayos posteriores. Se almacenan todos los reactivos entre 2-8°C, incluyendo el líquido estándar.

4.8.3.4 RESULTADOS.

Este ensayo se ha optimizado para medir niveles de IL-2 de ratón con sensibilidad de bioensayo. Sin embargo este ensayo permite también la medida de niveles de IL-2 de ratón mayores por extensión de la curva estándar a 960 pg/ml.

A. Procedimiento para curvas estándar desde 15 pg/ml a 240 pg/ml.

Se construye una curva estándar dibujando la absorbancia para cada estándar en el eje Y frente a la concentración correspondiente de IL-2 de ratón en el eje X.

B. Procedimiento para la curva estándar extendiendo a 960 pg/ml.

Se construye una curva estándar dibujando la absorbancia para cada estándar en el eje Y frente a la correspondiente concentración de IL-2 de ratón en el eje X. La curva se hace mediante interpolación punto por punto en la gráfica

en papel o en ordenador. Para muestras diluidas, hay que multiplicar la cantidad calculada de IL-2 de ratón por el factor de dilución.

C. *Determinación de la concentración de IL-2 de ratón en las muestras.*

Se calcula la absorbancia de las muestras. Se determina la concentración correspondiente mediante una regresión lineal o interpolando punto por punto con la curva estándar generada respectivamente en A y B.

4.8.3.5 CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.

A. *Calibración del estándar.*

La cantidad de IL-2 contenida en el estándar se calibró por comparación del test con una de referencia estándar de IL-2 de ratón.

B. *Sensibilidad.*

La detección límite de este ensayo se determinó en 15 pg/ml después de un análisis estadístico de los resultados de la ELISA. La absorbancia obtenida con 15 pg/ml fué mayor que 2 desviaciones estándar por encima de la absorbancia de la vaselina obtenida desde los pocillos controles del cero (pocillos que contienen todos los componentes del ensayo excepto la IL-2 de ratón).

C. *Especificidad.*

Empleando este InterTest-2X Kit se ensayaron soluciones que contienen las siguientes citokinas: *mIL-10*, *mIL-1 β* , *hIL-2*, *Il-2* de rata, *mIL-3*, *mIL-4*, *mIL-5*, *mIL-6*, *mIL-7*, *mIL-7*, *mTNF- α* , *mINF- β* , *mGM-CSF*, *mSCF*. Estas soluciones no produjeron absorbancias por encima de 0 pg/ml del estándar.

D. Linearidad.

El análisis de regresión lineal del rango de concentraciones entre 15 y 250 pg/ml debe dar como resultado un coeficiente de correlación $>0,99$.

4.8.4 DETERMINACION DE TNF α .

Para la determinación de los niveles en suero de ratón de TNF α a las distintas horas de inducido el estado séptico se ha utilizado el Factor Test-XTM Mouse TNF α ELISA Kit (código 80-2802-00, Genzyme Immunobiologicals).

4.8.4.1 PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El Factor Test-XTM Mouse TNF α ELISA Kit se basa en una técnica de ELISA de fase sólida que emplea el principio del sandwich de múltiples anticuerpos. Primero, una placa de 96 pocillos precubiertos con anticuerpo monoclonal anti-mTNF α se usa para capturar el mTNF α presente en las muestras estándar y las

muestras problema. Después de lavar para eliminar el material no ligado, se añade un anticuerpo policlonal anti-mTNF α conjugado con peroxidasa el cual se liga al mTNF α capturado.

Tras un nuevo lavado, se añade una solución sustrato que inicia cambio de color catalizado por la peroxidasa que se paraliza por acidificación. La absorbancia medida a 450 nm es proporcional a la concentración de mTNF α presente en los estándar y las muestras.

4.8.4.2 REACTIVOS Y MATERIALES.

Material suministrado por el kit.

- Placa de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-m-TNF α de hamster.
- 50 ml de solución buffer de lavado concentrado (x20).
- 1,3 ml de TNF α recombinante standar de ratón a una concentración de 8.96 ng/ml.
- 12 ml de anticuerpo policlonal anti-mTNF α de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante.
- 6 ml de sustrato reactivo A (0.01 N de peróxido de hidrógeno en solución buffer).
- 6 ml de cromógeno. Sustrato reactivo B (tetrametilbencidina (TMB) en metanol (<50%), DMSO (<2%) y glicerol (<15%)).
- 12 ml de solución stop (ácido sulfúrico 1M).
- Cubiertas de plástico adhesivo para la placa.

4.8.4.3 PROCEDIMIENTO.

A. Equilibrar el test a la temperatura ambiente de la habitación. Debe sacarse de la nevera 30 minutos antes de su uso.

B. Determinación del tamaño del ensayo (la placa entera, media...) según el número de pocillos requeridos.

Se asignan 10 pocillos para los estándares (5 valores por duplicado) y el número apropiado de pocillos para las muestras. Se debe hacer una curva estándar con cada ensayo.

C. Preparación del buffer de lavado.

Se prepara de acuerdo con la tabla 1 haciendo una dilución 1:20 del buffer de lavado (que viene 20 veces concentrado) con agua desionizada. Se mezcla fuertemente. Este buffer de lavado se usa para lavar las placas y para diluir el estándar y las muestras del test que van a ser ensayadas. No debe diluirse todo el buffer de lavado de una vez, sino sólo el que vaya a emplearse en cada ensayo para evitar su deterioro.

Tabla 1: dilución del buffer de lavado.

TAMAÑO DEL ENSAYO	CONCENTRACION	AGUA
Placa entera	50 ml	950 ml
Media placa	25 ml	475 ml
Un cuarto de placa	12.5 ml	235.5 ml

D. Preparación del mTNF α estándar.

- El mTNF sin diluir es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit mientras se almacene a 2-8°C. Hay suficiente cantidad para realizar 6 curvas estándar.

- Cuando se testen muestras de suero, se realizan todas las diluciones estándar en buffer de lavado. Cuando se testan sobrenadantes de cultivos, las diluciones se deben hacer en medio de cultivo. Esto minimiza las diferencias de absorbancia entre las muestras y los estándar por causa de los diluentes.

- Como se muestra en la tabla 2, se marcan los tubos (paso 1), se pipetea la cantidad de buffer de lavado diluido o medio de cultivo en los tubos (paso 2) y se realizan diluciones seriadas de la muestra estándar (paso 3).

Tabla 2: Diluciones seriadas del estándar.

PASO 1	PASO 2	PASO 3
TUBOS MARCADOS	BUFFER DE LAVADO	ESTANDAR
2240 pg/ml	300 μ l	100 μ l del estándar
560 pg/ml	300 μ l	100 μ l del anterior
140 pg/ml	300 μ l	100 μ l del anterior
35 pg/ml	300 μ l	100 μ l del anterior
0 pg/ml	300 μ l	—

E. Organización de la placa.

Se saca la placa de la bolsa sellada. Los pocillos y tiras que no vayan a emplearse en el ensayo deben ser guardados en la bolsa con desecante a 2-8°C. Se deben numerar las tiras de pocillos.

F. Incubación de la muestra.

Añadir las muestras y 5 estándar por duplicado a la placa de microtitulación de acuerdo con el ensayo diseñado.

1- Para la curva estándar, añadir 100 μ l/pocillo de cada estándar por duplicado (10 pocillos en total).

2- Los pocillos de las muestras requieren un total de 100 μ l/pocillo. Los sobrenadantes de cultivos y las muestras de suero requieren al menos una dilución 1:2.

Para los pocillos con muestra, añadir 50 μ l del buffer de lavado diluido por pocillo, entonces añadir 50 μ l de muestra a cada pocillo. El buffer de lavado se usa solo para diluir las muestras, no con los medios de cultivo tisulares.

3- Se sella la placa con adhesivo y se incuba 2 horas +/- 5 minutos a 37°C +/- 2°C.

G. Incubación con el anticuerpo conjugado con HRP.

1- Se quita el líquido de los pocillos por aspiración o invirtiendo la placa y agitando con cuidado para no descolocar las tiras de pocillos.

2- Lavar la placa 4 veces con buffer de lavado en cada pocillo. Llenar los pocillos completamente y después decantar bien. Se requiere una técnica consistente de lavado para la buena realización del ensayo. El buffer de lavado debe dispensarse con fuerza y ser retirado completamente de los pocillos por aspiración o decantación.

3- Secar la placa en toallas de papel.

4- Pipetear 100 μ l de anti-TNF-alfa de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en cada pocillo.

5- Sellar con adhesivo la placa e incubar 1 hora +/- 5 minutos a 37 +/- 2°C.

H. Reacción del sustrato.

1- Preparar la solución de sustrato mezclando volúmenes iguales de los reactivos A y B para producir la solución de sustrato de acuerdo a la tabla 3.

NCTAS: la solución de sustrato se debe preparar no antes de 15 minutos de su uso. Se preparará solo la cantidad que se vaya a usar en el ensayo. En el momento de prepararla esta solución no debe tener color.

2- Quitar el líquido de los pocillos por aspiración o invirtiendo la placa y agitando con cuidado.

3- Lavar 4 veces con fuerza cada pocillo con buffer de lavado como se ha descrito anteriormente.

Tabla 3: Preparación de la solución de sustrato.

TAMAÑO ENSAYO	REACTIVO A	REACTIVO B
Placa entera	6.0 ml	6.0 ml
Media placa	3.0 ml	3.0 ml
Un cuarto de placa	1.5 ml	1.5 ml

4- Secar la placa con papel.

5- Añadir 100 μ l de la solución de sustrato preparada

en cada pocillo.

6- Incubar a temperatura de la habitación durante 10+/-1 minutos.

7- Para el desarrollo de color añadiendo 100 μ l de solución de parada por pocillo. El color azul de los pocillos se torna amarillo.

8- Ajustar el blanco del lector de ELISA en los pocillos con 0 pg/ml de muestra estándar, entonces leer la absorbancia a 450 nm en los pocillos restantes.

4.8.4.4 RESULTADOS.

Este ensayo se ha optimizado para medir cantidades relativamente pequeñas de TNF α de ratón. Sin embargo este ensayo permite también la medida de grandes cantidades de TNF α de ratón aumentando la curva por encima de 2240 pg/ml.

A. Procedimiento para curvas estándar desde 35 hasta 560 pg/ml.

Se construye una curva estándar poniendo la absorbancia significativa para cada estándar en el eje Y frente a la correspondiente concentración de TNF α de ratón en el eje X. Dene seguir una regresión lineal.

B. Procedimiento para curvas estándar hasta 2240 pg/ml.

Para aumentar el rango del análisis, puede añadirse en estándar 2240 pg/ml a la curva estándar.

C. Determinación de la concentración de TNF α de ratón en las muestras.

1- Calcular la absorbancia significativa.

2- Determinar la concentración correspondiente usando una regresión lineal o una interpolación punto por punto con las curvas generadas en A y B.

3- Multiplicar la cantidad calculada de TNF α de ratón por el factor de dilución. Las muestras que den un valor muy alto deben rediluirse y volver a analizarse.

4.8.4.5 CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.

A. Calibración estándar.

La cantidad de TNF α contenida en el estándar ha sido calibrada por comparación de el Factor-Test-X Standar con una referencia estándar de concentración conocida de TNF α altamente purificado de ratón por análisis de aminoácidos, por un ensayo de proteína BCA y por ELISA.

B. Sensibilidad.

Los límites de detección de este ensayo son 15 pg/ml después de los análisis estadísticos de los resultados.

C. Especificidad.

Soluciones conteniendo diferentes citokinas fueron ensayadas con este kit (mIL-1 α , mIL-1 β , mIL-2, mIL-3, mIL-4, mIL-6, mIL-7, mIFN β , mGM-CSF, hTNF β). Concentraciones de 10⁶ pg/ml no mostraron reacción cruzada con este Kit.

D. Linearidad.

El análisis de regresión lineal del rango de concentraciones entre 35 y 560 pg/ml debe tener un coeficiente de correlación >0.99.

4.8.5 DETERMINACION DE IL-6.

Para la determinación de los niveles en suero de ratón de IL-6 a las distintas horas de inducido el estado séptico se ha utilizado el Murine Interleukin-6 (mIL-6) Inter ELISA Kit (código EM-IL-6, Endogen).

4.8.5.1 PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Este método es un ensayo de un enzima acoplado a un inmunoabsorbente para una medida cuantitativa de IL-6 murina en sobrenadantes de cultivo o suero.

La placa de microtitulación de 96 pocillos (precubiertas con anticuerpo monoclonal anti-mIL-6) se bloquea primero y después

se usa para capturar la IL-6 de ratón presente en los standar y en las muestras.

Después de lavar para eliminar el material no ligado, se añade un reactivo conjugado prediluido anti-mIL-6 que se une a la IL-6 capturada. Tras un nuevo lavado para eliminar el material no ligado, la adición del sustrato TMB (tetrametilbencidina) inicia el desarrollo en la oscuridad de una reacción enzimática coloreada, la cual se frena al añadir un ácido orgánico diluido. Terminada la reacción, se mide la absorbancia a 450 nm que será proporcional a la concentración de IL-6 presente en las muestras.

Se obtiene una curva estándar al enfrentar las concentraciones estándar de IL-6 de ratón con sus respectivas absorbancias. Las concentraciones de IL-6 de ratón en las muestras a estudiar se determinan a través de la curva estándar obtenida.

4.8.5.2 REACTIVOS Y MATERIALES.

Material suministrado por el kit.

- Placa de 96 pocillos precubierta con anticuerpo monoclonal anti-IL-6 murina.
- 2 viales liofilizados de IL-6 murina estándar recombinante derivada de E. coli.
- Diluyente del estándar.
- Reactivo de placa.
- Solución de buffer de lavado concentrado (x30).

- Reactivo conjugado prediluido anti-IL-6 murina.
- Reactivo de sustrato TMB (tetrametilbencidina).
- Solución stop (ácido inorgánico diluido).
- Cubiertas adhesivas de plástico para la placa.

4.8.5.3 PROCEDIMIENTO.

A. Preparación del buffer de lavado.

Se marca un bote de 2 litros para el buffer de lavado. Se añade el contenido total del bote del buffer de lavado concentrado (x30) y se diluye con 1,5 litros de agua destilada o desionizada. Se mezcla vigorosamente. El buffer de lavado debe estar a temperatura de la habitación antes de su uso para el ensayo. Si se emplea solo parte de la placa, el buffer reconstituido se mantiene a 4°C. Se mantienen reconstituido durante 8-10 meses refrigerado. No se puede usar si se observa contaminado.

B. Preparación de las diluciones estándar de IL-6 murino.

- 1- Preparar los estándar justo antes de su uso. No se almacenan los estándar diluidos.
- 2- Para sobrenadantes de cultivo se reconstituyen los IL-6 estándar en el propio medio de cultivo. Para muestras de suero, usar en los estándar agua destilada

o desionizada. El volumen de reconstitución está indicado en el vial del estándar. Esto dará una solución de 1250 pg/ml de mIL-6. Tarda aproximadamente 1 minuto en disolverse. Mezclar con suavidad invirtiendo el vial.

3- Cuando se van a ensayar muestras de suero, se usa el diluyente estándar para preparar las diluciones seriadas de la curva estándar. Si las muestras son sobrenadantes, se usará para esto el medio de cultivo. Guardar el segundo vial de estándar si se pretende usar 2 placas parciales.

4- La mIL-6 reconstituida a 1250 pg/ml es el primer punto de la curva estándar. Para los puntos restantes, se preparan diluciones seriadas 5 veces menores que la anterior como se detalla a continuación: se marcan 2 tubos con 250 y 50 pg/ml. Se pipetea 400 μ l del diluyente apropiado (paso 3) en cada tubo. Se pipetea 100 μ l del mIL-6 reconstituido en el tubo de 250 pg/ml. Se mezcla bien. Se pipetea 100 μ l de este segundo tubo en el de 50 pg/ml. Así quedan formadas las tres concentraciones para la curva estándar.

C. Primera incubación.

1- Marcar en la hoja de datos el estándar (blanco o control negativo), los estándar de mIL-6 y las muestras que se van a analizar. Los tres estándar y el

blanco deben emplearse por duplicado con cada serie de muestras.

2- Si se usa una pipeta multicanal, se usa un nuevo reservorio de reactivo para adicionar el reactivo de placa.

3- Adicionar 50 μ l del reactivo de placa a todos los pocillos que se van a utilizar antes de la adición de las muestras y estándar.

4- Añadir 50 μ l de estándar y muestras en los pocillos restantes. Las muestras de suero del grupo sham no se han diluído, mientras que las muestras de los restantes grupos se han diluído a una proporción del 1/100 (5 μ l de suero/500 μ l de diluyente) (ver sección G).

5- Cubrir la placa con el adhesivo, cuidando que todas las tiras y bordes están cubiertos. Incubar 2 horas a 37+/-2°C en incubador con atmósfera húmeda.

6- Al final del periodo de incubación, quitar el adhesivo. Lavar la placa 5 veces con buffer de lavado usando el procedimiento que se describe más adelante.

D. Lavar la placa.

1- Lavado manual. Dar un golpecito suave a los contenidos de la placa en un fregadero u otro receptáculo. Usando una botella con pitorro, llenar vigorosamente cada pocillo completamente con buffer de

lavado, tirar el contenido de los pocillos. Repetir este proceso 4 veces más. Después del lavado final mover la placa arriba y abajo y secar con toallitas de papel u otro material absorbente.

2- Automático. Aspirar todos los pocillos y lavar 5 veces con buffer de lavado. Después del último lavado secar la placa.

E. Segunda incubación.

1- Usando una pipeta normal o multicanal, añadir 100 μ l de reactivo conjugado prediluido a cada uno de los pocillos usados.

2- Poner un nuevo adhesivo sellando bien la placa. Incubar 1 hora a $37\pm 2^\circ\text{C}$ en incubador con atmósfera húmeda.

3- Al final de la segunda incubación, quitar el adhesivo y lavar de nuevo 5 veces.

F. Reacción de sustrato/stop.

1- Usar diferentes puntas de pipeta para el TMB y la solución stop.

2- Si se usan placas parciales ver la sección G.

3- Poner 100 μ l de reactivo TMB en cada pocillo.

4- Permitir el desarrollo de la reacción coloreada enzimática a temperatura ambiente durante 30°C . La placa debe desarrollarse en oscuridad. No cubrir la

placa con papel de aluminio. Da un color azul que se torna amarillo cuando se añade la solución stop.

5- Después de 30 minutos, parar la reacción con solución stop añadiendo 100 μ l en cada pocillo.

6- Medir la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm. La placa debe leerse dentro de los 30 minutos siguientes a la parada de la reacción.

G. Muestras con mayor concentración de 1250 pg/ml de mIL-6.

En este caso se harán diluciones menores de la muestra con el diluyente apropiado. Por ejemplo, una dilución 5 veces menor se prepara añadiendo 0.1 ml (100 μ l) de la muestra a 400 μ l de diluyente de la curva estándar o el medio en caso de muestras de cultivos. Se mezcla bien y se ensayan.

H. Empleo de placas parciales.

Este ELISA proporciona la posibilidad de usar solo media placa en ocasiones separadas. Se decide el número de tiras que se desean emplear. Se quitan las tiras innecesarias y se almacenan con desecante a 2-8°C en la bolsa metálica. Preparar los estándares de mIL-6 y realizar la primera incubación tal como se ha descrito. Para la segunda incubación, añadir 100 μ l del reactivo conjugado prediluido a cada pocillo e incubar

1 hora a 37°C. Cuando se va a añadir el TMB, se saca del bote solo la cantidad que se va a necesitar para la primera media placa. No se combina el sustrato que se deja reservado para la otra media placa. Hay que tener un cuidado especial para que el TMB no se contamine. Si tiene color azul antes de su uso, es que está contaminado y no se puede usar. Añadir 100µl de este TMB premezclado a cada pocillo. Permitir el desarrollo de la reacción enzimática en oscuridad a temperatura ambiente. Parar la reacción y leer a 450 nm.

4.8.5.4 RESULTADOS.

A. Los cálculos de las concentraciones desconocidas se pueden hacer manualmente con papel milimetrado o en un ordenador. Se genera una curva estándar lineal representando las absorbancias en el eje Y frente a las concentraciones de los estándares en el eje X. Los valores de los duplicados no deben desviarse más del 10%.

B. La cantidad de IL-6 en cada muestra se determina interpolando desde el valor de la absorbancia hasta ver la concentración usando la curva estándar.

C. Si las muestras han requerido una dilución determinada,

una vez buscada la concentración en el eje X, ésta se multiplica por el factor de dilución.

4.8.5.5 CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.

A. Sensibilidad.

Este kit detecta un mínimo de 15 pg/ml de IL-6 biologicamente activa. La curva estándar tiene un rango entre 0 y 1250 pg/ml.

B. Especificidad.

Es específico para la medida de IL₆ murina natural o recombinante. No produce reacción cruzada con IL-6 humana, de rata, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF α o IFN γ murinos.

C. Estabilidad.

La realización de este ensayo ha sido testada empleando reactivos almacenados a 2-6°C durante 6 meses. La precisión, sensibilidad y linealidad del ensayo se encuentran en las especificaciones detalladas arriba.

4.9 DETERMINACION DE PGE₂.

Los niveles en orina de ratón de PGE₂ a las distintas horas

de inducido el estado séptico se han medido mediante kits comerciales de detección de dicha prostaglandina por la técnica de ELISA (Prostaglandin E₂ ELISA Kit (código #404110), ELISA Technologies, Neogen Corporation). Para la lectura de absorbancias se ha utilizado un lector de ELISA modelo Menarini Sucart (Menarini Diagnostics) con filtro de 450 nm.

4.9.1 PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Este método utiliza una técnica de ELISA para el análisis cuantitativo de esta prostaglandina en fluidos biológicos. Este test opera en base a la competición entre el enzima conjugado y la PGE₂ de la muestra por un número limitado de sitios de unión en la placa cubierta con el anticuerpo.

La muestra o la solución estándar se añade en primer lugar a la microplaca. Después, se añade el enzima conjugado diluido, se agita y se incuba a temperatura de la habitación durante una hora. Durante la incubación, tiene lugar la competencia por los sitios de unión. La placa se lava quitando todo el material que no se haya ligado. El enzima conjugado ligado se detecta por la adición de K-Blue Sustrato el cual genera un color óptimo después de los 30 minutos. Los resultados cuantitativos pueden ser obtenidos por medida y comparación de la absorbancia de la lectura de los pocillos de las muestras frente a los standars con un lector de placa a 450 nm. La extensión de color es

inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ en la muestra o en el estándar. Por ejemplo, la ausencia de PGE₂ en la muestra resultará en un color azul brillante, mientras que la presencia de PGE₂ resultará en un descenso o ausencia de color.

4.9.2 REACTIVOS Y MATERIALES.

A. Material suministrado por el kit.

- 30 ml de EIA buffer para diluir el enzima conjugado, los estándar y las muestras.
- 30 ml de solución Buffer de lavado. Tiene que diluirse 3 veces con agua desionizada. Se usa para lavar todo el enzima conjugado no ligado, las muestras y estándar de la placa después de la incubación de 1 hora.
- 20 ml de K-Blue sustrato (Tetrametilbencidina (TMB) más H₂O₂). Se usa para desarrollar el color en los pocillos después del lavado.
- 150 µl de enzima conjugado de PGE₂ (concentrado de PGE₂ conjugado peroxidasa de rábano picante).
- 100 µl de PGE₂ Estándar, a una concentración de 1 µg/ml.
- Microplacaplaca de 96 pocillos cubierta con anticuerpo frente a PGE₂. La placa está lista para su uso.

