

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL

**MODULACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS
Y MECANISMOS DE APOPTOSIS LEUCOCITARIA EN
PACIENTES QUIRÚRGICOS DE ALTO RIESGO CON
SEPSIS MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE
N-ACETILCISTEÍNA O VITAMINA C.**

IGNACIO FERRÓN CELMA

Granada 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

DIRECTORES:

DR. D. PABLO BUENO LARAÑO

DR. D. JOSÉ ANTONIO FERRÓN ORIHUELA

DR. D. ALFONSO MANSILLA ROSELLÓ

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor, por el licenciado:

D. IGNACIO FERRÓN CELMA

Los trabajos de investigación recogidos en esta Tesis Doctoral, se engloban en el marco de un proyecto financiado por los Fondos de Investigación Sanitaria (FIS), expediente número 02/1157.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi Madre

"Por motivarme en los momentos de desánimo y darme siempre su apoyo".

Agradecimientos:

- En primer lugar, agradezco a mis directores de Tesis los doctores Pablo Bueno Laraño, investigador de la Unidad de Cirugía Experimental, José Antonio Ferrón Orihuela, Jefe del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo y Alfonso Mansilla Roselló, facultativo Especialista de Área, del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, el haberme dado la oportunidad de realizarla, así como su apoyo y dedicación, al prestarme su tiempo y sus conocimientos en todo momento.
- A los investigadores de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, los doctores Antonia Collado, M^ª Dolores Collado, Juan Sainz, Juan Manuel Moreno, Rosa Wangensteen y Virginia Chamorro, mis compañeros doctorandos Laila Hassan, Carmen Olmedo e Isabel Rodríguez, y al personal de la Unidad Experimental, Ana María Comino, Conchi López, Encarnación Arias, Antonio García, Francisco Jiménez y Francisca López, por su amistad y compañía que hicieron más amenos tantos días de trabajo, y por su ayuda y colaboración inestimables.
- A Amalia de la Rosa, enfermera de la Unidad Experimental, las enfermeras y enfermeros de la UCI, Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, y Reanimación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, por su disponibilidad para extraer la sangre de los pacientes del estudio y administrar los tratamientos.

- A los cirujanos del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, especialmente a los entonces Médicos Internos Residentes, Karim Muffak, Mario Serradilla, Gonzalo Gutiérrez y Antonio Palomeque y a la Dra. Ana García Navarro, por contribuir en la detección de los pacientes incluidos en el estudio y realizar su seguimiento.
- Al personal del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, en especial a los entonces Farmacéuticos Internos Residentes José Javier Márquez, Laura Criado y María del Mar Montes, por la elaboración de las formas farmacéuticas administradas así como la aleatorización y seguimiento del cumplimiento de los tratamientos.
- A D^ª. María del Mar Rodríguez Águila y D^ª. Sabina Pérez Vicente, de la Fundación FIBAO y a D. Andrés Cabrera Leon de la Escuela Andaluza de Salud Pública de Granada, por su asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados.
- Al Personal del Servicio de Análisis Clínicos, especialmente al Dr. Francisco Ruiz-Cabello Osuna por su atención y por resolver mis dudas metodológicas.
- A D^ª. Mercedes Rodríguez del Castillo Martín y a D. Carlos Merino Acero, de la Biblioteca General del Hospital, por su ayuda y orientación documental.

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
APC:	Célula presentadora de antígenos.
ARDS:	Síndrome de distrés respiratorio del adulto.
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP:	Adenosin trifosfato.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
CARS:	Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria.
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario.
CLP:	Punción cecal y ligadura.
CTLs:	Células T citotóxicas.
DED:	Dominio de muerte.
DHA:	Ácido dihidroascórbico.
DNA-PK:	Protein-quinasa del ácido desoxirribonucleico.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético.
EGFP:	Proteína verde fluorescente mejorada.
ELAM:	Molécula de adhesión endotelial leucocitaria.
FADD:	Factor asociado a dominios de muerte.
FasL:	Ligando de Fas.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína.
FLICE:	Enzima convertidora de IL-1 similar al FAAD.
FMLP:	Formil-metionil-leucil-fenilalanina.
G-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos.
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos.
GPX:	Glutation peroxidasa.
GR:	Glutation reductasa.
GRO:	Proteína (oncogen) relacionada con el crecimiento.
GSH:	Glutation reducido.
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno.
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular.
IFN- γ :	Interferón gamma.
Ig:	Inmunoglobulina.
IL:	Interleuquina.
IL-1R:	Receptor de interleuquina-1.
IL-1 RAcP:	Proteína accesoria del receptor de interleuquina-1

IL-1ra:	Antagonista del receptor de interleuquina-1.
IMF:	Intensidad media de fluorescencia.
Kd:	Constante de disociación.
KDa:	KiloDaltons.
LPS:	Lipopolisacárido.
MadCAM:	Molécula de adhesión celular de mucosas.
MARS:	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Antagonista Mixta.
M-CSF:	Factor estimulador de colonias de macrófagos.
MDA:	Malondialdehído.
MIF:	Factor inhibidor de la migración de macrófagos.
MODS:	Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple.
M-PRM:	Mono-poly resolving médium: Medio de separación Ficoll-Hypaque.
NAC:	N-acetilcisteína.
NaCl:	Cloruro sódico.
NADPH:	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato.
NK:	Células natural killer.
NF- κ B:	Factor de transcripción kappa B.
NO:	Óxido nítrico.
HO:	Radical hidroxilo.
PaCO ₂ :	Presión parcial de CO ₂ .
PAF:	Factor activador de plaquetas.
PaO ₂ /FiO ₂ :	Índice presión arterial de oxígeno/ concentración de oxígeno inspirado.
PARP:	Poli adenosina-difosfato-ribosa polimerasa.
PBS:	Tampón fosfato salino pH 7,4.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PE:	Ficoeritrina.
PECAM-1:	Molécula de adhesión endotelio-plaquetaria 1.
PI:	Yoduro de propidio.
Pm:	Peso molecular.
PMNs:	Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.
PS:	Fosfatidilserina.
PT:	Poros de transición.
ROS:	Especies reactivas de Oxígeno.

sFas:	Molécula soluble de Fas.
sFasL:	Molécula soluble del ligando de Fas.
sICAM:	Molécula de adhesión intercelular soluble.
SIRS:	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
SNC:	Sistema nervioso central.
SOD:	Superóxido dismutasa.
SOFA:	Puntuación para la Evaluación del Fallo Secuencial de Órganos
SREBP:	Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides.
Th:	Linfocitos T-colaboradores
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa.
TNF-R:	Receptor de TNF- α .
TRAIL:	Ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF.
TWEAK:	Inductor débil de apoptosis similar a TNF.
UCI:	Unidad de cuidados intensivos.
UV:	Ultravioleta.
U/L:	Unidades/litro
VCAM:	Molécula de adhesión vascular celular.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	2
1.1.-Fisiología de la inflamación	2
1.1.1.-Fases de la inflamación.....	2
1.1.2.-Células y mediadores implicados en el proceso inflamatorio.....	3
1.1.2.1.-PMNs.....	3
1.1.2.2.-Monocitos.....	3
1.1.2.3.-Moléculas de adhesión.....	4
1.1.3.-Citoquinas	5
1.1.3.1.-Introducción.....	5
1.1.3.2.-Clasificación.....	5
1.1.3.3.-Características de las citoquinas: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α	6
1.1.4.-Estrés oxidativo: Especies reactivas de oxígeno (ROS)	11
1.1.4.1.-Sistemas antioxidantes del organismo.....	12
1.2.-Apoptosis e inflamación	13
1.2.1.-Introducción.....	13
1.2.2.-Mecanismos y componentes de la apoptosis celular.....	14
1.2.2.1.-Vía extrínseca: Apoptosis por factores y receptores de muerte.....	15
1.2.2.1.1.-Fas.....	15
1.2.2.1.2.-FasL.....	17
1.2.2.1.3.-Fas y FasL solubles.....	18
1.2.2.1.4.-Caspasas.....	19
1.2.2.1.4.1.-Introducción.....	19
1.2.2.1.4.2.-Caspasa-3 y sus sustratos.....	20
1.2.2.2.-Vía intrínseca de la apoptosis.....	22
1.2.2.2.1.-Mitocondria y apoptosis.....	22
1.2.2.2.2.-Familia de proteínas Bcl-2.....	23
1.2.2.3.-Fosfatidilserina como marcador de la apoptosis: Anexina V.....	25
1.3.-Agresión y respuesta inflamatoria	26
1.3.1.-SIRS, CARS y sus posibles consecuencias.....	26
1.4.-Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (MODS)	30
1.5.-Epidemiología del SIRS/MODS	31
1.6.-Citoquinas y su relación con el SIRS/MODS	32

1.7.-Estrés oxidativo y su relación con el SIRS/MODS.....	34
1.8.-Apoptosis y su relación con el SIRS/MODS.....	35
1.9.-Estrategias terapéuticas del SIRS/MODS.....	35
1.9.1.-Modulación de la respuesta inflamatoria y la apoptosis leucocitaria mediante la administración de NAC o vitamina C.....	38
1.9.1.-Vitamina C.....	38
1.9.2.-N-acetilcisteína (NAC).....	39
2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
3.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
3.1.-Tipo de estudio.....	45
3.2.-Sujetos de estudio.....	45
3.2.1.-Criterios de inclusión.....	45
3.2.2.-Criterios de exclusión.....	46
3.3.-Administración de N-acetilcisteína o vitamina C.....	46
3.4.-Toma de muestras.....	46
3.5.-Obtención y preparación de muestras.....	47
3.5.1.-Plasma y lisado de células sanguíneas.....	47
3.5.2.-Suero.....	48
3.5.3.-Tubos de coagulación.....	48
3.6.-Evaluación del MODS: Escala de Bruselas.....	48
3.7.-Determinación del hemograma y fórmula leucocitaria.....	48
3.7.1.-Materiales y reactivos.....	49
3.7.2.-Procedimiento.....	49
3.7.3.-Expresión de resultados.....	49
3.8.-Parámetros bioquímicos para la determinación del riesgo de mortalidad y el desarrollo de MODS.....	50
3.8.1.-Materiales y reactivos.....	50
3.8.2.-Procedimiento.....	50
3.8.3.-Expresión de resultados.....	50
3.9.-Citometría de flujo: Fundamento.....	51
3.10.-Citoquinas.....	52

3.10.1.-Determinacion de citoquinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α	52
3.10.1.1.-Fundamento.....	52
3.10.1.2.-Materiales y reactivos.....	52
3.10.1.3.-Procedimiento.....	53
3.10.1.4.-Expresión de resultados.....	53
3.11.-APOPTOSIS.....	54
3.11.1.-Determinación de la expresión de Fas (CD95).....	54
3.11.1.1.-Fundamento.....	54
3.11.1.2.-Materiales y reactivos.....	55
3.11.1.3.-Procedimiento.....	55
3.11.1.4.-Expresión de resultados.....	58
3.11.2.-Determinación de la apoptosis de PMNs y linfocitos.....	59
3.11.2.1.-Fundamento.....	59
3.11.2.2.-Materiales y reactivos.....	60
3.11.2.3.-Obtención y preparación de muestras.....	60
3.11.2.4.-Determinación de la viabilidad celular.....	62
3.11.2.5.-Procedimiento.....	63
3.11.2.6.-Expresión de resultados.....	65
3.11.3.-Determinación de los niveles de caspasa-3, PARP y Bcl-2.....	65
3.11.3.1.-Fundamento de la técnica.....	65
3.11.3.2.-Materiales y reactivos.....	66
3.11.3.3.-Procedimiento.....	66
3.11.3.4.-Expresión de resultados.....	67
3.12.-Análisis estadístico.....	67
4.-RESULTADOS.....	70
4.1.-Características generales de los sujetos de estudio.....	70
4.2.-Citoquinas.....	73
4.2.1.-Interleuquina 6 (IL-6).....	74
4.2.2.-Interleuquina 10 (IL-10).....	76
4.2.3.-Interleuquina 4 (IL-4).....	78
4.2.4.-Interferón gamma (IFN- γ).....	80

4.2.5.-Interleuquina 2 (IL-2).....	82
4.2.6.-Factor de necrosis tumoral α (TNF- α).....	84
4.3.-Apoptosis leucocitaria.....	86
4.3.1.1.-Expresión de Fas (CD95) en linfocitos CD3 ⁺	87
4.3.1.2.-Expresión de Fas (CD95) en PMNs CD15 ⁺	89
4.3.2.1.-Porcentaje de linfocitos en apoptosis.....	91
4.3.2.2.-Porcentaje de PMNs en apoptosis.....	92
4.3.3.1.-Niveles de caspasa-3.....	93
4.3.3.2.-Niveles de PARP.....	95
4.3.3.3.-Niveles de Bcl-2.....	97
4.4.-Fórmula leucocitaria.....	99
4.4.1.-Leucocitos totales.....	100
4.4.2.-Porcentaje de linfocitos.....	102
4.4.3.-Porcentaje de PMNs.....	104
5.-DISCUSIÓN.....	107
5.1.-Efecto de la administración de NAC o vitamina C sobre los niveles plasmáticos de citoquinas.....	107
5.2.-Efecto de la administración de NAC o vitamina C sobre la apoptosis de linfocitos y PMNs.....	111
6.-CONCLUSIONES.....	123
7.-BIBLIOGRAFÍA.....	125
8.-ANEXOS.....	144
8.1.-Anexo 1: Documento informativo de participación en ensayo clínico.....	144
8.2.-Anexo 2: Escala POSSUM.....	147
8.3.-Anexo 3: Escala de Calificación del Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple Bruselas.....	149

1- INTRODUCCIÓN

1.1.-FISIOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN

El daño de tejidos o la infección de los mismos producen la activación de la respuesta inflamatoria. Para que se produzca un proceso inflamatorio, deben existir previamente estímulos que lo produzcan; tales estímulos pueden ser microorganismos, endotoxinas-exotoxinas, tejidos necróticos, proceso de isquemia-reperusión o lesiones de tejidos blandos (1). Entre estas últimas, se incluyen las lesiones de los tejidos por una incisión quirúrgica, así como las producidas por traumatismos o quemaduras que actúan como estímulos no específicos que activan la respuesta inflamatoria. La magnitud e intensidad de la respuesta inflamatoria es un reflejo biológico de la intensidad y magnitud de la agresión, de forma que una herida quirúrgica limpia provoca una respuesta inflamatoria local modesta mientras que infecciones sistémicas o las heridas producidas por traumatismos, estimulan una respuesta inflamatoria más severa.

1.1.1.-Fases de la inflamación

La respuesta inflamatoria puede estructurarse en 2 fases:

Fase I: Iniciada tras producirse el estímulo inflamatorio, es la fase de los iniciadores: En ella se produce la activación de la coagulación, activación de plaquetas, activación de mastocitos (que producen histamina que actúa como vasodilatador), activación del sistema de contacto (por el cual se produce, vía prekalicreína-kalicreína-bradiquinina, el óxido nítrico (NO), que al igual que la histamina produce vasodilatación), y por último la cascada del complemento (cuya activación origina una serie de proteínas que pueden lisar gérmenes patógenos y que tienen funciones vasoactivas y de quimioatracción, además de estimular la activación de los otros cuatro iniciadores) (2).

Fase II: Respuesta fagocítica o fase efectora; como consecuencia de la activación de los iniciadores, se produce un ambiente procoagulante. Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) contribuyen a este ambiente en la microcirculación, activando la agregación plaquetaria, la cascada de coagulación e inhibiendo la fibrinólisis (2). Además se disminuye o cesa el flujo en la zona afectada. Este proceso puede formar parte de la estrategia normal de contención, en respuesta a una lesión o infección local, puesto que elimina las vías de entrada de bacterias, toxinas y quimioatrayentes a la circulación sistémica. Para llegar a la Fase II, es necesario que se supere un umbral de concentración de quimioatrayentes que se ve favorecido por la vasodilatación, disminución de la velocidad del flujo sanguíneo, aumento de la

permeabilidad, edema, etc., originados en la Fase I. Estos quimioatrayentes difunden del foco local y actúan sobre células endoteliales capilares, PMNs y monocitos al interactuar sobre receptores de membrana, activándolos. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina 1 (IL-1) son considerados mediadores proinflamatorios primarios que inducen otros mediadores proinflamatorios secundarios denominados quimioquinas. Hay dos grupos principales de quimioquinas: la subfamilia CXC quimiotáctica para los PMNs, y la subfamilia CC quimiotáctica para los monocitos (3).

1.1.2.-Células y mediadores implicados en el proceso inflamatorio

1.1.2.1.-PMNs

Los PMNs son las primeras células en llegar al lugar de la lesión, y los eventos que se producen como consecuencia o acompañando a esta llegada, tales como la migración de monocitos y la generación de edema, pueden depender de esta acumulación inicial de PMNs (4). Además, los constituyentes de los PMNs no son sólo citotóxicos, sino que también se pueden liberar proteínas de la matriz en forma de fragmentos quimiotácticos amplificando así la respuesta inflamatoria (4). Los PMNs son atraídos por un gradiente quimiotáctico, incrementando su adherencia al endotelio de los órganos diana interactuando con él a través de receptores celulares y siendo secuestrados en su parénquima (5-7). De este modo, son reclutados de forma temprana en el lugar de la lesión donde se origina un proceso ordenado de fagocitosis liberando especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas proteolíticas. Los ROS actúan produciendo oxidación de proteínas o peroxidación lipídica de las membranas celulares, mientras que las enzimas granulares presentes en los PMNs actúan por procesos independientes del oxígeno que permiten la digestión directa de las bacterias (8). Debido a la actividad fagocítica y la liberación de estas sustancias, se produce una licuefacción formada por células necróticas del individuo y PMNs muertos en un ambiente proteico, que constituye el pus. Por otro lado, la liberación por parte de los PMNs de ROS, hidrolasas ácidas y otros productos lisosómicos, produce daño endotelial y estimulación adicional de la microcirculación que conduce a una activación adicional de la cascada inflamatoria (9).

1.1.2.2.-Monocitos

La segunda población celular crítica que participa en la Fase II de la inflamación son los monocitos, que son atraídos por mecanismos similares a los de los PMNs, estando su respuesta modulada por la intensidad de la señal de los quimioatrayentes. Por tanto,

los PMNs son los primeros en llegar al foco inflamatorio seguidos de los monocitos, que, debido a su mayor tamaño, tienen más difícil y lenta su diapédesis, es decir, su paso a través de las paredes de los vasos. Entre los principales activadores de los monocitos se encuentran los lipopolisacáridos de la membrana bacteriana (LPS), IL-1 y el factor activador del complemento C5a. Los monocitos, que son atraídos al foco de la lesión y se diferencian a macrófagos, estimulan una gran respuesta proinflamatoria, liberándose gran cantidad de citoquinas diferentes, involucradas en la inflamación y defensa del organismo. La activación de los macrófagos de los tejidos conlleva la generación de ROS, oxidación del ácido araquidónico por la vía de la lipoxigenasa y ciclooxigenasa generándose leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos (10). Estos últimos se consideran, junto con el NO, mediadores secundarios. Todos estos mediadores ejercen efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos que activan completamente la respuesta fagocítica, siendo importante su actividad para la función fagocítica de los PMNs. Además, los monocitos presentan los antígenos a los linfocitos T y B que ayudan a erradicar los microorganismos y son, junto con las células endoteliales, los principales productores de mediadores inflamatorios.

1.1.2.3.-Moléculas de adhesión

El ambiente de citoquinas (especialmente TNF- α e IL-1) y otros mediadores moleculares quimioatrayentes como los factores activadores del complemento (C3a y C5a), formil péptidos (como la formil-metionil-leucil-fenilalanina: FMLP y formil-neoleucil-leucil-fenilalanina: FNLP), así como la histamina, que se producen por la activación de PMNs y macrófagos, actúan sobre el endotelio, el cual se activa y comienza la expresión de diversas moléculas y receptores en su superficie, necesarios para que se produzca la adhesión y el paso de los leucocitos a través de los endotelios vasculares (migración transendotelial), así como la síntesis y secreción de citoquinas adicionales y mediadores inflamatorios secundarios incluyendo prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factor activador de plaquetas (PAF), ROS, NO y proteasas (catepsina y elastasa) (8, 11).

Tanto los leucocitos como las células endoteliales presentan moléculas de adhesión en sus membranas, de forma que al activarse, las células interactúan entre sí a través de estas moléculas y sus ligandos correspondientes. Hay diferentes tipos de moléculas de adhesión entre las que encontramos las selectinas y las integrinas. Las P-, E-, y L-selectinas son glicoproteínas responsables de la adherencia inicial y desplazamiento de

los leucocitos sobre el endotelio activado, en un proceso denominado “rolling”. Destacan las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial (ELAM) implicadas en el asentamiento leucocitario en órganos y tejidos. Por su parte, las integrinas son glicoproteínas entre las que destacan las β 2-integrinas denominadas CD11x/CD18; donde la “x” se sustituye por otra letra en función de la célula en que la encontramos: la “a” en leucocitos de origen linfoide, “b” en mieloides, “c” y “d” en monocitos y macrófagos. Las integrinas permiten una adhesión más fuerte de leucocitos con sus ligandos endoteliales correspondientes, las inmunoglobulinas del endotelio, entre las que se encuentran las moléculas de adhesión celular vascular (VCAM), moléculas de adhesión intercelular (ICAM), moléculas de adhesión endotelio-plaquetaria (PECAM-1) y moléculas de adhesión celular de la mucosa (MadCAM-1) (12, 13).

1.1.3.-Citoquinas

1.1.3.1.-Introducción

Las citoquinas son proteínas producidas por diversos tipos de células que actúan como mediadores intercelulares y que ejercen sus efectos a través de la interacción con receptores de membrana específicos (14). Desempeñan funciones muy diversas en el organismo tanto a nivel local como sistémico y tienen acciones pleiotrópicas, es decir, que ejercen múltiples efectos en diferentes células diana. Entre sus funciones destaca el desarrollo de los procesos inflamatorios y su resolución, así como un papel fundamental en la proliferación y apoptosis celular. A nivel sistémico actúan sobre el eje hipotalámico-adrenal y producen la activación del sistema nervioso simpático estimulando la gluconeogénesis hepática, lipólisis periférica y degradación de proteínas. De este modo, el organismo dispone de aminoácidos para la demanda metabólica que genera el proceso inflamatorio (15).

1.1.3.2.-Clasificación

A través de experimentos *in vitro* con clones de linfocitos T de ratón, las citoquinas más importantes implicadas en la inflamación se han clasificado clásicamente como Th1 y Th2 en función del tipo celular que las produce de forma predominante (16). Entre las Th1 se encuentran la interleuquina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ), que inducen la respuesta inmune humoral e inmunidad mediada por células. Las células Th2 producen interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 5 (IL-5) y probablemente

interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 10 (IL-10), ayudando a la respuesta inmune humoral. Además el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son sintetizadas por ambos tipos de clones aunque en mayor cantidad (5 veces más) por las Th1 (16, 17). El fenotipo de secreción de citoquinas no está ligado a una especificidad particular del receptor de un antígeno y depende probablemente del estado de diferenciación de las células. Además, la respuesta apropiada puede ser Th1 o Th2 según el agente infeccioso (16).

Las citoquinas también se pueden clasificar en proinflamatorias y anti-inflamatorias: Entre las proinflamatorias destacan IL-1, IL-6 y TNF- α y en menor medida IL-2, IL-8, IL-12, IL-18 e IFN- γ . Las principales citoquinas anti-inflamatorias son IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y destaca además el papel anti-inflamatorio del receptor soluble de la IL-1 (IL-1RII soluble) (18).