B. Material requerido no suministrado.

- 60 ml de agua desionizada.
- 10 ml de ácido clorhídrico 1 M.

D. Recomendaciones sobre el procedimiento.

- No es necesario dejar los reactivos que se calienten a la temperatura de la habitación antes de su uso.
- Debe quedar una bolsa desecante en la cartuchera de estaño con las tiras de pocillos que no se usen. La cartuchera hay que mantenerla cerrada cuando no se use para mantener el ambiente seco.
- Siempre hay que usar diferentes pipetas para el buffer de lavado, el enzima conjugado, estándar y muestras para no mezclar.
- Antes de pipetear un reactivo hay que enjuagar la pipeta tres veces con ese reactivo (es decir, se llena la pipeta con la cantidad de reactivo deseada y se dispensa dentro del mismo vial. Esto se repite dos veces más). Ahora la punta de pipeta está enjuagada y lista para dispensar el reactivo en el pocillo o tubo de test.
- Cuando se pipetea dentro de los pocillos, no se puede tocar con la punta de la pipeta el interior de los pocillos ni los reactivos que contengan para no producir contaminación cruzada.
- Los estándar se deben examinar por duplicado.
- Cada vez que se realice un ensayo hay que hacer una curva estándar.
- Agitar suavemente todos los reactivos y las muestras antes de su uso. No realizar agitaciones vigorosas.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

D. Recomendaciones sobre el procedimiento.

- *No es necesario dejar los reactivos que se calienten a la temperatura de la habitación antes de su uso.*
- *Debe quedar una bolsa desecante en la cartuchera de estaño con las tiras de pocillos que no se usen. La cartuchera hay que mantenerla cerrada cuando no se use para mantener el ambiente seco.*
- *Siempre hay que usar diferentes pipetas para el buffer de lavado, el enzima conjugado, estándar y muestras para no mezclar.*
- *Antes de pipetear un reactivo hay que enjuagar la pipeta tres veces con ese reactivo (es decir, se llena la pipeta con la cantidad de reactivo deseada y se dispensa dentro del mismo vial. Esto se repite dos veces más). Ahora la punta de pipeta está enjuagada y lista para dispensar el reactivo en el pocillo o tubo de test.*
- *Cuando se pipetea dentro de los pocillos, no se puede tocar con la punta de la pipeta el interior de los pocillos ni los reactivos que contengan para no producir contaminación cruzada.*
- *Los estándar se deben examinar por duplicado.*
- *Cada vez que se realice un ensayo hay que hacer una curva estándar.*
- *Agitar suavemente todos los reactivos y las muestras antes de su uso. No realizar agitaciones vigorosas.*

- Cuando se usen cantidades parciales de un kit, se recomienda transferir el volumen apropiado de cada reactivo a un tubo de cristal limpio para su dispensación. Esto reducirá la contaminación del reactivo por las repetidas tomas de producto desde el bote original.
- El enzima conjugado es mucho más estable en su forma concentrada. Se diluye solo el volumen necesario para las tiras de pocillos que se vayan a usar.
- Antes de tomar ninguna medida de la absorbancia, limpiar el fondo de la placa por fuera con un papel para quitar las huellas de los dedos.

4.9.3 PROCEDIMIENTO.

A. Preparar los estándar como muestra la tabla 1.

Tabla 1

ESTANDAR	PREPARACION
A	Solución stock 1 $\mu\text{g/ml}$
B	20 μl de A y 980 μl de EIA buffer: 20ng/ml
C	200 μl de B y 1.8 ml de EIA buffer: 2ng/ml
D	200 μl de C y 1.8 ml de EIA buffer: 0.2ng/ml

Continuar la preparación de los estándar como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Estándar	ng/ml	EIA buffer (añadir μ l)	Estándar B μ l	Estándar C μ l	Estándar D μ l
S_0	0	como está	-	-	-
S_1	0,1	500	-	-	500
S_2	0,2	-	-	-	como está
S_3	0,4	800	-	200	-
S_4	1,0	500	-	500	-
S_5	2,0	-	-	como está	-
S_6	4,0	800	200	-	-
S_7	10,0	500	500	-	-

B. Determinar el número de pocillos que se van a usar. Calcular siempre unos cuantos pocillos más cuando se calcule la cantidad del enzima conjugado, pues puede haber un pequeño fallo durante el pipeteo (4 pocillos más para pipeta simple y 8 más para multicanal).

C. Diluir el enzima conjugado de PGE_2 .

Añadir 1 μ l del enzima conjugado a 50 μ l de buffer de EIA por cada pocillo ensayado. Para toda la placa, añadir 110 μ l del enzima conjugado de PGE_2 en 5.5 ml de buffer de EIA. Mezclar bien la solución.

D. Añadir 50 μ l de los estándar (S) por duplicado y de las muestras (U) a los pocillos apropiados. Algunas muestras requieren diluirse.

E. Añadir 50 μ l del enzima conjugado diluido de PGE₂ en cada pocillo (Se puede emplear una pipeta multicanal para una adición rápida).

F. Agitar la placa ligeramente para mezclar los contenidos. Se puede usar un agitador de placas.

G. Cubrir con película de plástico e incubar la placa a la temperatura de la habitación durante 1 hora. Mantener la placa lejos de cambios y fluctuaciones de temperatura.

H. Diluir el buffer de lavado con agua desionizada (30 ml de buffer de lavado más 60 ml de agua desionizada). Agitar a fondo.

I. Después de la incubación, verter el contenido de la placa. Golpear y secar la placa con una toallita.

J. Lavar cada pocillo con 200 μ l de buffer de lavado. Repetir tres veces el lavado.

K. Añadir 150 μ l de K-Blue sustrato a cada pocillo (Usar pipeta multicanal para mejorar los resultados).

L. Dejar la placa a temperatura ambiente durante 30

minutos.

LL. Añadir 50-100 μ l de HCl 1 M a cada pocillo para parar la reacción.

M. Suavemente agitar la placa antes de tomar la lectura para conseguir un color uniforme en cada pocillo.

N. Leer en un lector de ELISA a 450 nm.

Ñ. Dibujar la curva estándar y estimar la concentración de las muestras desde dicha curva.

4.9.4 RESULTADOS.

A. Calcular la media de los valores duplicados.

B. La media de los dos valores de S_0 es ahora el valor B_0 (S_1 será B_1 , y así sucesivamente).

C. Seguidamente, encontrar el porcentaje de máxima unión (valor $\%B/B_0$). Para hacer ésto, dividir las medias de cada valor estándar (desde B_1 a B_7) por el valor de B_0 y multiplicar por 100 para conseguir los porcentajes.

D. Representar la curva estándar dibujando el $\%B/B_0$ para cada concentración estándar en el eje Y (ordenadas) frente a la concentración en el eje X (abcisas). Dibujar la curva usando una técnica de regresión lineal.

E. Dividir las medias de cada muestra por el valor de B_0 y multiplicar por 100 para alcanzar los porcentajes.

F. Usando la curva estándar, la concentración de cada muestra puede ser determinada por comparación de el $\%B/B_0$ de cada muestra a la correspondiente concentración de PGE_2 estándar.

G. Si las muestras se han diluido, la concentración determinada desde la curva estándar debe multiplicarse por el factor de dilución.

4.9.5 CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.

- Reactividad cruzada con otras sustancias.

Prostaglandina E_2	100,0%
Prostaglandina A_1	100,0%
Prostaglandina A_2	100,0%
Prostaglandina B_1	100,0%
Prostaglandina B_2	100,0%
Prostaglandina E_1	100,0%

6-Keto-Prostaglandina E ₁	85,50%
Prostaglandina F ₁ Ó	10,40%
13,14-Dihidro-	
15-Keto-Prostaglandina F ₂ Ó	2,00%
Prostaglandina D ₂	0,26%
11β-Prostaglandina F ₂ Ó	0,11%
6-Keto-Prostaglandina F ₁ Ó	<0,01%
15-Keto-Prostaglandina F ₂ Ó	<0,01%
Prostaglandina F ₂ Ó	<0,01%
Tromboxano B ₂	<0,01%

4.10 DETERMINACION DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS CD4 Y CD8.

La determinación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 a las 24 horas de provocado el estado séptico se ha realizado en sangre total del ratón mediante una reacción de inmunofluorescencia directa. La lectura de la inmunofluorescencia resultante se ha medido en un citómetro de flujo modelo.

4.10.1 PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El método consiste en una reacción específica antígeno-anticuerpo mediante la cual se añaden a la sangre total dos anticuerpos monoclonales anti receptores CD4 y CD8 de la membrana

linfocitaria. Dichos anticuerpos monoclonales específicos están marcados con un cromógeno (el anti-CD8 con fluoresceína y el anti-CD4 con ficoeritrina). Después de lavar para eliminar el material no ligado, la fluorescencia resultante medida por citometría de flujo será la expresión de la unión del anticuerpo marcado con su receptor específico de membrana, y por tanto indicará la cantidad de las células linfocitarias por unidad de volumen que contengan en su membrana los receptores CD4 o CD8.

4.10.2 REACTIVOS Y MATERIALES.

- 3 ml (300 μ g) de anticuerpo monoclonal de rata anti receptor CD8 de ratón marcado con fluoresceína (Caltag Laboratories).
- 0,5 ml (50 μ g) de anticuerpo monoclonal de rata anti-receptor CD4 de ratón marcado con ficoeritrina (Caltag Laboratories).
- 50 ml de solución para lisar los hematíes.
- 50 ml de solución de formaldehído al 1%.
- Pipetas de precisión entre 5 μ l-500 μ l.
- Centrífuga refrigerada.
- Citómetro de flujo.

4.10.3 MANEJO Y RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.

La sangre total del ratón una vez obtenida se analizará

inmediatamente a temperatura ambiente. Una vez marcada con los anticuerpos monoclonales y previa lisis de los hematíes y posterior centrifugación y lavado, se conservará con la solución de formaldehído a 0-8°C en frigorífico y en oscuridad hasta su lectura en un periodo máximo de 36 horas.

4.10.4 PROCEDIMIENTO.

A. De la sangre total recogida en un tubo de hemograma con EDTA se extraen 50 μ l que se introducen en un tubo de cristal.

B. Se añaden al tubo de cristal con la sangre 5 μ l de cada anticuerpo monoclonal específico marcado con cromógeno.

C. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

D. Se añaden 500 μ l de solución para lisar los hematíes, dejándola actuar durante 5 minutos.

E. El tubo con los hematíes ya lisados se centrifuga a 1500 R.P.M. durante 5 minutos a 4°C.

F. Decantar para eliminar el material no ligado y los hematíes lisados.

G. Se añade a cada tubo 100 μ l de solución de formaldehído al 10%.

H. Cubrir cada tubo con papel de aluminio para preservarlo de la luz y almacenar en frigorífico a 4-8°C por un periodo máximo de 36 horas.

I. Para la lectura de la fluorescencia retirar el papel de aluminio y utilizar un citómetro de flujo.

4.10.5 RESULTADOS.

Los resultados se expresan en porcentaje de células por 50 μ l de sangre total que es directamente proporcional a la intensidad de fluorescencia que se detecta por citometría.

El número total de cada subpoblación linfocitaria por μ l se calcula en base al hemograma realizado previamente a cada muestra de sangre, en el que se incluye el número total de leucocitos por μ l y la fórmula leucocitaria, en la que se expresa la participación en % de los linfocitos en la composición de dicha fórmula.

4.10.6 CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.

- Especificidad.

A. Anticuerpo monoclonal de rata anti-CD8 de ratón. Este anticuerpo se une a proteínas de aproximadamente 30.000 daltons que se encuentran en el 85% de los timocitos de ratón, en los linfocitos T supresores/citotóxicos de ratón y sus células precursoras. No se une a los linfocitos T cooperadores/inductores de ratón. Este anticuerpo no es altamente específico de especie, por lo que puede ser utilizado en todas las cepas de ratón usadas con más frecuencia en los laboratorios.

B. Anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 de ratón. Este anticuerpo se une a proteínas de aproximadamente 30.000 daltons que se encuentran en el 85% de los linfocitos T cooperadores/ inductores y sus células precursoras. No se une a los linfocitos T citotóxicos/supresores de ratón. Este anticuerpo no es altamente específico de especie, por lo que puede ser utilizado en todas las cepas de ratón usadas con más frecuencia en los laboratorios.

4.11 ESTUDIO ESTADISTICO.

El estudio estadístico del comportamiento de una o varias variables en las poblaciones se lleva a cabo a partir de muestras de dichas poblaciones. Las muestras deben ser aleatorias y suficientemente amplias para asegurar la veracidad de los

resultados, que una vez obtenidos y tabulados de manera adecuada (estadística descriptiva), han de ser sometidos a distintas pruebas para determinar la confianza con la que pueden aceptarse las hipótesis planteadas a partir de ellos (tests de hipótesis).

A continuación se exponen los fundamentos teóricos imprescindibles de cada uno de los procedimientos estadísticos empleados en el presente trabajo, si bien la mayoría de las formulaciones matemáticas han sido omitidas intencionadamente en busca de una mayor claridad.

4.11.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA.

4.11.1.1 MEDIA ARITMETICA.

Cociente resultante de dividir la suma de los valores que una variable cuantitativa toma en cada elemento de la muestra por el tamaño de ésta:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

4.11.1.2 DESVIACION TIPICA

Es la raíz cuadrada de la varianza y nos ofrece una idea de la heterogeneidad o variabilidad de los valores muestrales:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

4.11.2 TESTS DE HIPOTESIS.

Como cuestión previa, parece conveniente recordar, aunque sea con brevedad, el concepto de significación estadística. Se dice que existe significación estadística cuando, en un test de hipótesis, H_0 (hipótesis nula) es rechazable, es decir, cuando la posibilidad de rechazar H_0 (y por tanto poder aceptar la hipótesis alternativa H_1), siendo H_0 cierta, es pequeña (normalmente $p < 0,05$, o lo que es lo mismo, un error α inferior al 5%, aunque errores α menores del 10% y a veces del 15% pueden aceptarse como significativos o con clara tendencia a la significación, dependiendo del planteamiento y los objetivos del test formulado) (Armitage, 1987; Carrasco, 1989).

4.11.2.1 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV.

Es un test de bondad de ajuste a una distribución normal, y verifica si una variable aleatoria continua (aquella que se expresa numéricamente y toma cualquier valor dentro de unos límites dados) ajusta sus resultados en una población a una curva de distribución normal. Esta prueba, al igual que otras similares como el test de normalidad de D'Agostino (1986), puede aplicarse también a variables aleatorias cuantitativas discretas (aquellas que toman valores numéricos aislados) y cualitativas, siempre que los datos se agrupen en clases y se opere con las marcas de clase y las frecuencias absolutas. De cualquier manera, para este tipo

de variables suele usarse directamente el test Chi^2 , que incluye entre sus aplicaciones, como se vió en el apartado anterior, la bondad de ajuste a una distribución.

Cuando el test es significativo, al poder rechazarse la hipótesis nula ($H_0 =$ La variable sigue una distribución normal), será preciso modificar los datos para lograr la normalidad (generalmente mediante transformación logarítmica) o bien utilizar una prueba independiente de la distribución (no paramétrica).

4.11.2.2 ANALISIS DE LA VARIANZA.

Se ha utilizado este método para comparar la media de las distintas variables cuantitativas independientes obtenidas entre todos los grupos y a las distintas horas.

El análisis de la varianza de una vía (ANOVA 1), dentro del concepto general de análisis de la varianza ideado en 1925 por Fisher, es un procedimiento para contrastar si las r poblaciones normales y con varianzas iguales, de las que se han obtenido r muestras aleatorias e independientes, tienen igual media o no. No se trata, como podría pensarse en un principio, de una generalización del test de Student para dos muestras independientes de poblaciones con varianzas iguales, pues si efectuáramos todas las comparaciones dos a dos el error α fi' al acumulado sería la suma de los errores α de cada uno de los test realizados, y existiría una alta probabilidad de rechazar la H_0 .

global sin deber hacerlo.

La mecánica del ANOVA 1, sistematizada de manera general y eludiendo complejas referencias matemáticas y conceptuales, es la siguiente:

- Comprobar, mediante tests como el de Kolmogorov-Smirnov o el de D'Agostino, que cada muestra proviene de una variable aleatoria normal.

- Comprobar la hipótesis de que todas las muestras provienen de poblaciones con iguales varianzas. Ello puede hacerse calculando los rangos o amplitudes de cada una de las muestras y observando que no presenten excesivas diferencias entre sí ni aumenten conforme lo hacen las medias. Cuando este procedimiento sencillo no arroje un resultado claro, habrá que aplicar el test de Bartlett utilizado para comparar varias varianzas independientes.

- Calcular F_{exp} y compararla con F_{α} ($r-1$; $N-r$, siendo r el número de muestras y N el tamaño total de todas las muestras).

- Cuando el ANOVA 1 es significativo ($F_{exp} > F_{\alpha}$), y en algunas ocasiones aún sin serlo, conviene examinar las medias de cada muestra y la magnitud de las diferencias entre ellas.

En tales casos pueden emplearse diversos procedimientos (Student, Tukey, Scheffé, Dunnet), pero el método de secuencia de Newman (1939) y Keuls (1952) es el más potente. Consiste en ordenar las k medias en orden ascendente, comparando primero las dos medias extremas de entre las k , luego las dos medias extremas de entre las $k-1$, y así sucesivamente. En cada paso se toma el

valor k oportuno ($k, k-1, k-2, \text{etc.}$) y, siempre que se encuentre que las medias más alta y más baja de un grupo, contrastadas mediante una t_{exp} clásica, no son significativamente diferentes, se decide que ninguno de los miembros del grupo lo son (Tallarida, 1987).

La ventaja fundamental de este método consiste en que en cada paso el número k de medias comparadas va disminuyendo, el valor de t_{α} también disminuye, y por tanto resulta más probable encontrar una significación estadística al comparar las medias entre sí.

4.11.2.3 TESTS NO PARAMETRICOS.

Ante la posibilidad, y debido a que el tamaño muestral de todas las poblaciones ha sido $n=10$, de que los resultados obtenidos para cada variable aleatoria no siguiesen una distribución normal, se han aplicado los tests no paramétricos que a continuación se detallan para hacer las comparaciones entre los distintos grupos. Hay que destacar que los resultados obtenidos tras la aplicación de los mismos han sido prácticamente iguales a los hallados tras aplicar el test del análisis de la varianza. Los resultados, aunque no se muestran en este trabajo por criterios de simplificación, se encuentran a disposición de aquellas personas que solicitasen comprobar los mismos.

4.11.2.3.1 TEST DE MANN-WHITNEY.

Es un test no paramétrico para contrastar los valores de dos variables aleatorias cuantitativas e independientes que siguen una distribución cualquiera.

La mecánica de la prueba, idéntica a la del también muy usado test de Wilcoxon para muestras independientes, excepto en la fórmula para obtener el estadístico R_{exp} consiste básicamente en unir ambas muestras y ordenar los valores de menor a mayor, asignándoles rangos correlativos a los elementos y corrigiendo los empates, para a continuación sumar los rangos correspondientes a cada muestra.

Las sumas de rangos, si no existe diferencia significativa entre las muestras, serán bastante similares, mientras que si los valores de una de ellas son mayores que los de la otra, tenderán a ocupar rangos superiores, arrojando una suma más elevada.

La significación puede obtenerse contrastando el estadístico U_{exp} de Mann-Whitney (1947) calculado con un U_{α} teórico buscado en tablas (Auble, 1953), o mejor realizando una aproximación a la Normal cuando ambos tamaños muestrales n_1 y $n_2 > 10$.

4.11.2.3.2 TEST DE KRUSKAL-WALLIS.

La idea, desarrollada al exponer el test de Mann-Whitney, de comparar dos variables aleatorias usando los rangos obtenidos al unir todos los datos de ambas muestras y ordenarlos en sentido

creciente, puede ser extendida a más de dos grupos.

Disponemos ahora de r muestras independientes de tamaños n_{1j} , n_{2j} hasta n_{rj} y se desea contrastar la hipótesis nula H_0 de que los valores de las r poblaciones de las que provienen las r muestras son iguales, frente a la hipótesis alternativa H_1 de que al menos una de las poblaciones tiende a dar valores más altos que al menos una de las otras.

Uniremos las r muestras en una sola, asignaremos rangos y obtendremos las sumas de rangos para cada una de las muestras, calculando el estadístico W de Kruskal-Wallis y, si existen empates, lo dividiremos por un factor de corrección determinado por el número de grupos empatados y por el número de empates en el grupo de empatados.

Finalmente, si W es mayor que un Chi^2 con $r-1$ g.l., rechazaremos la hipótesis nula de igualdad con un error α y procederemos a la realización de comparaciones múltiples mediante tests no paramétricos especiales.

4.11.2.4 PRUEBA EXACTA DE FISHER.

Se ha empleado este test, con la Corrección de Yates, para el estudio de la supervivencia entre los distintos grupos a las distintas horas, dado que se trata de variables cualitativas y de un caso de comparación de proporciones independientes que, al no cumplir el requisito de que todas las frecuencias teóricas calculadas sean mayores que 5, imposibilita la aplicación del

test del Chi^2 (Martín-Andrés, 1990).

Esta prueba valora si la desproporción que presenta la tabla es o no atribuible al azar, y para ello se ha de calcular la probabilidad de presentación de esta desproporción anómala y de todas las más extremas hasta la que se nos ha presentado. Si dicha probabilidad es menor que 0,05, aceptaremos que el hecho de haberse presentado una tabla con tal desproporción de caracteres hará necesario rechazar la hipótesis nula de igualdad de proporciones.

RESULTADOS

Alfonso Mansilla Roselló

5.1 IL-1 α .

A 1ª hora se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas de los niveles séricos de IL-1 α entre los grupos simulado, el control (LPS) y el pretratado conjuntamente con IL-1 β murina e ibuprofén. Sin embargo, en el grupo tratado solamente con ibuprofén se produce un marcado y significativo aumento de esta citokina con respecto a los grupos simulado, el control y el pretratado con IL-1 β murina.

A 2ª hora se produce un gran aumento en suero de IL-1 α en el grupo control (LPS), con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los cuatro grupos restantes. A su vez, hay que destacar que a esta hora no existen diferencias significativas de los niveles séricos de esta citokina entre el grupo simulado y los tres grupos tratados (IL-1 β murina, ibuprofén e IL-1 β murina más ibuprofén).

Por último, a 4ª hora existe un aumento significativo en suero de IL-1 α en todos los grupos problema (control y todos los tratados) con respecto al grupo simulado. No se observan diferencias en los valores de esta citokina entre el grupo control y los grupos tratados tanto con IL-1 β murina como con IL-1 β murina más ibuprofén, ni entre estos dos últimos grupos entre sí. Sin embargo, en el grupo tratado solamente con ibuprofén, se produce a esta hora un marcado aumento de esta citokina con respecto al grupo control (LPS) y los otros dos grupos tratados (IL-1 β murina e IL-1 β murina más ibuprofén), con diferencia estadísticamente significativa.