1.1.3.3.-Características de las citoquinas

Interleuquina-1 (IL-1):

Esta citoquina activa PMNs, regula la expresión de moléculas de adhesión y promueve la quimiotaxis. IL-1 es producida principalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células NK, células endoteliales, PMNs y células T, y estimula a otras células para que produzcan más citoquinas (efecto endocrino, paracrino y autocrino) (19, 20).

Posee propiedades fisiológicas similares a las de TNF- α pero menos capacidad para producir shock. Al igual que TNF- α , es importante en la reparación de las lesiones y su adecuada actividad es esencial para mantener una correcta inmunidad a largo plazo. Es un potente inductor de los factores estimuladores de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y macrófagos (M-CSF), y de la síntesis de proteínas de la fase aguda. Una liberación elevada de IL-1 produce una excesiva marginación de PMNs activados a la pared vascular, estimula la actividad procoagulante del endotelio y la unión de leucocitos. A diferencia de TNF- α , su administración no es letal, pero produce muchos de los fenómenos hematológicos y metabólicos agudos que se asocian con la sepsis (21).

Se distinguen dos tipos de IL-1: alfa y beta. La IL-1 α se encuentra predominantemente asociada a membrana y ejerce sus efectos por contacto celular. La IL-1 β es más fácil de detectar en la circulación donde produce efectos o alteraciones similares al TNF- α , siendo sus efectos sinérgicos. La vida media de IL-1 es aún más corta que la del TNF

(6-10 min.), lo cual hace aún más difícil su detección en los procesos agudos en los cuales se libera. IL-1 produce el clásico efecto de respuesta febril, por la estimulación local de la actividad de las prostaglandinas en el hipotálamo anterior (22).

La actividad de IL-1 se encuentra mediada por receptores, destacando IL-1RI que necesita de una proteína accesoria (IL-1 RAcP) para interactuar con él, de forma que la señal produce la activación de la transcripción mediada por NF- κ B (23). Al igual que el TNF- α , la IL-1 tiene receptores solubles, destacando la forma soluble de IL-RI que aumenta la actividad de la IL-1 al retirar al antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra). El receptor IL-1RII, por el contrario, suprime, tanto en su forma de membrana como soluble, la actividad de IL-1, al tratarse de un receptor “señuelo” (24).

Interleuquina-2 (IL-2):

Se trata de una citoquina de origen linfoide que pertenece al grupo de los mediadores proinflamatorios (25). Es el principal promotor de la proliferación y diferenciación de linfocitos T, producción de inmunoglobulinas y mantenimiento de la integridad inmunológica del sistema digestivo o “barrera intestinal”. También estimula la producción de una cascada de interleuquinas, interferones, y TNF- α (25). Es difícil de detectar, en agresiones agudas, debido a su corta vida media. La disminución en la expresión de actividad IL-2 se encuentra asociada a una disminución de la competencia inmunológica, y existen evidencias que sugieren que la apoptosis de linfocitos contribuye a dicha inmuno-competencia (25).

Interleuquina-4 (IL-4)

Es producida principalmente por células T, mastocitos y basófilos. Sus efectos más destacados incluyen la proliferación de linfocitos B e inmunidad mediada por inmunoglobulina E (Ig-E). Se ha demostrado su efecto inhibitorio sobre la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, incluyendo IL-1, TNF- α e IL-6, y además promueve la producción de IL-1ra (26). Parece ser que como consecuencia de lesiones graves y sepsis puede producirse un fenotipo inmune definido por la producción de IL-4 por parte de células T CD4⁺ (26).

Incrementa de forma sinérgica la expresión de antígenos de las células endoteliales inducida por TNF- α e IL-1, pero inhibe el incremento que éstos y el IFN- γ producen en la expresión de moléculas de adhesión (9, 26).

Interleuquina-6 (IL-6):

Es una familia de al menos seis fosfoglicoproteínas. Es producida por monocitos/macrófagos, células endoteliales y también por los linfocitos T y B, fibroblastos, queratinocitos y otros tipos celulares (12). La fuente de IL-6 tras las agresiones no se conoce bien, pero el intestino y las heridas parecen producirla en respuesta a las lesiones. Se ha sugerido el intestino como una fuente de IL-6 tras la cirugía y traumatismos (27), lo cual se ha confirmado en modelos experimentales animales (28, 29). Por otra parte, IL-6 parece ser producida en lugares alejados de forma posterior a la agresión, incluyendo el pulmón (30). Ejerce sus acciones al unirse a un receptor de membrana compuesto por una subunidad de unión de 80 KDa y una glicoproteína encargada de la transducción de la señal, de 130 KDa (12).

TNF- α e IL-1 son potentes inductores de la producción de IL-6 en diversos tipos de tejidos, incluido el tubo digestivo. Los niveles de IL-6 permanecen elevados durante más tiempo que las citoquinas antes mencionadas, por lo que son más fácilmente detectables, siendo sus niveles proporcionales a la extensión del tejido dañado durante la intervención más que a la duración del propio proceso quirúrgico (30).

La inflamación sistémica y una respuesta procoagulante a la infección se encuentran estrechamente relacionadas. Las citoquinas inflamatorias, como IL-6, son capaces de activar la coagulación e inhibir la fibrinólisis (12). Así mismo, IL-6 actúa como factor estimulador de células B, factor de crecimiento de hibridoma/plasmocitoma, factor estimulador de hepatocitos y factor de diferenciación de células T citotóxicas. Actúa sinérgicamente con IL-1 en la proliferación de timocitos, y en combinación con TNF- α aumenta la proliferación de células T y promueve la activación y acumulación de PMNs. La administración de IL-6 no ocasiona compromiso hemodinámico (31).

IL-6 es también un importante mediador en la producción de proteínas de la fase aguda de origen hepático, durante la agresión y la convalecencia, esenciales para la respuesta inmune, la coagulación y la respuesta metabólica. Además, causa fiebre y activa el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (32).

La producción y secreción de IL-6 puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus, LPS, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), si bien durante la sepsis, se encuentra inducida por endotoxina, TNF- α o IL-1 β (12).

Interleuquina-10 (IL-10):

Fue descubierta en 1989 como un producto de las células Th2, que suprimía la producción de IFN- γ producido por las Th1. Es liberada por macrófagos y células T en respuesta a diversos estímulos incluyendo las endotoxinas, si bien su producción se encuentra retrasada respecto a la de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α , siendo la expresión de IL-10 inducida por éstas e inhibida por sí misma de modo autocrino (33-35).

Se trata de una citoquina anti-inflamatoria, efecto que ejerce frente a varios tipos celulares entre los que se encuentran macrófagos y células endoteliales. Concretamente la IL-10 media, en parte, en la expresión génica de la síntesis de citoquinas produciendo una inhibición en la producción de IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 por parte de monocitos y PMNs estimulados con endotoxina (36). Además promueve la liberación de receptores de TNF (p55 y p75) y la expresión de IL-1ra (receptor de IL-1 con acción antagonista) e inhibe la translocación de NK- κ B.

IL-10 es, por tanto, un componente normal del proceso inflamatorio y actúa disminuyendo su duración y magnitud. Esta afirmación se consolida por el hecho de que ratones carentes de IL-10 (“ratones knockout”) y ratones normales tratados con anticuerpos anti-IL-10 presentan una respuesta inflamatoria muy acentuada en respuesta a endotoxina o peritonitis (37, 38). Así mismo, se ha demostrado que la neutralización de IL-10 durante una endotoxemia, incrementa la producción de TNF- α por los monocitos y la tasa de mortalidad, mientras que su restitución reduce los niveles de TNF- α y los efectos negativos asociados a este factor (36, 39).

IL-10 es una de las citoquinas más frecuentemente encontrada en la circulación; la modulación de su actividad puede tener efectos beneficiosos pero también adversos en el desenlace. De forma endógena y administrada exógenamente, principalmente en modelos de shock endotoxémico y bacteriémico, reduce la magnitud de la respuesta inflamatoria y mejora el desenlace. Sin embargo, puede exacerbar la disfunción de células T, macrófagos y células NK (33), alterar su apoptosis, su función antimicrobiana e incrementar la mortalidad en otros modelos menos agudos de sepsis. Las propiedades anti-inflamatorias potenciales de IL-10 deben ser sopesadas cuidadosamente por su posible efecto inmunosupresor al considerar su uso en pacientes con inflamaciones agudas y síndrome séptico (40). El fenómeno anti-inflamatorio de IL-10 no puede separarse del efecto de inmunosupresión, y hay evidencias que muestran que la inmunosupresión que se observa tras la sepsis o en lesiones térmicas, está asociada

frecuentemente a una disminución de las respuestas mitógenas de linfocitos T y una apoptosis incrementada de los mismos (40).

Interferón- γ (IFN- γ)

Es una citoquina producida principalmente por linfocitos T y macrófagos. Puede actuar sinérgicamente con TNF- α para producir actividad citotóxica y citostática; de forma sinérgica incrementa la liberación de TNF- α promovida por IL-2 y facilita la producción de anticuerpos por las células B. IFN- γ aumenta la adhesión de linfocitos a las células endoteliales, induce cambios morfológicos en éstas y estimula la activación y acumulación de PMNs. Así mismo, aumenta la capacidad fagocítica de éstos y la función antimicrobiana de los macrófagos promoviendo su maduración e incrementando su actividad (41).

IFN- γ produce además, un aumento de la proliferación de linfocitos e incrementa la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α y la expresión de moléculas de adhesión y receptores celulares del TNF- α (41). Es esencial para la supervivencia en algunos casos de agresiones por bacterias y hongos. La administración de IFN- γ a pacientes sépticos puede mejorar algunos aspectos de la función inmune de las células (42) aunque otros estudios no han mostrado una disminución de las infecciones o mortalidad en pacientes quemados (43).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α):

TNF- α es la primera y más potente citoquina en responder en el individuo tras producirse una lesión o infección aguda. Las principales fuentes de producción de TNF- α son monocitos/macrófagos y también linfocitos T, abundantes en la zona peritoneal y esplénica (destacando las células de Kupffer) (9, 21).

La vida media del TNF- α circulante es de 14-18 minutos, y es degradado en diversos órganos incluyendo hígado, piel, tracto gastrointestinal y riñón (21).

TNF- α se encuentra involucrado en el reclutamiento y maduración de monocitos, macrófagos y PMNs, produciendo un efecto paracrino que permite la recuperación de las lesiones. Entre estos efectos paracrinos se encuentra la hemostasis, el incremento de la permeabilidad y proliferación vascular y la síntesis de colágeno (44). Por otra parte, promueve procesos metabólicos que contribuyen a mejorar la producción de nutrientes y proteínas de la fase aguda (19).

Entre los efectos negativos de TNF- α se encuentran el colapso circulatorio y el daño de órganos sólidos. Estos efectos dependen de múltiples factores; el efecto procoagulante del TNF- α favorece los fenómenos trombóticos de la microcirculación, que puede llevar a la necrosis celular y a un aumento de la permeabilidad. Además, el TNF- α contribuye a producir una depresión miocárdica y al acúmulo de macrófagos y PMNs activados en los lugares de inflamación o lesión (45).

TNF- α ejerce sus efectos a través de los receptores específicos de membrana TNFR-1 y TNFR-2. En condiciones fisiológicas a través de TNFR-1 se producen los principales efectos biológicos del TNF- α , incluyendo las respuestas inflamatorias, activación de NF-kB y apoptosis. También se apunta a este receptor como responsable de la actividad tóxica de TNF- α (41).

Los receptores solubles del TNF- α (sTNFR) se encuentran también elevados en las inflamaciones agudas, compitiendo así con la unión del TNF- α a sus receptores de membrana. Esto supone una regulación endógena a una posible respuesta inflamatoria exagerada, pero además de este efecto antagonista, los sTNFRs pueden servir como transportadores o reservorios de TNF- α en la circulación.

Altos niveles de TNF parecen tener un papel importante en la disfunción orgánica y en la mortalidad en modelos experimentales de shock endotóxico e infecciones bacterianas, pero no parece tener un papel importante en la mortalidad tras un modelo de sepsis inducida por punción del ciego tras su ligadura (CLP), tal y como observaron Ayala y col. en 1996 e Hiramatsu y col. en 1997 en sus experimentos, bloqueando el TNF- α en ratones (46, 47). Por tanto, otros mediadores deben contribuir a los cambios que se producen en la apoptosis y la inflamación tras CLP.

1.1.4.-Estrés oxidativo: Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La definición clásica de radical libre lo describe como cualquier especie química que existe de forma independiente, que contiene uno o más electrones desapareados. Dichos electrones desapareados confieren a la molécula una alta reactividad con otras moléculas para aparear dicho electrón, generando un producto más estable (48). Entre las moléculas denominadas de forma genérica radicales libres, se incluyen las especies reactivas de oxígeno (ROS) y algunos óxidos de nitrógeno. Los ROS son oxidantes producidos tanto en individuos sanos como en situaciones de enfermedad, y tienen funciones de defensa, intervienen como señales celulares y participan en la inflamación.

Las principales fuentes de ROS son los leucocitos y las células endoteliales. Su liberación se produce principalmente a través de la acción enzimática de NADPH oxidasa, xantina-oxidasa, citocromo p450 reductasa, lipoxigenasa y prostaglandina sintetasa entre otras (49). Entre las situaciones en que se producen, se encuentra la respiración aeróbica de la mitocondria y metabolismo del ácido araquidónico, los procesos de isquemia y reperfusión y el “estallido respiratorio” de los leucocitos, como se denomina a una serie de eventos que incluyen un aumento del consumo de oxígeno, aumento de la actividad de la vía de las hexosas monofosfato y aumento de la producción de diversas sustancias con propiedades antimicrobianas que derivan del metabolismo del oxígeno como por ejemplo el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido. Estas situaciones incluyen el shock producido en la revascularización de miembros, intestino o corazón isquémicos, así como pancreatitis, trasplante de órganos e inflamaciones sistémicas (48, 50). Además, como consecuencia de los procesos inflamatorios, se produce la activación de las células del sistema inmune, principalmente PMNs y células endoteliales, que son las principales fuentes de ROS, las cuales, una vez liberados, intervienen como mediadores a través de la generación de sustancias quimiotácticas y la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (48). Además, producen daño tisular directo y, al actuar promoviendo la generación de citoquinas estimulan las células endoteliales que producen más citoquinas amplificando la señal inflamatoria y finalmente produciendo daño adicional en los tejidos, que pueden estar alejados del lugar del daño primario (49).

Por otra parte, los ROS de los PMNs modifican sus propias membranas celulares quedando así marcados para su retirada por los macrófagos (51).

De este modo, cuando el equilibrio se rompe por una producción excesiva de agentes oxidantes o por una disminución de la capacidad antioxidante del organismo, se pueden producir daños oxidativos en un proceso conocido como “estrés oxidativo” (48).

1.1.4.1.-Sistemas antioxidantes del organismo

Hay una serie de mecanismos endógenos que sirven para proteger el organismo de la acción de los agentes oxidantes, entre los que se encuentran antioxidantes circulantes como la albúmina, intracelulares como el glutatión reducido (GSH), y actividades enzimáticas específicas como superóxido dismutasa (SOD). Así pues, frente a los ROS hay mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. Entre los no

enzimáticos se incluyen las vitaminas E y C, el ácido α -lipoico, la vitamina A (β -carotenos) y el GSH. Entre los sistemas enzimáticos se encuentran la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). Estas enzimas requieren metales como cofactores: hierro para la catalasa, selenio para la GPX y cobre, zinc o manganeso para la SOD, por lo que las trazas de metales se pueden considerar con acción antioxidante en cuanto que forman parte de los centros activos de estos sistemas enzimáticos (52).

1.2.-APOPTOSIS E INFLAMACIÓN

1.2.1.-Introducción

El término apoptosis o muerte celular programada define un programa codificado genéticamente, cuyas características morfológicas, bioquímicas y moleculares son diferentes de las de la necrosis (53). Igualmente, son diferentes desde el punto de vista de su mecanismo de acción ya que la necrosis es simplemente el resultado pasivo de una agresión a la célula, mientras que la apoptosis forma parte integral de sus procesos fisiológicos normales (53), es más, se trata de un proceso esencial para la vida, interviniendo en la gestación y el desarrollo del organismo (54). Del mismo modo, la apoptosis tiene lugar como proceso normal en la renovación de células de los tejidos (regeneración del epitelio intestinal y descamación de las células de la piel lesionada por el sol, entre otros), en la involución de órganos por la falta de hormonas tróficas, en la muerte celular tras la privación de factores de crecimiento o estímulos específicos y en células que han sufrido daños subletales (55). Además, la apoptosis se encuentra relacionada con diversas situaciones patológicas: así, la apoptosis de ciertas neuronas del cerebro contribuye a enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson, mientras que el fallo para iniciar la apoptosis por daños severos de su ADN, en las células que se dividen, contribuye al cáncer (56). Alteraciones en las señales de muerte celular, en receptores citoplasmáticos o de membrana y en los genes que controlan la apoptosis se encuentran involucradas en la patogénesis de malformaciones congénitas (57).

Entre los cambios morfológicos que se observan en la célula durante la apoptosis, y que permiten su diferenciación de la necrosis, se incluyen la fragmentación del ADN por acción de las endonucleasas, formándose fragmentos de 180-200 KDa (58), condensación de la cromatina, compactación de las organelas (citoconcentración), dilatación del retículo endoplásmico, alteraciones de la membrana y disminución del tamaño de la célula y del retículo endoplásmico, que se transforma en vesículas

(cuerpos apoptóticos). Otros eventos producidos durante la apoptosis son la elevación de los niveles citosólicos de Ca^{2+} y una pérdida de la regulación del pH que provoca una acidificación intracelular (53). La apoptosis, *in vivo*, culmina con la retirada de los cuerpos apoptóticos por otras células, evitando las complicaciones derivadas de la liberación del contenido celular. No provoca una respuesta inflamatoria, es decir, que los componentes residuales de la célula muerta son ingeridos por las células fagocíticas sin la intervención de los neutrófilos. Estos cambios morfológicos pueden ocurrir en una secuencia predecible y reproducible, que puede completarse en 30-60 minutos (59)

La necrosis, por el contrario, es una respuesta patológica que implica un incremento dramático del volumen de la célula, que finalmente lleva a la lisis. Es un tipo de muerte celular inducida por la exposición a compuestos o tratamientos nocivos (60, 61). Así, se produce la liberación del contenido celular, incluyendo proteasas y lisosomas al espacio extracelular, produciendo más activación de las células inflamatorias y alteraciones de la inflamación (51).

La apoptosis se produce como consecuencia de señales biológicas codificadas genéticamente en todas las células eucarióticas conocidas. Las células se mantienen vivas por una serie de señales como son factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, contacto con otras células etc., de manera que contienen a la célula para que ésta no entre en apoptosis, mientras que otras células no podrán competir con sus células vecinas, y entrarán en apoptosis debido a la falta de factores de supervivencia (54). Las señales de supervivencia del ambiente en que se encuentra la célula y sus sensores internos de la integridad celular, normalmente mantienen el control de la maquinaria de la apoptosis de la célula. Cuando esta célula pierde el contacto con las que la rodean o sufren un daño irreparable interno, la célula inicia la apoptosis. Igualmente, en una célula que simultáneamente recibe señales contradictorias para estimular o atenuar su ciclo de división, también se dispara la apoptosis (62, 63).

1.2.2.-Mecanismos y componentes de la apoptosis celular

La apoptosis esta regulada por dos vías principales: la primera implica a los miembros de la superfamilia de los receptores de TNF, y la segunda está bajo el control de los miembros de la familia de genes de Bcl-2, que incluye miembros pro y antiapoptóticos (64). La primera de estas vías se produce a través de receptores de membrana, denominados receptores de muerte, que al interaccionar con sus ligandos

correspondientes originan señales intracelulares que activan proteínas que por diferentes mecanismos ejecutan la apoptosis de la célula. Esta vía se inicia principalmente por los receptores de TNF- α (TNFRs) y por otro tipo de receptor de la familia de TNF denominado Fas (CD95), que pueden directamente activar una cascada de proteasas denominadas caspasas, siendo la caspasa-8 la caspasa iniciadora (62). La segunda es la denominada la vía intrínseca de la apoptosis, implica a la mitocondria y a los miembros de la familia Bcl-2, y lleva a la actuación de una cascada de caspasas, por la activación de caspasa-9 como caspasa iniciadora aunque en esta vía existen mecanismos de apoptosis independientes de las caspasas (59). Por tanto, estas dos vías no son independientes y pueden converger en la activación de la cascada de las caspasas.

1.2.2.1.-Vía extrínseca: Apoptosis por factores y receptores de muerte

En la definición clásica de apoptosis, las células están programadas para morir de forma autónoma. Sin embargo, la identificación de factores y receptores de muerte celular que regulan la apoptosis indican que ésta puede estar también controlada por un “factor” externo en algunas circunstancias (65).

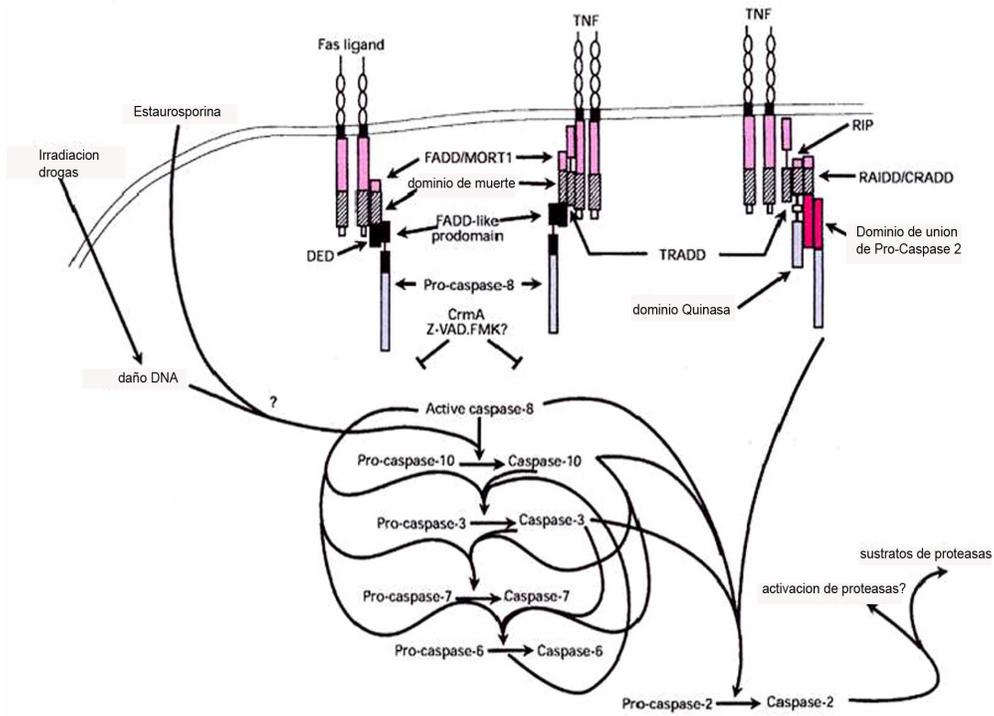
Esta vía se basa por tanto, en la interacción de receptores de membrana con sus ligandos correspondientes ya sean solubles o asociados a membranas celulares. Destacan el receptor Fas (también denominado CD95 o Apo-1) y su ligando FasL (CD95L) (61, 66). Además, existen otros ligandos y receptores que también pertenecen a la superfamilia del TNF. Entre los ligandos se encuentran las linfotoxinas, el ligando de CD30, el ligando de 4-1BB, el ligando de CD40, el ligando de CD27, y TRAIL (ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF) y entre los receptores se encuentran TNF-RI, TNFRII, el receptor de la linfotoxina- β , CD40, CD30, CD27 y otros identificados posteriormente, destacando DR-3, Apo-3 (cuyo ligando es el TWEAK), DR4 y DR5 (con el mismo ligando: TRAIL), DR6 y CAR1 (65, 66).

1.2.2.1.1-Fas (CD95)

La proteína Fas, también denominada CD95 o Apo-1 es el receptor del ligando FasL. Se trata de una proteína de membrana tipo I de 48 KDa, compuesta de 319-335 aminoácidos, caracterizada por tener dominios extracelulares ricos en cisteína (67). Se encuentra expresada en varios tejidos y células, incluidos el timo, hígado, corazón, riñón, ovarios y pulmones (67, 68), en células NK (69), células T y B activadas y células T y B malignas (61).

La unión de FasL y Fas o la unión a Fas de anticuerpos agonistas anti-Fas, induce la apoptosis de células que expresan Fas en su superficie (68). Parece ser que al igual que ocurre con el TNF y sus receptores, la unión de FasL produce la unión de los tres dominios del receptor Fas (trimerización de Fas), y su región citoplasmática trimerizada produce entonces la transducción de la señal (65). Una vez producida la trimerización, se origina el ligamiento de otras partes del receptor, denominadas dominios de muerte (DED). A continuación, una proteína citoplasmática, FADD (Factor asociado a dominios de muerte, también denominado MORT1), se une a través de su propio DED, a los DED ya ligados del receptor (62). Las señales que se originan a continuación se producen a través de una molécula denominada FLICE, que en realidad es caspasa-8 (70, 71). Esta proteína tiene dos dominios DED en la zona N-terminal, mediante los cuales se une a FADD. Parece que FADD interacciona con la procaspasa-8, que por autoproteólisis se activa pasando a caspasa-8 (72), que activa caspasas efectoras posteriores como la caspasa-9 o caspasa-3 produciéndose la apoptosis (62, 72). La figura 1 muestra los diferentes componentes que participan en la transducción de la señal, producida por la interacción de los receptores de muerte con sus ligandos correspondientes.

Figura 1.-Cascada de activación de las caspasas por interacción con receptores de la familia TNF.



1.2.2.1.2.-FasL (CD95L)

Es el principal ligando de la familia de TNF. Es una proteína de membrana tipo II, de 40 KDa, que tiene un extremo N-terminal en el citoplasma y uno C-terminal que se extiende por el espacio extracelular y que es similar al de los otros miembros de la familia (62). CD95L es una molécula homotrimérica. Cada trímero de CD95L se une a 3 receptores de CD95, e induce su trimerización para traducir la señal (73, 74).

FasL se encuentra expresado en linfocitos T activados y células NK, y de forma constitutiva en células endoteliales, en tejidos como los testículos y los ojos y en PMNs (75-79). Los órganos linfoides (timo, nódulos linfáticos, bazo), pulmones e intestino delgado expresan pequeños niveles de ARN mensajero (ARNm) de FasL, sugiriendo un papel de FasL en el sistema inmune en general y en la inmunidad de mucosas (75).

La acción de Fas y FasL se representa esquemáticamente en la figura 2. Fas y FasL juegan un importante papel principalmente en 3 tipos de apoptosis fisiológica:

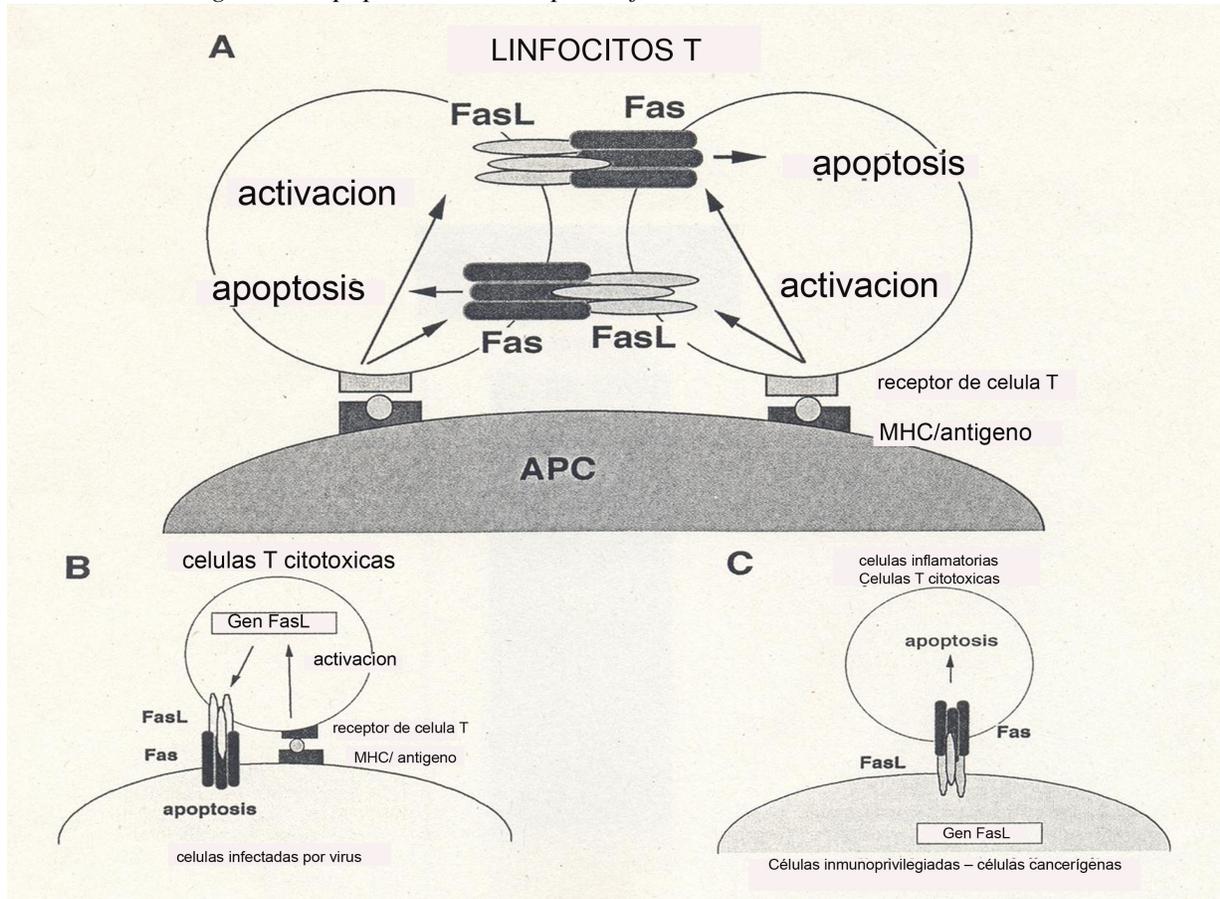
A.- Eliminación periférica de células T maduras activadas al final de la respuesta inmune.

B.- Eliminación de células diana como aquellas infectadas por virus o células cancerígenas mediante células T citotóxicas y células NK.

C.- Eliminación de células inflamatorias en lugares “inmunoprivilegiados” como el ojo y los testículos (62, 80).

Además, el FasL presente en células endoteliales puede ejercer un efecto ateroprotector por su habilidad para inducir la apoptosis de células mononucleares que intentan invadir la pared del vaso en ausencia de un estímulo inflamatorio (81). Por tanto, Fas actúa produciendo la apoptosis de las propias células inflamatorias y como mecanismo para eliminar otras células por parte de las células T citotóxicas (CTLs). La identificación de FasL como molécula citotóxica viene a completar el mecanismo de lisis enzimática (sistema perforina/granzima B) utilizado por los CTLs y células NK para eliminar las células diana, siendo ambos los principales mecanismos para la citotoxicidad mediada por CTLs (66). Los linfocitos T CD8⁺ y NK emplean ambos sistemas mientras que los linfocitos T CD4⁺ usan preferentemente el sistema del FasL. También es posible que las CTLs utilicen otro factor/es de muerte como TNF- α o TRAIL en el caso de estar bloqueados los otros dos sistemas (66).

Figura 2.- Apoptosis mediada por linfocitos T, vía Fas/FasL.



1.2.2.1.3.-Fas y FasL solubles

Del mismo modo que la proteólisis del TNF asociado a la membrana produce TNF soluble, el FasL asociado a la membrana, por acción de una metaloproteasa, sufre una liberación proteolítica para originar una citoquina soluble de 26-29 kD que tiene una estructura trimérica, denominada FasL soluble (sFasL) (82). sFasL es funcional, aunque parece que FasL actúa de forma local por interacción célula-célula en situaciones fisiológicas, mientras que la forma soluble se libera para atenuar el proceso (83). Schneider y col., en 1998 (84), observaron que en contraste con la forma unida a la membrana, el ligando soluble es pobremente activo, sugiriendo un modelo en el que la actividad apoptótica del FasL de membrana es disminuida por su procesado y liberación, asegurando que el sFasL no causaba daño tisular (84), al contrario de lo que se pensó en un principio (61, 74). Sin embargo, no se puede excluir que elevados niveles locales de sFasL, en conjunción con otros agentes citotóxicos, puedan producir la muerte celular (84). Además sFasL puede mediar el “suicidio” autocrino de células T y este mecanismo puede ser responsable de la supresión de la respuesta inmune y la

tolerancia periférica por pérdida de células T (85). Algunos trabajos muestran que la forma soluble de FasL en humanos induce la apoptosis de forma eficiente en algunas células que expresan Fas. Suda y col., en 1996, (86) observaron que la forma soluble de FasL eliminaba las células de forma selectiva; los linfocitos T de sangre periférica potencialmente útiles no son eliminados mientras que sí lo son las peligrosas células T senescentes activadas. Kim y col., en el año 2000, observaron que sFasL producido por PMNs así como el TNF- α , incrementaban de forma significativa la apoptosis y la activación de caspasa-3 de células del epitelio gástrico infectadas con *H. pylori* (87).

Por otro lado, niveles elevados de sFasL se han detectado en el suero de pacientes que padecen diferentes enfermedades inflamatorias tales como lupus eritematoso, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren (88) y en otras enfermedades como leucemia (82), linfocitosis, miocarditis (89, 90), enfermedad hepática de los alcohólicos (91), fallo cardíaco congestivo (81) y en suero de pacientes con leucemia linfocítica y linfomas de células NK (82). También se ha demostrado que sFasL actúa como factor quimiotáctico para los PMNs humanos en ensayos de migración *in vitro* aunque por vías de señalización diferentes a las de la apoptosis (73).

Existe asimismo, una forma soluble de la molécula Fas, denominada Fas soluble (sFas) (92). La hipótesis más extendida es que sFas bloquea la apoptosis al competir con Fas por la unión a FasL, bloqueando así la apoptosis inducida por éste (92).

Al igual que ocurría con ciertas citoquinas, niveles elevados de sFas se han relacionado con el fallo de órganos y la supervivencia (93, 94) y han sido detectados en el plasma de pacientes con procesos inflamatorios generalizados (95, 96). Además, pueden modular la actividad apoptótica de PMNs, inhibiéndola o retrasándola durante el estado inflamatorio (97).

1.2.2.1.4-Caspasas

1.2.2.1.4.1.-Introducción

Son proteasas con cisteína en su estructura, que actúan sobre los grupos de ácido aspártico de las proteínas. Las caspasas son sintetizadas en forma de proenzimas inactivas que presentan tres dominios (uno amino terminal, una subunidad grande y una subunidad pequeña), que se activan de forma específica y secuencial. Dicha activación puede producirse por la interacción con otras caspasas, pero también pueden regular su propia activación al actuar directa o indirectamente sobre su propio precursor, originándose una activación exponencial. Además, hay inhibidores, que pueden actuar

sobre las procaspasas, o proteínas implicadas en la activación de las caspasas, o pueden estar inhibidas por su confinamiento en lugares específicos. Sus reacciones proteolíticas son muy específicas, actuando sobre una serie de sustratos concretos (98).

Hay que tener en cuenta que las vías en las que están implicadas las diferentes caspasas son diferentes en función tanto del tipo de estímulo como del tipo de célula donde se producen; por ejemplo, la caspasa-9 es importante para la activación de la caspasa-3 inducida por radiación UV en células del SNC, mientras que en el caso de timocitos y esplenocitos, la caspasa-9 y la caspasa-3 parecen tener vías independientes al ser activadas por radiación UV. Por tanto, hay células o estímulos en los que la muerte celular incluye la participación de ambas caspasas, ninguna de ellas, o alguna de forma independiente (99, 100).

1.2.2.1.4.2.-Caspasa 3 y sus sustratos

La caspasa-3, también denominada CPP32, APOPAIN o YAMA, es una de las caspasas efectoras más importantes y mejor caracterizada. La enzima activa es un heterodímero con subunidades de 17 y 12 KDa derivados de una proenzima de 32 KDa (101). Se encuentra ampliamente distribuida, con una alta expresión en líneas celulares de origen linfocítico, lo cual sugiere que tiene un importante papel en la apoptosis en el sistema inmune.

Es uno de los ejecutores clave de la apoptosis, y una vez activada actúa sobre otras caspasas, siendo la responsable parcial o total de la rotura proteolítica de muchos sustratos que presentan una región similar a la encontrada en su sustrato más estudiado, la poly ADP-ribosa polimerasa (PARP) (102). Entre los sustratos de caspasa-3 se encuentran además del PARP, la DNA protein-quinasa (DNA-PK: enzima reparadora del ADN), U1-70 KDa y las ribonucleoproteínas heteronucleares C1 y C2 (proteínas nucleares implicadas en las modificaciones postranscripcionales del ARNm), proteínas reguladoras de esteroides (SREBP), el inhibidor de la disociación del D4-GDP (reguladora de las GTPasas que controlan los cambios morfológicos de citoesqueleto y membranas de células linfoides y mieloides), la proteína denominada “huntingtin” (producto génico de la enfermedad de Huntington, en la que hay una alteración de la apoptosis) y proteínas de retinoblastoma (Rb: proteína reguladora del ciclo celular, con una conocida función antiapoptótica) (103-109).

Por tanto, una de las funciones centrales de la caspasa-3, u homólogos similares, en la apoptosis es la inducción de la degradación del DNA (104) y la condensación de la

cromatina al producirse la interacción de FasL o TNF- α (99). Para la apoptosis nuclear, es necesaria la intervención de uno o más componentes citoplasmáticos, además de las caspasas mencionadas, que ayudan a la caspasa-3 a entrar en el núcleo, donde actúa sobre sustratos, aunque también es posible que sea el sustrato de la caspasa-3, situado en el citoplasma, el que cause la degradación del ADN al ser activado por caspasa-3 y entrar en el núcleo (110).

Además de en el núcleo, la caspasa-3 también se une a sustratos del citoplasma, como la citoqueratina 18, aunque debe haber otros factores implicados como demuestran experimentos realizados en ratones deficientes en caspasa-3 (111).

En células que sobreexpresan caspasa-3 se ha demostrado en experimentos *in vitro*, que la proteína antiapoptótica Bcl-2 puede ser un sustrato de esta caspasa-3, en la apoptosis inducida por Fas o por déficit de IL-3, disparándose la apoptosis. Además, la interacción con Bcl-2 puede producir un fragmento que promueve la apoptosis, activándose caspasas que ocupan un lugar anterior en la cascada, contribuyendo a su amplificación (112-114).

El sustrato de la caspasa-3, **PARP**, es una proteína nuclear implicada en modificaciones postranscripcionales fundamentales en muchos procesos como son la reparación del ADN, estabilidad de la cromatina, proliferación celular y muerte celular (115). Kaufmann y col., en 1993 (103) observaron que esta proteína de 116 KDa era procesada específicamente liberándose un fragmento de 85 KDa, y otro de 25 KDa, en muchas formas de apoptosis, incluyendo la inducida por quimioterápicos en líneas celulares y por dexametasona en timocitos. Se comprobó además, que tanto los receptores de TNF- α como Fas, provocaban esta misma liberación. En experimentos *in vitro*, se ha observado que las caspasas-2, -4, -6, -8, -9 y -10, añadidas en altas concentraciones, pueden disociar el PARP aunque parece que caspasa-3 y -7 son responsables principales de la segmentación del PARP durante la apoptosis (102). De este modo, el PARP liberado puede utilizarse como marcador de la actividad caspasa y la apoptosis.

1.2.2.2.-Via intrínseca de la apoptosis

1.2.2.2.1.-Mitocondria y apoptosis

Además de la cascada proteolítica de las caspasas que se ha mencionado anteriormente, otro evento implicado a continuación de la activación de la caspasa-8 es

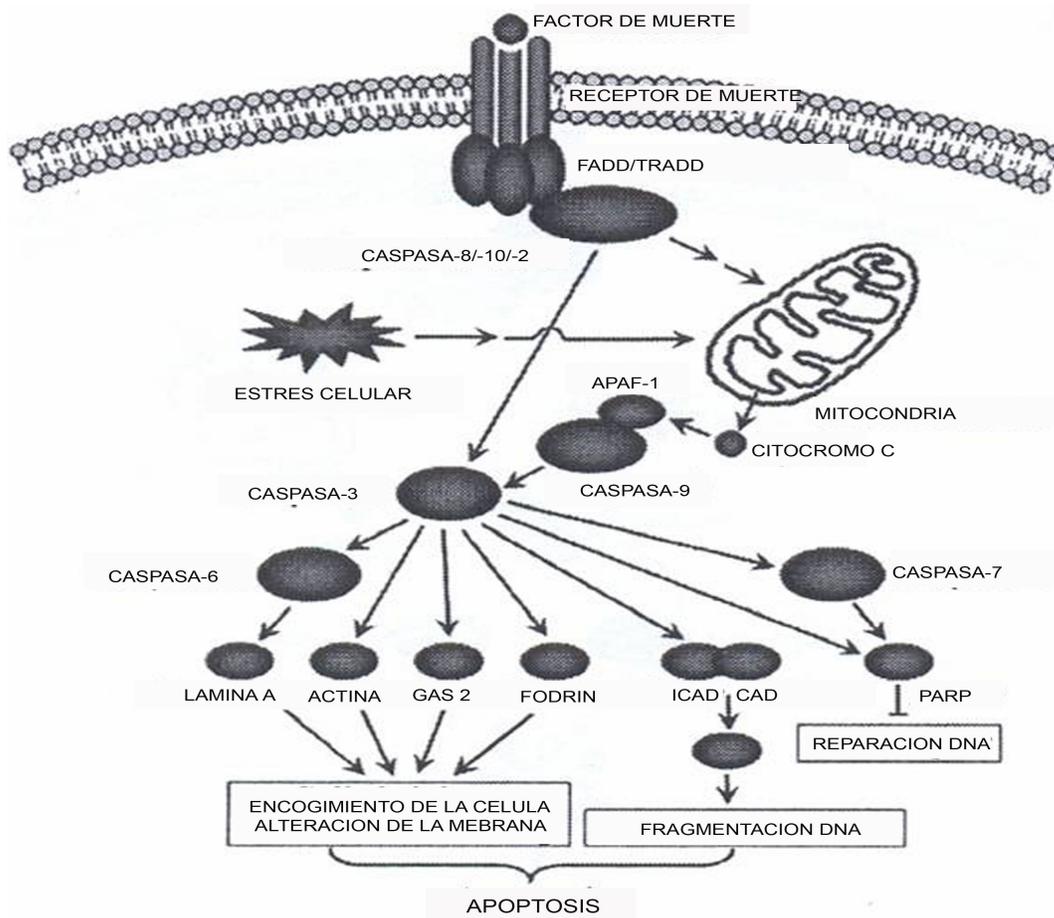
la liberación de citocromo c de la mitocondria. La activación de caspasa-8 produce su interacción con la proteína Bid, una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, produciéndose la liberación de citocromo c (116-118). Se cree que una vez que el citocromo c es liberado, la muerte celular puede producirse por dos mecanismos:

1.-Un mecanismo apoptótico rápido que implica la activación de caspasas por la unión del citocromo c a la proteína adaptadora Apaf-1, induciendo la asociación de ésta con la procaspasa-9, la cual procesa y activa otras caspasas (59).

2.-Un mecanismo más lento ocasionado por el colapso del transporte de electrones. Este segundo mecanismo tiene lugar por la depleción del citocromo c de la mitocondria debido a la ruptura de ésta, lo que conlleva la pérdida del gradiente electroquímico de la membrana interna ($\Delta\Psi_m$), produciéndose una serie de consecuencias deletéreas para la célula que incluyen la generación de ROS y la disminución de la producción de ATP (59). Otros mediadores de la apoptosis también son liberados de la mitocondria, como es la procaspasa-3, liberada al citosol durante la apoptosis, aunque no está claro si es activada después de su liberación (59). En ocasiones, durante la apoptosis se puede producir un colapso del potencial de la membrana interna de la mitocondria, resultando en la formación de un gran canal conocido como poro de transición de permeabilidad (PT). La apertura de este poro produce la expansión del espacio de la matriz mitocondrial, que puede provocar la ruptura de la membrana externa, liberando al citosol proteínas activadoras de las caspasas, que estaban localizadas en el espacio intermembrana.

En la figura 3 se representa la maquinaria de la apoptosis mediada por factores de muerte y la implicación de la mitocondria y la liberación de citocromo c. El citocromo c parece ser importante en la apoptosis iniciada por estímulos como el daño del DNA o los glucocorticoides; sin embargo su importancia para la apoptosis inducida por ligandos de muerte es controvertida. En experimentos *in vitro* se ha observado que la mitocondria, citocromo c y Bid no tienen obligatoriamente un papel en la apoptosis mediada por FasL, aunque debe contribuir a esta función en algún contexto (72). La unión a Fas de anticuerpos agonistas anti-Fas, además de un incremento en PMNs de la actividad de caspasa-3 y caspasa-8, produce un incremento de la permeabilidad mitocondrial. Estudios con inhibidores farmacológicos de la actividad caspasa muestran que la actividad de la caspasa-8 tiene lugar antes, y la activación de caspasa-3 después de la disrupción de la mitocondria (119).

Figura 3.- Interacción entre la apoptosis por factores de muerte y la mitocondria.



1.2.2.2.2.-Familia de proteínas Bcl-2

Son una familia de proteínas localizadas principalmente en la mitocondria, que tienen un papel fundamental en la regulación de la apoptosis celular. Se han identificado en mamíferos varios miembros de la familia Bcl-2 (homólogos de CED-9): Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, y Mcl-1 que inhiben la apoptosis, mientras otros como Bax, Bik, Bak, Bad y Bcl-xs, activan la apoptosis (120-122). Los productos de ambos tipos de genes forman homo y heterodímeros, y el efecto que se produce viene determinado por las cantidades relativas de ambos (122, 123). De esta forma se cree que la razón Bcl-2/Bax determina la supervivencia o muerte de algunos tipos de células tras un estímulo apoptótico.

Bcl-2 es el miembro antiapoptótico más estudiado. Se encuentra en la cara externa de la membrana mitocondrial, en el retículo endoplásmico (ER) y en la cubierta nuclear (59, 124). Previene la apoptosis inducida en diferentes tipos de células por un amplio rango de estímulos nocivos, incluyendo hipoxia, falta de suero, glucosa, citoquinas y

factores de crecimiento, peroxidación de la membrana, radiación ionizante, glucocorticoides, ionóforos del calcio, anti-CD3, dexametasona, estaurosporina, drogas citotóxicas y en algunos casos por ROS (120-122, 125-127). Además, la sobrerregulación de Bcl-2 parece ser un mecanismo de selección positiva para el desarrollo de linfocitos, y su continua expresión es crítica para la supervivencia de las células T y B periféricas maduras.