II.-1a 1ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	20,62	20,4611	10	0	68
GRUPO 2	15,664	11,4658	10	0	32,5
GRUPO 3	19,388	13,5913	10	0	45,88
GRUPO 4	54,604	39,4498	10	21,4	158
GRUPO 5	36,744	28,9517	10	4	82,8

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 4	GRUPO 2	38,940	4,9222	5	$p < 0,01$	4,9025
GRUPO 4	GRUPO 3	35,216	4,4514	4	$p < 0,05$	3,7825
GRUPO 4	GRUPO 1	33,984	4,2957	3	$p < 0,05$	3,4300
GRUPO 4	GRUPO 5	17,860	2,2576	2	NO	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 2	21,080	2,6646	4	NO	3,7825
GRUPO 5	GRUPO 3	17,356	2,1939	3	NO	3,4300
GRUPO 5	GRUPO 1	16,124	2,0381	2	NO	2,8525
GRUPO 1	GRUPO 2	4,9560	0,6264	3	NO	3,4300
GRUPO 1	GRUPO 3	1,2320	0,1557	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 2	3,7240	0,4707	2	NO	2,8525

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

IL-1 α 2ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	25,612	13,6122	10	1,64	41,88
GRUPO 2	111,356	64,9513	10	43,44	196,16
GRUPO 3	39,156	13,0898	10	9,28	50,08
GRUPO 4	55,812	28,1577	10	27,52	125,52
GRUPO 5	42,192	26,8570	10	25,52	117,28

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 2	GRUPO 1	85,744	7,7696	5	$p < 0,01$	4,9025
GRUPO 2	GRUPO 3	72,200	6,5423	4	$p < 0,01$	4,6750
GRUPO 2	GRUPO 5	69,164	6,2672	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 2	GRUPO 4	55,544	5,0331	2	$p < 0,01$	3,8125
GRUPO 4	GRUPO 1	30,200	2,7365	4	NO	3,7825
GRUPO 4	GRUPO 3	16,656	1,5093	3	NO	3,4300
GRUPO 4	GRUPO 5	13,620	1,2342	2	NO	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	16,580	1,5024	3	NO	3,4300
GRUPO 5	GRUPO 3	3,0360	0,2751	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	13,544	1,2273	2	NO	2,8525

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

IL-1 α 4^a HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	36,28	27,0099	10	0	81
GRUPO 2	86,624	34,6777	10	55,44	163,16
GRUPO 3	80,272	35,0505	10	38,28	137,64
GRUPO 4	117,988	23,8165	10	80,04	168,84
GRUPO 5	74,556	30,3052	10	36,48	147,2

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEUL-S

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 4	GRUPO 1	81,708	8,4762	5	p<0,01	4,9025
GRUPO 4	GRUPO 5	43,432	4,5055	4	p<0,05	3,7825
GRUPO 4	GRUPO 3	37,716	3,9125	3	p<0,05	3,4300
GRUPO 4	GRUPO 2	31,364	3,2536	2	p<0,05	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	50,344	5,2225	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 2	GRUPO 5	12,068	1,2519	3	NO	3,4300
GRUPO 2	GRUPO 3	6,3520	0,6589	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	43,992	4,5636	3	p<0,01	3,4375
GRUPO 3	GRUPO 5	5,7160	0,5929	2	NO	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	38,276	3,9706	2	p<0,01	2,8125

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

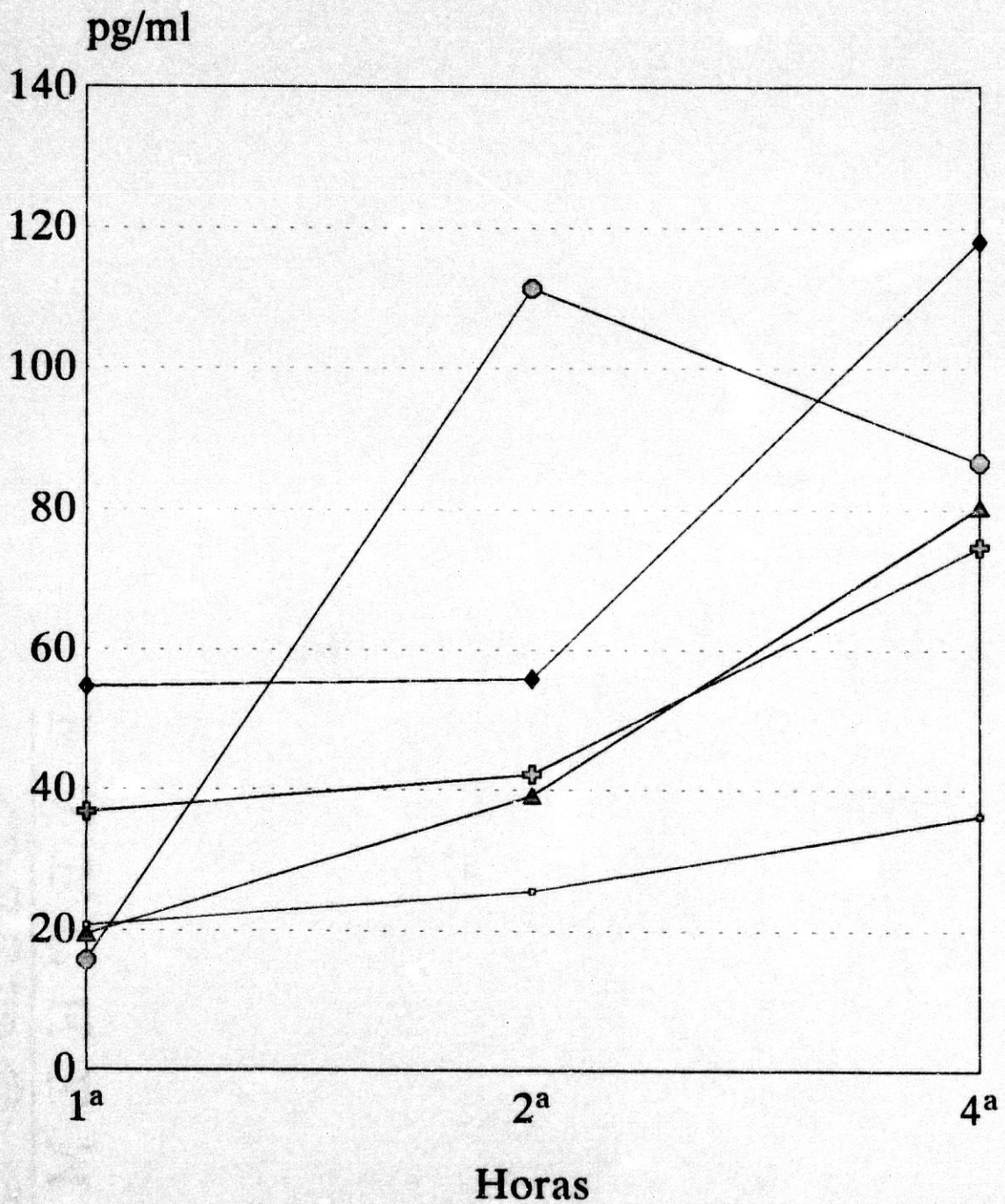
GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

RESULTADOS IL-1 alfa

NIVELES SERICOS



→ SIMULADO ● LPS ▲ IL-1B ◆ IBUPROFEN ✦ IL-1B+IBUPROFEN

5.2 TNF α

A 1ª hora se produce un aumento significativo de TNF α en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado. Este aumento es significativamente mayor en el grupo tratado con IL-1 β murina con respecto a los grupos tratados tanto con ibuprofén como en el éste se asocia con IL-1 β murina, sin existir diferencias con respecto al grupo control (LPS). No se observan diferencias entre el grupo control y los tratados con ibuprofén e IL-1 β murina más ibuprofén, ni entre éstos últimos entre sí.

A 2ª hora persiste un aumento significativo, aunque menor que a la hora anterior, de TNF α en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado. Sin embargo, en el grupo tratado con IL-1 β murina este incremento de TNF α sérico es significativamente menor que en los grupos control y los otros tratados (ibuprofén e IL-1 β murina más ibuprofén). Por otro lado, en el grupo tratado con IL-1 β murina más ibuprofén se produce un mayor aumento de esta citokina con respecto al grupo control y a los grupos tratados con ibuprofén o IL-1 β murina. No se aprecian diferencias entre el grupo control y el tratado solamente con ibuprofén.

Por último, a 4ª hora permanecen significativamente aumentados los niveles séricos de TNF α en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado. Este incremento es significativamente mayor en los grupos tratados con ibuprofén y con ibuprofén más IL-1 β murina (y entre estos dos más en el que se administra sólo ibuprofén) con respecto a los grupos control y el tratado sólo con IL-1 β murina, sin existir diferencias entre estos dos últimos grupos entre sí.

TNF α 1ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	58,72	171,9632	10	0	546,8
GRUPO 2	3908,6	2840,2423	10	226	8415,2
GRUPO 3	5045,96	2681,2852	10	2050,8	9997,6
GRUPO 4	2992,32	502,668	10	2125,2	3910,8
GRUPO 5	2614,56	567,3044	10	2029,6	3467,2

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 3	GRUPO 1	4987,24	8,8550	5	p<0,01	4,9025
GRUPO 3	GRUPO 5	2431,40	4,3170	4	p<0,05	3,7825
GRUPO 3	GRUPO 4	2053,64	3,6463	3	p<0,05	3,4300
GRUPO 3	GRUPO 2	1137,36	2,0194	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	3849,88	6,8356	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 2	GRUPO 5	12,9404	2,2976	3	NO	3,4300
GRUPO 2	GRUPO 4	916,280	1,6269	2	NO	2,8525
GRUPO 4	GRUPO 1	2933,60	5,2087	3	p<0,01	4,3475
GRUPO 4	GRUPO 5	377,760	0,6707	2	NO	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	2555,84	4,5380	2	p<0,01	3,8125

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

TNF α 2ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	24,80	52,7976	10	0	139,6
GRUPO 2	1444,4	509,7249	10	627,2	2183,6
GRUPO 3	1043,32	266,506	10	618	1504,4
GRUPO 4	1474,44	229,6614	10	1113,2	1890,4
GRUPO 5	1806,68	353,4359	10	1331,6	2406

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 5	GRUPO 1	1781,88	17,620	5	p<0,01	4,9025
GRUPO 5	GRUPO 3	763,36	7,5488	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 5	GRUPO 2	362,28	3,5826	3	p<0,05	3,4300
GRUPO 5	GRUPO 4	332,24	3,2855	2	p<0,05	2,8525
GRUPO 4	GRUPO 1	1449,64	14,335	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 4	GRUPO 3	431,12	4,2633	3	p<0,05	3,4300
GRUPO 4	GRUPO 2	30,040	0,2970	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	1419,6	14,038	3	p<0,01	4,3475
GRUPO 2	GRUPO 3	401,08	3,9663	2	p<0,01	3,8125
GRUPO 3	GRUPO 1	1018,52	10,072	2	p<0,01	3,8125

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

TNP: 4ª HORA
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	23,24	53,3895	10	0	161,2
GRUPO 2	682,92	299,1986	10	204	1226,4
GRUPO 3	803,36	293,5161	10	414,4	1550,8
GRUPO 4	1355,32	338,0098	10	759,6	1814,4
GRUPO 5	1097	298,179	10	736	1626

ANALISIS ESTADISTICO
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 4	GRUPO 1	1332,08	15,246	5	$p < 0,01$	4,9025
GRUPO 4	GRUPO 2	672,40	7,6959	4	$p < 0,01$	4,6750
GRUPO 4	GRUPO 3	551,96	6,3174	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 4	GRUPO 5	258,32	2,9566	2	$p < 0,05$	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	1073,76	12,289	4	$p < 0,01$	4,6750
GRUPO 5	GRUPO 2	414,08	4,7393	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 5	GRUPO 3	293,64	3,3608	2	$p < 0,05$	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	780,12	8,9288	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 3	GRUPO 2	120,44	1,3785	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	659,68	7,5503	2	$p < 0,01$	3,8125

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

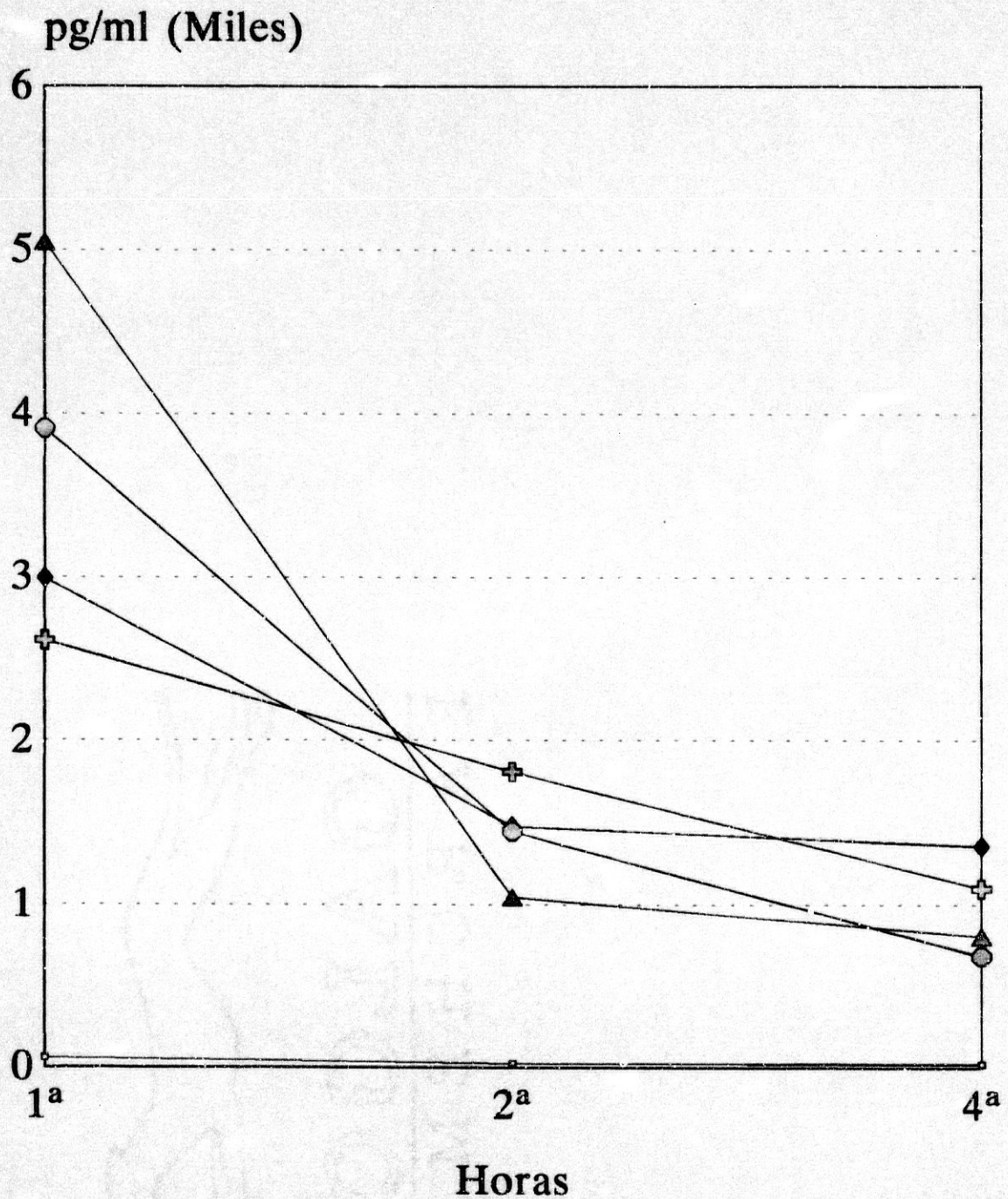
GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

RESULTADOS TNF alfa

NIVELES SERICOS



◻ SIMULADO ◉ LPS ▲ IL-1 β ◆ IBUPROFEN ⊕ IL-1 β +IBUPROFEN

5.3 IL-2

A 1ª hora, solamente se observa un aumento significativo de los niveles séricos de IL-2 en el grupo tratado con IL-1 β murina más ibuprofén con respecto a todos los grupos restantes (simulado, control (LPS), IL-1 β murina e ibuprofén), sin existir diferencias significativas al comparar éstos grupos entre sí.

A 2ª hora se produce un aumento significativo de los niveles en suero de esta citokina en todos los grupos tratados (IL-1 β murina, ibuprofén e IL-1 β murina más ibuprofén; sin existir diferencias significativas entre ellos), solamente con respecto al grupo simulado. En el grupo control no se aprecian diferencias significativas al compararlo tanto con el grupo simulado como con todos los grupos tratados.

Por último, a la 4ª hora se evidencia un aumento significativo de IL-2 en suero en todos los grupos tratados (IL-1 β murina, ibuprofén e IL-1 β murina más ibuprofén) con respecto al grupo simulado, así como un aumento de los niveles séricos de esta citokina en el grupo tratado con las dos drogas con respecto al grupo control y a los grupos tratados con ambas drogas de forma aislada. Igualmente, no aparecen diferencias entre el grupo simulado con el control ni entre éste con respecto a los grupos tratados con IL-1 β murina o con ibuprofén.

IL-2 1ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	17,73	20,1515	10	0	57,1
GRUPO 2	28,58	34,8662	10	0	108,8
GRUPO 3	52,89	51,0331	10	0	175,5
GRUPO 4	74,65	65,6216	10	0	192,5
GRUPO 5	227,76	259,8026	10	61,9	929

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 5	GRUPO 1	210,03	5,3861	5	p<0,01	4,9025
GRUPO 5	GRUPO 2	199,18	5,1079	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 5	GRUPO 3	174,87	4,4844	3	p<0,01	4,3475
GRUPO 5	GRUPO 4	153,11	3,9264	2	p<0,01	3,8125
GRUPO 4	GRUPO 1	56,92	1,4597	4	NO	3,7825
GRUPO 4	GRUPO 2	46,07	1,1814	3	NO	3,4300
GRUPO 4	GRUPO 3	21,76	0,5580	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	35,16	0,9016	3	NO	3,4300
GRUPO 3	GRUPO 2	24,31	0,6234	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	10,85	0,2782	2	NO	2,8525

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

IL-2 2ª HORA
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	5,5	7,7305	10	0	18,8
GRUPO 2	47,96	38,2017	10	6,9	109,4
GRUPO 3	60,52	54,889	10	0	139,2
GRUPO 4	92,5	68,167	10	16,2	192,5
GRUPO 5	98,4	47,906	10	31,1	164,3

ANALISIS ESTADISTICO
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 5	GRUPO 1	92,94	5,8468	5	p<0,01	4,9245
GRUPO 5	GRUPO 2	50,48	3,2583	4	NO	3,7885
GRUPO 5	GRUPO 3	37,92	2,3855	3	NO	3,4380
GRUPO 5	GRUPO 4	5,94	0,3739	2	NO	2,8525
GRUPO 4	GRUPO 1	87	5,4728	4	p<0,01	4,6950
GRUPO 4	GRUPO 2	44,54	2,8746	3	NO	3,4380
GRUPO 4	GRUPO 3	31,97	2,0116	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	55,02	3,4612	3	p<0,05	3,4380
GRUPO 3	GRUPO 2	12,56	0,8107	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	42,46	2,7404	2	NO	2,8525

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

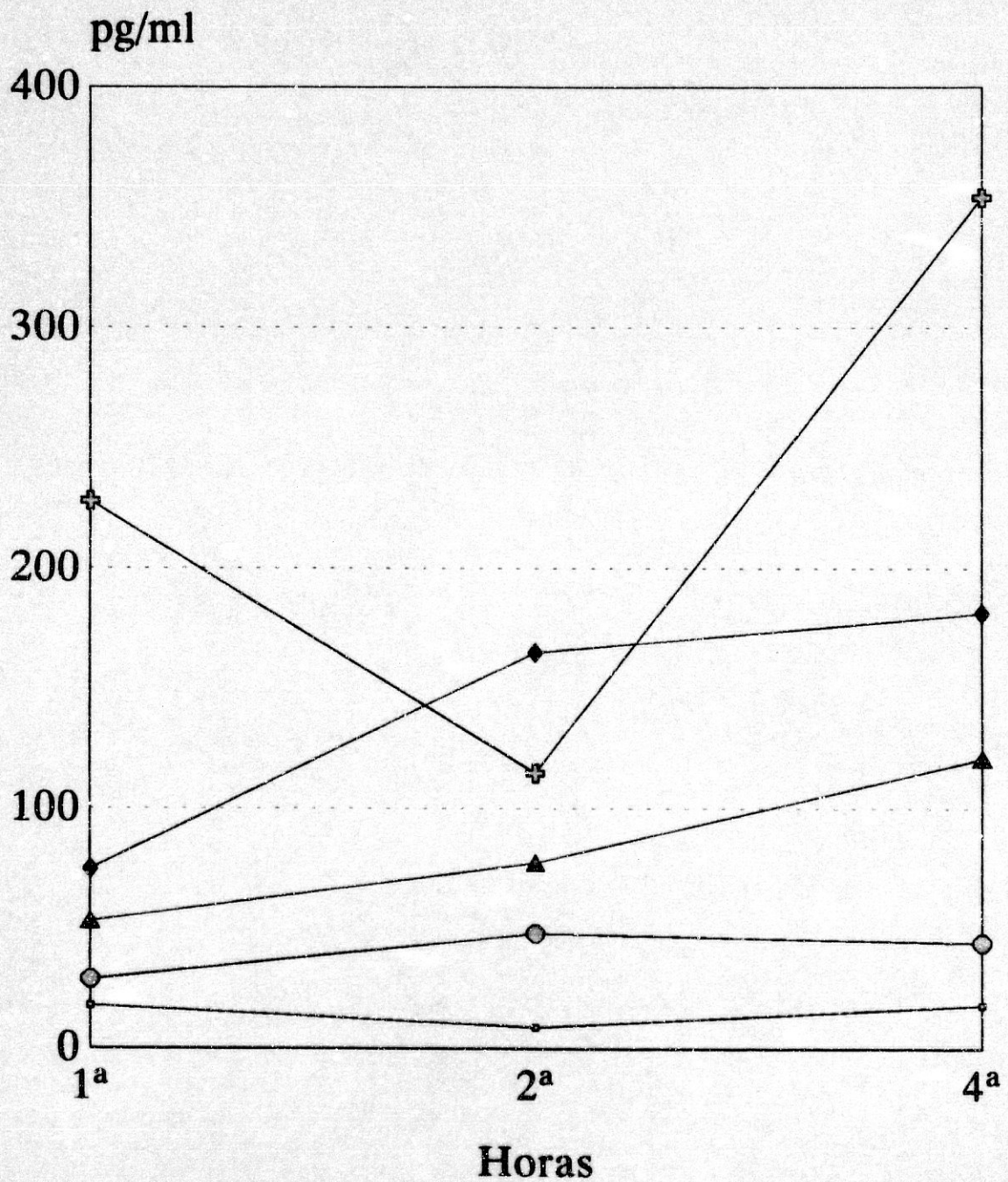
GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

RESULTADOS IL-2

NIVELES SERICOS



—○— SIMULADO —●— LPS —▲— IL-1B —◆— IBUPROFEN —⊕— IL-1B+IBUPROFEN

IL-2 4ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	2,9	4,727	10	0	10,9
GRUPO 2	32,48	25,124	10	6,3	76,9
GRUPO 3	117,62	61,360	10	40,2	250
GRUPO 4	136,76	71,4	10	14,4	273
GRUPO 5	315,38	225,161	10	71	666,8

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 5	GRUPO 1	312,48	9,1028	5	p<0,01	4,908
GRUPO 5	GRUPO 2	288,90	8,2412	4	p<0,01	4,68
GRUPO 5	GRUPO 3	197,76	5,7611	3	p<0,01	4,352
GRUPO 5	GRUPO 4	178,72	5,2035	2	p<0,01	3,816
GRUPO 4	GRUPO 1	133,86	4,0062	4	p<0,05	3,784
GRUPO 4	GRUPO 2	104,28	3,1209	3	NO	3,432
GRUPO 4	GRUPO 3	19,14	0,5728	2	NO	2,854
GRUPO 3	GRUPO 1	114,72	3,4334	3	p<0,05	3,432
GRUPO 3	GRUPO 2	85,14	2,5481	2	NO	2,854
GRUPO 2	GRUPO 1	29,58	0,8852	2	NO	2,854

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

5.4 IL-6.

A 1ª hora, se observa un aumento significativo de los niveles en suero de IL-6 en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado. No existen diferencias significativas en este incremento entre el grupo control con respecto a los tres grupos tratados. Sin embargo, el aumento de esta citokina es significativamente mayor en el grupo tratado con ibuprofén con respecto a los tratados con IL-1 β murina o con ambas drogas, sin existir diferencia entre estos dos últimos grupos.