Bcl-2 ejerce su efecto antiapoptótico manteniendo la integridad de la mitocondria, previniendo de este modo la liberación al espacio intermembrana, de moléculas proapoptóticas, como proteínas activadoras de las caspasas y factor inductor de la apoptosis (AIF) (128). Bcl-2 previene de forma directa o indirecta la liberación de citocromo c, que puede facilitar un cambio en la estructura del Apaf-1 que permite la actuación sobre la procaspasa-9 (129). Además, se piensa que Bcl-2 forma un complejo con Apaf-1 y caspasa-9, manteniendo a esta última inactiva, de forma que el estímulo apoptótico causa la disociación de Bcl-2, permitiendo la activación de la caspasa-9 y la muerte por apoptosis (130). Por otro lado, las células en apoptosis pueden mostrar una reducción del potencial transmembrana mitocondrial debido a la apertura de poros PT inducidos por varios agentes, incluyendo Ca^{2+} , H_2O_2 e hidroperóxido ter-butílico y las propias caspasas. Bcl-2 puede prevenir la aparición del poro PT mientras que Bax induce tanto PT como la apoptosis (131, 132). En células hematopoyéticas, la apoptosis se ha relacionado con una disminución de la cantidad de Ca^{2+} en el citosol, siendo estas alteraciones del Ca^{2+} inhibidas por la sobreexpresión de Bcl-2 (133), aunque parece que su diana funcional es mantener el potencial de la membrana mitocondrial regulando el transporte de iones aumentando el flujo de H^+ (133). Precisamente en los lugares donde está localizado Bcl-2, es donde se generan ROS. Bcl-2 no parece influir en la generación de éstos, pero tiene funciones antioxidantes (51), y parece prevenir el daño oxidativo de los constituyentes celulares, incluyendo los lípidos de las membranas (125).

Las propiedades antiapoptóticas de Bcl-2 no tienen por qué implicar una inhibición de las caspasas, de modo que Bcl-2 podría ser inefectivo en la inhibición de apoptosis mediada por receptores tipo TNF (102). Las señales a través de Fas no regulan negativamente Bcl-2, ni inducen sus antagonistas Bax y Bcl-xS.; es posible que Bcl-2 y Fas regulen diferentes vías al menos en linfocitos (134). Así, Bcl-2 protege debilmente frente a la apoptosis en linfocitos inducida por la unión de ligandos al receptor CD95 (134). Sin embargo, CD95 puede disparar vías alternativas ya que Bcl-2 puede proteger

frente a la muerte inducida por CD95 en ciertos tipos de células (135-138), aunque no inhibe la apoptosis en la mayoría de éstas, puesto que las caspasas ya han sido liberadas con anterioridad y se producirá la apoptosis de todas formas (139). Bcl-2 sí tiene efecto en la inhibición de la apoptosis producida por otras causas, como es la inducida por prooxidantes, debido a que en este caso, la disrupción de la mitocondria ocurre con anterioridad a la activación de la caspasa-3, exposición de fosfatidilserina (PS) y alteraciones del núcleo.

En cualquier caso, Bcl-2 muestra un efecto protector en la apoptosis celular, que puede traducirse en un efecto beneficioso para el individuo en determinadas situaciones. Así, Bcl-2 en la sepsis, produce dicho efecto protector al prevenir la muerte de linfocitos, si bien, únicamente se ha demostrado en experimentos con ratones (140). Sí se ha comprobado en la sepsis humana, que los niveles de Bcl-2 están disminuidos en las células mononucleares, en los pacientes sépticos respecto a los críticos no sépticos y que dichos niveles en los pacientes que no sobrevivieron eran del orden de 10 veces menores que los de aquellos que sobrevivieron (64). Además, aunque no había cambios en la expresión de Bax, la razón Bax/Bcl-2 estaba afectada por la disminución de Bcl-2, lo cual se ha descrito previamente como un reostato que dispara la apoptosis (125, 140).

1.2.2.3.-Fosfatidilserina (PS) como marcador de la apoptosis: Anexina V

Entre las alteraciones que tienen lugar durante la apoptosis se encuentra la disrupción de los componentes del citoesqueleto que puede estar facilitando la redistribución de los fosfolípidos de membrana. Cuando la célula es viable mantiene una asimetría entre ambos lados de la membrana plasmática, mientras que durante la apoptosis se produce la exposición del fosfolípido PS en el exterior de la misma (141).

Este evento fue observado primero en plaquetas (142) y en eritrocitos senescentes (143). Fadok y colaboradores, en 1992, fueron los primeros en demostrar que la exposición de PS en la superficie tenía lugar en las células nucleadas durante la apoptosis (144,145). Por otro lado, la sobreexpresión de represores conocidos de la apoptosis, como el Bcl-2 y Ab1, inhibe la externalización de la PS (123). Estos cambios en la asimetría de la membrana preceden al daño que puede llevar a la liberación de enzimas de la célula que son perjudiciales para los tejidos vecinos (58), tienen lugar antes de los cambios morfológicos asociados a la apoptosis y se produce con posterioridad a la cascada proteolítica de las caspasas, pero posiblemente antes de la condensación nuclear y rotura de los constituyentes del citoesqueleto intracelular y la

matriz nuclear (145). La exposición de la PS en las células apoptóticas tiene otras implicaciones: participa en el reconocimiento y eliminación específicas por parte de los macrófagos (145).

Las **anexinas** son una familia de proteínas implicadas en múltiples aspectos de la biología celular incluyendo la regulación del transporte a través de la membrana. La Anexina V fue inicialmente descrita por Bohn y colaboradores (146), que en 1984, la aislaron de la placenta de humanos y la llamaron proteína de placenta 4 (PP4). Posteriormente, Reutelingsperger y col. (147) la aislaron de cordón umbilical por su actividad anticoagulante y fue llamada anticoagulante-vascular- α (171). Estas observaciones llevaron al estudio de la interacción de PS con Anexina V en células apoptóticas por el conocimiento de que la Anexina V se une, en presencia de iones de Ca^{2+} , específicamente a la membrana cuando PS está presente (148). La unión de la Anexina V a la PS es calciodependiente, reversible y se produce con una constante de disociación (Kd) de aproximadamente 5×10^{-10} M. En el caso de las células necróticas, la unión de la Anexina V se debe a la ruptura de la integridad de la membrana plasmática, por la entrada de la Anexina V y su unión a la PS de la cara interna de la membrana (141). Así, la Anexina V es un potente discriminador entre células viables y apoptóticas. Anexina V conjugada con FITC y en combinación con yoduro de propidio (PI), puede ser utilizada para distinguir células viables, en apoptosis y necróticas (53).

1.3.-AGRESIÓN Y RESPUESTA INFLAMATORIA

1.3.1.-SIRS, CARS y sus posibles consecuencias.

Las citoquinas dirigen la respuesta inflamatoria al lugar donde se ha producido una agresión o una inflamación y son necesarias para una correcta recuperación de las lesiones. Sin embargo, una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias desde el lugar de la agresión, puede ocasionar inestabilidad sistémica y hemodinámica. Dicha situación es conocida como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (**SIRS**). El SIRS representa, por tanto, la situación clínica en la cual la función de contención de la inflamación ha fallado. Se puede definir como un cuadro subclínico o clínico progresivo caracterizado por una respuesta inflamatoria generalizada, asociado a una agresión orgánica, independientemente de su causa. Cuando el SIRS es resultado de un proceso infeccioso confirmado, es denominado sepsis. En este caso, el término sepsis representa la respuesta inflamatoria sistémica de la infección presente (149). Parece ser

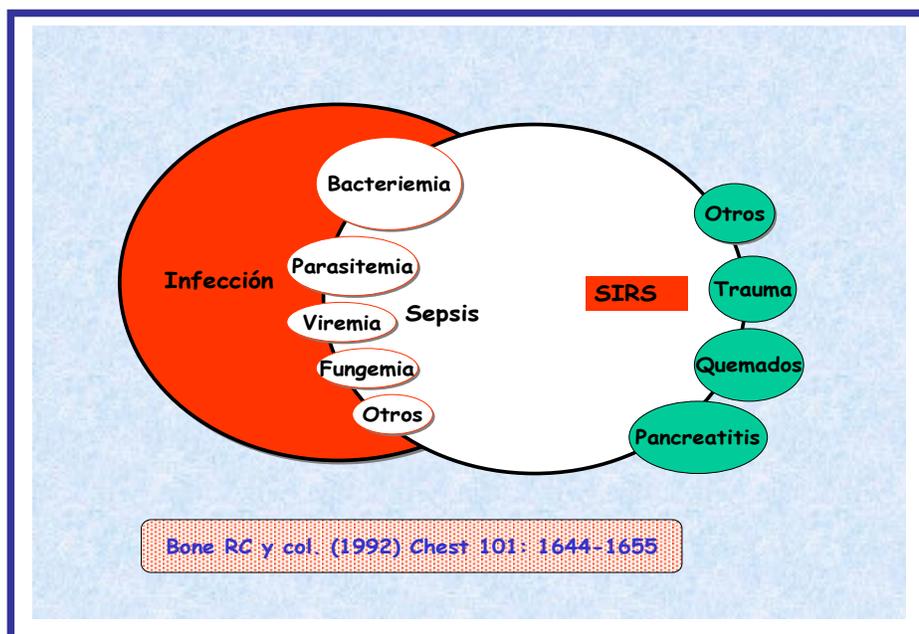
que una respuesta similar o incluso idéntica, puede producirse en ausencia de una infección, es decir, que la activación de células inflamatorias y la liberación de citoquinas pueden producir un síndrome prácticamente indistinguible de la respuesta sistémica a una infección grave (150). De este modo, Bone y colaboradores, en 1992, propusieron el término SIRS para describir este proceso inflamatorio independientemente de su causa, que puede ser infeccioso pero también puede ser no infeccioso como es el caso de los SIRS producidos como consecuencia de pancreatitis, quemaduras y traumatismos severos entre otros (151). En la figura 4 se representa la relación entre SIRS, sepsis e infección.

Criterios del SIRS:

El SIRS puede producirse tras una amplia serie de lesiones e incluye al menos dos de las siguientes manifestaciones clínicas aunque no está limitada a ellas:

- 1.-Temperatura corporal mayor de 38°C o menor de 36°C.
- 2.-Frecuencia cardiaca mayor de 90 pulsaciones por minuto.
- 3.-Taquipnea, caracterizada por una frecuencia respiratoria superior a 20 inspiraciones por minuto, o hiperventilación, indicada por una presión parcial de CO₂ (PaCO₂) inferior a 36 mm Hg.
- 4.-Una alteración en los niveles de leucocitos, tanto por encima de 12000 células/ μ l como por debajo de 4000 células / μ l, o la presencia de más de un 10% de neutrofilos inmaduros.

Figura 4.- Esquema de la relación entre la sepsis, infección y SIRS.



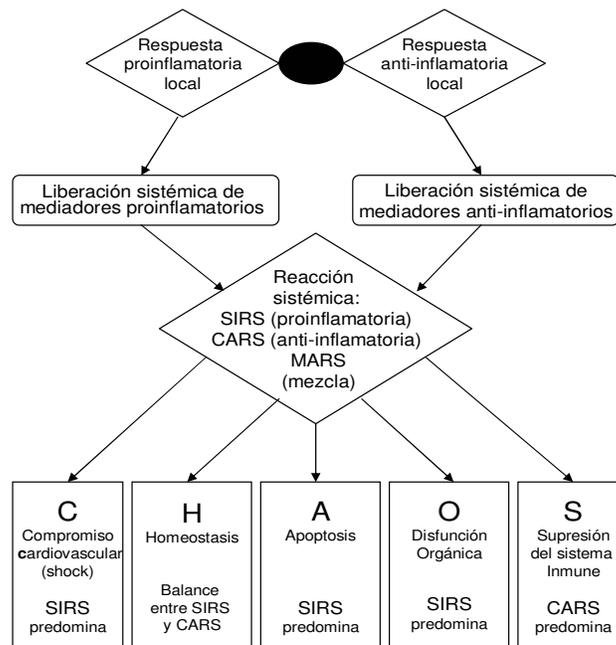
Al producirse el SIRS, simultáneamente se induce la producción de citoquinas anti-inflamatorias contra él. Los mediadores pro y anti-inflamatorios interaccionan inicialmente en el microambiente de la inflamación y, si se produce un balance, se restaura la homeostasis. Es decir, que en una inflamación normal la restauración de las condiciones pasa por la producción de citoquinas anti-inflamatorias que contrarregulan el proceso inflamatorio. Por tanto, se cree que tienen la función de inhibir la inflamación una vez ésta ha cumplido su propósito. De esta forma, la presencia de citoquinas anti-inflamatorias podría servir para atenuar algunas de estas respuestas exageradas. Sin embargo, un exceso de actividad anti-inflamatoria podría ser perjudicial. Esta situación en que las citoquinas anti-inflamatorias se producen en exceso, y se hacen sistémicamente dominantes, se denomina Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria (**CARS**) (152). Si esta reacción es muy severa, puede manifestarse clínicamente como anergia o inmunosupresión, comprometiendo la recuperación del paciente, con una susceptibilidad a las infecciones aumentada, lo cual se debe a que en el CARS los mediadores anti-inflamatorios que se liberan, especialmente las citoquinas, tienen un efecto importante sobre la función de los monocitos, incluyendo la actividad de presentación de antígenos (153). De este modo, en un amplio número de pacientes, las manifestaciones clínicas de la sepsis no se corresponden con una respuesta inflamatoria sistémica por citoquinas, sino que se deben a esta respuesta anti-inflamatoria refractaria. Así, la idea del CARS, lleva a una respuesta anti-inflamatoria exagerada, del mismo modo que una respuesta proinflamatoria exagerada lleva al SIRS (9).

Además de los síndromes descritos (SIRS y CARS), se ha propuesto que en función de la relación temporal de las señales pro y anti-inflamatorias se puede producir un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Antagonista Mixta (MARS). Es decir, que puede haber múltiples fluctuaciones de SIRS y CARS, pudiendo algunos pacientes sufrir un síndrome mixto (153).

Por tanto, la respuesta del organismo a un daño inicial de cualquier tipo (infeccioso, trauma, quemadura) será una respuesta inflamatoria, pudiendo producirse como resultado el SIRS, CARS ó MARS según predomine la respuesta proinflamatoria, anti-inflamatoria o mixta. El espectro de consecuencias derivadas de estas respuestas, denominado **CHAOS** (compromiso o shock **C**ardiovascular, **H**omeostasis, **A**poposis, disfunción **O**rgánica y **S**upresión del sistema inmune), se encuentra recogido en la figura 5, donde queda reflejado que las respuestas inflamatorias sistémicas pueden tener

consecuencias deletéreas diversas que afecten al sistema cardiovascular, la apoptosis, la función de sistemas orgánicos y al propio sistema inmune.

Figura 5.- Espectro de consecuencias derivados de las diferentes respuestas inflamatorias sistémicas.



Este nuevo concepto sugiere además, que la estrategia terapéutica será diferente; terapia convencional de anti-mediadores o antagonistas serán efectivos en un predominio del SIRS, mientras que si el CARS es el predominante, la terapia requerirá una nueva estrategia que debería reforzar la capacidad inmunológica del paciente (9).

1.4.-Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (MODS)

Una de las principales consecuencias negativas que puede producirse como consecuencia del desarrollo de SIRS es la disfunción orgánica. Cuando dicha disfunción es grave y afecta a más de un órgano se habla de fracaso multiorgánico (FMO), que representa el desenlace más severo del SIRS y puede denominarse Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (MODS).

En contraste con el SIRS, cuyos criterios definen una respuesta fisiológica apropiada y adaptada, el desarrollo de la disfunción orgánica es siempre perjudicial para el paciente. Por tanto, es apropiado considerar el MODS como un síndrome y no una enfermedad a ser tratada, pero cuyo desarrollo debe ser prevenido. El MODS,

invariablemente supone una amenaza para la vida que evoca a los cambios fisiológicos de la inflamación sistémica. El MODS puede entenderse como una recuperación inadecuada de la inflamación sistémica, un síndrome que refleja las consecuencias adversas de una respuesta que es potencialmente preservadora de la vida (154).

Aunque el SIRS está presente de forma más frecuente en pacientes que desarrollan MODS, son muchos los pacientes con SIRS que no llegan a desarrollarlo. Inicialmente se mostró que el uso de los criterios del SIRS para predecir la aparición del MODS o infecciones en pacientes con trauma no era muy fiable (150). Sin embargo, posteriormente, Gando y col., en 1997 (155), estudiaron 40 pacientes con trauma y vieron que la duración del SIRS está relacionada con el MODS, de forma que el SIRS tal y como está definido actualmente, es bastante sensible para discriminar aquellos pacientes que desarrollan MODS de aquéllos que no lo desarrollan.

Si bien existen diversas teorías sobre el desarrollo del MODS, todas confluyen en la transición del SIRS al MODS que se puede resumir del siguiente modo: a diferencia de lo que sucede en el proceso normal tras una lesión o herida, en el caso del SIRS, se produce un fenómeno sistémico de activación de factores iniciadores y quimioatrayentes, que conduce al contacto de éstos con todos los PMNs que haya en la circulación y también de todas las células endoteliales. Del mismo modo, estas señales son reconocidas también por los monocitos circulantes, que en vez de ser dirigidos a un lugar específico lesionado, se encuentran rodeados por quimioatrayentes que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, las cuales, son vertidas al fluido extracelular. Así, los PMNs, a diferencia de lo que sucede en un proceso de lesión localizada, no disponen de un gradiente de quimioatracción para migrar, sino que se produce la interacción con el endotelio a lo largo de toda la circulación, si bien, hay un predominio de acumulación de PMNs en los tejidos viscerales, coincidiendo con aquellos que se encuentran finalmente afectados en el desarrollo del MODS, es decir, pulmones, hígado e intestino, donde aparece el mayor grado de PMNs extravasados. Así, se produce un ambiente procoagulante y una vasoconstricción que da lugar a una trombosis microcirculatoria. Este proceso, que forma parte de la estrategia normal de contención en respuesta a una lesión o infección local, cuando se produce de forma sistémica o descontrolada, puede ser perjudicial al producirse una pérdida progresiva de la oxigenación y disponibilidad de sustratos en los tejidos. Así, como consecuencia de la vasoconstricción y la trombosis, se produce una disminución de la perfusión que da como resultado en una necrosis focal (156, 157).

Por lo general los sistemas más afectados en el MODS son el respiratorio, el cardiovascular (suelen ser los primeros en fallar), el hígado y el riñón (149) aunque en esta secuencia hay diferencias según los trabajos consultados (150). Además, hay un incremento lineal en la mortalidad en función del número de sistemas orgánicos que fallan (150, 158, 159-161) e influye además el grado de disfunción y el tiempo que dura este fallo (150).

Un importante avance ha sido el desarrollo de sistemas de puntuación para el MODS, como el “Multiple Organ Dysfunction Score”, el “SOFA (Sequential Organ Failure Assessment score)” y el “Logistic Organ Dysfunction System”, que aportan métodos para comparar resultados de los numerosos ensayos realizados y permite identificar los pacientes de alto riesgo (161-164).

1.5.-EPIDEMIOLOGÍA DEL SIRS/MODS

La prevalencia del MODS se ha visto incrementada como resultado no sólo de las mejoras en las tecnologías de soporte vital (tanto medicación como dispositivos) sino también por la aplicación de estas tecnologías a una mayor población de pacientes de alto riesgo. En la incidencia del MODS hay un predominio en los subgrupos poblacionales de ancianos, cirugía de urgencia, cirugía de abdomen séptico y politrauma (149).

En cirugía gastrointestinal, cerca del 84% de los pacientes desarrollan SIRS después de la intervención quirúrgica; sin embargo, el 99% de los pacientes con SIRS pero sin sepsis se recuperaban sin desarrollar disfunciones orgánicas graves (165). La incidencia de sepsis se ha visto incrementada en los últimos 60 años y es la causa de muerte por MODS más común en UCI en EEUU y Europa (9). Mientras que casi todos los pacientes con sepsis desarrollan la disfunción de un sistema orgánico, la disfunción de múltiples órganos tiene lugar en el 24-30% de los pacientes con sepsis y el 33% de estos pacientes fallecía a pesar de las medidas de soporte de cuidados intensivos (165).

El MODS puede identificarse en el 30% de los pacientes con trauma, 24% de aquellos con pancreatitis aguda y cerca del 40% de pacientes quemados (9).

La duración del SIRS o su número de criterios positivos tras la cirugía se correlaciona con los parámetros de estrés quirúrgico (como la pérdida de sangre y la duración de la intervención). Así, en 1997, en un trabajo de Haga y colaboradores (165), cinco de seis pacientes que cumplieron los criterios de SIRS durante más de 30 días desarrollaron MODS severo y tres de ellos fallecieron. Aunque la presencia de SIRS por sí solo no

fue útil para la predicción del desarrollo del MODS, sí lo es para el reconocimiento de las complicaciones postquirúrgicas y disfunciones orgánicas finales. La recuperación temprana del SIRS puede impedir la progresión de la disfunción orgánica (165).

1.6.-CITOQUINAS Y SU RELACIÓN CON EL SIRS/MODS

Las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α , han sido consideradas como la “triada inflamatoria” mediando en las respuestas tanto local como sistémica. La persistencia de citoquinas proinflamatorias en la circulación, que reflejan un SIRS, está asociada con el MODS y muerte por enfermedades críticas (166). Los niveles circulantes de IL-6 se encuentran incrementados tanto en las bacteriemias agudas como en enfermedades crónicas así como en situaciones asociadas a la inflamación incluyendo la cirugía (167, 168). Asimismo, se han detectado niveles elevados de IL-6 hasta en un 80% de los pacientes con sepsis o ARDS (169). En general, IL-6 es considerada como un mediador integral de la respuesta a lesiones de la fase aguda.

IL-6 es útil en investigación quirúrgica como un índice de la magnitud de la inflamación sistémica, correlacionándose con el pronóstico, siendo más elevados los niveles en los individuos que no sobrevivían respecto a los supervivientes (170), siendo un factor predictivo potencial de la evolución clínica de los pacientes quirúrgicos (171). Reinhart y col., en el año 2002, observaron que concentraciones plasmáticas de IL-6 por encima de 1000 pg/ml eran altamente predictivos de un riesgo elevado de muerte (12).

Según otros trabajos, aunque los niveles absolutos de TNF- α e IL-6 no son buenos predictores de la muerte en shock séptico, su persistencia en suero es altamente predictivo del desarrollo de MODS y de muerte (169).

Niveles plasmáticos elevados de IL-1 β y TNF- α en el momento de admisión en UCI, y de IL-6 a partir del segundo día en el postoperatorio temprano o tras traumatismos, se encuentran asociados con la mortalidad y con un mayor riesgo de un subsiguiente MODS. Estos datos apoyan la idea de que el MODS es causado por una respuesta inflamatoria autodestructiva excesiva (172).

Hay que tener en cuenta que las elevaciones de los niveles de IL-6, que se producen de forma tardía en los pacientes críticos, pueden deberse a infecciones nosocomiales o indicar una infección más que el fallo de órganos (173). Asimismo hay que considerar las transfusiones sanguíneas, que pueden elevar los niveles de citoquinas como IL-6 e IL-8 (173).

En el caso de la sepsis, la utilidad de los valores de IL-6 para el diagnóstico está limitada en pacientes críticos, por la elevación inespecífica causada por la inflamación independiente de la infección (12). TNF- α e IL-6 se han detectado en pacientes quemados con y sin infección. Niveles elevados de citoquinas se han encontrado en estados inflamatorios y no inflamatorios en ausencia de infección (150, 174).

Niveles elevados de TNF- α en plasma se correlacionan bien con la severidad de las enfermedades y la mortalidad pero no con cultivos sanguíneos positivos, niveles de endotoxina o shock séptico subsecuentes. Casey y col., en 1993, observaron niveles detectables de TNF- α en el 54% de los pacientes sépticos (169). En el trabajo de Bilbault y col., en 2004, en las primeras 12 horas tras aparecer la fiebre, en los pacientes que adquieren sepsis grave, se observó un incremento significativo de TNF- α en comparación con los pacientes críticos no sépticos (64).

La concentración plasmática de IL-1 β , el otro gran iniciador de la respuesta inflamatoria, se ha visto que está también aumentada en pacientes con sepsis (en el 37% de éstos) o shock séptico (169).

Por otra parte, IL-10 es un potente inhibidor de la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los monocitos/macrófagos. Si bien los niveles plasmáticos de IL-10 se encuentran más elevados en el shock séptico, no puede equilibrar el aumento de mediadores moleculares producidos en esta situación. Así pues, los niveles de IL-10 están relacionados con la severidad de la inflamación y el desarrollo del MODS en el shock séptico (175, 176).

Munster y col., en el año 2000 (156), refieren que al igual que en el caso de IL-6, aunque IL-10 se encuentra incrementada respecto a los controles sanos, su concentración no era diferente entre los pacientes sépticos y no sépticos críticos. Sin embargo, la razón IL-10/TNF- α , en las primeras 12 horas estaba incrementada en los pacientes sépticos y además era más elevada en aquéllos que posteriormente fallecieron (156).

Torre y col., en el año 2000 (26), observaron que los niveles plasmáticos de IL-4 se encontraban elevados en pacientes con SIRS en el momento de su diagnóstico y durante los siguientes 5 días, y se correlacionaban con la mortalidad. Además los niveles de IL-4 eran más altos en los SIRS con infección que en los no infecciosos, algo que no ocurría con IL-10 (26).

1.7.-ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON EL SIRS/MODS

Durante la cirugía, los cambios en la perfusión de órganos y tejidos, así como el grado de oxigenación pueden afectar el “equilibrio oxidativo” (177), y originarse una sobreproducción de ROS que puede contribuir al desarrollo de procesos patológicos como el SIRS y la sepsis (50, 178). Los efectos destructivos de la inflamación sobre los tejidos parecen estar mediados principalmente por los ROS y las potentes enzimas leucocitarias. Las células clave que contribuyen en el SIRS a través de los ROS son los PMNs, que se han infiltrado en dichos tejidos, aunque hay otras células fagocíticas implicadas en la generación de ROS como son los macrófagos (49).

En pacientes críticos, con SIRS o en los pacientes sépticos se produce estrés oxidativo determinado por un elevado índice de peroxidación lipídica y altas concentraciones plasmáticas de nitritos/nitratos así como una mayor activación leucocitaria. Además, estos pacientes presentan una menor capacidad total antioxidante en el plasma (179, 180). Pascual y col., en 1998, observaron que los niveles de actividad antioxidante eran bajos en pacientes sépticos y elevados en pacientes con shock séptico (181). Aunque la producción oxidante en general estaba aumentada, parece que la función fagocítica está disminuida en pacientes sépticos, y se piensa que la mayor producción de oxidantes en general se debe a un aumento del número de leucocitos y quizás a la pérdida de mecanismos antioxidantes (180).

Los índices de peroxidación lipídica están relacionados con el SIRS y su duración y con el MODS y su gravedad (6, 179-183). Se piensa que el proceso de estrés oxidativo en conexión con el SIRS continuado puede promover el desarrollo del MODS (180, 184).

1.8.-APOPTOSIS Y SU RELACIÓN CON EL SIRS/MODS

La muerte celular programada de las células del sistema inmune y quizás de las células del parénquima de órganos sólidos podría dirigir la duración e incluso la magnitud de las respuestas producidas tras las lesiones o agresiones al organismo, incluyendo los procedimientos quirúrgicos. Un proceso correcto y eficiente de apoptosis regula la eliminación sistemática de las células senescentes y no funcionales tras la activación y proliferación que se produce como respuesta a una agresión. En las respuestas inflamatorias sistémicas (SIRS/Sepsis), puede producirse una desregulación del proceso de apoptosis, que contribuye al desarrollo de enfermedades o síndromes

como el MODS. Las células del sistema inmune, en especial los PMNs, sufren dicha desregulación en la apoptosis debido al proceso inflamatorio, permaneciendo más tiempo activados y en circulación, ejerciendo sus efectos lesivos sobre el endotelio y los tejidos (185, 186). De este modo se produce a una apoptosis excesiva de células endoteliales y de órganos parenquimatosos, que podría estar contribuyendo a la disfunción de órganos (187). En el caso de los linfocitos también se produce una afectación, que se traduce en una pérdida de su funcionalidad, dificultando la recuperación del proceso inflamatorio y por tanto agravando la situación (60, 187). En situaciones como el SIRS/Sepsis y en los pacientes quirúrgicos, en que se origina una respuesta inflamatoria exagerada, se produce una disminución del número de linfocitos y un gran incremento de los PMNs circulantes que se deben, al menos en parte, a una alteración en la apoptosis (60, 188).

1.9.-ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DEL SIRS/MODS

En los estudios clínicos para el tratamiento del SIRS y MODS ha habido siempre resultados poco acertados por las dificultades que aparecen al tratar de modificar la respuesta biológica de los pacientes críticos, por cuatro factores principalmente: 1) la respuesta fisiológica de los pacientes críticos es compleja, produciéndose la acumulación de factores que no permite una única intervención para producir una respuesta clínica, 2) la población de pacientes es heterogénea y hay factores como la edad, co-morbilidad, lesión que origina el proceso etc., que alteran la efectividad de la terapia, 3) es difícil estandarizar los tiempos en que se realiza la intervención terapéutica y 4) la presencia de polimorfismos genéticos en la población, que ha identificado grupos de individuos que pueden tener respuestas fisiológicas diferentes a situaciones de estrés similares (189). Así, por ejemplo, en cuanto a las variaciones genéticas de los individuos cabe destacar el caso de las proteínas de la familia Bcl-2, implicadas en la apoptosis celular. Se ha visto que esta familia de genes está disminuida en las células mononucleares de algunos pacientes sépticos graves y se corresponde con una mala evolución. En estos casos, la intervención terapéutica solo sería beneficiosa si se llevara a cabo durante un periodo concreto, de modo que diversas técnicas de biología molecular como los microarrays de cDNA y PCR en tiempo real (RT-PCR) permitirían identificar de forma rápida y temprana, en el curso de la infección, a aquellos pacientes con alto riesgo de mortalidad, abriendo así el camino para tratarlos con fármacos como

la proteína C activada, que influyen en la sobreexpresión de estos genes de Bcl-2 (64, 190).

Entre las estrategias terapéuticas frente al SIRS y el MODS que se han utilizado, se encuentra la **actuación sobre los principales efectores y mediadores del daño tisular:**

-**PMNs:** previniendo o limitando las interacciones leucocito-endotelio, mediante bloqueadores de selectinas o CD11/CD18 integrinas y limitando la acción de los PMNs mediante el bloqueo de las ciclooxigenasas y antagonistas de los canales del calcio y con tratamientos anticoagulantes (150, 191, 192).

También se pueden considerar en este apartado las terapias dirigidas a los oxidantes, entre ellos los producidos por las actividades enzimáticas xantín-oxidasa y NADPH oxidasa, y las proteasas (150).

Por otro lado, también se han utilizado tratamientos para combatir la inmunosupresión, administrando IFN- γ y estimuladores de colonias de granulocitos (CSF-G), y en el caso de los linfocitos se ha tratado de inhibir su apoptosis (150).

-**Citoquinas** y otros mediadores: mediante la administración de citoquinas y otros mediadores o sus antagonistas, y actuando sobre sus receptores: inhibición de TNF- α , IL-1, PAF, prostaglandinas, tromboxanos, ROS, NO o bradiquinina. Así, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF han demostrado su efectividad en pacientes con infecciones gram-positivas y estados inflamatorios no bacterianos asociados a la sobreactivación de macrófagos, así como en pacientes con infecciones gram-negativas, si bien, deben ser administrados antes o de forma temprana al daño para ser efectivos (9, 150). También se han administrado receptores solubles de citoquinas, antagonistas de receptores (como los antagonistas de los receptores de la IL-1: IL-1ra, que se unen a receptores de IL-1 y han sido efectivos en disminuir la respuesta a procesos inflamatorios e infecciosos). Otros tratamientos empleados son la proteína C reactiva recombinante, anticuerpos frente al factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y bloqueo de las proteínas del complemento y sus receptores (C5a y C5aR) (190, 193).

Durante los años 80 se administraron **glucocorticoides** para combatir la inflamación generalizada y recientemente se ha administrado metilprednisolona para tratar la inflamación sistémica en pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS) (193).

Hay que tener en cuenta que las citoquinas tienen también efectos beneficiosos en la curación de las heridas, erradicación de bacterias y mantenimiento de homeostasis. Además su administración a bajas dosis mejora la supervivencia de ratones tras

agresiones endotóxicas e inducción de sepsis como se ha visto en trabajos utilizando IL-1 α , IL-2 y TNF (194-196). En este contexto, nuestro grupo de investigación ha comprobado que el tratamiento con IL-1 β , en ratones a los que se induce una endotoxemia, reduce los niveles séricos de las fases solubles de las moléculas de adhesión ICAM-1, ELAM-1 y VCAM-1 (197) y de las citoquinas IL-1 α , TNF- α e IL-6 (198) que se habían incrementado tras la agresión, disminuyendo la infiltración leucocitaria y el daño tisular (199) y mejorando la inmunosupresión inducida y la supervivencia (200).

-**Endotoxinas:** tratando de neutralizarlas, administrando antibióticos, se ha observado una mejora en la supervivencia de algunos pacientes con sepsis gram-negativa al controlar la respuesta séptica (9, 150, 193).

Todos los resultados han sido bastante contradictorios según el tipo, lugar y severidad de las lesiones. Es comúnmente aceptado que la mejor estrategia para combatir el MODS es la **prevención** del mismo, impidiendo la evolución de la inflamación sistémica:

-Una de estas estrategias considerada dentro de la prevención es el tratamiento inmediato de todas las lesiones o heridas que sean tratables, de forma que queda limitada la respuesta inflamatoria para poder restaurar el estado fisiológico normal. Del mismo modo, intervenciones quirúrgicas iniciales que sean definitivas, reintervenciones para eliminar tejidos necróticos, drenaje de abscesos, y control de la peritonitis pueden ser efectivos (150).

-Por otra parte, es importante una nutrición adecuada, destacando que la alimentación enteral, cuando sea posible, dentro de las 24 h de la lesión o cirugía del paciente, es óptima y permite una reducción de las complicaciones sépticas y los mecanismos de defensa inmunológicos (201). La nutrición enteral es beneficiosa para el mantenimiento de la barrera de la mucosa intestinal y función inmune del paciente (150). Además, es importante la administración de aminoácidos como la glutamina y suplementos vitamínicos (vitamina E, C y betacarotenos), fortalecidos con arginina, ácidos grasos omega-3, nucleótidos, zinc y fibra (149). Son importantes pues, tanto el soporte nutricional de todo el organismo como el de los órganos de forma específica; los pacientes que desarrollan MODS tienen un requerimiento mayor de sustratos energéticos (calorías), así como de proteínas (150).

-Es también importante garantizar una correcta monitorización del oxígeno en todos los pacientes críticos, lo cual se consigue controlando el gasto cardíaco, oxigenación y su consumo, manteniéndolos en valores adecuados (150).

-Así mismo, se han estudiado los efectos beneficiosos de fármacos como la dexametasona que induce la glutamin-sintetasa de la mucosa yeyunal. La antitrombina-III que ejerce un efecto terapéutico, de forma independiente de su acción anticoagulante, por inhibición de la activación leucocitaria al estimular la prostaciclina y prevenir el aumento continuo de sICAM-1 plasmáticas y así disminuir las E-selectinas.

1.9.1.-Modulación de la respuesta inflamatoria y la apoptosis leucocitaria mediante la administración de vitamina C o de NAC

Entre los tratamientos para la modulación de la respuesta inflamatoria y la apoptosis leucocitaria se encuentra la administración de vitamina C o de N-acetilcisteína:

1.9.1.1.-Vitamina C

Es un antioxidante hidrosoluble que se encuentra principalmente en las frutas cítricas y es capaz de actuar a modo de barredor de especies reactivas de oxígeno; reduce los radicales superóxido, hidroxilo (HO[•]) y H₂O₂ formando ácido dihidroascórbico (DHA) (50). Otra acción importante de la vitamina C es la regeneración de la vitamina E a partir del radical tocoferol. Así, la administración de suplementos de vitaminas A, C y E, están asociados a una mejora de las defensas antioxidantes (202). Igualmente, se ha demostrado una mejora de la función respiratoria en pacientes mayores hospitalizados, tratados con vitamina C (203). Además, en pacientes críticos, con sepsis y ARDS se ha detectado una disminución de los niveles plasmáticos de vitamina E y vitamina C (204, 205) y se ha sugerido que niveles plasmáticos bajos de vitamina C son predictivos del desarrollo de MODS en poblaciones de riesgo (206).

Sin embargo, la vitamina C en estudios clínicos no ha sido muy utilizada, debido a su posible efecto pro-oxidante bajo ciertas circunstancias (52): por ejemplo, catalizando la conversión de Fe³⁺ a Fe²⁺ puede producirse la reacción de Fenton con la formación del radical HO[•]; y al combinarse con el hierro, puede acelerar la peroxidación lipídica, produciendo daño de las membranas celulares (207, 208).

Por otro lado, la vitamina C juega un papel importante en muchas funciones de los PMNs incluyendo un incremento de la quimiotaxis, incremento de la ingestión de partículas, aumento de la actividad de lisozimas para eliminación de células y

protección frente a los efectos tóxicos del radical superóxido (209).

Relación de la vitamina C con la producción de citoquinas y la apoptosis:

La vitamina C puede producir una disminución de la producción de citoquinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 y TNF- α en diferentes ensayos realizados *in vitro* (210, 211) e *in vivo* (212, 213), aunque otros autores han demostrado un incremento de la producción de IL-1 β y TNF- α por células mononucleares de sangre periférica incubadas con vitamina C (214).

En monocitos, la vitamina C parece tener un efecto inhibitor de la apoptosis: se asocia con una reducción de la apoptosis vía Fas y de la actividad de la Caspasa-3, -8 y -10 y con una preservación de la integridad de la mitocondria (215).

En linfocitos T humanos y células T Jurkat se ha observado un aumento de la expresión del receptor Fas y de su susceptibilidad a la apoptosis por dicha vía, por efecto del DHA (216, 217). Además, se ha descrito que la vitamina C puede producir la descomposición de hidroperóxidos lipídicos generando toxinas que pueden reaccionar con el ADN de la célula promoviendo la apoptosis (218). Sin embargo, en linfocitos T de ratones se ha observado que la vitamina C produce resistencia a la inducción de apoptosis (219).

En el caso de los PMNs, a pesar de haberse observado un efecto proapoptótico de los ROS (220, 221), la vitamina C ha sido asociada con un aumento de la apoptosis de estas células (211, 222, 223).

1.9.1.2.-N-acetilcisteína (NAC)

Es convertida, *in vivo*, en L-cisteína, que repone los depósitos intracelulares de GSH. Su grupo tiol le confiere también actividad antioxidante directa a la molécula. GSH puede actuar directamente como barredor de ROS o enzimáticamente a través de la vía de la enzima GPX (52). Además, el GSH es importante en el mantenimiento de enzimas y otros componentes celulares en su estado reducido, produce una inhibición de la función de PMNs y monocitos y regeneración de NO y tiene efectos en la producción de citoquinas (224, 225).

Es una molécula muy interesante para estudios clínicos ya que se conoce ampliamente su seguridad por haber sido utilizada durante muchos años en humanos, para el tratamiento de la intoxicación con paracetamol y como mucolítico en pacientes con

enfermedades pulmonares obstructivas (226). En la patogénesis de MODS, es importante la hipoxia tisular y la capacidad de obtener el oxígeno (227). Hay estudios en animales de experimentación que sugieren que la NAC puede mejorar la oxigenación de tejidos (228). Sin embargo, Agustí y col., en 1997, (227) no observaron ninguna mejora en la oxigenación de tejidos en pacientes con MODS e hipoxia esplénica tratados con NAC y no observaron que en los pacientes con MODS hubiera un empeoramiento en los mecanismos que controlan la extracción de oxígeno (227). Otros autores han observado una mejora de la función hepática y respiratoria, efectos hemodinámicos positivos, una disminución de las complicaciones infecciosas y disfunción orgánica y aumento de la fagocitosis en pacientes con SIRS/Sepsis, shock séptico, ARDS o en pacientes traumatizados tratados con NAC (101, 229-231). Sin embargo, no se observaron diferencias en la mortalidad o en el desenlace de los pacientes con MODS en unidades de cuidados intensivos aunque sí en los pacientes con shock séptico que respondían al tratamiento y en pacientes con ARDS (232, 233).

Tampoco se observaron diferencias en la capacidad antioxidante total, al administrarse NAC de forma temprana, e incluso podía ser perjudicial si se administraba de forma tardía (232, 234, 235). Otro estudio, sin embargo, encontró que los pacientes sépticos tratados con NAC presentaban una atenuación del estrés oxidativo determinado por la peroxidación lipídica (malondialdehído y filtración de eritrocitos) y una mejora de sus parámetros clínicos (disminución de complemento activado C5a) (236).

Relación de la NAC con la producción de citoquinas y la apoptosis:

La NAC inhibe, *in vitro*, la activación del factor NF- κ B, que regula la expresión de mediadores inflamatorios a nivel transcripcional; Paterson y col., en el año 2003 (237) trataron a pacientes sépticos con NAC y observaron una disminución de la activación del factor NF- κ B y de la IL-8 respecto a los pacientes sépticos no tratados. Se han observado disminuciones de los niveles de TNF- α , IL-4 e IFN- γ en experimentos *in vitro* y modelos animales (238, 239). Sin embargo, en otros estudios no se observó la disminución de TNF- α u otros mediadores como la IL-6, IL-1, IL-10, corticoesteroides y sICAM, tanto en animales de experimentación como en diferentes tipos de pacientes tratados con NAC (229, 238, 240, 241).

La activación de los PMNs produce una resistencia a la apoptosis inducida vía Fas, y dicha resistencia se corresponde con un aumento de los depósitos intracelulares de GSH. Además, la administración de GSH exógeno o NAC disminuye la apoptosis

inducida por agonistas de Fas (119, 220, 242). LPS, GM-CSF y el GSH estabilizan la mitocondria e inhiben la activación de la caspasa-3 y -8 y la apoptosis de PMNs vía Fas (119).

Los agentes que disminuyen el GSH, alterando el ambiente redox, predisponen a la apoptosis, de forma que una caída en los niveles de GSH y subsiguiente incremento de ROS puede contribuir a la iniciación de la apoptosis espontánea (220, 242).

Por otra parte, se ha observado un efecto proapoptótico de la NAC en otras líneas celulares como la línea hibridoma 3DO, de origen linfoide, en la que el aumento de los niveles intracelulares de GSH incrementa la apoptosis inducida por ROS y por el tratamiento con anticuerpos anti-Fas (243).

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral postula la siguiente **hipótesis de trabajo**:

“La administración de antioxidantes (N-acetilcisteína o vitamina C) en los pacientes quirúrgicos de alto riesgo con sepsis produce una atenuación de la respuesta inflamatoria sistémica reflejada por la disminución de los niveles plasmáticos de citoquinas y la modulación de la apoptosis leucocitaria”.

Para corroborar dicha hipótesis se han planteado los siguientes **objetivos**:

Objetivo principal:

-Estudiar la influencia de la administración de NAC o vitamina C sobre la respuesta inflamatoria sistémica en los pacientes quirúrgicos sépticos.

Objetivos secundarios:

-Determinar los niveles plasmáticos de las principales citoquinas relacionadas con la inflamación (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α), en pacientes quirúrgicos de alto riesgo con sepsis, durante la primera semana del postoperatorio, comparando los resultados del grupo de pacientes no tratados y los de aquellos modulados con NAC o vitamina C.

-Determinar la expresión de receptores de muerte celular, la apoptosis y los niveles leucocitarios de caspasa-3, PARP y Bcl-2, en pacientes quirúrgicos de alto riesgo con sepsis, durante la primera semana del postoperatorio, comparando los resultados del grupo de pacientes no tratados y los de aquellos modulados con NAC o vitamina C.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-TIPO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo controlado a doble ciego en el que los pacientes se clasificaron de forma aleatoria en 3 grupos (A, B y C) que reciben tratamientos diferentes. La aleatorización se realizó por asignación al paciente de un número consecutivo ascendente siguiendo una secuencia aleatoria obtenida a través de un programa informático.

3.2.-SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos de estudio son pacientes ingresados en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada que se han sometido a una intervención quirúrgica electiva o urgente por un cuadro séptico de origen abdominal.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de dicho hospital y se ha realizado en la Unidad de Investigación Cirugía Experimental del mismo centro.

A todos los participantes se les solicitó la firma del correspondiente consentimiento informado para entrar a formar parte del estudio informándoles previamente de las características e implicaciones del mismo según se recoge en el Anexo 1 de esta Tesis.

3.2.1.-Criterios de inclusión

Los pacientes quirúrgicos de alto riesgo incluidos en el estudio son pacientes que presentan al menos dos de los criterios de SIRS y datos clínicos de foco séptico abdominal por etiologías diversas y un riesgo de mortalidad en el postoperatorio superior al 30% cuantificado según la escala POSSUM (“Physiological and Operative Severity Score for the enUmeration of Mortality and Morbidity”) (244), que hayan sido sometidos a una intervención quirúrgica abdominal. La estimación del riesgo de mortalidad se realizó inmediatamente después de finalizada la intervención quirúrgica. Con la escala POSSUM, se evalúan 12 parámetros fisiológicos y 6 quirúrgicos, recogidos en el Anexo 2 de esta Tesis, a partir de los cuales, se obtiene una puntuación fisiológica y otra quirúrgica. La suma de ambas puntuaciones determina el riesgo de mortalidad expresado como porcentaje. Si la suma de ambas puntuaciones supone un riesgo de muerte en el postoperatorio superior al 30%, el paciente es susceptible de entrar en el estudio.

3.2.2.-Criterios de exclusión

Edad menor de 18 años, embarazo, enfermedad terminal médica o quirúrgica y negativa a participar en el estudio.

3.3.-Administración de N-acetilcisteína o vitamina C

Los tratamientos son suministrados por el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y se administran cada 8 horas por vía intravenosa comenzando a las 12 horas después de finalizar la intervención quirúrgica y durante los primeros seis días posteriores a la intervención quirúrgica. Las dosis utilizadas son las previamente descritas por otros autores (236, 245).