A 2ª hora se sigue apreciando un aumento significativo de IL-6 en suero en todos los grupos respecto al grupo simulado, incrementándose sus valores respecto a la hora anterior. Sin embargo, este incremento es significativamente menor en el grupo tratado con ibuprofén respecto al grupo control y al tratado con IL-1 β murina, sin existir diferencias al comparar estos dos últimos grupos entre sí ni entre el grupo tratado con ambas drogas y el grupo control o los tratados con IL-1 β murina o ibuprofén.

Por último, a 4ª hora persiste un aumento significativo de esta citokina en todos los grupos respecto al grupo simulado, incrementándose sus valores comparados con la hora anterior excepto en el grupo tratado con IL-1 β murina. Así, este incremento es significativamente menor en el grupo tratado con IL-1 β murina respecto al grupo control y a los otros dos grupos tratados; y significativamente mayor en los grupos tratados con ibuprofén o con esta droga más IL-1 β murina (siendo mayor en el grupo tratado sólo con ibuprofén) con respecto al grupo control.

IL-6 1ª HORA
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	2467,77	117,4903	10	102,5	481,4
GRUPO 2	39064,4	15137,987	10	30479	80767
GRUPO 3	18842,8	15087,429	10	6533	50168
GRUPO 4	55223,9	39018,696	10	21965	145334
GRUPO 5	232424	7069,0898	10	12741	34559

ANALISIS ESTADISTICO
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 4	GRUPO 1	54976,13	8,6296	5	$p < 0,01$	4,9025
GRUPO 4	GRUPO 3	36381,1	5,7108	4	$p < 0,01$	4,6750
GRUPO 4	GRUPO 5	31981,9	5,0202	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 4	GRUPO 2	16159,5	2,5366	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	38816,63	6,0931	4	$P < 0,01$	4,6750
GRUPO 2	GRUPO 3	20221,6	3,1742	3	NO	3,4300
GRUPO 2	GRUPO 5	15822,4	2,4837	2	NO	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	22994,23	3,6094	3	$P < 0,05$	3,4300
GRUPO 5	GRUPO 3	4399,2	0,6905	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	18595,03	2,9189	2	$P < 0,05$	2,8525

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

IL-6 2ª HORA
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	196,16	193,5339	10	59,5	711
GRUPO 2	130992,3	49191,339	10	44003	197928
GRUPO 3	126611,2	36071,478	10	25246	146487
GRUPO 4	88101,7	15343,487	10	68173	117662
GRUPO 5	100314,3	21106,902	10	62940	134247

ANALISIS ESTADISTICO
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 2	GRUPO 1	130796,14	13,939	5	$p < 0,01$	4,9025
GRUPO 2	GRUPO 4	42890,6	4,5712	4	$p < 0,05$	3,7825
GRUPO 2	GRUPO 5	30678	3,2696	3	NO	3,4300
GRUPO 2	GRUPO 3	4381,1	0,4669	2	NO	2,8525
GRUPO 3	GRUPO 1	126415,04	13,473	4	$p < 0,01$	4,6750
GRUPO 3	GRUPO 4	38509,5	4,1042	3	$p < 0,05$	3,4300
GRUPO 3	GRUPO 5	26296,9	2,8027	2	NO	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	100118,14	10,670	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 5	GRUPO 4	12212,6	1,3016	2	NO	2,8525
GRUPO 4	GRUPO 1	87905,54	9,3687	2	$p < 0,01$	3,8125

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

IL-6 4ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	104,36	80,2998	10	21,9	237,7
GRUPO 2	156225,2	37718,556	10	56111	185511
GRUPO 3	100970,7	20320,041	10	69858	146576
GRUPO 4	207508,5	16208,176	10	172030	230122
GRUPO 5	180100,8	21823,767	10	133183	203870

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 4	GRUPO 1	207404,14	28,903	5	p<0,01	4,9025
GRUPO 4	GRUPO 3	106537,8	14,846	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 4	GRUPO 2	51283,3	7,1467	3	p<0,01	4,3475
GRUPO 4	GRUPO 5	27407,7	3,8195	2	p<0,01	3,8125
GRUPO 5	GRUPO 1	179996,44	25,083	4	p<0,01	4,6750
GRUPO 5	GRUPO 3	79130,1	11,027	3	p<0,01	4,3475
GRUPO 5	GRUPO 2	23875,6	3,3273	2	p<0,05	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	156120,84	21,756	3	p<0,01	4,3475
GRUPO 2	GRUPO 3	55254,5	7,7002	2	p<0,01	3,8125
GRUPO 3	GRUPO 1	100866,34	14,056	2	p<0,01	3,8125

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

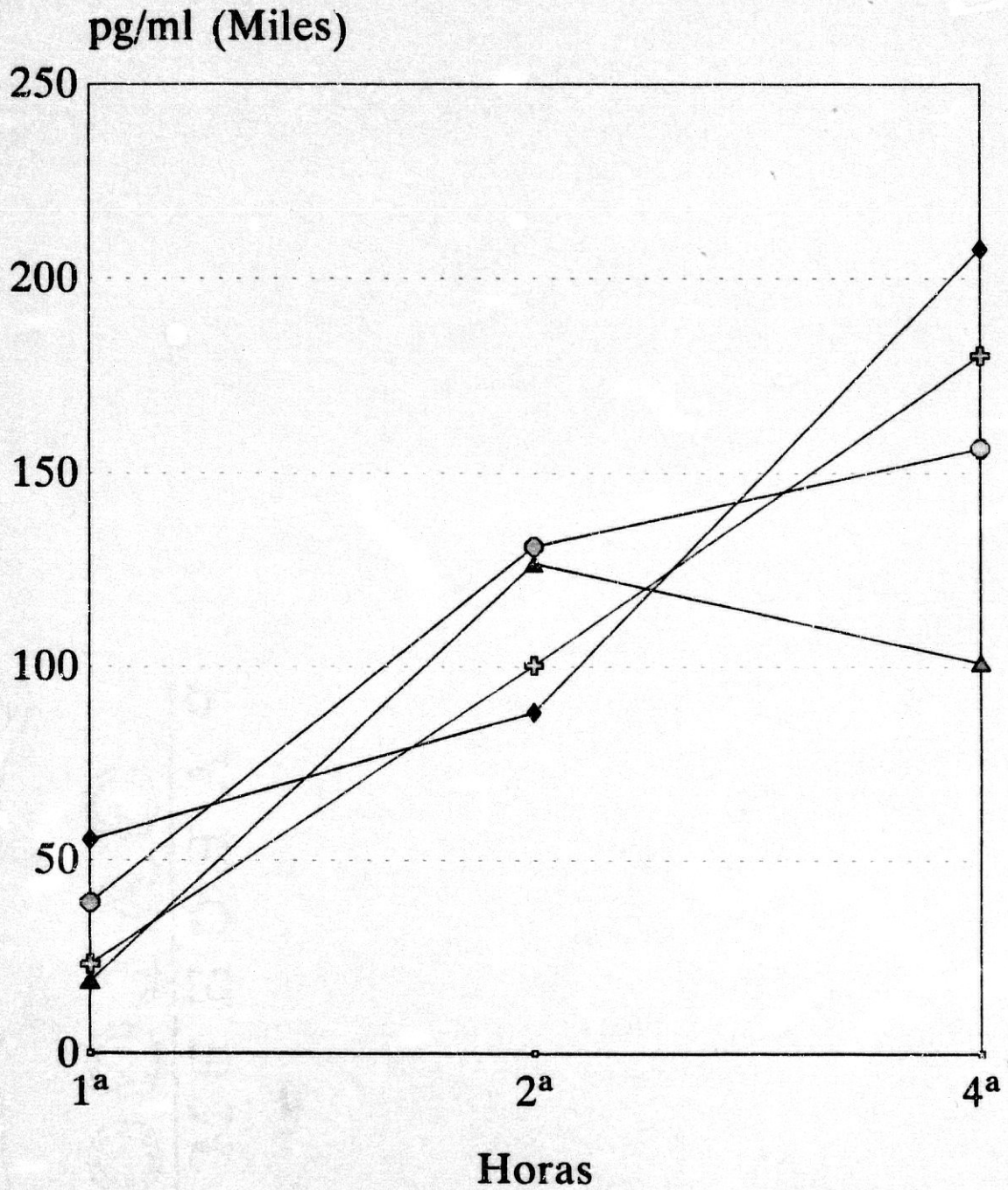
GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

RESULTADOS IL-6

NIVELES SERICOS



—○— SIMULADO ● LPS ▲ IL-1β ◆ IBUPROFEN ⊕ IL-1β+IBUPROFEN

5.5 PGE₂.

A 4ª hora se evidencia un aumento significativo de los niveles en orina de PGE₂, tanto en el grupo control (LPS) como en los grupos tratados con IL-1β murina o con ibuprofén con respecto al grupo simulado, sin existir diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en el grupo tratado conjuntamente con IL-1β murina e ibuprofén se produce un descenso significativo de PGE₂, con respecto al grupo control y los otros dos grupos tratados, sin evidenciarse diferencias con el grupo simulado.

A 8ª hora sigue existiendo un aumento significativo de PGE₂, tanto en el grupo control como en el tratado con IL-1β murina con respecto al grupo simulado, sin producirse diferencias significativas entre estos dos grupos. Sin embargo, a esta hora se produce un descenso significativo de PGE₂, en el grupo tratado con ibuprofén y también en el que esta droga se asocia con IL-1β murina con respecto al grupo control y al tratado sólo con IL-1β murina, sin existir diferencias significativas entre aquellos grupos y permaneciendo los valores de PGE₂, a un nivel similar al del grupo simulado.

Por último, a la 12ª hora los valores de PGE₂, en orina permanecen significativamente elevados en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado, sin existir en este momento diferencias significativas al comparar todos estos grupos problema entre sí.

PGE, 4ª HORA
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	2007,4	196,8277	10	1800	2350
GRUPO 2	5200	2149,9354	10	2500	7500
GRUPO 3	6350	2245,9841	10	3250	8500
GRUPO 4	5370	2455,7416	10	2600	8000
GRUPO 5	3245	830,1439	10	2050	4000

ANALISIS ESTADISTICO
PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 3	GRUPO 1	4342,6	7,5767	5	$p < 0,01$	4,9025
GRUPO 3	GRUPO 5	3105	5,4174	4	$p < 0,01$	4,6750
GRUPO 3	GRUPO 2	1150	2,0064	3	NO	3,43
GRUPO 3	GRUPO 4	980	1,7098	2	NO	2,8525
GRUPO 4	GRUPO 1	3362,6	5,8668	4	$p < 0,05$	4,675
GRUPO 4	GRUPO 5	2125	3,7076	3	$p < 0,05$	3,43
GRUPO 4	GRUPO 2	170	0,2966	2	NO	2,8525
GRUPO 2	GRUPO 1	3192,6	5,5702	3	$p < 0,01$	4,3475
GRUPO 2	GRUPO 5	1953	3,4110	2	$p < 0,05$	2,8525
GRUPO 5	GRUPO 1	1237,6	2,1593	2	NO	2,8525

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

Alfonso Mansilla Roselló

PGE, 8ª HORA
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	2030	151,2907	10	1850	2300
GRUPO 2	6060	806,1569	10	5250	7500
GRUPO 3	6310	1411,2248	10	3750	7500
GRUPO 4	1600	1037,6255	10	450	3100
GRUPO 5	2130	214,9935	10	1800	2500

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 3	GRUPO 4	4710	17,113	5	$p < 0,01$	4,902
GRUPO 3	GRUPO 1	4280	15,551	4	$p < 0,01$	4,675
GRUPO 3	GRUPO 5	4180	15,188	3	$p < 0,01$	4,347
GRUPO 3	GRUPO 2	250	0,9083	2	NO	2,852
GRUPO 2	GRUPO 4	4460	16,205	4	$p < 0,01$	4,675
GRUPO 2	GRUPO 1	4030	14,643	3	$p < 0,01$	4,347
GRUPO 2	GRUPO 5	3930	14,279	2	$p < 0,01$	3,812
GRUPO 5	GRUPO 4	530	1,5258	3	NO	3,43
GRUPO 5	GRUPO 1	100	0,3633	2	NO	2,852
GRUPO 1	GRUPO 4	430	1,5224	2	NO	2,852

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

PGE₂ 12ª HORA

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	1890	238,9793	10	1650	2300
GRUPO 2	4410	2177,2562	10	2300	7000
GRUPO 3	4175	1269,569	10	2750	5750
GRUPO 4	3145	1187,5395	10	1500	4750
GRUPO 5	3660	1139,883	10	2100	4750

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 2	GRUPO 1	2520	5,9008	5	p<0,01	4,23
GRUPO 2	GRUPO 4	1265	2,9621	4	NO	3,96
GRUPO 2	GRUPO 5	750	1,7562	3	NO	3,58
GRUPO 2	GRUPO 3	235	0,5502	2	NO	2,95
GRUPO 3	GRUPO 1	2285	5,3506	4	p<0,01	3,96
GRUPO 3	GRUPO 4	1030	2,4118	3	NO	3,58
GRUPO 3	GRUPO 5	315	1,2059	2	NO	2,95
GRUPO 5	GRUPO 1	1770	4,1416	3	p<0,05	3,58
GRUPO 5	GRUPO 4	515	1,2059	2	NO	2,95
GRUPO 4	GRUPO 1	1255	2,9387	2	p<0,05	2,95

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

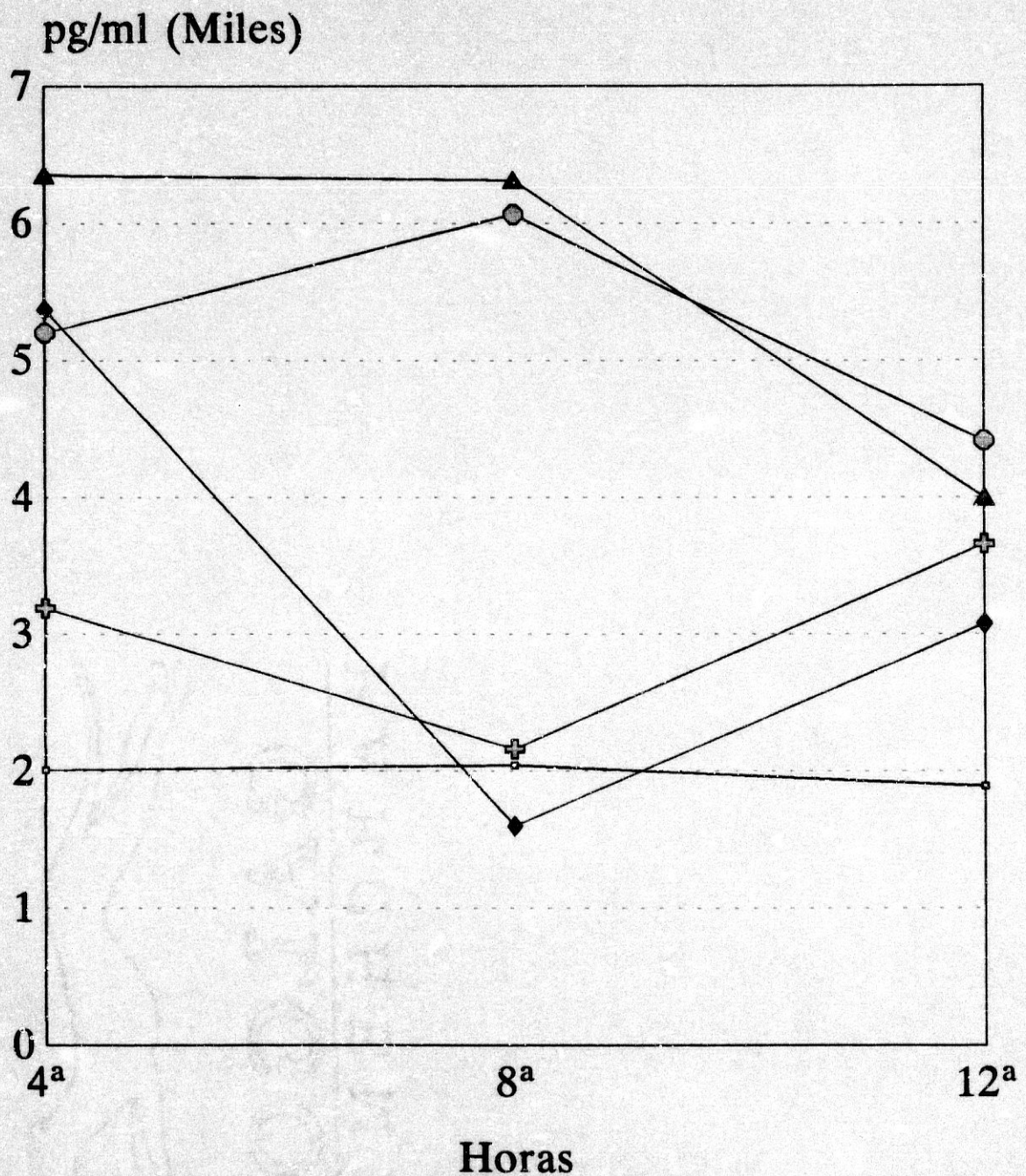
GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

Alfonso Mansilla Roselló

RESULTADOS PGE₂

NIVELES EN ORINA



— SIMULADO ● LPS ▲ IL-1B ◆ IBUPROFEN ⊕ IL-1B+IBUPROFEN

5.6 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

En cuanto al número total de leucocitos/ μ l a las 24 horas de inducido el estado séptico experimental, se observa que se produce una disminución significativa del mismo tanto en el grupo control como en los grupos tratados con ibuprofén o cuando éste se asocia a IL-1 β murina con respecto al grupo simulado, sin evidenciarse diferencias entre estos grupos. Por contra, en el grupo tratado sólo con IL-1 β murina el número total de leucocitos/ μ l es muy similar al del grupo simulado, siendo a su vez significativamente mayor que al del grupo control.

Con respecto al número total de linfocitos/ μ l, se produce una marcada y significativa disminución del mismo a las 24 horas en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado. Sin embargo este descenso es significativamente menor en el grupo tratado con IL-1 β murina con respecto al grupo control y al tratado conjuntamente con ambas drogas. No se evidencian diferencias significativas entre los otros dos grupos tratados ni al enfrentarse éstos con el grupo control.

Por último, en el estudio de la subpoblaciones linfocitarias a las 24 horas se observa que el porcentaje de linfocitos CD4 aumenta significativamente en todos los grupos problema con respecto al grupo simulado, sin apreciarse diferencias al comparar estos grupos entre sí. Sin embargo, en el porcentaje de linfocitos CD8 se produce un descenso significativo del mismo tanto en el grupo tratado con IL-1 β murina como en el que esta droga se asocia con ibuprofén, sin existir diferencias entre ellos, con respecto al grupo control y al grupo tratado sólo con

ibuprofén. Dicho descenso en ambos grupos incluso llega a ser significativo al compararlo con el grupo simulado. Por contra, tanto en el grupo control como en el tratado sólo con ibuprofén, se produce un incremento significativo de este porcentaje al compararlo con el grupo simulado, sin apreciarse diferencias entre ellos mismos. De esta forma, el índice CD4/CD8 permanece aumentado de forma significativa tanto en el grupo tratado con IL-1 β murina como en el que ésta se asocia a ibuprofén con respecto a los otros tres grupos y sin existir diferencias entre los dos primeros. No existen diferencias significativas en este índice entre el grupo control y el tratado sólo con ibuprofén, permaneciendo en valores indiferenciables al del grupo simulado.