Todos los grupos reciben el tratamiento estándar de su cuadro clínico, al que se añade:

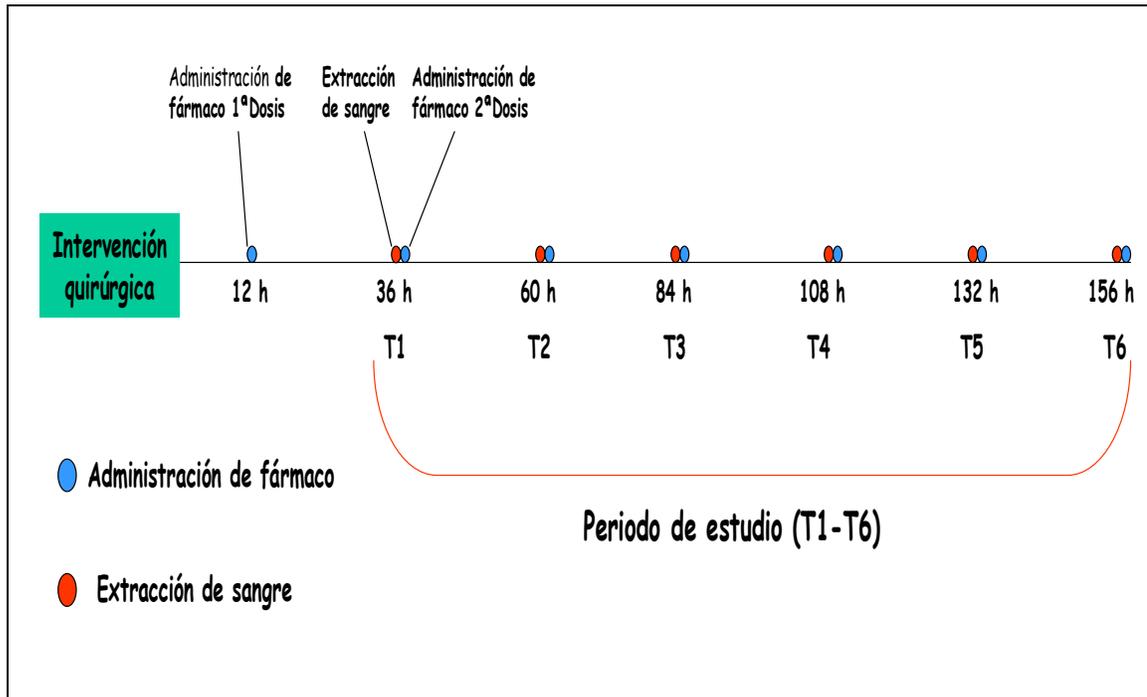
- A) **Placebo**: 250 ml de suero glucosalino cada 8 horas.
- B) **NAC**: 75 mg/Kg/día: 25 mg/Kg diluidos en 250 ml de suero glucosalino cada 8 h.
- C) **Vitamina C**: 450 mg/día: 150 mg diluidos en 250 ml de suero glucosalino cada 8 h.

3.4.-Toma de muestras

Las muestras de sangre periférica comienzan a extraerse a las 36 horas de finalizar la intervención quirúrgica y cada 24 horas durante los siguientes 6 días, es decir, un total de 6 extracciones (Tiempos T1 a T6), tal y como se muestra en la figura 6. De este modo, la primera muestra (T1) es extraída 24 horas después de administrarse la primera dosis de fármaco que tenía lugar a las 12 horas después de finalizar la intervención quirúrgica. Una vez extraída la primera muestra, se administra una nueva dosis de fármaco y la siguiente extracción tendrá lugar a las 24 horas para posteriormente administrar de nuevo la dosis de fármaco y así sucesivamente.

De forma paralela, se analizan todos los parámetros de estudio en 10 individuos sanos con edades similares a las de los grupos de estudio considerados como los niveles basales de la población.

Figura 6.-Administración del tratamiento y extracción de muestras.



3.5.-OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras para el estudio se obtienen a partir de sangre periférica extraída por punción venosa en los tiempos previamente descritos. En cada extracción se recogen 3 tubos: tubo de hemograma (con EDTA como anticoagulante), tubo de bioquímica (que contiene un filtro para separar el suero) y tubo de coagulación (con citrato como anticoagulante), de los cuales se obtendrán diferentes tipos de muestras donde realizar las determinaciones:

3.5.1.-Plasma y lisado de células sanguíneas

El **plasma** se obtiene a partir de la muestra de sangre periférica contenida en tubos de hemograma de 3 ml con EDTA como anticoagulante. Este tubo es centrifugado a 400 x g durante 15 minutos, transcurridos los cuales, se obtiene un sobrenadante (plasma) y un precipitado de células. El plasma obtenido se retira con una pipeta estéril y se almacena en tubos eppendorf a -20°C hasta su posterior análisis.

El **lisado de células sanguíneas** se obtiene a partir del precipitado de células que había quedado en el fondo del tubo de hemograma tras la centrifugación. De este

precipitado se realiza una dilución 1/100 con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,8. Esta dilución se deposita en tubos de 1,5 ml y se almacena a -20°C hasta su utilización posterior.

3.5.2.-Suero

Se obtiene a partir de la sangre periférica extraída por punción venosa, que ha sido depositada en tubos estériles de bioquímica. Los tubos son centrifugados a 1000 x g durante 15 minutos. A continuación se separa el suero, que queda en la parte superior del tubo, utilizando una pipeta pasteur de plástico estéril. El suero obtenido se almacena en tubos de plástico a -80°C hasta su utilización posterior.

3.5.3.-Tubos de coagulación

Son utilizados únicamente para el aislamiento de leucocitos por centrifugación en gradiente de ficoll, para determinar el grado de apoptosis que se describirá más adelante.

3.6.-EVALUACIÓN DEL MODS: ESCALA DE BRUSELAS

Para determinar el desarrollo del MODS se utiliza el sistema de puntuación de Bruselas o “escala de Bruselas” (164) que se recoge en el anexo 3. Los datos clínicos y bioquímicos obtenidos a lo largo del seguimiento de cada paciente aportan información acerca de la funcionalidad de los distintos sistemas orgánicos: función cardíaca (presión sistólica), función pulmonar (presión parcial de oxígeno: PaO₂/FiO₂), funcionalidad del sistema nervioso central (Glasgow), hemostasia (plaquetas), función renal (creatinina) y función hepática (bilirrubina). De este modo se puede determinar la presencia o no de MODS así como el grado de disfunción de cada sistema en particular.

3.7.-DETERMINACIÓN DEL HEMOGRAMA Y FÓRMULA LEUCOCITARIA

Se realizan las siguientes determinaciones: número total de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas y fórmula leucocitaria.

Estas determinaciones nos aportan información sobre el estado hematológico del individuo, destacando los niveles leucocitarios y las proporciones de los diferentes tipos

La hemoglobina y su concentración corpuscular media se expresan en g/dL, el hematocrito en porcentaje, y la hemoglobina corpuscular media en picogramos (pg).

El volumen corpuscular medio se expresa en femtolitros (fL). En la figura 7 se puede observar el formato en que se obtienen los datos de hemograma y fórmula leucocitaria de una muestra de sangre periférica.

3.8.-PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL RIESGO DE MORTALIDAD Y EL DESARROLLO DE MODS

Para la estimación del riesgo de mortalidad mediante la escala POSSUM, además de los datos obtenidos del hemograma, fórmula leucocitaria y los parámetros clínicos y quirúrgicos que se recogen en el anexo 2, es necesario conocer los niveles serológicos de **urea e iones sodio y potasio** determinados mediante un analizador automático de bioquímica. Del mismo modo, para evaluar la funcionalidad de los sistemas renal y hepático incluidos en la Escala de Bruselas, se determinan los niveles serológicos de **creatinina y bilirrubina**.

3.8.1.-Materiales y reactivos

Materiales

- Analizador automático para bioquímica Hitachi 912 (Roche, España).

Reactivos

- Los utilizados por el analizador espectrofotométrico computerizado y proporcionados por los Laboratorios Roche (España).

3.8.2.-Procedimiento

Las determinaciones se realizan en suero, obtenido del modo anteriormente descrito. Las cuantificaciones son realizadas de forma automática por el analizador espectrofotométrico Hitachi 912 (Roche).

3.8.3.- Expresión de resultados

Las unidades en las que se expresan los datos bioquímicos son mEq/L para los iones sodio y potasio y mg/dL para el resto de las determinaciones bioquímicas.

3.9.-CITOMETRÍA DE FLUJO: FUNDAMENTO

Para la determinación de los niveles plasmáticos de citoquinas, la apoptosis leucocitaria y el estudio de expresión de receptores y proteínas relacionadas con la apoptosis, se emplean diferentes técnicas de citometría de flujo. Para ello se utiliza un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), instalado en la Unidad de Investigación Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

El citómetro dispone de un láser de argón de 488 nm de longitud de onda que incide sobre las células o partículas y permite por tanto, diferenciar unas de otras por su tamaño y complejidad según como sea desviada la trayectoria de la luz láser. Para esto, se utilizan dos parámetros: **1)** el FSC (forward-angle light scatter) que se relaciona con el diámetro celular y **2)** el SSC (side-angle light scatter) que hace referencia a la conformación de las estructuras internas de la célula (53). Además de estos parámetros, para la detección de las células o partículas de interés, pueden ser marcadas con una sustancia fluorescente de modo que se detecta la intensidad de dicha fluorescencia, es decir, el espectro de emisión de esta sustancia tras haber sido excitada por la luz láser. En la figura 8 se muestra una imagen del citómetro FACScan (Becton Dickinson) empleado en las determinaciones.

Figura 8.-Citómetro de flujo FACScan



3.10.-CITOQUINAS

3.10.1.-DETERMINACION DE CITOQUINAS: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α

3.10.1.1.-Fundamento

Se han determinado por citometría de flujo mediante la técnica de CBA (cytometric beads array) (Becton Dickinson). Utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) y kits comerciales de detección de citoquinas humanas Th1/Th2 (Becton Dickinson). Esta técnica CBA conjuga la especificidad de la técnica de inmunoensayo de ELISA con la citometría de flujo. Para la técnica CBA se dispone de seis tipos de partículas, revestidas con anticuerpos específicos para las proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α . Los seis tipos de partículas pueden diferenciarse por su intensidad de fluorescencia en un rango o canal de longitud de onda concreto del citómetro de flujo (FL3). De este modo, tras una incubación, las partículas mencionadas se unirán de forma específica con las citoquinas presentes en el plasma problema o en los liofilizados empleados para elaborar una curva patrón. Posteriormente se adicionan anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente (ficoeritrina) y se analizan los niveles de citoquinas en función de la fluorescencia emitida, que es captada en el citómetro de flujo. Los valores de fluorescencia obtenidos de los liofilizados de concentraciones conocidas, nos permiten extrapolar las concentraciones de las muestras problema en una curva patrón de concentraciones conocidas.

3.10.1.2.-Materiales y reactivos

- Tubos de poliestireno de 5ml Falcon (Beckton-Dickinson, USA.).
- Centrifuga Medifriger (Selecta, España).
- Pipetas automáticas de rango entre 10 μ l- 1000 μ l.
- Puntas para las pipetas de los calibres referidos.
- Citómetro de flujo FacScan (Beckton-Dickinson, España).
- Kit de detección de citoquinas por citometría de flujo; Human Th1/Th2 Cytokine CBA-II (BD-Pharmingen, San Diego, USA).

3.10.1.3.-Procedimiento

El análisis se realiza siguiendo las recomendaciones del fabricante del Kit Human Th1/Th2 (Beckton-Dickinson): a partir del plasma obtenido como se ha descrito anteriormente, se preparan diluciones seriadas de un liofilizado proporcionado por la casa comercial, para realizar una curva estándar a partir de la cual se extrapolan los resultados de las muestras problema.

Se utilizan 50 μ l de muestra de plasma problema o estándar que se incuban durante 3 horas, protegidos de la luz, con 50 μ l de una mezcla de los seis tipos de partículas y 50 μ l de reactivo de detección (ficoeritrina).

Después de la incubación se adiciona 1 ml de una solución de lavado y se centrifuga a 200 x g durante 5 minutos descartándose el sobrenadante.

Finalmente se adicionan 300 μ l de solución de lavado, se resuspenden las partículas por agitación en vortex, y se comienza su análisis en el citómetro.

Una vez fijadas las condiciones del citómetro para poder detectar las partículas fluorescentes en función de su tamaño, y una vez ajustadas las fluorescencias para evitar solapamientos, se analizan 2500 partículas de cada tubo (muestra o estándar), agitando previamente en vortex cada muestra a analizar.

A partir de las fluorescencias obtenidas de los estándares de concentraciones conocidas, se pueden conocer las concentraciones de las citoquinas extrapolando las medidas de fluorescencia que originan las muestras problema.

El rango de sensibilidad para el análisis de la concentración de citoquinas en el plasma es el siguiente: de 2,6 a 5000 pg/ml para IL-2, de 2,6 a 15.000 pg/ml para IL-4, de 3,0 a 15.000 pg/ml para IL-6, de 2,8 a 5000 pg/ml para IL-10, de 2,8 a 27 pg/ml para TNF- α y de 7,1 a 5000 pg/ml para IFN- γ .

3.10.1.4.-Expresión de resultados

Se realiza una curva estándar a partir de los valores de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia, que es detectada por el citómetro, y las concentraciones conocidas de citoquinas de las diluciones seriadas. La tabla 1 recoge las concentraciones de la curva estándar en función de las diluciones realizadas.

Los valores de concentración, de los seis tipos de citoquinas, de las muestras problema se obtienen por extrapolación a partir de sus valores de fluorescencia y la curva estándar.

Tabla 1.-Concentraciones (pg/ml) de las citoquinas de interés de la curva estándar (patrón) en función de las diluciones realizadas.

	Top estándar	Tubo dilución 1:2	Tubo dilución 1:4	Tubo dilución 1:8	Tubo dilución 1:16	Tubo dilución 1:32	Tubo dilución 1:64	Tubo dilución 1:128	Tubo dilución 1:256	Blanco de reacción
IL-2	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	0
IL-4	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	0
IL-6	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	0
IL-10	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	0
TNF- α	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	0
IFN- γ	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20	0

3.11.-APOPTOSIS

3.11.1.-DETERMINACIÓN DE Fas (CD95)

3.11.1.1.-Fundamento

La cuantificación de la expresión de la proteína Fas (CD95) en la superficie de linfocitos y PMNs, pone de manifiesto la capacidad de estas células para entrar en apoptosis en presencia de estímulos proapoptóticos. Para medir de forma específica la expresión de CD95 en PMNs y linfocitos, se utiliza el anticuerpo anti-CD95 conjuntamente con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD15 que se encuentran presentes en linfocitos T y en granulocitos (incluyendo PMNs y eosinófilos) respectivamente, y que permiten identificar estas poblaciones celulares. Es decir, una vez identificadas las células (linfocitos y granulocitos), a través de sus receptores de membrana específicos (CD3⁺ y CD15⁺), se detecta la expresión del receptor CD95.

El método se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo mediante la cual, se añaden a la sangre obtenida de los sujetos de estudio, contenida en tubos de citrato, anticuerpos monoclonales anti-receptores CD3, CD15 y CD95. Dichos anticuerpos están marcados con un fluorocromo cuya fluorescencia es detectada en el citómetro de flujo (inmunofluorescencia directa). Como control negativo se utilizan inmunoglobulinas irrelevantes del mismo isotipo y con los mismos fluorocromos que la proteína a cuantificar (CD95).

3.11.1.2.-Materiales y reactivos

Materiales:

- Tubos de poliestireno de 5ml Falcon (Beckton-Dickinson, USA.).
- Pipetas automáticas de entre 5 µl- 1000 µl.
- Puntas para las pipetas de los calibres referidos.
- Centrifuga Medifriger (Selecta, España).

Reactivos:

- Anti CD95-PE: anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano conjugado con ficoeritrina (Pharmingen-BD, San Diego, USA).
- Anti CD15-FITC: anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Pharmingen-BD, San Diego, USA.)
- Anti CD3-FITC: anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Pharmingen-BD, San Diego, USA).
- Reactivo de lisis eritrocitaria de cloruro de amonio PharM Lyse (BD, USA).
- Anti CD3-PE: anticuerpo monoclonal de raton anti-humano conjugado con ficoeritrina (Pharmingen-BD, San Diego, USA).
- Anti CD15-PE: anticuerpo monoclonal de raton anti-humano conjugado con ficoeritrina (Pharmingen-BD, San Diego, USA)

3.11.1.3.-Procedimiento

Inmediatamente después de la extracción de sangre de los sujetos de estudio, se realiza el marcaje con los diferentes anticuerpos monoclonales:

-Determinación de CD95 en linfocitos:

- Se utilizan dos tubos Falcon. En cada uno se vierten 50 µl de la sangre recién extraída. En uno de los tubos se adicionan 5 µl de anticuerpo anti-CD3-FITC y 5 µl del anticuerpo anti-CD15-PE, mientras que al segundo tubo se le adicionan 5 µl de anti-CD3-FITC y 5 µl de anti-CD95-PE.
- A continuación se agitan intensamente durante 2-3 segundos con vortex y se incuban durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
- Después de la incubación se adicionan a ambos tubos 1 ml de reactivo de lisis eritrocitaria, dejando que actúe durante 7 minutos, transcurridos los cuales se realiza la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

Para realizar la adquisición de las células, previamente se establecen las condiciones necesarias para localizar la población de linfocitos, por sus características de tamaño y

complejidad, en el gráfico (“dot plot”). Deben fijarse además, los parámetros referentes a las fluorescencias de los dos marcadores utilizados (compensaciones), de manera que no haya solapamientos. Una vez fijadas estas condiciones se delimita la región, donde aparecen los linfocitos, en el gráfico (“dot plot”) (figura 9). Además de este gráfico, se utiliza otro, en el que se pueda diferenciar, en función de la fluorescencia del FITC (FL1), la población CD3 positiva, es decir, los linfocitos T (figura 10). Una vez delimitadas las células de interés, se realiza un histograma en el que medimos la fluorescencia en FL2 (CD95 positiva) que emiten las células anteriormente identificadas por su fluorescencia en FL1. Para ello se adquieren un total de 5000 células CD3 positivas (figura 11).

Figura 9.-Gráfico (“dot plot”): localización de las poblaciones de granulocitos (R1) y linfocitos (R2) por sus características de tamaño (FSC) y complejidad (SSC).

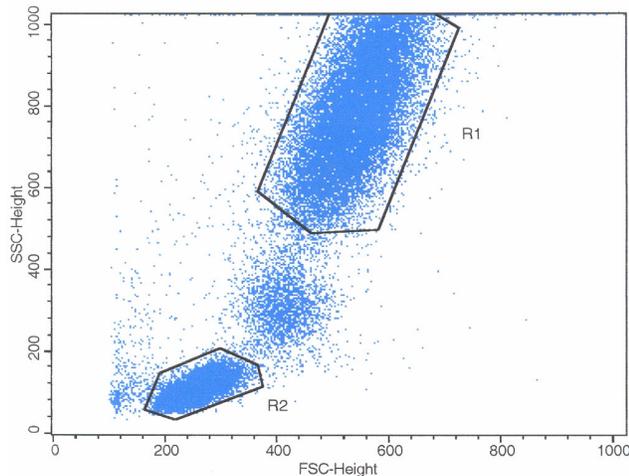


Figura 10.-Gráfico (“dot plot”): delimitación de la región que corresponde a linfocitos T CD3+ (R2) en la que posteriormente se determinará CD95.

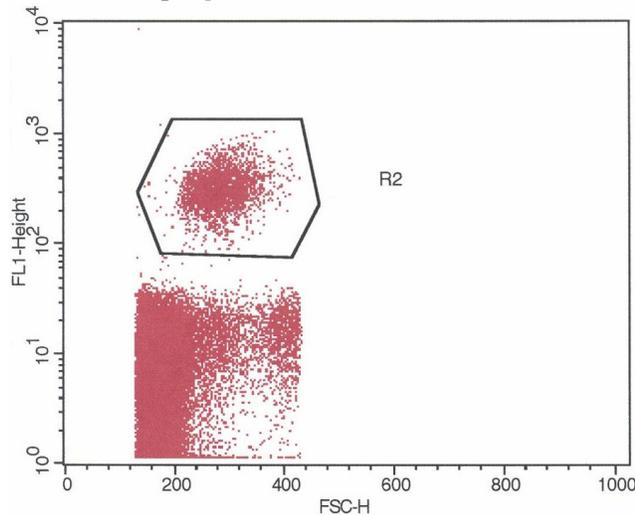
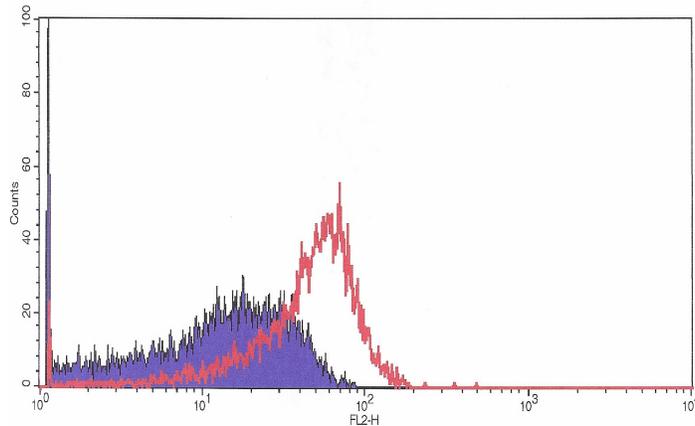


Figura 11.- Histograma: fluorescencia correspondiente a CD95-PE (FL2) en un control negativo (azul) y su muestra correspondiente (rojo), en linfocitos CD3+ previamente localizados.



-Determinación de CD95 en PMNs:

- Se utilizan dos tubos Falcon. En cada uno se vierten 50 μ l de la sangre recién extraída. En uno de los tubos se adicionan 5 μ l de anticuerpo anti-CD15-FITC y 5 μ l del anticuerpo anti-CD3-PE, mientras que al segundo tubo se le adicionan 5 μ l de anti-CD15-FITC y 5 μ l de anti-CD95-PE.
- A continuación se agitan intensamente durante 2-3 segundos con vortex y se incuban durante 15 minutos, a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
- Después de la incubación se adicionan a ambos tubos 1 ml de reactivo de lisis eritrocitaria, dejando que actúe durante 7 minutos, transcurridos los cuales se realiza la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

Para realizar la adquisición, previamente se establecen las condiciones necesarias para localizar la población de granulocitos, por sus características de tamaño y complejidad (FSC y SSC), en el gráfico (“dot plot”). Además se fijan los parámetros referentes a las fluorescencias (compensaciones), de los dos marcadores utilizados, de manera que no se solapen. Una vez fijadas estas condiciones se delimita en el gráfico (“dot plot”), la región donde aparecen los granulocitos (figura 9). Además de este gráfico, es necesario otro, en el que se pueda diferenciar, en función de la fluorescencia del FITC (FL1), la población CD15 positiva, es decir, los polimorfonucleares PMNs (del mismo modo que se hacía con los linfocitos T CD3+) (Figura 12). Una vez delimitadas las células de interés, se necesita un gráfico (histograma) en el que medimos la fluorescencia en FL2 (CD95 positiva) que emiten las células anteriormente identificadas por su fluorescencia

en FL1. Para ello se adquieren un total de 5000 células CD15 positivas, del mismo modo que se hacía con los linfocitos T CD3+ (Figura 13).

Figura 12.-Gráfico (“dot plot”): delimitación de la región que corresponde a granulocitos CD15+ (R2) en la que posteriormente se determinará CD95.