LEUCOCITOS TOTALES/ μ l
ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	4220	162,3268	10	3980	4390
GRUPO 2	2415,5556	411,9803	10	1920	2980
GRUPO 3	3505,5556	1074,4663	10	1930	5570
GRUPO 4	2908,75	871,5739	10	1660	4160
GRUPO 5	2920	616,6239	10	1960	4200

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 1	GRUPO 2	1804,4444	6,2	5	$p < 0,01$	4,23
GRUPO 1	GRUPO 4	1311,25	4,4081	4	$p < 0,05$	3,96
GRUPO 1	GRUPO 5	1300	4,4668	3	$p < 0,01$	3,58
GRUPO 1	GRUPO 3	714,4444	2,4548	2	NO	2,95
GRUPO 3	GRUPO 2	1090	4,4314	4	$p < 0,01$	3,96
GRUPO 3	GRUPO 4	596,8056	2,3539	3	NO	3,58
GRUPO 3	GRUPO 5	585,5556	2,3806	2	NO	2,95
GRUPO 5	GRUPO 2	504,4444	2,0508	3	NO	3,58
GRUPO 5	GRUPO 4	11,25	0,0443	2	NO	2,95
GRUPO 4	GRUPO 2	493,1944	1,9452	2	NO	2,95

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

LINFOCITOS TOTALES/ μ l

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	3024	204,5238	10	2830	3320
GRUPO 2	432,2222	244,7334	10	230	1000
GRUPO 3	671,1111	301,1829	10	200	1200
GRUPO 4	427,5	242,4724	10	200	890
GRUPO 5	263,3333	84,8528	10	180	430

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 1	GRUPO 5	2760,6667	30,517	5	$p < 0,01$	4,99
GRUPO 1	GRUPO 4	2596,5	28,082	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 1	GRUPO 2	2591,7778	28,650	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 1	GRUPO 3	2352,8889	26,009	2	$p < 0,01$	3,86
GRUPO 3	GRUPO 5	407,7778	5,3335	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 3	GRUPO 4	243,6111	3,0912	3	NO	3,465
GRUPO 3	GRUPO 2	238,8889	3,1245	2	$p < 0,05$	2,875
GRUPO 2	GRUPO 5	168,8889	2,2090	3	NO	3,465
GRUPO 2	GRUPO 4	4,7772	0,0599	2	NO	2,875
GRUPO 4	GRUPO 5	164,1667	2,0831	2	NO	2,875

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

LINFOCITOS CD4/ μ l

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	36,2	5,6745	10	30	44
GRUPO 2	62,425	8,4496	10	53,5	79,1
GRUPO 3	69,0667	9,6395	10	47,5	80
GRUPO 4	61,3667	10,2027	10	50,9	77,8
GRUPO 5	62,8889	16,2201	10	23,2	77,8

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 3	GRUPO 1	32,8667	7,51	5	$p < 0,01$	4,99
GRUPO 3	GRUPO 4	7,7	2,0818	4	NO	3,82
GRUPO 3	GRUPO 2	6,6417	1,742	3	NO	3,465
GRUPO 3	GRUPO 5	6,1778	1,6702	2	NO	2,875
GRUPO 5	GRUPO 1	26,6889	6,0983	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 5	GRUPO 4	1,5222	0,4115	3	NO	3,465
GRUPO 5	GRUPO 2	0,46389	0,1216	2	NO	2,875
GRUPO 2	GRUPO 1	26,225	5,8629	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 2	GRUPO 4	1,0583	2,2775	2	NO	2,875
GRUPO 4	GRUPO 1	25,1667	5,7505	2	$p < 0,01$	3,86

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

§ LINFOCITOS CD8/ μ 1

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	10,8	1,9235	10	9	14
GRUPO 2	15,075	1,6909	10	12,5	17,6
GRUPO 3	7,3889	3,8754	10	3	14,7
GRUPO 4	16,1778	3,5713	10	10,4	20,7
GRUPO 5	5,7222	1,4228	10	3,7	8,4

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 4	GRUPO 5	10,4556	11,227	5	$p < 0,01$	4,99
GRUPO 4	GRUPO 3	8,7889	9,4374	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 4	GRUPO 1	5,3778	4,8804	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 4	GRUPO 2	1,1028	1,1488	2	NO	2,875
GRUPO 2	GRUPO 5	9,3528	9,7431	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 2	GRUPO 3	7,6861	8,0068	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 2	GRUPO 1	4,275	3,7958	2	$p < 0,05$	2,875
GRUPO 1	GRUPO 5	5,0878	4,6082	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 1	GRUPO 3	3,4111	3,0956	2	$p < 0,05$	2,875
GRUPO 3	GRUPO 5	1,6667	1,7896	2	NO	2,875

GRUPO 1= SIMULADO

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

INDICE CD4/CD8

ESTADISTICA BASICA

NOMBRE	MEDIA	DESV. TIP.	TAMAÑO	MINIMO	MAXIMO
GRUPO 1	3,414	0,82673	10	2,72	4,8
GRUPO 2	4,1637	0,66899	10	3,31	5,23
GRUPO 3	11,9022	5,784	10	4,55	22,4
GRUPO 4	4,1122	1,6985	10	2,61	7,48
GRUPO 5	11,2378	3,3513	10	6,27	16,87

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA DE NEWMAN-KEULS

VARIABLE 1	VARIABLE 2	DIFERENCIA	Q EXP.	R	Niv. Sig.	Q TEOR.
GRUPO 3	GRUPO 1	8,4882	6,477	5	$p < 0,01$	4,99
GRUPO 3	GRUPO 4	7,79	7,0333	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 3	GRUPO 2	7,3585	6,7781	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 3	GRUPO 5	0,66444	0,5999	2	NO	2,875
GRUPO 5	GRUPO 1	7,8238	5,97	4	$p < 0,01$	4,75
GRUPO 5	GRUPO 4	7,1256	6,4334	3	$p < 0,01$	4,415
GRUPO 5	GRUPO 2	7,074	6,1962	2	$p < 0,01$	3,86
GRUPO 2	GRUPO 1	0,74975	0,5597	3	NO	3,465
GRUPO 2	GRUPO 4	0,051528	0,0451	2	NO	2,875
GRUPO 4	GRUPO 1	0,69822	0,5327	2	NO	2,875

GRUPO 1= SIMULADO

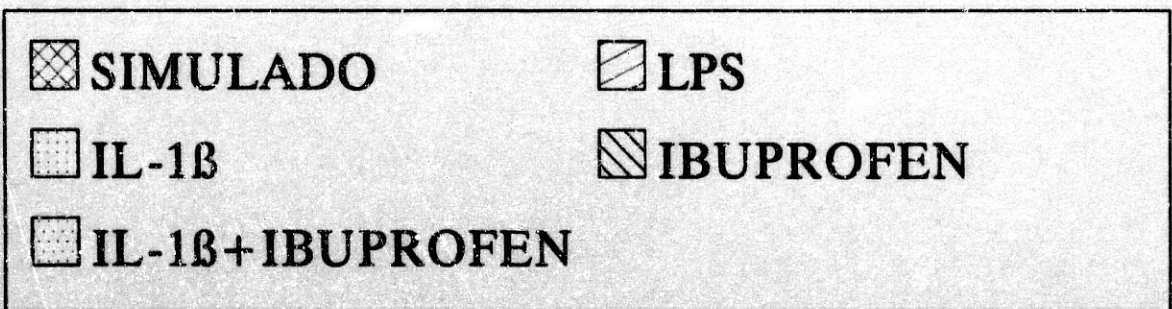
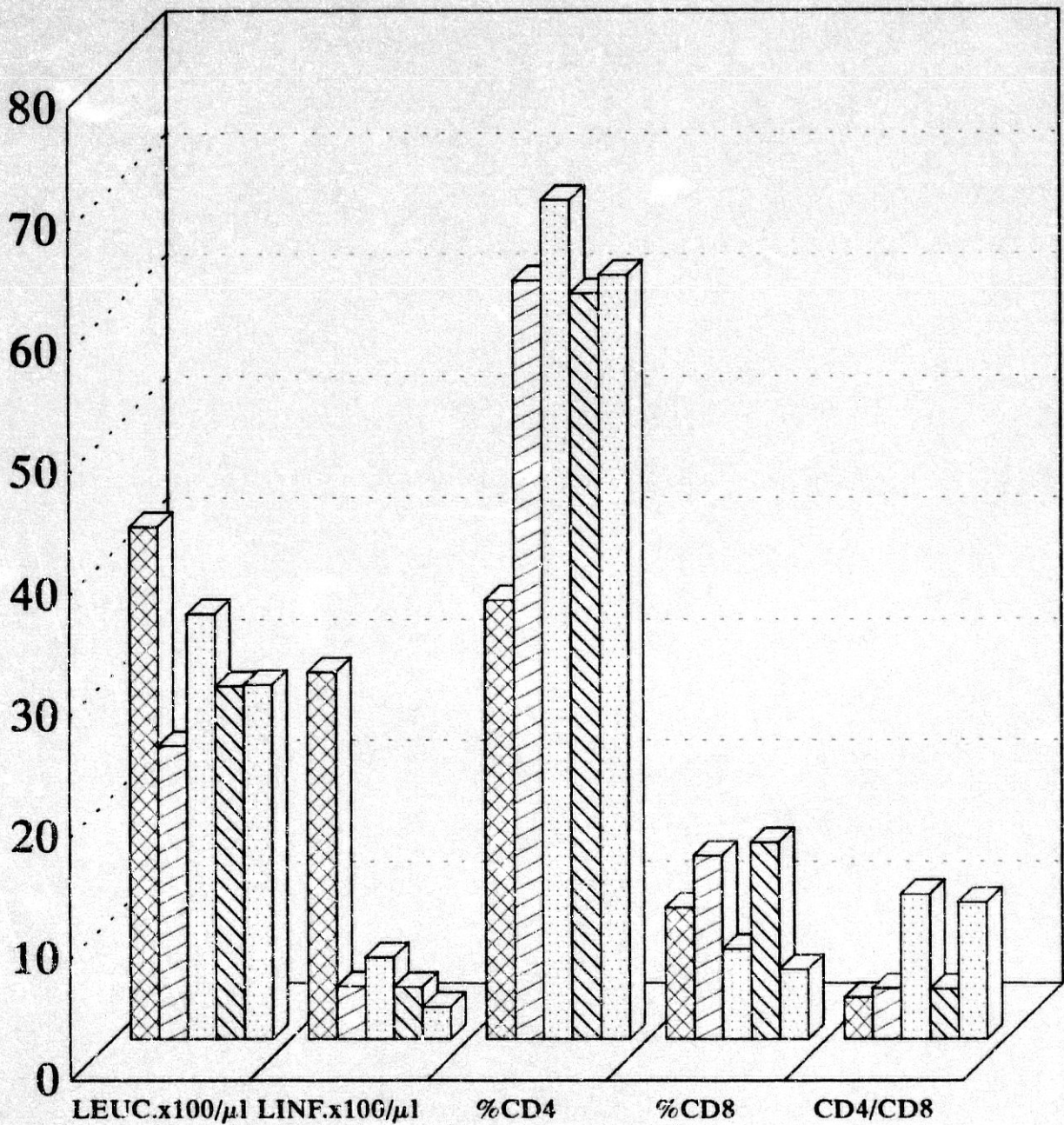
GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

RESULTADOS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS



5.7 MORTALIDAD.

Se observa como en todos los grupos tratados se produce un descenso significativo de la mortalidad con respecto al grupo control (LPS).

Esta disminución del índice de mortalidad es significativa tanto a las 24 como a las 48 horas en todos los grupos tratados al compararlos con el grupo control.

A las 72 horas sigue siendo significativo el descenso de la mortalidad en los grupos tratados con IL-1 β murina y en el que ésta se asocia con ibuprofén con respecto al grupo control. En este momento no ocurre lo mismo con el grupo tratado sólo con ibuprofén, en el cual no se aprecian diferencias significativas al compararlo con el grupo control.

Por último, a las 96 horas existe un marcado y significativo descenso de la mortalidad en todos los grupos con respecto al grupo control.

En ningún momento se evidencian diferencias significativas entre los tres grupos tratados al compararlos entre sí.

MORTALIDAD**NUMERO DE MUERTES/HORAS**

GRUPO	N	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
GRUPO 2	10	4	3	2	1
GRUPO 3	10	0	2	1	0
GRUPO 4	10	0	0	4	0
GRUPO 5	10	0	1	1	0

% MORTALIDAD/HORAS

GRUPO	N	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	TOTAL
GRUPO 2	10	40%	30%	10%	20%	100%
GRUPO 3	10	0%	20%	10%	0%	30%
GRUPO 4	10	0%	0%	40%	0%	40%
GRUPO 5	10	0%	10%	10%	0%	20%

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

MORTALIDAD A LAS 24 HORAS

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA EXACTA DE FISHER

VARIABLE 1	VARIABLE 2	N	R.P.*	Err. Est.*	Niv. Sig.
GRUPO 2	GRUPO 3	10	0	0	$p < 0,05$
GRUPO 2	GRUPO 4	10	0	0	$p < 0,05$
GRUPO 2	GRUPO 5	10	0	0	$p < 0,05$
GRUPO 3	GRUPO 4	10	-	-	NO SIG.
GRUPO 3	GRUPO 5	10	-	-	NO SIG.
GRUPO 4	GRUPO 5	10	-	-	NO SIG.

MORTALIDAD A LAS 48 HORAS

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA EXACTA DE FISHER

VARIABLE 1	VARIABLE 2	N	R.P.*	Err. Est.*	Niv. Sig.
GRUPO 2	GRUPO 3	10	9,33	9,79	$p < 0,05$
GRUPO 2	GRUPO 4	10	0	0	$p < 0,01$
GRUPO 2	GRUPO 5	10	21	26,45	$p < 0,01$
GRUPO 3	GRUPO 4	10	0	0	NO SIG.
GRUPO 3	GRUPO 5	10	2,25	2,96	NO SIG.
GRUPO 4	GRUPO 5	10	0	0	NO SIG.

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-1 β murina

GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-1 β murina+IBUPROFEN

* Razón de Predominio

* Error Estándar

MORTALIDAD A LAS 72 HORAS

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA EXACTA DE FISHER

VARIABLE 1	VARIABLE 2	N	R.P.*	Err. Est.*	Niv. Sig.
GRUPO 2	GRUPO 3	10	9,33	9,79	p<0,05
GRUPO 2	GRUPO 4	10	6	6,12	NO SIG.
GRUPO 2	GRUPO 5	10	16	17,88	p<0,01
GRUPO 3	GRUPO 4	10	0,64	0,70	NO SIG.
GRUPO 3	GRUPO 5	10	1,71	1,79	NO SIG.
GRUPO 4	GRUPO 5	10	2,66	2,72	NO SIG.

MORTALIDAD A LAS 96 HORAS

ANALISIS ESTADISTICO

PRUEBA EXACTA DE FISHER

VARIABLE 1	VARIABLE 2	N	R.P.*	Err. Est.*	Niv. Sig.
GRUPO 2	GRUPO 3	10	0	0	p<0,01
GRUPO 2	GRUPO 4	10	0	0	p<0,01
GRUPO 2	GRUPO 5	10	0	0	p<0,01
GRUPO 3	GRUPO 4	10	0,64	0,70	NO SIG.
GRUPO 3	GRUPO 5	10	1,71	1,79	NO SIG.
GRUPO 4	GRUPO 5	10	2,66	2,72	NO SIG.

GRUPO 2= LPS

GRUPO 3= LPS+IL-18 murina

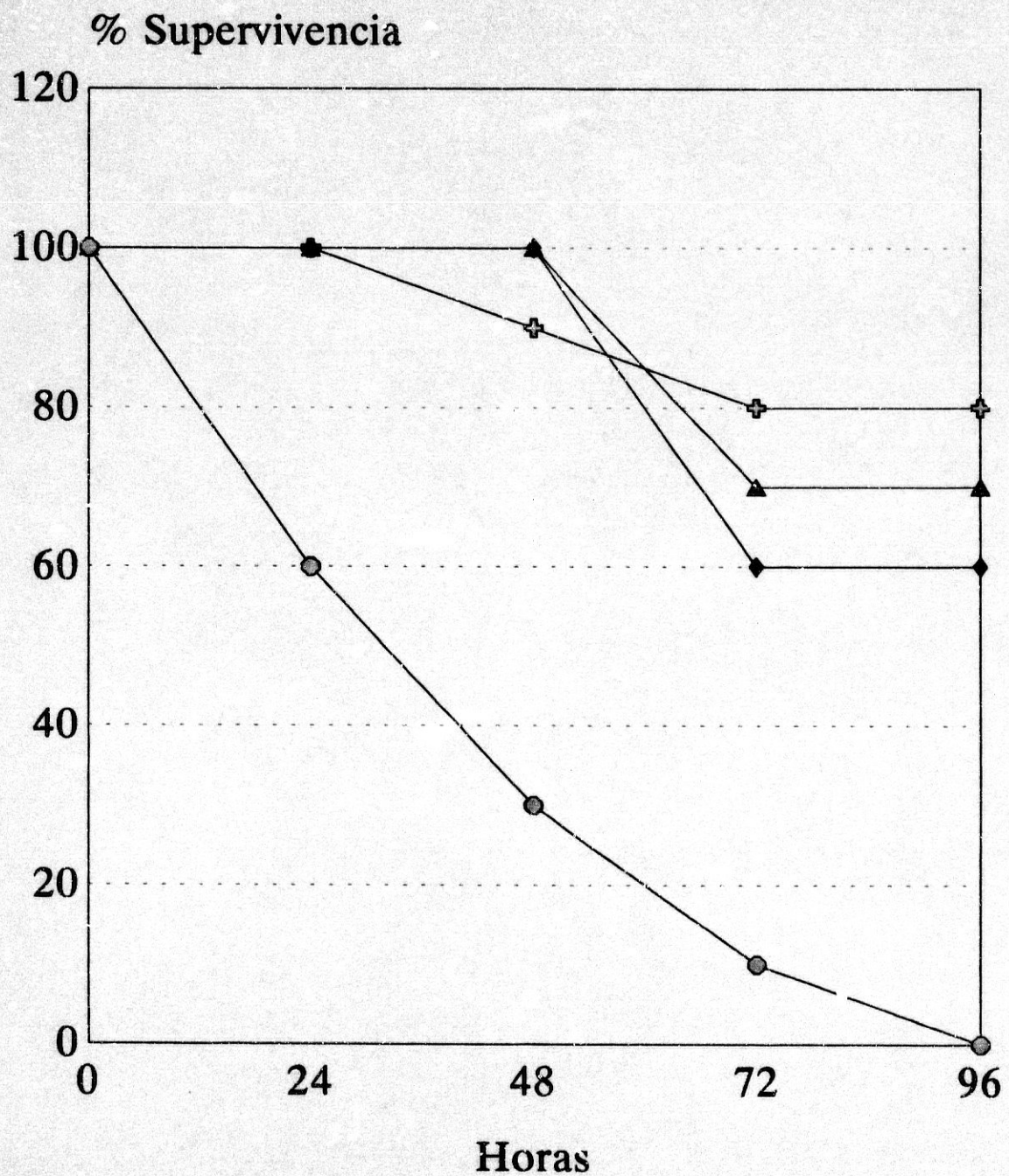
GRUPO 4= LPS+IBUPROFEN

GRUPO 5= LPS+IL-18 murina+IBUPROFEN

* Razón de Predominio

* Error Estándar

RESULTADOS SUPERVIVENCIA



● LPS ▲ IL-1 β ◆ IBUPROFEN ✚ IL-1 β +IBUPROFEN

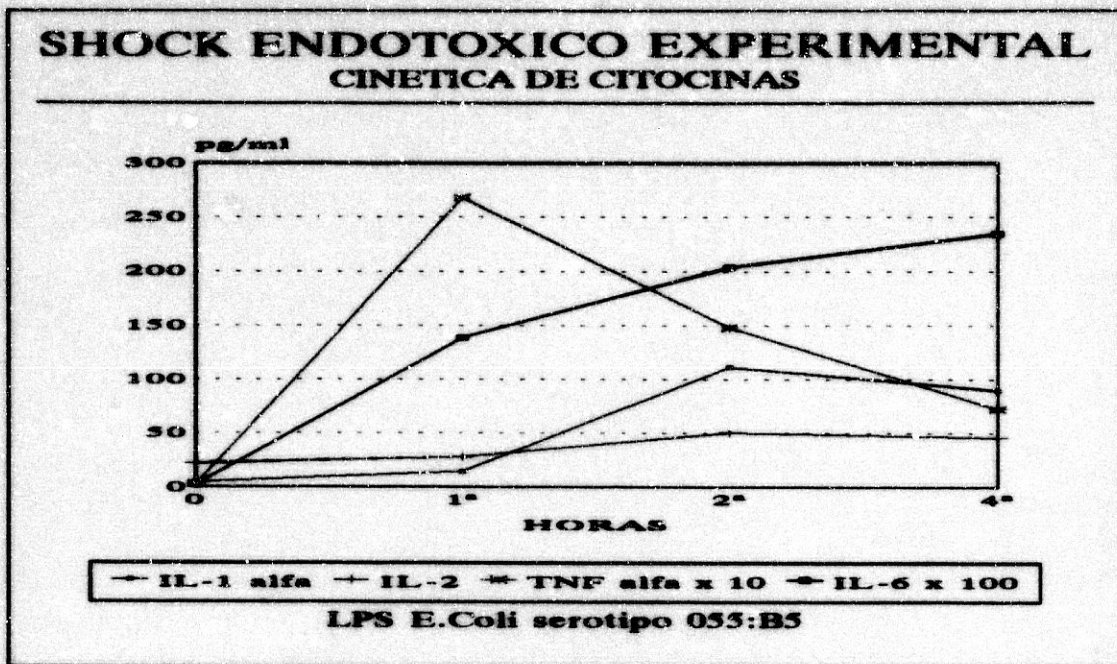
DISCUSSION

La respuesta inflamatoria e inmunológica que se deriva tras una agresión endotóxica es el resultado de las interacciones celulares provocadas por la activación en cascada de distintos sistemas intermediarios, entre los cuales destaca el sistema de las citokinas. Este sistema es altamente eficaz tanto en el control local como sistémico del proceso infeccioso. Sin embargo, un estímulo endotóxico intenso y continuado puede sobrepasar los mecanismos fisiológicos de control del mismo, provocando una estimulación anárquica y permanente del sistema de citokinas cuya consecuencia biológica final es la destrucción de los sistemas orgánicos del individuo (Heumann y Baumgardner, 1993).

En el shock endotóxico experimental se reproduce una situación de activación exagerada del sistema de citokinas, sirviendo actualmente como uno de los modelos para el estudio de la cinética de estos mediadores en esta situación.

En el modelo utilizado para la realización de esta experiencia, se ha observado como tras la agresión endotóxica se produce un aumento de TNF α con un pico máximo en suero a la hora de provocada dicha agresión, descendiendo progresivamente en las horas sucesivas. Igualmente, se produce un aumento de IL-1 α , aunque más tardío que el de la citokina anterior, con un pico máximo de aparición en suero a las dos horas de inyección del LPS. Con respecto a la IL-6, se ha observado que su aumento es progresivo y ascendente durante todas las horas posteriores a la provocación del shock endotóxico. Sin embargo, prácticamente no existen variaciones significativas en la determinación de la IL-2 a las distintas horas en que se ha medido (Gráfico 1).

Gráfico 1



En distintos modelos experimentales de shock, tanto si es provocado por endotoxina o por LPS, la cinética a nivel de activación de citocinas concuerda con la observada en esta experiencia. Esta cadencia de acontecimientos comienza con un aumento de la producción, por parte sobre todo de las células monocitárias activadas por el LPS de TNF α e IL-1 (Ayala et al., 1992; Cannon et al., 1990; Coran et al., 1992; Endo et al., 1992; Freudenberg et al., 1993; Friedlander et al., 1994; Furutani et al., 1994; Giaten et al., 1991; Heumann y Baumgardner, 1993; León et al., 1991; Mathison et al., 1988; Natanson et al., 1988; Smith et al., 1993; Tilders et al., 1994). El LPS se liga a los receptores CD14 y CD18 de la membrana monocitária tras lo cual es ingerido por la célula (Kang et al., 1992), e induce la síntesis de RNAm de distintas citocinas (IL-1, IL-6, TNF) por

activación de la tirosina proteínkinasa (Geng et al., 1993). El aumento de producción de TNF α tras la estimulación de la célula monocitaria por el LPS comienza a ser detectado en suero a los 30 minutos, alcanzando un pico máximo a entre la 1ª y 2ª hora, tras las cuales comienza a descender progresivamente hasta ser casi indetectable a las 4-6 horas de inducido el estado séptico experimental (Heumann y Baumgardner, 1993; Kelly et al., 1992; León et al., 1991; Mathison et al., 1988; Natanson et al., 1988). En modelos de shock séptico inducido en cerdos por Pseudomona aeruginosa (Walsh et al., 1992) o por LPS (Klosterhalfen et al., 1992) se obtiene igualmente un pico máximo de TNF α a los 60 minutos de inducida la sepsis. Tras la sepsis inducida en ratón por ligadura y punción cecal el máximo nivel de TNF α es más tardío que tras la inyección intraperitoneal de LPS, apareciendo el pico a las 8 horas (Eskandari et al., 1992). Resultados similares a los obtenidos con LPS se producen en voluntarios sanos tras la administración intravenosa de endotoxina de E. coli (Spinas et al., 1991). Los niveles de TNF α en suero se han correlacionado con el peor pronóstico y mayor mortalidad de los pacientes en estado de shock séptico (Cannon et al., 1990; Damas et al., 1989; Marks et al., 1990). Sin embargo, el peor pronóstico se debe, no a niveles elevados de esta citokina en un momento dado, sino a su cinética a lo largo de las horas, puesto que en aquellos pacientes que sobreviven a la sepsis los valores de TNF α descienden rápidamente hasta niveles normales, mientras que en los que mueren permanecen elevados a lo largo del tiempo (Calandra et al., 1990; Endo et al., 1992; Eskandari et al.,

1992).

El papel de la IL-1 α en el shock endotóxico hay que verlo de forma integrada con el del TNF α , puesto que el macrófago activado sintetiza conjuntamente ambas citokinas y sus cinéticas siguen cursos paralelos (Dinarello, 1991). En el shock experimental la IL-1 α comienza a aparecer en suero más tardíamente que el TNF α , comenzando a detectarse a partir de la 1 $^{\text{a}}$ hora de provocada la infección y alcanzando sus máximos niveles entre la 2 $^{\text{a}}$ y 3 $^{\text{a}}$ hora, tras las cuales comienza a descender (Dinarello, 1991; Heumann y Baumgardner, 1993). Este incremento de IL-1 α se debe, al igual que en el caso anterior, al aumento de producción y excreción de la misma por parte del macrófago estimulado y activado directamente por el lipopolisacárido de la membrana bacteriana por los mecanismos comentados anteriormente (Geng et al., 1993; Kang et al., 1992), como se ha demostrado tanto in vivo en modelos de experimentación animal y en voluntarios sanos tras administrar endotoxina por vía intravenosa (Ayala et al., 1992; Cannon et al., 1990; Cavaillon, 1993; Dinarello, 1991) como in vitro al estimular macrófagos con LPS (Ayala et al., 1992; Cavaillon, 1993). Al contrario de lo que ocurre con el TNF α , el aumento en suero de los niveles de IL-1 se correlacionan con un mejor pronóstico de los pacientes en estado séptico (Cannon et al., 1990; Luger et al., 1986). Los distintos momentos de aparición en suero de los niveles máximos de TNF α y de IL-1 α observados en nuestra experiencia coinciden con los previamente publicados por otros autores utilizando modelos similares de shock endotóxico (Cannon et al., 1990; Hesse

et al., 1988; Heumann y Baumgardner, 1993; León et al., 1992; Michie et al., 1988).

Con respecto a la IL-6, en este estudio experimental se ha observado como sus niveles en suero aumentan de forma progresiva y continuada durante todas las horas posteriores a la inducción del estado séptico, alcanzando su máximo valor a las 4 horas. Distintos estudios muestran resultados muy similares, encontrando un aumento progresivo de esta citokina con pico máximo a las 4 horas en modelos murinos de shock séptico (Ayala et al., 1992; León et al., 1992). Del mismo modo se han descrito niveles circulantes elevados de IL-6 con valores máximos entre las 2 y 4 horas en voluntarios sanos tras la administración intravenosa de endotoxina (Fong et al., 1989) y valores séricos igualmente elevados de esta citokina en pacientes con sepsis (Helfgott et al., 1989; Muñoz et al., 1991; Yoshimoto et al., 1992; Waage et al., 1989). El aumento de IL-6 durante las primeras fases del shock endotóxico está mediado e inducido por el LPS y la secreción previa tanto de TNF como de IL-1 (Kelly y Cross, 1992; Schutt y Schumann, 1993; Smith et al., 1993; Starnes et al., 1990; Wright et al., 1993) que inducen la expresión del gen que codifica la síntesis de esta citokina (Ng et al., 1994; Vannier y Dinarello, 1994). A su vez, la IL-1 tiene capacidad de estimular a los linfocitos T CD4 y CD8 para sintetizar IL-6 (Lorre et al., 1994). El papel que juega esta citokina tanto en procesos inflamatorios como infecciosos está todavía por definir, pero parece ser que la IL-6 tiene un protagonismo crítico en el desarrollo y evolución de los mismos, como lo demuestra el hecho

de que el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra la IL-6 en ratones infectados con LPS de *E. coli* produce un aumento en la supervivencia de los mismos (Starnes et al., 1990). La IL-6 es el principal regulador en la producción de proteínas de fase aguda por el hepatocito durante en las fases iniciales de la respuesta del huésped ante la infección (Fong et al., 1989; Gauldie et al., 1987; Gauldie et al., 1990; Ramadori et al., 1988; Waage y Steinshamn, 1993) y juega un papel fundamental en la diferenciación final y activación de los linfocitos T durante la respuesta inmunitaria (Wright et al., 1993). Actualmente se considera que la elevación de la IL-6 es útil como marcador de mal pronóstico en pacientes portadores de sepsis por gérmenes Gram - (Calandra et al., 1991; Calandra et al., 1989; Casey et al., 1993; Hack et al., 1989; León et al., 1992; Libert et al., 1992; Pinsky et al., 1993).

Con respecto a la IL-2, los resultados obtenidos en este estudio muestran que sus niveles séricos no se modifican durante las fases iniciales del shock endotóxico. La IL-2 es producida exclusivamente por los linfocitos T estimulados por distintos antígenos, y tiene como función primordial el promover la proliferación clonal de los linfocitos T activados facilitando su crecimiento y diferenciación hacia células maduras e inmunológicamente activas, principalmente linfocitos CD4 y células NK, por lo que juega un papel fundamental en la respuesta inmunológica del huésped ante una agresión antigénica (Chouaib et al., 1984; Jankovic, 1993; Stephen y Lowry, 1993). Se ha demostrado in vitro que la administración exógena de IL-2 a

células esplénicas de ratón provoca un aumento en la producción de anticuerpos por las células T en respuesta a la estimulación con LPS (Delaney y Kaminski, 1993). La producción de IL-2 por el linfocito T precisa la previa estimulación de esta célula por el antígeno que se ve facilitada por los efectos coestimuladores de la IL-1 e IL-6 (Jankovic, 1993; Maizel et al., 1981; Smith et al., 1980). Con el estímulo antigénico se induce la síntesis por parte del linfocito de ARNm específico de IL-2, detectándose los máximos niveles de ambas sustancias a las 24 horas de provocado dicho estímulo (Jankovic, 1993), lo que explicaría el por qué no se modifican sus niveles séricos durante las primeras horas de provocado el shock séptico experimental.

En esta experiencia también se demuestra que tras una agresión endotóxica se produce un incremento de los niveles urinarios de PGE₂. Dichos niveles urinarios son fiel reflejo de los niveles de PGE₂ en plasma, sin embargo su presencia en orina se demora varias horas desde que se detecta en plasma debido a que tiene que ser sometida previamente a los procesos de filtración y excreción renal, motivo por el cual en este estudio las mediciones de dicha prostaglandina se han hecho a horas más tardías que las de las distintas citokinas. En distintos modelos experimentales se ha demostrado este incremento de los niveles plasmáticos de PGE₂ durante el estado de shock séptico (Anderson et al., 1975; Kessler et al., 1973; Tilders et al., 1994). Este incremento en plasma de PGE₂ es debido a un aumento en la síntesis y excreción de esta prostanglandina por parte de los

macrófagos activados, en nuestro caso por LPS (Friedlander et al., 1994; Kang et al., 1992; Miller-Graziano et al., 1988; Tilders et al., 1994). Igualmente, tanto al TNF como la IL-1 son potentes agentes estimuladores de la síntesis de PGE₂ (Fletcher et al., 1993; Kitahama, 1993; Lorre et al., 1994). La PGE₂ tiene potentes propiedades inmunosupresoras, ya que anula la función presentadora de antígeno por el monocito, disminuye la expresión de IL-2 por los linfocitos T helper, inhibe la proliferación y maduración de linfocitos T y B estimulando estas propiedades en los linfocitos T supresores (Boraschi et al., 1984; Miller-Graziano et al., 1988). Estudios previos de shock endotóxico en perros provocado mediante la infusión intravenosa de Escherichia coli muestran una curva en la que se aprecia un aumento progresivo de los niveles plasmáticos de PGE₂ con un pico máximo a las 2 horas de provocado el estado de sepsis, tras el cual comienzan a descender de forma paulatina (Coran et al., 1992). Dicha curva es equiparable a la observada en este estudio pero referida en nuestro caso a los niveles de PGE₂ en orina tras la agresión endotóxica.

Por último, en esta experiencia se ha observado que a las 24 horas de provocado el shock séptico en el ratón se produce un descenso del número total de leucocitos en sangre periférica. Esta disminución de leucocitos circulantes es debida al fenómeno de marginación leucocitaria provocada por la agresión endotóxica (Car et al., 1994). El aumento de TNF inducido por la inyección de LPS produce por sí mismo marginación leucocitaria hacia los

órganos lesionados (Osborn, 1990), lo que provoca un acúmulo de PMNs en estos tejidos durante el shock séptico, hecho al que también contribuye la IL-1 (Engelberts et al., 1994; Waage y Steinshamn, 1993). Este fenómeno está mediado por la capacidad que tienen tanto el LPS como el TNF de inducir la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria (ELAM-1, ICAM-1) en las membranas de las células endoteliales durante una agresión endotóxica (Engelberts et al., 1994; Vasalli, 1992; Waage y Steinshamn, 1993), lo que explica la migración y redistribución de los leucocitos hacia los distintos órganos lesionados. Tras la infusión experimental de LPS se produce una rápida expresión de estas moléculas en los endotelios, apareciendo a las 2 horas de provocado el estado séptico y alcanzando su máxima expresión a las 4 horas de inducido el mismo (Engelberts et al., 1994).

Sin embargo también se observa que la proporción CD4/CD8 permanece dentro de los límites de la normalidad, a expensas de un aumento significativo de ambas subpoblaciones linfocitarias respecto al grupo normal, lo que indica una estimulación inmunológica provocada por la inyección del LPS.

En distintos modelos experimentales de inmunosupresión post-quemadura en ratones, se evidencia una disminución del índice CD4/CD8 a expensas de una disminución de los linfocitos CD4 con aumento de los linfocitos CD8 (Zapata-Sirvent y Hansbrough, 1985). Sin embargo esto ocurre sobre el 14º día de provocada la quemadura mientras que durante los primeros días de inducida la misma este índice permanece dentro de los límites de la normalidad, como se observa en nuestro modelo tras la agresión

endotóxica, lo que indica que el estado de inmunosupresión se agrava progresivamente durante el periodo post-quemadura.

El mantenimiento del índice D4/CD8 dentro de los límites de la normalidad observado en esta experiencia a las 24 horas de provocada la agresión endotóxica, consecuencia del aumento de ambas subpoblaciones linfocitarias, puede deberse a que tras el potente estímulo endotóxico se produce un aumento de producción por parte del macrófago activado de tanto de IL-1 como de PGE₂ como se ha comentado anteriormente. Se ha demostrado que la IL-1 produce una estimulación de la expansión clonal de los linfocitos CD4 (Lichtman et al., 1988; O'Riordain et al., 1992). Igualmente otros estudios demuestran que la PGE₂ estimula la proliferación y maduración de linfocitos CD8 (Boraschi et al., 1984; Miller-Graziano et al., 1988;) e inhibe selectivamente la proliferación de los linfocitos CD4 (Watanabe et al., 1994).

En este estudio se ha observado que podemos provocar una modulación farmacológica de la respuesta del huésped ante un insulto endotóxico. Así, tanto con el tratamiento con ibuprofén como con el pretratamiento con IL-1 β recombinante murina se produce una modulación en la cinética de las distintas citokinas producidas durante las primeras horas del shock endotóxico.

En los ratones pretratados con IL-1 β murina y con respecto a la IL-1 α , se observa como su presencia en suero se encuentra dentro de los límites de la normalidad durante las dos primeras horas tras la agresión endotóxica, evitando en gran ascenso que aparece en el grupo control. En la 4ª hora se produce un aumento respecto a las cifras basales, pero hay que hacer notar que dicho

incremento no se ha producido de forma brusca, sino de forma progresiva. El mecanismo por el cual el tratamiento con IL-1 interfiere este ascenso brusco de citokinas observado durante las primeras horas de una infección letal, puede deberse a una disminución de la producción de citokinas, en este caso en concreto de IL-1 α , por los macrófagos previamente sensibilizados por la IL-1 β inyectada (Vogels et al., 1994; Wallach et al., 1988; Ye et al., 1992). Los mecanismos íntimos por los cuales se produciría este efecto no son bien conocidos todavía, y actualmente son objeto de investigación.

Contrariamente a lo que ocurre con la IL-1 β , el tratamiento con ibuprofén produce un aumento de IL-1 α en las primeras horas del shock endotóxico pero evitando el gran ascenso que se produce de esta citokina durante la 2ª hora de inducido el mismo en el grupo control. Estudios experimentales de shock séptico en perros demuestran que el tratamiento con ibuprofén reduce los efectos fisiopatológicos del mismo sin alterar la producción de citokinas (Coran et al., 1992; Spinass et al., 1991). Estudios *in vitro* demuestran que el ibuprofén restaura en los macrófagos esplénicos la capacidad para liberar IL-1 tras producir un shock hemorrágico al animal de experimentación (Ertel et al., 1992). Todo ello estaría en consonancia con la afirmación de que el ibuprofén restaura las funciones inmunológicas del macrófago haciéndole recobrar su capacidad para producir y liberar citokinas, en este caso IL-1 α , en un grado fisiológico, necesaria para que se produzca una respuesta inmunológica adecuada (Ertel et al., 1992; Haupt et al., 1991).

Sin embargo, cuando se asocian ambas drogas la cinética de la IL-1 α sigue una curva prácticamente igual a la obtenida cuando se administra aisladamente IL-1 β , lo que indica que los efectos aislados de ambas drogas no se modifican cuando se administran conjuntamente, predominando en este caso el efecto de la IL-1 β sobre el del ibuprofén.

Igualmente se han observado modificaciones en los niveles séricos de TNF α con respecto al grupo control en el grupo pretratado con IL-1 β . En todas las horas sus valores se encuentran por encima de los basales. En la 1ª hora tras la inyección del LPS los niveles de esta citokina son mayores que los que presenta el grupo control a la misma hora, pero la diferencia observada en este estudio no es significativa. Sin embargo, otros autores sí encuentran significación en esta diferencia (León et al., 1992). Este aumento de TNF α en suero en la primera hora se puede explicar por una disminución del número de receptores celulares para el mismo provocado por la IL-1 inyectada previamente (Holtmann y Wallach, 1987; Ye et al., 1992), lo que provocaría una disminución de sus efectos biológicos a pesar de estar elevados sus niveles circulantes. Por otra parte, también se observa en esta experiencia que el tratamiento con IL-1 β produce un descenso de TNF α a la 2ª hora de provocada la infección, lo que concuerda con un modelo experimental muy similar al aquí presentado (León et al., 1992). Ello puede deberse, al igual que ocurre con la IL-1 α , a una disminución de la producción de este mediador por parte del macrófago en esta situación, de forma que la administración

exógena de IL-1 β modularía la actividad de esta célula sensibilizándola para producir y liberar TNF α en un grado más "fisiológico" (León et al., 1992; Vogels et al., 1994; Wallach et al., 1988).

Sin embargo el tratamiento con ibuprofén produce durante las dos primeras horas del shock endotóxico unos niveles circulantes de TNF α similares al del grupo control, pero a partir de la 4ª hora sus valores en suero aumentan de forma significativa respecto a este grupo y al pretratado con IL-1 β . Estudios de shock endotóxico en perros y endotoxemia aguda en voluntarios sanos demuestran que el tratamiento con ibuprofén produce un aumento de los niveles circulantes de TNF α durante las primeras horas de iniciada la agresión endotóxica (Coran et al., 1992; Spinass et al., 1991). Este efecto del ibuprofén parece deberse a que esta droga disminuye la producción de PGE₂, la cual se ha demostrado que es un importante agente regulador de la respuesta inmunitaria actuando mediante un mecanismo de "feedback" negativo a nivel local sobre la respuesta inmunitaria humoral y celular (Goodwin y Webb, 1980; Morley, 1981; Schultz et al., 1978). Estudios *in vitro* demuestran que la PGE₂ inhibe la liberación de TNF α por los macrófagos estimulados por el LPS (Kunkel et al., 1988; Renz et al., 1988), mientras que este efecto inhibitor de la PGE₂ puede ser suprimido mediante la adición de drogas inhibitoras de la ciclo-oxigenasa, como la indometacina o el ibuprofén, lo que se traduce en un aumento de la liberación de TNF α por el macrófago (Kunkel et al., 1988; Sironi et al., 1992;

Spengler et al., 1989). El que los niveles de $TNF\alpha$ aumenten con respecto al grupo control a partir de la 4ª hora de provocada la agresión endotóxica, se puede deber a que se necesita un periodo de tiempo para que el ibuprofén manifieste su efecto inhibitorio sobre la síntesis de PGE_2 (hecho observado en esta experiencia y que será comentado más adelante). La administración conjunta de IL-1 β e ibuprofén, produce una curva de niveles séricos de $TNF\alpha$ muy similar a la obtenida cuando se administra el ibuprofén de forma aislada, lo que indica que en este caso predomina el efecto de esta droga sobre el de la IL-1 β . Por tanto, se puede decir que en este modelo experimental de shock endotóxico la IL-1 β produce una disminución de $TNF\alpha$ en las horas más tardías en que ha sido determinado, mientras que el ibuprofén, a las mismas horas, produce un aumento del mismo.

Con respecto a la IL-2, se ha observado que el tratamiento con IL-1 β no provoca alteraciones significativas en los niveles séricos de esta citokina con respecto al grupo control, a pesar de que en todas las horas sus valores permanecen más elevados. La IL-2 precisa del efecto coestimulador de la IL-1 para ser producida por los linfocitos T activados (Larsson et al., 1980; Maizel et al., 1981). Se ha comprobado en esta experiencia que el tratamiento con IL-1 β permite que los niveles de IL-1 permanezcan prácticamente dentro de los límites de la normalidad durante las primeras horas del shock endotóxico, lo que explicaría que durante este periodo no se modifiquen los niveles de IL-2. Igualmente, como se comentará más adelante, en esta experiencia se ha observado que durante las primeras horas de la

agresión endotóxica se produce un gran aumento de los niveles urinarios de PGE_2 , incluso en el grupo que se está comentando. Estudios experimentales *in vitro* demuestran que la PGE_2 ejerce una acción inhibitoria sobre la producción de IL-2 por los linfocitos T (Chouaib y Fradelizi, 1982; Chouaib et al., 1984), mecanismo que también contribuiría a explicar el por qué los niveles séricos de IL-2 no aumenten durante las primeras horas del shock endotóxico.

Sin embargo, el tratamiento con ibuprofén produce una curva de niveles séricos de IL-2 cuyos valores son más altos que en el grupo control y en el tratado con IL-1 β , sin llegar a ser significativos. Este aumento sí es significativo a 2ª hora respecto a los valores normales, con tendencia a la significación a 4ª hora respecto a los mismos. Se aprecia que dicha curva tiene una tendencia ascendente, que se puede explicar por el efecto ya comentado que esta droga tiene sobre la producción de PGE_2 , y a su vez el que la PGE_2 tiene sobre la producción de IL-2 (Chouaib y Fradelizi, 1982; Chouaib et al., 1984).

El hecho más llamativo observado en esta experiencia con respecto a la presencia en suero de IL-2 tras la agresión endotóxica, es que la administración conjunta de ibuprofén e IL-1 β produce grandes variaciones de los valores de la misma. Así se aprecia como tras producirse un gran aumento de IL-2 a la 1ª hora con respecto a los demás grupos, desciende a la 2ª hora de forma brusca hasta igualarse con los otros grupos problema pero siendo mayores que las cifras basales, para más tarde volver a

aumentar de forma significativa con respecto a todos los grupos. Parece apreciarse un efecto sumatorio de las acciones que ambas drogas ejercen de forma aislada. Se ha comentado anteriormente que el pretratamiento con IL-1 β produce una curva sérica de IL-1 α muy similar a la provocada por el LPS, y que la IL-1 es un factor coestimulador para la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T (Larsson et al., 1980; Maizel et al., 1981). Igualmente se ha comentado que la inhibición de la PGE₂ por el ibuprofén puede producir un aumento de IL-2 (Chouaib y Fradelizi, 1982; Chouaib et al., 1984). De esta forma parece que el aumento de la de la IL-1 α que se produce durante las primeras horas del shock endotóxico, y que aumentan por encima de las cifras basales si se trata con IL-1 β , sumado a la inhibición que el ibuprofén produce sobre la síntesis de PGE₂, tiene un efecto potenciador sobre la producción de IL-2. Sin embargo se aprecia un gran descenso de esta citokina a la 2ª hora cuando ambas drogas se administran conjuntamente, hasta cifras similares a las de los restantes grupos problema. Ello podría estar en relación con el gran aumento de PGE₂ aparecido en orina a la 4ª hora, lo que produciría un gran efecto inhibitorio transitorio sobre la producción de IL-2. Sin embargo, las horas de medición de IL-2 en suero y de PGE₂ en orina no son simultáneas, por lo que sería necesario realizar dichas mediciones en el mismo momento en futuras experiencias para comprobar esta afirmación.

En este estudio se demuestra que el pretratamiento del shock endotóxico experimental con bajas dosis de IL-1 β reduce los

niveles circulantes de IL-6, resultados acordes con otras experiencias similares a la aquí presentada y ya publicadas (León et al., 1991). El tratamiento del shock endotóxico con anticuerpos monoclonales anti-TNF atenúa la producción de IL-6 (Fong et al., 1989; Tracey y Cerami, 1990), lo que indica que el TNF es esencial para la amplificación o iniciación de la liberación de IL-6 durante las primeras fases del shock endotóxico experimental (Ng et al., 1994; Starnes et al., 1990; Wright et al., 1993). Igualmente, la IL-1 provoca un aumento de la síntesis de IL-6 (Tracey y Cerami, 1990). En este trabajo se demuestra que el tratamiento con IL-1 β produce una disminución de los niveles séricos tanto de TNF α e IL-1 α , lo que explicaría la disminución de IL-6, lo que está en consonancia con lo comentado.

Con respecto a esta citokina, en esta experiencia se ha observado que el tratamiento con ibuprofén modifica los niveles séricos de IL-6, de manera que mientras sus valores son similares a los del grupo control durante la 1ª hora de provocado el estado séptico, éstos aumentan durante la 2ª hora pero permaneciendo por debajo de los obtenidos en el grupo control y en el tratado con IL-1 β de forma aislada, para más tarde, a la 4ª hora seguir ascendiendo por encima de los valores referidos a estos dos últimos grupos. Estudios de endotoxemia aguda provocada en voluntarios sanos concluyen que el tratamiento con ibuprofén eleva los niveles séricos de IL-6 (Spinass et al., 1991), relacionando este efecto con la disminución de PGE $_2$ inducida por esta droga, que como se ha comentado anteriormente actúa como

mecanismo de "feedback" negativo sobre la producción de citokinas por el macrófago (Sironi et al., 1992). Sin embargo otros estudios de shock endotóxico en perros demuestran que el tratamiento con ibuprofén no modifica los niveles de IL-6 a las 3 horas de inducida la sepsis con respecto al grupo control, aunque a partir de ese momento hay una tendencia al aumento que ya no ha sido determinada en esa experiencia; y por otra parte, como ocurre de manera muy similar en el modelo aquí presentado, este ascenso se inicia de forma más tardía con respecto al grupo control tras la infusión de la endotoxina (Coran et al., 1992). Este efecto del ibuprofén sobre la cinética de la IL-6 parece estar mediado por su capacidad para disminuir la síntesis de PGE₂. En este sentido, ya se comentará más adelante como en el grupo tratado con esta droga se produce un importante descenso de PGE₂ en orina a la 8ª hora de inyectado el LPS. Dichos niveles urinarios reflejan los presentes en suero aunque de forma más tardía, y probablemente este descenso de PGE₂ se correlacione con el aumento de IL-6 en suero observado a la 4ª hora debido, por un lado al efecto inhibitorio que la PGE₂ tiene sobre la producción de IL-6 (Sironi et al., 1992; Spinaz et al., 1991), y por otro al efecto igualmente inhibitorio que esta prostaglandina ejerce sobre la producción de TNF α (Kunkel et al., 1988; Renz et al., 1988) y que puede ser suprimido con drogas antiinflamatorias (Kunkel et al., 1988; Spengler et al., 1989). Como se ha comentado anteriormente, la IL-6 precisa de la liberación previa de TNF α e IL-1 α para poder ser producida

(Fischer et al., 1992; Kitahama, 1993; Ng et al., 1994) y en esta experiencia se observa como el tratamiento con ibuprofén aumenta la liberación de estas dos citokinas en fases avanzadas del shock endotóxico, probablemente por disminución de la producción de PGE_2 , lo que puede estar relacionado con el aumento a la 4ª hora de la inyección del LPS de los niveles séricos de IL-6. Cuando se administran de forma conjunta IL-1 β con ibuprofén, se observa como la curva de IL-6 durante la 1ª y 2ª hora es muy similar a la obtenida al administrar IL-1 β de forma aislada, por lo que parece predominar el efecto de esta droga sobre el ibuprofén y que puede estar relacionado con la disminución que la IL-1 β produce sobre la producción de TNF α e IL-1 α (Fong et al., 1989), pero a partir de la 4ª hora se produce un aumento de IL-6 con respecto al grupo control y al tratado sólo con IL-1 β , pero menor que el observado cuando se administra ibuprofén de forma aislada, lo que parece indicar que aunque en este momento predomina el efecto de esta última droga sobre la producción de IL-6 por los mecanismos ya comentados, la IL-1 β , que como se ha visto es capaz de disminuir por sí sola los niveles séricos de IL-6, puede contribuir a descender el aumento de IL-6 producido por el ibuprofén.

Con respecto a los niveles urinarios de PGE_2 , se ha observado en esta experiencia que el pretratamiento del ratón con estas dosis de IL-1 β antes de la agresión endotóxica, no produce modificaciones en los mismos durante las primeras horas de establecido el estado séptico. La inyección intravenosa de dosis altas de IL-1 (5 μ g/kg) en un animal de experimentación produce

un cuadro de shock equiparable al séptico que conduce a la muerte del animal, pudiendo ser prevenidos estos efectos mediante la administración de inhibidores de la ciclo-oxigenasa (Okusawa et al., 1988). Otras experiencias, tanto *in vivo* como *in vitro*, demuestran que la IL-1 a dosis altas puede inducir la síntesis de PGE₂ (Albrightson et al., 1985; Coti et al., 1993; Dinarello et al., 1987; Dinarello, 1993; Farrar y Hume, 1985; Kitahama, 1993; Knudsen et al., 1986). Este hecho demuestra que parte de los efectos letales de la IL-1 a dosis altas están provocados por productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico, entre ellos la PGE₂, y que para ser inducidos se precisan unas dosis apropiadas de IL-1. Sin embargo, en este estudio no se evidencia que a dosis subletales la IL-1 β eleve los niveles urinarios de PGE₂ por encima de los observados en el grupo control, lo que indica que a estas dosis y en el momento en que se ha administrado no tiene efecto sobre la producción de PGE₂ en las primeras fases del shock endotóxico. Sin embargo, y como era de esperar, el tratamiento con ibuprofén produce un marcado descenso de los niveles urinarios de esta prostaglandina a la 8ª hora de iniciada la agresión endotóxica, incluso hasta sus niveles normales, después de haber estado en la 4ª hora en las mismas cifras que el grupo control. Resultados muy similares se obtienen en el shock endotóxico en perros (Coran et al., 1992) y en ratas (Fletcher et al., 1993). Hay que destacar que en la 12ª hora las cifras de PGE₂ en este modelo experimental han aumentado con respecto a la 8ª hora, lo que puede indicar que el efecto del

ibuprofén parece tener un efecto transitorio ante una agresión endotóxica tan intensa, siendo este tiempo y dosis dependiente como hemos observado en experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio. A su vez, se ha observado en este modelo que en las fases avanzadas tras inyectar el LPS, en el grupo tratado con ibuprofén se produce un aumento de TNF α y de IL-1 α , las cuales estimulan la síntesis de PGE $_2$ (Coti et al., 1993; Dinarello, 1993; Fletcher et al., 1993; Kitahama, 1993), lo que podría explicar el aumento de PGE $_2$ en orina a la 8ª hora en este grupo. La reducción en la producción de PGE $_2$ es sobradamente conocido que es debido a la inhibición que el ibuprofén ejerce sobre la ciclo-oxigenasa, interfiriendo de esta manera en la síntesis de productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico, entre ellos la PGE $_2$ (Coran et al., 1992, Ertel et al., 1990; Jenkins et al. 1991; Zapata-Sirvent et al., 1986). Igualmente se ha observado que el tratamiento conjunto con IL-1 β más ibuprofén disminuye los niveles urinarios de esta prostaglandina, siguiendo una cinética paralela a partir de la 8ª hora con la curva producida por el tratamiento aislado con ibuprofén. Sin embargo hay que destacar que a la 4ª hora se produce un marcado descenso de PGE $_2$ si se administran de forma conjunta estas dos drogas con respecto a todos los grupos problema. El mecanismo por el que se produce este efecto no está aclarado y será objeto de futuras investigaciones.

Otra observación importante a destacar en este estudio, es que el pretratamiento con IL-1 β murina produce un aumento del

índice CD4/CD8, a expensas de aumentar los linfocitos CD4 manteniendo los linfocitos CD8 por debajo incluso de sus cifras normales. Este efecto se debe a que la IL-1 es capaz de inducir la proliferación y maduración de los linfocitos T durante la respuesta del huésped ante una infección (Fasano et al., 1991). Se ha demostrado in vitro que la IL-1 induce la expansión clonal de los linfocitos T humanos de sangre periférica y su activación, puesta de manifiesto mediante la síntesis y liberación de IL-2 (Dinarelli et al., 1986) y la activación de líneas celulares T y B murinas (Iwasaki et al., 1993). Otros estudios demuestran que esta expansión clonal linfocitaria se produce a expensas principalmente de los linfocitos T helper (Lichtman et al., 1988). En ratones quemados se ha demostrado que el tratamiento con IL-1 restaura en el macrófago su capacidad para presentar el antígeno a las células T helper, lo que favorece la proliferación de estas células hasta sus niveles normales (Kupper et al., 1985).

Con respecto al grupo tratado de forma aislada con ibuprofén, en esta experiencia se ha observado que el índice CD4/CD8 es prácticamente indiferenciable del que presenta el grupo control. Aunque existe un aumento apreciable de los linfocitos CD4 respecto a sus cifras basales y no se evidencian diferencias al comparar este porcentaje de células CD4 con los demás grupos problema, el mantenimiento de este índice dentro de los valores del grupo control es debido a un aumento simultáneo en el porcentaje de los linfocitos CD8. De esta forma se puede afirmar que el tratamiento con ibuprofén en este modelo de shock

endotóxico experimental no produce modificación alguna sobre las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8, ya que los resultados aquí obtenidos muestran que sus valores son prácticamente iguales a los obtenidos en el grupo control. En estudios de subpoblaciones linfocitarias realizados en modelos murinos de inmunosupresión tras una agresión térmica (Zapata-Sirvent y Hansbrough, 1985) o traumática (Zapata-Sirvent et al., 1986) se concluye que el ibuprofén, así como otros agentes antiinflamatorios, son capaces de mantener el índice CD4/CD8 dentro de la normalidad a las 24 horas de provocada la agresión. Dicho efecto es atribuido a que estas drogas bloquean la producción de PGE₂ y de esta forma se inhibe el efecto inmunosupresor que esta prostaglandina ejerce a través de la estimulación de los linfocitos CD8 (Goodwin y Webb, 1980; Goodwin, 1981; Zapata-Sirvent et al., 1986). Estos resultados discordantes con los aquí presentados pueden deberse a que los modelos utilizados han sido diferentes, y en nuestro caso una agresión endotóxica letal debe provocar un mayor estado de inmunosupresión que una quemadura o una agresión traumática que no produce la muerte del animal de experimentación con tanta rapidez, y obviamente la respuesta inmunológica del huésped ante la agresión debe ser mucho más difícil de modular farmacológicamente. Por otro lado, se ha comentado la influencia que puede ejercer la PGE₂ sobre la disminución del índice CD4/CD8. En este modelo se aprecia como el ibuprofén tiene un efecto transitorio sobre los niveles urinarios de la PGE₂,

situándose éstos a partir de la 12ª hora en los mismos valores del grupo control, lo que podría explicar que a partir de ese momento esta prostaglandina comenzase a ejercer su efecto estimulador sobre los linfocitos CD8. Sería necesario realizar mediciones de PGE₂ a partir de esta 12ª hora y comprobar si efectivamente sus valores siguen la misma cinética que en el grupo control. Sin embargo, la administración conjunta de IL-1β e ibuprofén sí produce una modificación importante del índice CD4/CD8, aumentándolo de forma marcada respecto al grupo control y al tratado con ibuprofén aisladamente, situándose en los mismos valores que el grupo tratado solamente con IL-1β y debido exactamente a los mismos motivos comentados para este último grupo, que no van por tanto a ser nuevamente expuestos, por lo que se puede afirmar que ambas drogas no ejercen ninguna influencia entre sí con respecto a la modificación de las subpoblaciones linfocitarias en este modelo experimental de shock endotóxico.

Por último, los resultados más sorprendentes observados en esta experiencia están referidos al aumento de supervivencia del animal de experimentación que se puede provocar mediante el tratamiento con estas drogas. Así, la administración al ratón de 80 ng de IL-1β 24 horas antes de provocar una agresión endotóxica letal produce un llamativo aumento de la supervivencia al compararlo con el grupo control (70% en el grupo tratado versus 0% en el control a las 96 horas). Con la misma dosis y administrada en el mismo momento que en esta experiencia se obtienen resultados muy similares en ratones granulocitopénicos

a los que se les ha provocado una infección letal con Pseudomonas aeruginosa (Van der Meer et al., 1988; Vogels et al., 1994). El pretratamiento de ratones infectados con una dosis letal de LPS de Escherichia coli con 20⁶ µg/kg de IL-1 α recombinante humana durante tres días, también provoca un aumento apreciable de la supervivencia respecto al grupo control, aunque menor que en los casos anteriores (León et al., 1991). Los mecanismos por los cuales la administración de IL-1 previa a la provocación de una infección letal se traducen en un aumento de la tolerancia a la agresión endotóxica manifestados por un llamativo incremento de la supervivencia no están todavía aclarados. Como se ha comentado anteriormente, la IL-1 restaura en el macrófago su capacidad para presentar el antígeno a los linfocitos T, favoreciendo su proliferación y activación, con lo que se mejora la respuesta inmunológica (Kupper et al., 1985), activa directamente los mecanismos de defensa celulares antibacterianos (Czuprynski et al., 1988), se ha demostrado in vitro que posee un efecto antibacteriano directo (Van de Meer et al., 1988), disminuye el número de receptores para el TNF (Sheppard y Norton, 1991), aumenta la capacidad bactericida de los PMNs (Shi et al., 1994), e induce la secreción por parte del hepatocito de proteínas de fase aguda que tienen efectos antitóxicos (Vogels et al., 1993). Todos estos efectos se traducen en una potenciación de la respuesta inmune inespecífica que provoca una atenuación de la severidad de la infección.

Se cree que su capacidad para disminuir los niveles de citocinemia presentes durante las primeras horas del shock

endotóxico, hecho observado en esta experiencia, parece tener una trascendente relación con la mayor supervivencia (O'Riordain et al., 1992), sobre todo si se refiere a la modulación de la secreción de IL-6 (León et al., 1992), como también se aprecia en este estudio. El tratamiento con IL-1 produce hipoferremia, lo cual se ha comprobado que tiene un efecto antimicrobiano (Van der Meer, 1988). Igualmente este tratamiento produce una disminución apreciable de las lesiones anatomopatológicas en el hígado, bazo, pulmón y cerebro de los ratones infectados con Listeria monocytogenes, al parecer debido a un aumento de la liberación del factor estimulador de colonias (CSF) que acelera la respuesta protectora del huésped ante la infección (Czuprynski et al., 1988). Otros autores creen que la explicación más plausible del efecto protector de la IL-1 es a través de su capacidad para producir modificaciones humorales, sobre todo produciendo proteínas de fase aguda capaces de ligar la endotoxina (Tobias et al., 1986; Van de Meer et al., 1988), lo que explica el hecho de que el tiempo requerido para la IL-1 tenga un efecto óptimo coincide con el necesario para que se sinteticen la mayoría de estas proteínas (Van de Meer et al., 1988).

Sea por uno u otro mecanismo, o por varios de ellos a la vez, está suficientemente comprobado que la IL-1 produce un efecto de tolerancia a la endotoxina que clínicamente se traduce en un aumento de la supervivencia, afirmación apoyada por los resultados de esta experiencia.

Igualmente, el tratamiento con ibuprofén se ha traducido en

un gran aumento de la supervivencia al compararlo con el grupo control (60% en el grupo tratado versus 0% en el grupo control a las 96 horas). Este efecto puede deberse a que durante las primeras fases del shock endotóxico se ha demostrado que el tratamiento con ibuprofén es capaz de impedir las alteraciones hemodinámicas y metabólicas producidas por este tipo de agresión, manteniendo el gasto cardíaco y la presión arterial por encima de los valores observados en sus respectivos controles (Coran et al., 1992; Northover y Subramanian, 1982; Pinsky, 1992; Yamanaka et al., 1993; Young y Passmore, 1990), y evitando la lesión tisular expresada por el descenso en plasma de los productos derivados de la peroxidación lipídica (Coran et al., 1992; Rockwell y Ehrlich, 1990). Sin embargo no aprecian grandes variaciones en la producción de citokinas, por lo que su efecto sobre la supervivencia parece estar mediado por sus acciones comentadas anteriormente (Coran et al., 1992). En modelos de shock hemorrágico en ratón el bloqueo de la producción de PGE₂ con ibuprofén ha demostrado que es capaz de restaurar las funciones alteradas del macrófago, estimulándolo a producir citokinas en un grado más fisiológico (Ochalski et al., 1993), hecho observado en esta experiencia, con lo que se produce una mejora de la respuesta inmunológica con una mayor resistencia a la infección bacteriana (Ertel et al., 1990).

Finalmente, el tratamiento conjunto con IL-1 β e ibuprofén ha producido, con respecto a la supervivencia, unos resultados similares a los obtenidos cuando estas drogas se administran separadamente (80% en el grupo tratado versus 0% en el grupo

control a las 96 horas), sin existir diferencias significativas entre los tres grupos, a pesar de existir una mayor supervivencia en el grupo que se está comentando con respecto a los otros dos tratados. Los mecanismos por lo que se produce este efecto son los comentados anteriormente para cada droga por separado, y aunque en algunos aspectos se ha observado que su administración conjunta provoca una potenciación de alguno de los efectos observados cuando se administran de forma aislada (p.e. un aumento de los niveles séricos de IL-2, o una disminución de la PGE₂ en orina a las 4 horas de la agresión endotóxica), se puede afirmar que con respecto a la supervivencia la administración conjunta de IL-1 β e ibuprofén no produce un aumento de la misma, por lo que no existe en este modelo una potenciación de los efectos terapéuticos que cada droga tiene por separado y que los mismos en general son inducidos por distintas vías.

CONCLUSIONES

Alfonso Mansilla Roselló

1.- La administración de IL-1 β y de Ibuprofén, tanto de forma aislada como conjuntamente, provoca una modificación de la respuesta inmunológica en el shock endotóxico experimental. Dicha modulación, ya observada en otros estudios, se debe, en el caso de la IL-1 β , a un cambio en la cinética de producción de las distintas citokinas aquí estudiadas durante las primeras horas de inducido el estado séptico, así como a un aumento del índice CD4/CD8, sin afectar la producción de PGE₂ durante este período. Sin embargo, el mecanismo de actuación del Ibuprofén se basa en su capacidad para disminuir la síntesis de PGE₂, sin afectar, en general, los niveles de citokinas en suero durante este mismo período.

2.- A pesar de haberse demostrado que ambos fármacos provocan una modulación de la respuesta inmunológica por mecanismos diferentes, no se ha observado que existan diferencias terapéuticas entre ellos mismos, como lo demuestra el hecho de que ambos, administrados separadamente, producen los mismos índices de supervivencia.

3.- La administración conjunta de IL-1 β y de Ibuprofén no provoca una potenciación de sus efectos terapéuticos, puesto que el índice de supervivencia consecuencia de dicha administración, es indistinguible del producido por ambos fármacos cuando se administran de forma separada.

4.- El único hecho observado derivado de la administración conjunta de ambos fármacos ha sido un aumento de los niveles séricos de IL-2 a la cuarta hora de inducido el estado séptico, así como una disminución de los niveles urinarios de PGE₂ a la cuarta hora de provocada dicha agresión endotóxica.

BIBLIOGRAFIA

Tesis Doctoral

Abraham E, Regan RF. The effects of hemorrhage and trauma on interleukin-2 production. *Arch Surg* 1985; 120:1341-1344.

Albrightson C, Baenziger NL, Needleman P. Exaggerated human vascular cell prostaglandin biosynthesis mediated by monocytes: role of monokines and interleukin 1. *J Immunol* 1985; 135(3):1872-1877.

Altmeier WA, Todd JC, Inge WW. Gram-negative septicemia: A growing threat. *Arch Surg* 1967; 166:530-542.

Anderson FL, Jubiz W, Tsagaris TJ, Kuida H. Endotoxin induced-prostaglandin E and F release in dogs. *Am J Physiol* 1975; 228:410-416.

Armitage P, Berry G. *Statistical methods in medical research*. 2nd. ed. Blackwell Scientific Publications. London. 1987.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2:319-323.

Auble D. Extended tables for the Mann-Whitney statistic. *Bulletin of the Institute of Educational research at Indiana University*, 1, nº2. 1953.

Ayala A, Kisala JM, Felt JA, Perrin MM, Chaudry IH. Does

endotoxin tolerance prevent the release of inflammatory monokines (Interleukin 1, Interleukin 6 or Tumor Necrosis Factor) during sepsis?. *Arch Surg* 1992; 127:191-197.

Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaundry IH. Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine* 1992;4:66-75

Baue AE. Multiple, progressive or sequential systems failure: A syndrome of the 1970's. *Arch Sur* 1975; 110:779-781.

Blaisdell FW. Pathophysiology of the respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 1974, 108:44-49.

Blalock A. Experimental shock: the cause of the low blood pressure produced by muscle injury. *Arch Surg* 1930; 20:959.

Border JR. Hypothesis: sepsis, multiple organ failure an the macrophage. *Arch Surg* 1988; 123:285-286.

Burke JF, Pontoppidan H, Welch CE. High output respiratory failure: an important cause of death adscribed to peritonitis or ileus. *Ann Surg* 1963; 158:581.

Butler LD, Layman NK, Cain RL. Interleukin-1 induced

pathophysiology: induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53:400-421.

Bywaters EGL, Beall O. Crush injuries with impairment of renal function. *Br Med J* 1941; 1:427.

Bywaters EGL. Anatomical changes of the liver after trauma. *Clin Sci* 1946; 6:19.

Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon- α , and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis* 1990; 161:982-987.

Calandra T, Gerain J, Heumann D. Interleukin-6 in patients with septic shock: correlation with outcome and with other cytokines. Program and abstracts of the Twenty-Ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1989; Washington, DC; Abstract 6.

Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellenkens J, Verhoef J, Glauser MP, and the Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: Evolution during sepsis, prognostic value and interplay with other cytokines. *Am*

J Med 1991; 91:23-29.

Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990; 161:79-84.

Car BD, Eng VM, Schnyder B, Ozmen L, Huang S, Gallay P, Heumann D, Aguet M, Ryffel B. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med* 1994; 179:1437-1444.

Carrasco JL. *El método estadístico en la investigación médica*. 4ª ed. Ciencia 3. Madrid. 1989.

Carrico JC. Incidence and problems of multiple-organ-failure syndromes. *Arch Surg* 1986; 121:196-197.

Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119:771-778.

Cavaillon JM. Interleukine-1. En: *Les Cytokines*. Paris. Masson, 1993; 145:166.

Cavaillon JM. Interleukine-6. En: *Les Cytokines*. Paris. Masson, 1993; 183:196.

Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62:3-10

Conti B, Barbacane RC, Felaco M, Grilli A, Placido FC, Reale M. Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist (hrIL-1RA) inhibits prostaglandin E₂ generation but not alkaline phosphatase activity in in vivo chronic granulomatous tissue induced by KMno₄. *Immunol Lett* 1993; 37:1-6.

Coran AG, Drongowski RA, Paik JJ, Remick DG. Ibuprofen Intervention in Canine Septic Shock: Reduction of Pathophysiology without Decreased Cytokines. *J Surg Res* 1992; 53:272-279.

Cross AS, Sadoff JC, Kelly N, Bernton E, Genski P. Pretreatment with recombinant tumor necrosis factor alfa/cachectin and murine interleukin 1 alfa protects mice from lethal bacterial infection. *J Exp Med* 1989; 169:2021-2027.

Czuprynski CJ, Brown JF, Young KM, Cooley AJ, Kurtz RS. Effects of murine recombinant interleukin-1 alfa on the host response to bacterial infection. *J Immunol* 1988; 140(3):962-968.

Chouaib S, Chatenoud L, Klatzmann D, Fradelizi D. The mechanisms of inhibition of human IL 2 production. II. PGE₂ induction of suppressor T lymphocytes. *J Immunol* 1984; 132(4):1851-1857.

Chouaib S, Fradelizi D. The mechanism of inhibition of human IL 2 production. *J Immunol* 1982; 129(6):2463-2468.

D'Agostino RB, Stephens MA. (eds): *Goodnes-of-fit-techniques*. Marcel Dekker. New York, 1986.

Damas P, Ledoux D, Nys M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992; 215:356-362.

Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1989; 17(10):975-978.

Deitch EA. Multiple Organ Failure. Pathophysiology and Potential Future Therapy. *Ann Surg* 1992; 216(2):117-134.

Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990; 30:s184-s189.

Deitch EA, Maejima K, Berg RD. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI-tract microflora in burned rats. *J Trauma* 1985; 25:385-392.

Delaney B, Kaminski NE. High concentrations of interleukin-2 selectively suppress T-cell dependent humoral immune responses.



4.5

5.0

5.6

6.3

7.1

8.0

9.0

10

11.2

12.5

14

16

18

20

22.4

25

28

31.5

36

40

45

50

56

63

71

80

90

100

2.8

3.2

3.6

4.0

4.5

5.0

5.6

6.3

7.1

8.0

9.0

10

11.2

12.5

14

16

18

20

22.4

25

28

31.5

36

40

45

50

56

63

2.5

2.2

2.0

1.8

1.6

1.5

1.4

1.3

1.25

1.2

1.18

1.15

1.12

1.1

1.08

1.05

1.02

1.0

0.98

0.95

0.92

0.9

0.88

0.85

0.82

0.8

0.78

0.75

MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Chouaib S, Fradelizi D. The mechanism of inhibition of human IL 2 production. *J Immunol* 1982; 129(6):2463-2468.

D'Agostino RB, Stephens MA. (eds): *Goodnes-of-fit-techniques*. Marcel Dekker. New York, 1986.

Damas P, Ledoux D, Nys M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992; 215:356-362.

Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1989; 17(10):975-978.

Deitch EA. Multiple Organ Failure. *Pathophysiology and Potential Future Therapy*. *Ann Surg* 1992; 216(2):117-134.

Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990; 30:s184-s189.

Deitch EA, Maejima K, Berg RD. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI-tract microflora in burned rats. *J Trauma* 1985; 25:385-392.

Delaney B, Kaminski NE. High concentrations of interleukin-2 selectively suppress T-cell dependent humoral immune responses.

Immunopharmacology 1993; 26:119-127.

Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA. Multiple regulatory elements in the Interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 1994; 14:4443-4454.

Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJC. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 1987; 139:1902-1910.

Dinarello CA. Modalities for reducing interleukin-1 activity in disease. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14:155-159.

Dinarello CA, Cannon JG, Mier JM. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J Clin Invest* 1986; 77:1734-1739.

Dinarello CA. The proinflammatory cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991; 163:1177-1184.

Dofferhoff AS, de-Jong HJ, Bom VJ, Van-der- Meer J, Limburg PC, de-Vries-Hospers HG, Marrink J, Mulder PO, Weits J. Complement activation and the production of inflammatory mediators during

the treatment of severe sepsis in humans. *Scand J Infect Dis* 1992; 24:197-204.

Drabkova J. New findings in emergency care and resuscitation in patients at risk for endotoxic shock. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Immunol* 1992; 42:102-105.

Emerson TR Jr, Lindsey DC, Jesmok GJ, Duerr ML, Fournel MA. Efficacy of monoclonal antibody against tumor necrosis factor alpha in an endotoxemic baboon model. *Circ Shock* 1992; 38:75-84.

Endo S, Inada K, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, Yoshida M. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* 1992; 38:264-274.

Engelberts I, Samyo SK, Leeuwenberg JF, Van-der-Linden CJ, Buurman WA. A role for ELAM-1 in the pathogenesis of MOF during septic shock. *J Surg Res* 1992; 53:136-144.

Ertel W, Morrison M, Meldrum DR, Ayala A, Chaudry IH. Ibuprofen restores cellular immunity and decreases susceptibility to sepsis following hemorrhage. *J Surg Res* 1992; 53:55-61.

Ertel W, Jarrar D, Jochum M, Thiele V, Kenney J, Faist E, Schildberg FW. Enhanced release of elastase is not concomitant with increased secretion of granulocyte-activating cytokines in whole blood patients with sepsis. *Arch Surg* 1994; 129:90-97.

Ertel W, Morrison M, Ayala A, Perrin MM, Chaudry IH. Blockade of prostaglandin production increases cachectin sintesis and prevents depression of macrophage functions after hemorrhagic shock. Ann Surg 1991; 213(3):265-271.

Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Renick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. Journal of Immunology 1992; 148:2724-2730.

Farrar WL, Hume JL. The role of arachidonic acid metabolism in the activities of interleukin-1 and 2. J Immunol 1985; 135:1153-1159.

Fasano MB, Cousart S, Neal S, McCall CE. Increased expression of the interleukin 1 receptor on blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. J Clin Invest 1991; 88:1452-1459.

Fink MP, Kaups KL, Wang H, Rothschild HR. Ibuprofen improves survival but does not ameliorate increased gut mucosal permeability in endotoxic pigs. Arch Surg 1992; 127:49-53.

Fischer E, Marano MA, Van-Zee KJ, Rock CS, Hawes AS, Thompson WA, DeForge L, Kenney JS, Renick DG, Bloedow DC. Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance

in *Escherichia coli* septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. *J Clin Invest* 1992; 89:1551-1557.

Fischer E, Van-Zee KJ, Marano MA, Rock CS, Kenney JS, Poutsika DD, Dinarello CA, Lowry SF, Moldawer LL. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood* 1992; 79:2196-2200.

Fleer A, Roord JJ, Weening RS. Cytokines. *Tijdschr Kindergeneesk* 1990; 58:186-193.

Fletcher JR, Collins JN, Graves ED, Luterman A, Williams MD, Izenberg SD, Rodning CB. Tumor necrosis factor-induced mortality is reversed with cyclooxygenase inhibition. *Ann Surg* 1993; 217:668-675.

Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin-1 beta and interleukin-6 appearance during lethal bacteriemia. *J Exp Med* 1989; 170:1627-1634.

Fong Y, Moldawer LL, Marano M. Endotoxemia elicits increased circulating beta-2IFN/IL-6 in man. *J Immunol* 1989; 142:2321-2324.

Freudenberg MA, Ness T, Kumazawa Y, Galanos C. The role of

cytokines in endotoxic shock and in endotoxin hypersensitivity. *Immun Infekt* 1993; 21:40-44.

Friedlander MA, Hilbert CM, Wu YC, Finegan CK, Rich EA. Disparate cytochemical characteristics and production of cytokines and prostaglandin E₂ by human mononuclear phagocytes from the blood, lung and peritoneal cavity. *J Lab Clin Med* 1994; 123:574-584.

Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL. Multiple system organ failure: The role of uncontrolled infection. *Arch Sur* 1980; 115:136-140.

Fukushima R, Alexander JW, Wu JZ, Mao JX, Szczur K, Stephens AM, Ogle JD, Ogle CK. Time course of production of cytokines and prostaglandin E₂ by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. *Cir Shock* 1994; 42:154-162.

Furutani M, Arii S, Monden K, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H, Fujita S, Mise M, Ishiguro S, Kitao T. Immunologic activation of hepatic macrophages in septic rats: a possible mechanism of sepsis-associated liver injury. *J Lab Clin Med* 1994; 123:430-436.

Gauldie J, Northemann W, Fey GH. IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J Immunol* 1990; 144:3804-3808.

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Landsdorp P, Bauman H.

Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:7251.

Geng Y, Zhang B, Lotz M. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. Journal of Immunology 1993; 151:6692-6700.

Girardin E, Dayer JM. Cytokines and antagonists in septic shock. Schweiz Med Wochenschr 1993; 123:480-491.

Goodwin JS, Webb DR. Regulation of the immune response by prostaglandins. Clin Immunol Immunopathol 1980; 15:106-122.

Goodwin JS. Immunologic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1981; 70:7-15.

Gordon D, Bray M, Morley J. Control of lymphokine secretion by prostaglandins. Nature 1976; 262:401-402.

Goris RJA, Boekhorst TPA, Nuytinck JKS, Gimbrere JSF. Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation? Arch Sur 1985; 120:1109-1115.

Goris RJA. Mediators of multiple organ failure. Intensive Care

Med 1990; 16:192-196.

Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 24:1269-1265.

Guidet B, Luquel L, Cadranel J, and L, Offenstadt G, Amstutz P. Specificity and serum concentration of tumor necrosis factor in septic shock. *Ann Med Interne Paris* 1990; 141:515-518.

Hack CE, De Grot ER, Felt-Bersma RJF. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74(5):1704-1710.

Haupt MT, Jastremski MS, Clemmer T, Metz CA, Goris GB. Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med* 1991; 19(11):1339-1347.

Heinrich C, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265:621-636.

Helfgott DC, Tatter SB, Santhanam U, Clarick RH, Bhardwaj N, May LT, Sehgal PB. Multiple forms of INF- β_2 /IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J Immunol* 1989; 142:948-953.

Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteriemia. *Surg Gynecol Obstet* 1988;

166:147-153.

Heumann D, Baumgartner JD. Cytokines et les infections bacteriennes et parasitaires. En: *Les Cytokines*. Paris. Masson, 1993; 341:358.

Holtmann H, Wallach D. Down-regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin-1 and 4B-phorbol-12-myristate-13-acetate. *J Immunol* 1987; 139:1161-1167.

Iwasaki T, Sims JE, Grabstein K, Dower SK, Rachle N, Bomsztyk K. Comparison of IL-1 alpha effectiveness in activating murine pre-B and T cell lines. *Cytokine* 1993; 5:416-426.

Jankovic DLJ. Interleukine-2. En: *Les Cytokines*. Paris. Masson, 1993; 223:236.

Jenkins JK, Carey DP, Byrne K, Sugerman HJ, Fowler AA. Sepsis-Induced lung injury and the effects of ibuprofen pretreatment. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:155-161.

John RC, Dorinsky PM. Immunologic therapy for ARDS, septic shock, and multiple-organ failure. *Chest* 1993; 103:932-943.

Kang YH, Lee CH, Monroy RL, Dwivedi RS, Odeyale C, Newball HH. Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides

in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. Electron Microsc Rev 1992; 5:381-419.

Kelly NM, Cross AS. Interleukin-6 is a better marker of lethality than tumor necrosis factor in endotoxin treated mice. *FEMS Microbiol Immunol 1992; 4:317-322.*

Kessler E, Hughes RC, Denner EN, Nadela SM. Evidence for the presence of prostaglandin-like material in the plasma of dogs with endotoxic shock. *J Lab Clin 1973; 81:85-90.*

Keuls M. *Euphytica 1952; 1:112.*

Kitahama S. Intracellular mechanism of interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E₂ production in a mouse osteoblast-like cell line and the possible involvement of protein kinase A and protein kinase C. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi 1993; 69:1092-1100.*

Klosterhalfen B, Horstmann-Jungemann K, Vogel P, Flohe S, Offner F, Kirkpatrick CJ, Hienrich PC. Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochem Pharmacol 1992; 43:2103-2109.*

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. Prognosis in Acute Organ-System Failure. *Ann Surg 1985; 202:685-693.*

Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* 1986; 137:3189-3194.

Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D. Prostaglandin E₂ regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* 1988; 263:5380-5384.

Kupper TS, Green DR, Durum SK, Baker CC. Defective antigen presentation to a cloned T helper cell by macrophages from burned mice can be restored with interleukin-1. *Surgery* 1985; 98(2):199-206.

Larsson EL, Iscove N, Coutinho A. Two distinct factors are required for induction of TCGF. *Nature* 1980; 283:664-669.

León P, Redmond HP, Shou J, Daly JM. Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch Surg* 1992; 127:146-151.

Libert C, Vink A, Coulie P, Brouckaert P, Everaerd B, Van-Snick J, Fiers W. Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its receptor in various murine models. *European Journal of Immunology* 1992;

22:2625-2630.

Lichtman AH, Chin J, Schmidt JA, Abbas AK. Role of the interleukin-1 in the activation of T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9699-9703.

Lorre K, Kasran A, Van-Vaeck F, de-Boer M, Ceuppens JL. Interleukin-1 and B7/CD28 interaction regulate interleukin-6 production by human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70:81-90.

Luger A, Graf H, Schwarz HP, Stummvoll HK, Luger TA. Decreased serum interleukin 1 activity and monocyte interleukin 1 production in patients with fatal sepsis. *Crit Care Med* 1986; 14:458-461.

Maier RV. Multisystem Organ Failure. *Arch Surg* 1986; 121:204-208.

Maizel AL, Mehta SR, Ford RJ, Lachman LB. Effect of interleukin of human lymphocytes and purified human T cells. *J Exp Med* 1981; 153:470-475.

Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist* 1947; 18:52-54.

Marks JD, Berman-Marks C, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:94-97.

Marshall JC, Christou NV, Horn R, Meakins JL. The Microbiology of Multiple Organ Failure. The Proximal Gastrointestinal Tract as an Occult Reservoir of Pathogens. *Arch Surg* 1988; 123:309-315.

Marshall JC, Meakins JL. Fallo orgánico múltiple. Editora Científica Médica Latinoamericana. Atención del Paciente Quirúrgico. México DF. 1991; 1(13):1-18.

Martin Andres A, Luna del Castillo JD. Bioestadística para las Ciencias de la Salud. 3ª ed. Norma. Madrid, 1990.

Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 1988; 81:1925-1937.

McNamara MJ, Norton JA, Nauta RJ, Alexander HR. Interleukin-1 receptor antibody (IL-1rab) protection and treatment against lethal endotoxemia in mice. *J Surg Res* 1993; 54:316-321.

Michie HR, Mazonue KR, Spriggs DR. Detection of circulating tumor

necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988; 318:1481-1486.

Miller-Graziano CL, Fink M, Wu JY, Szabo G, Kodys K. Mechanisms of altered monocyte prostaglandin E2 production in severely injured patients. *Arch Surg* 1988; 123:293-299.

Moldawer LL. Interleukin-1, TNF alfa and their naturally occurring antagonists in sepsis. *Blood Purification* 1993; 11:128-133.

Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML. Cytokines sepsis and immunomodulation. *Br J Surg* 1993; 80:289-297.

Morley J. Role of prostaglandins secreted by macrophages in the inflammatory process. *Lymphokines* 1981; 4:377-394.

Muñoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavillon JM. Dysregulation of the in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88:1747-1754.

Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169:823-832.

Newman D. *Biometrika* 1939; 31:20.

Ng SB, Tan YH, Guy GR. Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1. *J Biol Chem* 1994; 269:19021-19027.

Northover BJ, Subramanian G. Analgesic-antipyretic drugs as antagonists of endotoxin shock in dogs. *J Pathol Bacteriol* 1982; 83:463-469.

Norton LW. Does drainage of intra-abdominal pus reverse multiple organ failure? *Am J Surg* 1984; 149:347-351.

Nuytinck JKS, Offermans XJ, Kubat K, Goris RJA. Whole body inflammation in trauma patients. An autopsy study. *Arch Surg* 1988; 123:1519-1524.

O'Riordain MG, Collins KH, Pilz M, Saporoschetz IB, Mannick JA, Rodrick ML. Modulation of macrophage hyperactivity improves survival in a burn-sepsis model. *Arch Surg* 1992; 127:152-158.

Ochalski SJ, Hartman DA, Belfast MT, Walter TL, Glaser KB, Carlson RP. Inhibition of endotoxin-induced hypothermia and serum TNF-alpha levels in CD-1 mice by various pharmacological agents. *Agents Actions* 1993; 39:52-54.

Offenstadt G, Guidet B, Staikowsky F. Cytokines and severe

infections. Pathol Biol Paris 1993; 41:620-831.

Ogata M, Matsumoto T, Kamochi M, Yoshida SI, Mizuguchi Y, Shigematsu A. Protective effects of a leukotriene inhibitor and a leukotriene antagonist on endotoxin-induced mortality in carrageenan-pretreated mice. Infect Immunol 1992; 60:2432-2437.

Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. J Clin Invest 1988; 81:1162-1172.

Olivera DL, Esser KM, Lee JC, Greig RG, Badger AM. Beneficial effects of SK&F 105809, a novel cytokine-suppressive agent, in murine models of endotoxin shock. Circ Shock 1992; 37:301-306.

Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. Cell 1990; 62:3-6.

Ozaki Y, Ohashi T, Minami A, Nakamura S. Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 alpha. Infect Immun 1987; 55:187-220.

Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multilevel system organ failure and mortality. Chest 1993; 103:565-575.

Pinsky MR. Cardiovascular response in canine endotoxic shock: effect of ibuprofen pretreatment. Circ Shock 1992; 37:323-332.

Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. Physiol Rev 1990; 70:427-451.

Polk HC, Shields CL. Remote organ failure: a valid sign of occult intra-abdominal infection. Surgery 1977; 81:310-313.

Ramadori G, Van Damme J, Rieder H, Meyer zum Büschenfelde KH. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in man and mouse. Comparison with interleukin 1 β and tumor necrosis factor α . Eur J Immunol 1988; 18:1259-1264.

Renz H, Gong JG, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. J Immunol 1988; 41:2388-2393.

Rockwell WB, Ehrlich HP. Ibuprofen in acute-care therapy. Ann Surg 1990; 211:78-83.

Scaller MD. Sepsis syndrome: progress and therapeutic perspectives. Schweiz Med Wochenschr 1992; 122:768-775.

Schneidkraut MJ, Carlson RW. Cecal ligation and puncture is associated with pulmonary injury in the rat: role of cyclooxygenase pathway products. *Prostaglandins* 1993; 45:323-334.

Schultz RM, Parlidis NA, Stylos WA, Chirigos MA. Regulation of macrophage tumoricidal function: a role for prostaglandin of the E series. *Science* 1978; 202:320-321.

Schutt C, Schumann D. The endotoxin receptor CD14. *Immun Infekt* 1993; 21:36-40.

Sheppard BC, Norton JA. Tumor necrosis factor and interleukin-1 protection against the lethal effects of tumor necrosis factor. *Surgery* 1991; 109(6):698-705.

Shi J, Goodband RD, Chengappa MM, Nelssen JL, Tokach MD, McVey DS, Blecha F. Influence of interleukin-1 on neutrophil function and resistance to Streptococcus suis in neonatal pigs. *J Leukoc Biol* 1994; 56:88-94.

Sironi M, Gadina M, Kankova M, Riganti F, Mantovani A, Zandalasini M Ghezzi P. Differential sensitivity of in vivo tumor necrosis factor and Interleukin-6 production to modulation by anti-inflammatory drugs in mice. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14:1045-1050.

Smith SR, Calzatta A, Bankowski J, Kenworthy-Bott L, Terminelli C. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with Corynebacterium parvum. *J Leukoc Biol* 1993; 54:23-29.

Smith KA, Lachman LB, Oppenheim JJ, Favata MF. The functional relationship of interleukins. *J Exp Med* 1980; 151:1551-1557.

Spengler RN, Spengler ML, Strieter RM, Remick D, Larrick JW, Kunkel SL. Modulation of tumor necrosis factor alpha gene expression. *J Immunol* 1989; 142:4346-4350.

Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W, Cammisuli S. Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor alfa, interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J Infect Dis* 1991; 163:89-95.

Starnes HF, Pearce M, Yin K, Abrams J, Tewari A, Zou J. Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal Escherichia coli infection and lethal tumor necrosis factor-alpha challenge in mice. *J Immunol* 1992; 148:1968-1972.

Stephen F, Lowry MD. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993; 128:1235-1241.

Tilders FJ, DeRijk RH, Van-Dam AM, Vincent VA, Schotanus K, Persoons JH. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19:209-232.

Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after abdominal aortic aneurysms: An unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg* 1973; 178:117-122.

Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. *Protides fo the biological*, ed. Peeters, H. (Pergamon, New York) 1986; vol. 36:501-504.

Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 587:325-331.

Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after interleukin-1 administration. *J Immunol* 1991; 146:3478-3482.

Van Der Mer JWM, Barza M, Wolff SM, Dinarello CA. A low dose of recombinant interleukin-1 protects granulocytopenic mice from lethal Gram-negative infection. *Immunology* 1988; 85:1620-1623.

Vannier E, Dinarello CA. Histamine enhances interleukin-1-induced IL-6 gene expression and protein synthesis via H₂ receptors in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 1994; 269:9952-

9956.

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-452.

Vogels MTE, Hermsen CC, Huys HLP, Eling WMC, Van der Meer JWM. Roles of tumor necrosis factor alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, platelet-activating factor, and arachidonic acid metabolites in interleukin-1-induced resistance to infection in neutropenic mice. *Infect Immun* 1994; 62(5):2065-2070.

Vogels MT, Cantoni L, Carelli M, Sironi M, Ghezzi P, Van-der-Meer JW. Role of acute-phase proteins in interleukin-1-induced nonspecific resistance to bacterial infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:2527-2533.

Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in the serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989; 169:333-338.

Waage A, Steinshamm S. Cytokine mediators of septic infections in the normal and granulocytopenic host. *Eur J Haematol* 1993; 50:243-249.

Walsh CJ, Sugerman HJ, Mullen PG. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor alfa attenuates cardiopulmonary dysfunction in porcine Gram-negative sepsis. *Arch Surg* 1992; 127:138-145.

Wallach D, Holtmann H, Engelmann H, Nophar Y. Sensitization and desensitization to lethal effects of tumor necrosis factor and IL-1. *J Immunol* 1988; 140:2994-2999.

Wangensteen OH, Wangensteen SD. *The Rise of Surgery: From Empiric Craft to Scientific Discipline*. University of Minnesota Press, Minneapolis, 1979: p 513.

Watanabe S, Yssel H, Harada I, Arai K. Effects of prostaglandins E₂ on Th0-type human T cell clones: modulation of functions of nuclear proteins involved in cytokine production. *Int Immunol* 1994; 6:523-532.

Wright RM, Holladay CS, Spangelo BL. Lipopolysaccharide induces interleukin-6 release from rat peritoneal macrophages in vitro: evidence for a novel mechanism. *Circ Shock* 1993; 41:131-137.

Yamanaka S, Iwao H, Yukimura T, Kim S, Miura K. Effect of the platelet-activating factor antagonist, TCV-309, and the cyclooxygenase inhibitor, ibuprofen, on the haemodynamic changes in canine experimental endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 1993; 110:1501-1507.

Ye K, Clark BD, Dinarello CA. Interleukin-1 downregulates gene and surface expression of interleukin-1 receptor type 1 by destabilizing its mRNA, whereas interleukin-1 increases its expression. *Immunology* 1992; 75:427-434.

Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose S, Hiroishi K, Okamura H, Takemoto Y, Kanamaru A, Hada T, Tamura T, Kakishita E. High serum Interleukin-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and Interleukin-1/tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* 1992; 148:3596-3603.

Young JS, Passmore JC. Haemodynamic and renal advantages of dual cyclooxygenase and leukotriene blockade during canine endotoxic shock. *Circ Shock* 1990; 32:243-255.

Zapata-Sirvent R, Hansbrough JF, Bartle EJ. Prevention of posttraumatic alterations in lymphocyte subpopulations in mice by immunomodulating drugs. *Arch Surg* 1986; 121:116-122.

Zapata-Sirvent R, Hansbrough JF. Postburn immunosuppression in an animal model. III. Maintenance of normal splenic helper and suppressor lymphocyte subpopulations by immunomodulating drugs. *Surgery* 1985; 97(6):721-727.