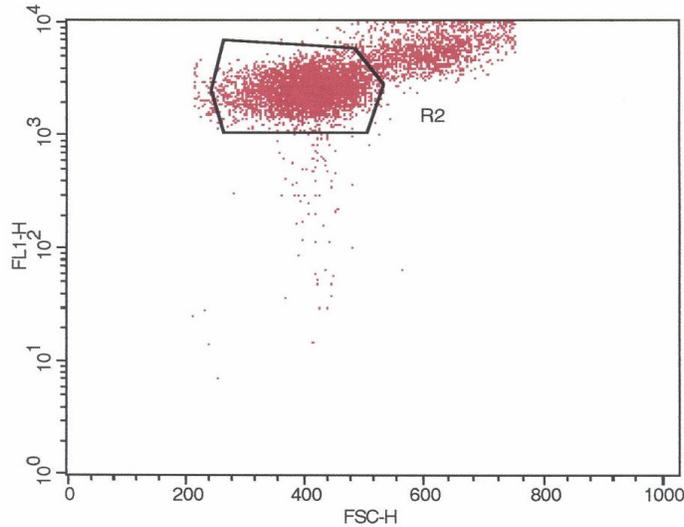
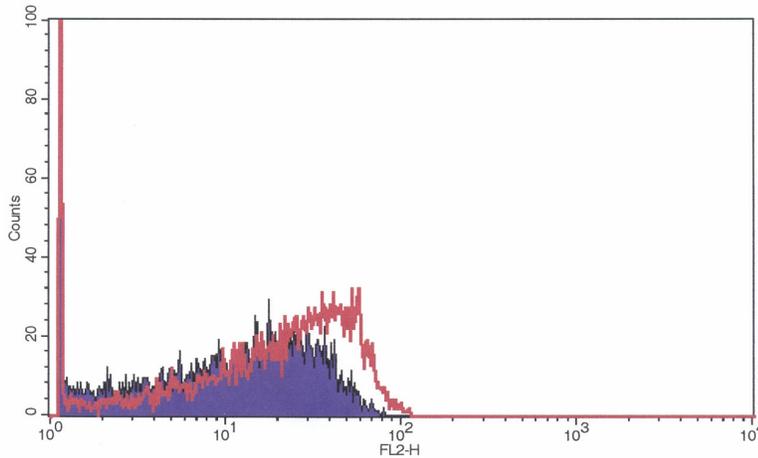


Figura 13.- Histograma: fluorescencia correspondiente a CD95-PE (FL2) en un control negativo (azul) y su muestra correspondiente (rojo), en granulocitos CD15+ previamente localizados.



3.11.1.4.-Expresión de resultados

En la determinación de CD95 se realiza el análisis de los resultados obtenidos en el histograma, evaluando dos parámetros:

- Porcentaje de células fluorescentes en FL2, es decir, CD95 positivas.
- Intensidad media de fluorescencia (IMF) en FL2 (CD95-PE) de la población celular

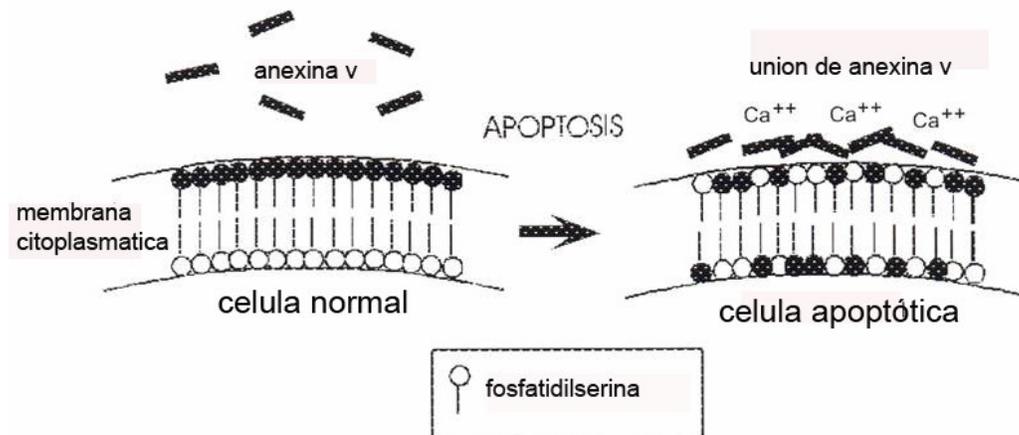
Los tubos marcados con anti-CD15-FITC o anti-CD3-FITC más el anticuerpo irrelevante del mismo isotipo, no presente en la población estudiada (anti-CD15-PE y anti-CD3-PE para linfocitos y PMNs respectivamente), sirvieron como controles negativos para la fluorescencia de CD95, de forma que se elimina la contribución de la autofluorescencia celular y las uniones inespecíficas.

3.11.2.-DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS DE PMNS Y LINFOCITOS

3.11.2.1.-Fundamento

Al iniciarse el proceso de apoptosis, se modifica la disposición de los fosfolípidos de la membrana, de forma que el fosfolípido fosfatidilserina (PS) pasa de la cara interna a la externa de dicha membrana, quedando expuesta al medio externo. La Anexina V es una proteína que presenta una gran afinidad por PS, de manera que se une a las células que la externalizan, en una reacción dependiente de calcio (148). En la figura 14 se muestra cómo se modifica la disposición de los fosfolípidos en el comienzo de la apoptosis.

Figura 14.-Interacción de Anexina V con los fosfolípidos de membrana durante la apoptosis celular.



La Anexina V se puede conjugar con un fluorocromo, como el EGFP (“Enhanced green fluorescent protein”) (Clontech®), para identificar mediante citometría de flujo, el grado de apoptosis de una población celular. La Anexina V se usa conjuntamente con el yoduro de propidio (PI), que tiñe el núcleo celular de las células en necrosis, que tienen

afectada la integridad de su membrana (246). Puesto que el PI no es excluido por las células necróticas, penetra en la célula intercalándose con el ADN y ocasionando una fluorescencia roja en los núcleos necróticos. Las células apoptóticas que aún conservan intacta la membrana excluyen el PI y no son teñidas (53). Finalmente, las células en apoptosis mueren pasando de ser PI negativas a PI positivas. Una vez las células exponen la PS, ésta permanece en la superficie celular y las células que mueren son pues Anexina V-EGFP positivas, PI positivas. De esta manera podemos distinguir las células que se encuentran en apoptosis temprana (Anexina V-EGFP positivas, PI negativas) de aquellas que se encuentran en apoptosis tardía o necrosis (Anexina V-EGFP positivas, PI positivas). Las células viables serán negativas para ambos marcajes.

3.11.2.2.-Materiales y Reactivos

Materiales:

- Tubos de poliestireno de 5ml Falcon (Becton-Dickinson, USA.).
- Centrifuga Medifriger (Selecta, España).
- Centrifuga Biofuge 28RS (Heraeus, España).
- Pipetas Pasteur estériles de plástico.
- Tubos de plástico estériles de 13 ml.
- Pipetas automáticas de entre 1 µl-1000 µl.
- Puntas para las pipetas de los calibres referidos.
- Citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, España).

Reactivos:

- FACSFlow (BD, España).
- Tampón fosfato salino PH 7.4 (Sigma, España).
- Tampón de ligamiento de Anexina V 10x: “Binding buffer” (Clontech, España).
- Anexina V-EGFP (Clontech, España).
- Yoduro de Propidio (Pharmingen, USA).
- Ficoll-Hypaque: Mono-poly Resolving Medium (ICN-Biomedicals, INC, USA).
- Azul tripan (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA).

3.11.2.3-Obtención y preparación de las muestras

Para la cuantificación del porcentaje de diferentes tipos de leucocitos de la sangre periférica que se encuentran en apoptosis, es necesario separarlos de los eritrocitos, para

lo cual se procede a realizar su aislamiento mediante gradiente de Ficoll. Dicho aislamiento se realiza a partir de la sangre contenida en tubos de coagulación con citrato. Se usan tubos con citrato y no con EDTA puesto que este último es un agente quelante y retira iones Ca^{2+} necesarios para la unión de la Anexina V a la fosfatidilserina.

-Mono-poly resolving médium (M-PRM) es una mezcla de un polisacarido (ficoll 400) y un medio de contraste radio-opaco (hypaque), en una proporción específica, para obtener una densidad de $1,114 \pm 0,002$ g/ml, que permite la separación de los eritocitos, de células mononucleares y polimorfonucleares (247).

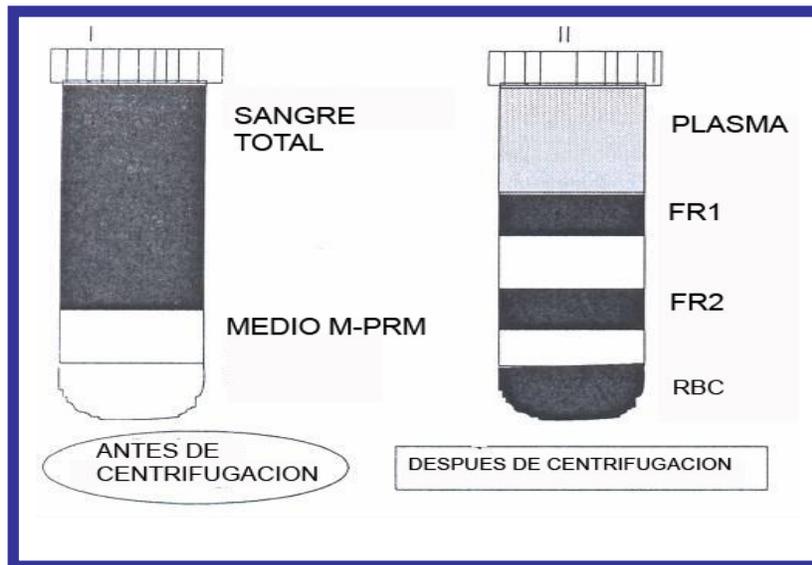
Debe utilizarse con sangre venosa tratada con anticoagulante, produciéndose una migración diferencial durante la centrifugación, resultando en la formación de dos bandas de células y un precipitado de eritrocitos.

-Aislamiento de las células:

Inmediatamente después de la extracción de la sangre periférica, se procede al aislamiento de las poblaciones de las células de interés. Para ello se vierten 3ml de mono-poly resolving medium (M-PRM) en un tubo de plástico estéril, de 13 ml utilizando una pipeta pasteur estéril de plástico: posteriormente se adicionan 3,5 ml de sangre periférica, procedente del tubo de citrato, teniendo especial cuidado de no mezclar ambos líquidos, de manera que queden uno sobre el otro. A continuación se centrifuga a $300 \times g$ durante 30 minutos, si bien, en determinadas ocasiones, debido a las características especiales del individuo del que procede la sangre, pueden ser necesarios hasta 50 minutos. De esta forma, tras la centrifugación, obtendremos tres fracciones diferenciadas en el tubo según se recoge en la figura 15: una fracción o banda en la interfaz plasma-medio de separación, que corresponde a los leucocitos mononucleares, una segunda banda por debajo de la anterior, donde están los PMNs, y en el fondo del tubo se encontrarán los eritrocitos.

A continuación se extraen ambas bandas de leucocitos con una pipeta pasteur y se vierten directamente sobre un tubo para citómetro (Tubo Falcon de 5 ml, Becton-Dickinson).

Figura 15.- Disposición de la sangre o poblaciones celulares y el medio de separación antes y después de la centrifugación.



- I. Aspecto de la sangre y el medio antes de la centrifugación
- II. Separación obtenida con M-PRM.
 - FR1 (en la interfaz plasma-medio de separación): banda de leucocitos mononucleares.
 - FR2 (por debajo de la interfaz): banda de leucocitos PMN.
 - RBC: precipitado de eritrocitos.

3.11.2.4.-Determinación de la viabilidad celular

Como paso previo a la determinación de la apoptosis celular, se ha estudiado la viabilidad de las células aisladas mediante gradiente de Ficoll. Para ello, con una pequeña parte de éstas aisladas se realiza una tinción con azul tripan: se realiza una suspensión celular, de las células aisladas, con suero salino obteniendo una concentración de 3000-5000 células por mililitro en NaCl al 0,9%. Tres gotas de dicha suspensión celular fueron mezcladas con una gota de azul tripan 1%. El número de células teñidas de un total de 200 fueron cuantificadas en una Cámara de Neubauer a los cinco minutos. De esta manera se comprueba que solamente se tiñen, y por lo tanto no son viables, alrededor del 1% de las células aisladas y nunca más del 3% (248).

La tinción con azul tripan sirve además, para la cuantificación del número de células que son aisladas por gradiente de densidad y fue corroborado por una tinción de

Giemsa, de forma que pudieron ajustarse las concentraciones óptimas de los reactivos inmunofluorescentes, que se usan a continuación, en función de las células a marcar.

3.11.2.5.-Procedimiento

Los leucocitos obtenidos por centrifugación en gradiente de Ficoll, se lavan dos veces con tampón fosfato salino (PBS) frío mediante centrifugación a 400 x g durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspende el precipitado de leucocitos con 1 ml de tampón de ligamiento 1X agitando intensamente, sin vortex. De esta solución se separan dos porciones de 100 μ l, utilizando una pipeta automática, que se vierten en sendos tubos Falcon de 5 ml (Becton-Dickinson). Uno de los tubos se considera como control negativo, y al otro se le adicionarán los reactivos de marcaje:

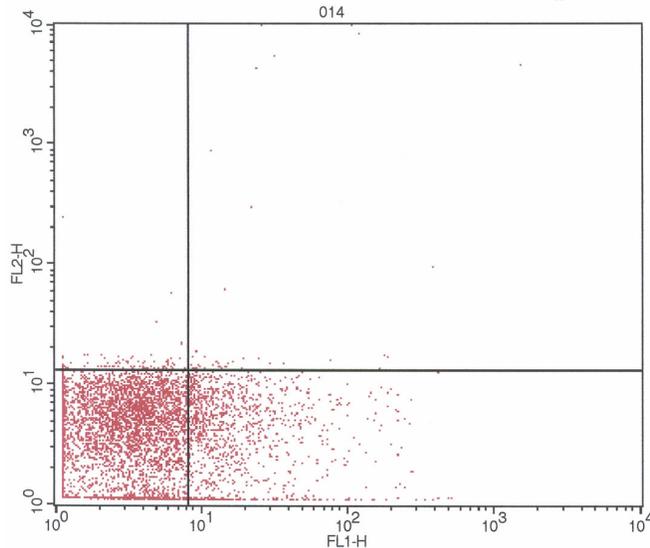
- Con una pipeta automática se adicionan 2 μ l de Anexina V, y 10 μ l de PI pipeteando repetidamente arriba y abajo para mezclar bien.
- El tubo así marcado se incuba protegido de la luz, a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Tras la incubación, se adicionan 700 μ l de tampón de ligamiento a ambos tubos (el marcado y el no marcado), y se procede a la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

Puesto que en cada tubo utilizado se encuentran tanto células mononucleares como PMNs, se analizan de forma independiente diferenciando las poblaciones de linfocitos y PMNs según sus características de tamaño (FSC) y complejidad (SSC). De esta manera se establecen regiones definidas para cada población, y se determina la apoptosis de linfocitos y granulocitos por separado. Para ello se utiliza un gráfico (“dot plot”) en el que el eje de abscisas representa el logaritmo de la fluorescencia de la Anexina V-EGFP (FL1) y el eje de ordenadas representa la fluorescencia del yoduro de propidio (FL2). Antes de llevar a cabo la adquisición de las células, se han de definir los parámetros relativos a la fluorescencia, de forma que no se produzca el solapamiento entre éstas, es decir, de FL1 y FL2. Además de las diferencias entre linfocitos y PMNs, las células en apoptosis presentan características de tamaño y complejidad que pueden variar respecto a las células viables y así mismo, pueden aparecer diferencias entre las poblaciones celulares de distintos individuos e incluso en muestras de un mismo individuo, que sean recogidas secuencialmente a lo largo de un determinado periodo de tiempo. Por tanto,

las regiones en que se incluyen las dos poblaciones leucocitarias deben modificarse cada vez que sea necesario, en función de la muestra a analizar.

En el gráfico (“dot plot”) que representa las fluorescencias (figura 16), se definen cuatro cuadrantes: en el inferior izquierdo se situarán las células que no presenten fluorescencia, es decir las células viables. En el cuadrante inferior derecho se sitúan las células que emiten fluorescencia en FL1, esto es, las células Anexina V positivas y PI negativas, que se refieren a células viables en apoptosis temprana. En el cuadrante superior derecho se encuentran las células que emiten fluorescencia en FL1 y FL2, es decir, que son Anexina-V positivas y PI positivas por lo que se trata de células en necrosis o en un estado de apoptosis avanzado.

Figura 16.- Diagrama de la fluorescencia obtenida en FL1 (Anexina V-EGFP) y en FL2 (PI) para la población de PMNs de un paciente quirúrgico del grupo de estudio.



Para la adquisición en el citómetro de flujo, se procede del siguiente modo:

- Se dispone de un tubo sin marcar (control negativo) y un tubo marcado con Anexina-V y PI.
- Se fijan las condiciones (voltajes y compensaciones) establecidas para poder observar los granulocitos y se adquiere el tubo sin marcar, de forma que se contabilicen 5000 células en la región en la que previamente se han localizado los PMNs por su tamaño (FSC) y complejidad (SSC) (figura 9).
- A continuación se adquiere el tubo marcado, contabilizando el mismo número de células y en la misma región.

-Este mismo proceso se repite con la población de linfocitos, para lo cual se fijan las condiciones establecidas para esta población y se contabilizarán las células de la región donde se localicen.

3.11.2.6.-Expresión de resultados

Los datos obtenidos del citómetro son analizados mediante un software adecuado con el programa “CELLQuest” asociado al citómetro FacScan (Becton Dickinson). Para la determinación de la fluorescencia emitida por Anexina V-EGFP y PI, se sustrajeron los controles negativos de forma apropiada para así eliminar la contribución de la autofluorescencia celular; el umbral de falsos negativos se fijó para excluir el 95% de los eventos en el análisis de la autofluorescencia de los controles negativos. Los resultados se expresan como porcentaje de células que se localizan en cada uno de los cuadrantes comentados. Para ello se utiliza un cuadro estadístico que nos indican dichos porcentajes. De esta manera tenemos datos sobre el porcentaje, calculado sobre un total de 5000 células, de aquéllas que se encuentran en los primeros estadios de la apoptosis y el porcentaje de células que se encuentra en apoptosis tardía o necrosis.

3.11.3.-DETERMINACIÓN DE CASPASA-3, PARP Y BCL-2

3.11.3.1.-Fundamento de la técnica

Los mediadores de los procesos de apoptosis caspasa-3, Bcl-2 y PARP se determinan por citometría de flujo mediante la técnica de CBA (cytometric beads array). Se utilizan el citómetro FACScan (Becton Dickinson) y kits comerciales “Human Apoptosis” (Becton Dickinson). Para la técnica CBA se dispone de tres tipos de partículas, revestidas con anticuerpos específicos para las proteínas mencionadas. Al igual que en el caso de las citoquinas Th1 y Th2, las partículas pueden diferenciarse por su intensidad de fluorescencia en un rango o canal de longitud de onda concreto (FL3). De este modo, las partículas de captura, tras incubación, se unirán de forma específica con las proteínas presentes en la muestra problema o en los liofilizados empleados para elaborar una curva patrón. Posteriormente se adicionan anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente (ficoeritrina) y se analizan los niveles de las proteínas en función de la fluorescencia emitida, que es captada en el citómetro de flujo. Los valores de fluorescencia obtenidos de los liofilizados de concentraciones conocidas, nos permiten extrapolar las concentraciones de las muestras problema.

3.11.3.2.-Materiales y reactivos

Materiales:

- Tubos de poliestireno de 5ml Falcon (Beckton Dickinson, USA.).
- Centrifuga Medifriger (Selecta, España).
- Pipetas automáticas de entre 10 µl- 1000 µl.
- Puntas para las pipetas de los calibres referidos.
- Citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, España).

Reactivos:

- Kit de apoptosis: Human apoptosis kit (BD-Pharmingen. San Diego,USA)

3.11.3.3.-Procedimiento

Las proteínas se analizan siguiendo las recomendaciones del fabricante:

Además de las determinaciones que se realizan en una dilución 1/100 del lisado de sanguíneas, obtenida tal y como se ha descrito anteriormente, se preparan diluciones seriadas de un liofilizado proporcionado por la casa comercial, para realizar una curva estándar a partir de la cual poder extrapolar los resultados de las muestras problema:

- 50 µl de muestra o estándar se incuban durante una hora, protegidos de la luz, con 50 µl de una mezcla de los tres tipos de partículas.
- Tras la incubación, se adicionan 500 µl de una solución de lavado y se centrifuga a 200 x g durante 5 minutos descartándose el sobrenadante.
- A continuación se adicionan 50 µl del reactivo de detección conjugado con ficoeritrina (PE), se resuspende el precipitado por agitación en vortex y se procede a incubar durante una hora, protegido de la luz.
- Tras la incubación se realiza otro lavado, del mismo modo que el anterior y finalmente se adicionan 300 µl de solución de lavado, se resuspenden por agitación en vortex, y se comienza su análisis en el citómetro.

Una vez fijadas las condiciones del citómetro, para poder detectar las partículas fluorescentes en función de su tamaño y estructura, y una vez ajustadas las fluorescencias para evitar solapamientos, se adquieren 2500 partículas de cada tubo (muestra o estándar), agitando previamente en vortex. A partir de las fluorescencias obtenidas de los estándares de concentraciones conocidas, se pueden conocer las concentraciones de caspasa-3, Bcl-2 y PARP liberado extrapolarando las medidas de

fluorescencia que originan las muestras problema. La tabla 2 recoge las concentraciones de los tres tipos de proteínas en función de las diluciones realizadas del liofilizado.

Tabla 2.-Concentraciones (unidades/ml) de las proteínas de interés de la curva estándar (patrón) en función de las diluciones realizadas

	Top estándar	Tubo dilución 1:2	Tubo dilución 1:4	Tubo dilución 1:8	Tubo dilución 1:16	Tubo dilución 1:32	Tubo dilución 1:64	Tubo dilución 1:128	Tubo dilución 1:256	Tubo dilución 1:512	Tubo dilución 1:1024	Blanco de reacción
Caspasa -3	6000	3000	1500	750	375	187,5	94	47	23,4	11,7	5,9	0
PARP	6000	3000	1500	750	375	187,5	94	47	23,4	11,7	5,9	0
Bcl-2	6000	3000	1500	750	375	187,5	94	47	23,4	11,7	5,9	0

3.11.3.4.-Expresión de resultados

Los valores de concentración de las tres proteínas determinadas, tienen asignados unidades arbitrarias de medida (unidades/mL). Cada unidad de caspasa-3, Bcl-2 y PARP liberado corresponde a la cantidad de proteína en 0,1 µg de proteínas totales obtenidas de un lisado de células Jurkat tratadas con camptotecina durante 4 horas.

El rango de detección para el análisis de estas proteínas en plasma es el siguiente: de 4,9 a 6000 unidades/ml para caspasa-3; de 18,5 a 6000 unidades/ml para PARP y de 28,8 a 6000 unidades/ml para Bcl-2.

3.12.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

-Se realizó inicialmente un análisis descriptivo de los datos con el fin de conocer la naturaleza de las variables y de describir la muestra. Para ello se obtuvieron estadísticos descriptivos de posición (medias y medianas) y de dispersión (desviaciones típicas y errores estándar) para las variables cuantitativas.

-Para el estudio analítico se realizó un análisis bivariante entre las variables cuantitativas independientes (niveles de citoquinas y proteínas relacionadas con la apoptosis) y la variable cualitativa dependiente (grupo de tratamiento: A, B y C).

Al tener una muestra de datos reducida y debido a la heterocedasticidad de los datos se aplicó la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis para contrastar si los grupos de estudio procedían de la misma población respecto a las variables cuantitativas de estudio. En caso de rechazar esta hipótesis se procedió posteriormente a identificar en

qué grupo/s se daba la diferencia respecto a la población mediante el estadístico U de Mann-Whitney, comparando por pares los tres grupos de tratamiento y realizando el ajuste de la significación por Bonferroni, fijada a priori en 0,1. Por lo tanto, un resultado fue estadísticamente significativo cuando el valor de p obtenido en la prueba de Mann-Whitney era menor o igual de 0,033 considerándose con tendencia a la significación aquellos valores de p entre 0,033 y 0,1.

-Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS versión 12.0.

4- RESULTADOS

4.1.- Características generales de los sujetos de estudio

Los pacientes de los tres grupos de estudio: placebo (A), NAC (B) y vitamina C (C), presentan características similares en cuanto a edad, sexo, puntuación POSSUM y riesgo de mortalidad estimado. Estas características, así como el tipo de patología, los procedimientos quirúrgicos realizados, la incidencia del MODS y la mortalidad postoperatoria tardía de los sujetos de estudio se muestran en las tablas siguientes.

Tabla 3.-Edad (años) de los pacientes por grupos de estudio.

	Media	Error típico	Máximo	Mínimo	N
Placebo	65,1	3,6	81	50	8
NAC	67,8	4,5	84	45	7
Vitamina C	63,6	6,1	89	41	8

Tabla 4.-Puntuación POSSUM de los pacientes por grupos de estudio.

	Media	Error típico	Máximo	Mínimo	N
Placebo	50,4	1,4	56	45	8
NAC	55	3,3	68	46	7
Vitamina C	54,2	4,7	71	42	8

Tabla 5.-Probabilidad de muerte (%) de los pacientes por grupos de estudio.

	Media	Error típico	Máximo	Mínimo	N
Placebo	52,0	4,1	70	35	8
NAC	60,5	8,7	92	30	7
Vitamina C	51,5	9,3	95	30	8

Tabla 6.-Sexo de los pacientes por grupos de estudio.

	Número de hombres/mujeres	n
Placebo	5/3	8
NAC	4/3	7
Vitamina C	4/4	8

Tabla 7.-Patologías de los pacientes por grupos de estudio.

	PLACEBO	NAC	Vitamina C
Peritonitis (bilíares, por diverticulitis, úlcus, perforaciones y colecistitis)	5	6	7
Isquemia intestinal complicada	1	0	1
Absceso intraabdominal	1	0	0
Dehiscencia de anastomosis tras gastrectomía	1	0	0
Colangitis	0	1	0

Tabla 8.-Procedimientos quirúrgicos por grupos de estudio

	PLACEBO	NAC	Vitamina C
Resección intestinal con o sin anastomosis	5	2	5
Sutura de perforación	2	2	2
Drenaje de colección o dehiscencia anastomótica	1	0	1
Colecistectomía con o sin drenaje de la vía biliar principal	0	3	0

Tabla 9.-Incidencia del MODS por grupos de estudio

	Nº de casos MODS / No MODS	% pacientes con MODS
Placebo	3/5	37,5
NAC	4/3	57,1
Vitamina C	3/5	37,5

Tabla 10.-Mortalidad postoperatoria de los pacientes por grupos de estudio

	Nº de casos Exitus / No Exitus	% pacientes fallecidos
Placebo	3/5	37,5
NAC	4/3	57,1
Vitamina C	5/3	62,5

4.2.- Citoquinas

4.2.1.-Interleuquina-6:

-Los niveles plasmáticos de IL-6 obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 9,7 pg/ml (ET: 2,4).

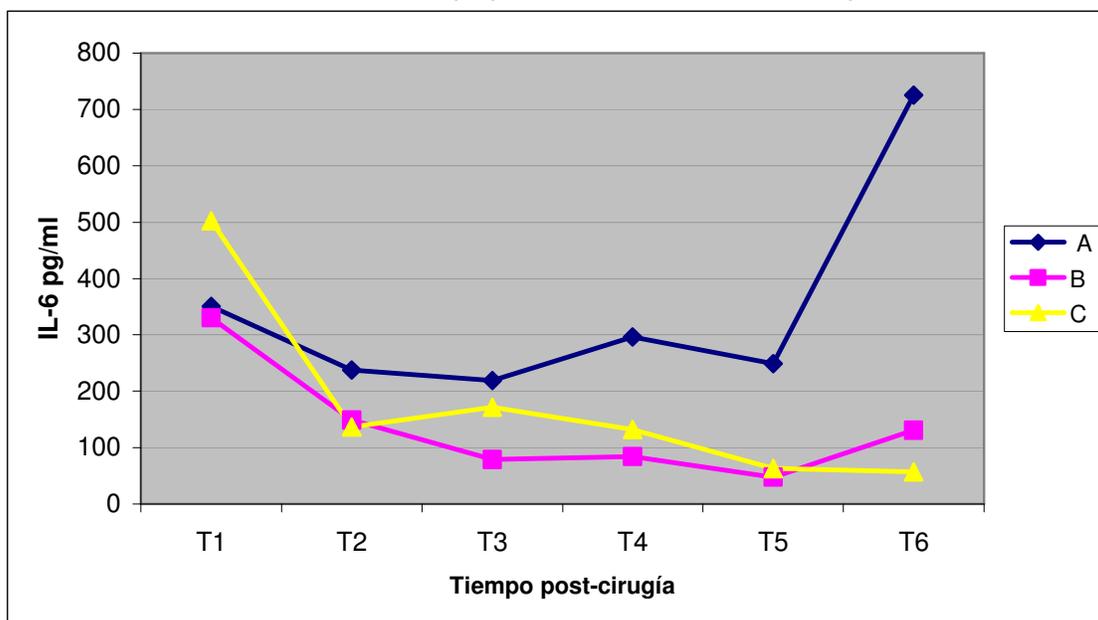
Los valores de IL-6 (pg/ml) correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 9 y se encuentran representados gráficamente en la figura 17.

Tabla 11.- Valores de IL-6 (pg/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	*T2	T3	T4	T5	*T6	N
PLACEBO	350,5 ET: 92,6	237,5 ET: 82,3	219,3 ET: 13,2	296,3 ET: 178,5	248,9 ET: 159,6	725,4 ET: 309,9	8
NAC	330,3 ET: 80,9	148,6 ET: 51,9	78,9 ET: 34,1	84,0 ET: 39,9	47,9 ET: 15,2	130,6 ET: 49,3	7
Vitamina C	502,3 ET: 161,3	136,4 ET: 59,3	171,4 ET: 95,5	132,5 ET: 85,8	63,0 ET: 34,2	57,1 ET: 36,2	8

* Diferencias entre el grupo placebo(A) y el grupo tratado con vitamina C (C): T2: $p=0,088$ y T6: $p=0,033$

Figura 17.-Evolución de los niveles plasmáticos de IL-6 (pg/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



La variabilidad de los resultados, representada por el error típico, es menor en los pacientes tratados y va disminuyendo durante el seguimiento postoperatorio.

-Los niveles de IL-6 en los pacientes del **grupo A** son significativamente superiores a los valores basales ($p < 0,033$). En el grupo A los valores descienden durante los tiempos de estudio T2 a T5 produciéndose una elevación a las 156 h de finalizada la intervención quirúrgica (T6).

-Los niveles de IL-6 en los pacientes del **grupo B** presentan una tendencia a disminuir desde las 36 h hasta las 84 h (T1-T3) y a partir de este momento permanecen constantes (T3-T6) e inferiores a los valores iniciales. En este grupo, los niveles de IL-6 son menores que en los pacientes del grupo A. Las diferencias entre ambos grupos van aumentando durante el postoperatorio, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas.

-Los pacientes del **grupo C** muestran una disminución acusada de los niveles de IL-6 entre las 36 y las 60 h (T1-T2) momento a partir del cual descienden hasta el final del seguimiento postoperatorio (T3-T6). En este grupo, los niveles de IL-6 son inferiores a los de los pacientes del grupo A: las diferencias se aproximan a la significación a las 60 horas después de la cirugía (T2) siendo significativas a las 156 horas después de la cirugía (T6).

-No existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IL-6 de los pacientes del grupo **B** y los niveles de los pacientes del grupo **C**.

4.2.2.-Interleuquina-10:

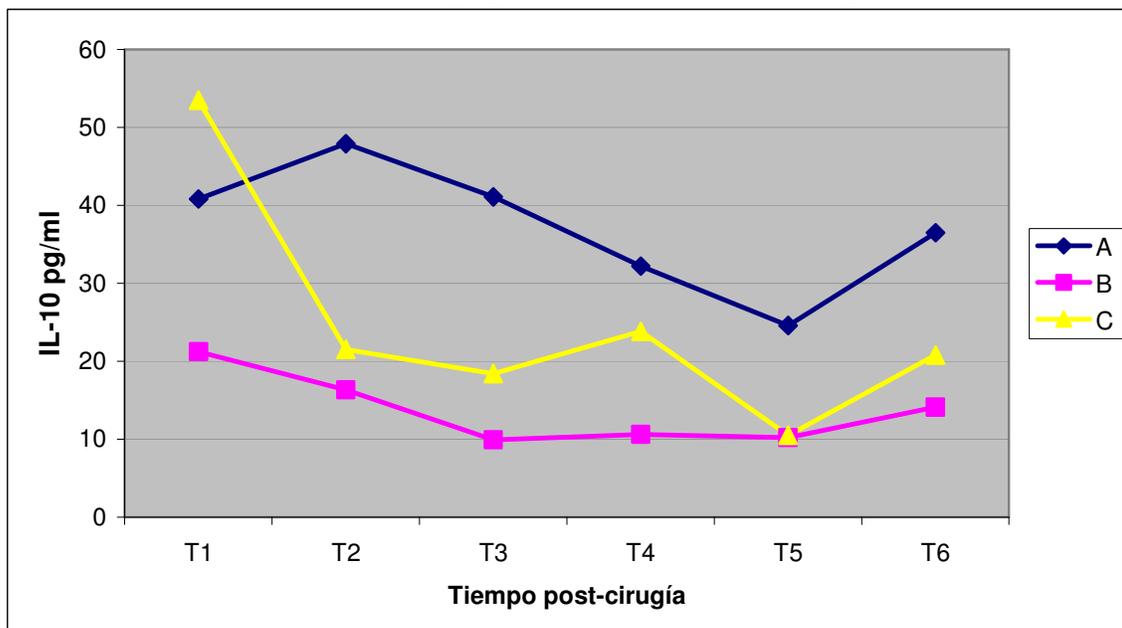
-Los niveles plasmáticos de IL-10 obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 9,6 pg/ml (ET: 3,7).

Los valores de IL-10 (pg/ml) correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 10 y se encuentran representados gráficamente en la figura 18.

Tabla 12.- Valores de IL-10 (pg/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	40,83 ET: 13,8	47,85 ET : 26,6	41,07 ET : 32,0	32,15 ET : 21,5	24,57 ET : 15,6	36,47 ET : 18,9	8
NAC	21,22 ET: 8,3	16,28 ET: 3,7	9,90 ET: 2,9	10,60 ET: 3,6	10,17 ET: 1,0	14,1 ET: 2,3	7
Vitamina C	53,52 ET: 26,9	21,52 ET: 14,1	18,37 ET: 10,3	23,77 ET: 18,4	10,52 ET: 5,7	20,77 ET: 15,9	8

Figura 18.-Evolución de los niveles plasmáticos de IL-10 (pg/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles de IL-10 en los pacientes del **grupo A** son superiores a los valores basales. En el grupo A se observa un aumento a las 60 h de la intervención quirúrgica (T2) descendiendo considerablemente a las 132 h (T5).

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de IL-10 descienden hasta las 84 h manteniéndose constantes hasta las 132 h (T3-T5) y produciéndose un aumento a las 156 h (T6), si bien, los valores siguen siendo inferiores a los iniciales. Este grupo presenta niveles de IL-10 inferiores a los de los pacientes del grupo A con un comportamiento paralelo en ambos. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de IL-10 descienden de forma acusada entre las 36 y las 60 h (T1-T2) manteniéndose constantes a partir de este momento. En este grupo, los niveles de IL-10 son menores que los de los pacientes del grupo A, desde las 60 horas posteriores a la finalización de la intervención quirúrgica (T2), con comportamientos similares, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

-No existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IL-10 de los pacientes del grupo **B** y los niveles de los pacientes del grupo **C**.

4.2.3.-Interleuquina-4:

-Los niveles plasmáticos de IL-4 obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 9,7 pg/ml (ET: 3,0).

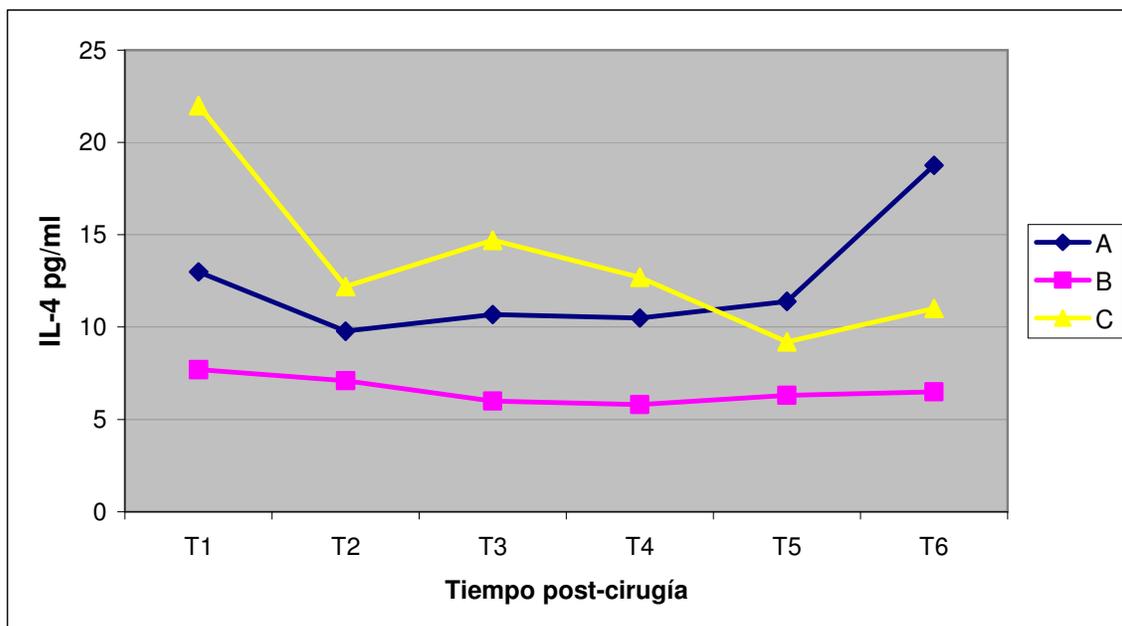
Los valores de IL-4 (pg/ml) correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 11 y se encuentran representados gráficamente en la figura 19.

Tabla 13.- Valores de IL-4 (pg/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	*T1	*T2	*T3	*T4	T5	T6	N
PLACEBO	13,00 ET : 4,0	9,78 ET : 2,2	10,68 ET: 3,4	10,48 ET: 2,8	11,4 ET : 3,3	18,76 ET : 6,6	8
NAC	7,66 ET: 1,9	7,14 ET: 1,8	6,04 ET: 1,6	5,76 ET: 1,8	6,25 ET: 1,7	6,47 ET: 2,0	7
Vitamina C	22,00 ET: 6,5	12,17 ET: 1,4	14,67 ET: 2,7	12,67 ET: 1,9	9,22 ET: 2,5	10,97 ET: 2,4	8

* Diferencias entre el grupo tratado con NAC (B) y el grupo tratado con vitamina C (C): T1: p=0.076, T2: p=0.086, T3: p=0.05 y T4: p=0.05

Figura 19.-Evolución de los niveles plasmáticos de IL-4 (pg/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles de IL-4 en los pacientes del **grupo A** son similares a los valores basales. En el grupo A los niveles de IL-4 descienden entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2), manteniéndose constantes hasta las 108 h (T4) en que comienzan a ascender, superando los niveles iniciales.

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles plasmáticos de IL-4, descienden hasta las 84 h después de la intervención quirúrgica (T1-T3), manteniéndose constantes hasta el final del seguimiento. Presentan valores de IL-4 menores que los pacientes del grupo A durante todo el postoperatorio, manteniéndose sus niveles bastante constantes, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

-En el **grupo C**, los niveles de IL-4 descienden de forma acusada entre las 36 y las 60 h (T1-T2) y aunque se produce un pequeño aumento a las 84 h (T3), los niveles vuelven a descender y se mantienen en valores similares a los de las 60h (T2). Presentan niveles de IL-4 similares a los de los pacientes del grupo A, si bien, son algo mayores hasta las 108 horas después de la intervención quirúrgica (T4).

-Los pacientes del grupo **B** presentan niveles de IL-4 inferiores a los del grupo **C**, que tienden a la significación hasta las 108 horas después de la cirugía (T1-T4).

4.2.4.-Interferón gamma (IFN- γ)

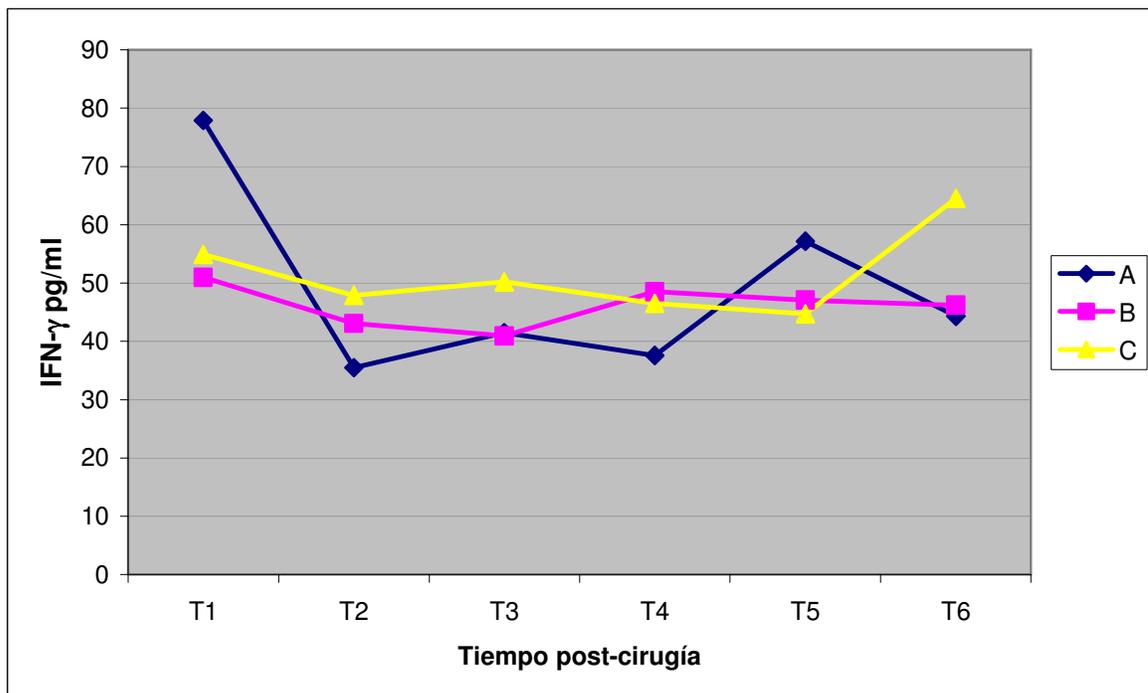
-Los niveles plasmáticos de IFN- γ obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 30,6 pg/ml (ET: 6,4).

Los valores de IFN- γ (pg/ml) correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 12 y se encuentran representados gráficamente en la figura 20.

Tabla 14.- Valores de IFN- γ (pg/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	77,9 ET : 34,4	35,51 ET : 11,1	41,51 ET : 10,4	37,63 ET : 10,8	57,23 ET : 15,4	44,28 ET : 12,0	8
NAC	51,00 ET: 21,9	43,10 ET: 16,9	40,9 ET: 16,1	48,46 ET: 23,0	47,05 ET: 15,5	46,20 ET: 15,2	7
Vitamina C	54,94 ET: 14,8	47,87 ET: 10,1	50,22 ET: 12,6	46,50 ET: 11,7	44,72 ET: 12,4	64,47 ET: 20,0	8

Figura 20.-Evolución de los niveles plasmáticos de IFN- γ (pg/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-En los pacientes del **grupo A** los niveles plasmáticos de IFN- γ son superiores a los niveles basales. En el grupo A los valores descienden entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2), manteniéndose prácticamente constantes a lo largo de los tiempos de estudio.

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de IFN- γ descienden ligeramente hasta las 84 h post- intervención quirúrgica (T1-T3), manteniéndose constantes hasta el final del seguimiento.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de IFN- γ son constantes durante el seguimiento produciéndose un aumento a las 156 h (T6).

-No existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IFN- γ de los pacientes del grupo **B** y los niveles de los pacientes del grupo **C**.

4.2.5.-Interleuquina-2:

-Los niveles plasmáticos de IL-2 obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 5,5 pg/ml (ET: 0,7).

Los valores de IL-2 (pg/ml) correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 13 y se encuentran representados gráficamente en la figura 21.

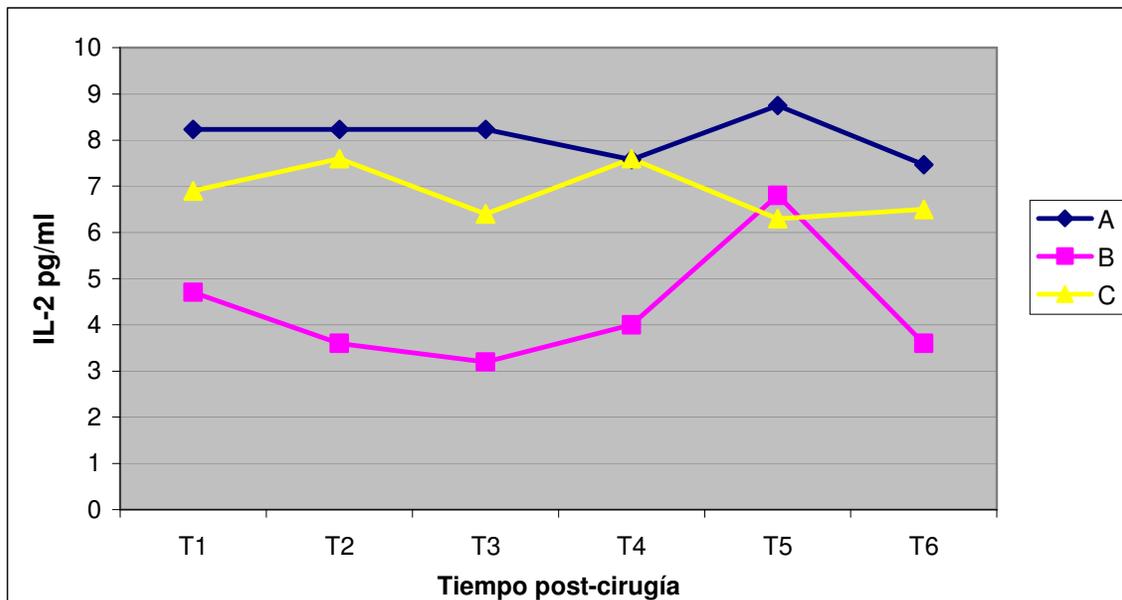
Tabla 15.- Valores de IL-2 (pg/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	*T2	*T3	*T4	*T5	*T6	N
PLACEBO	8,22 ET: 1,0	8,23 ET: 0,7	8,23 ET: 0,6	7,58 ET: 0,6	8,75 ET: 0,8	7,46 ET: 0,7	8
NAC	4,70 ET: 1,2	3,60 ET: 0,8	3,20 ET: 0,6	4,00 ET: 1,0	3,80 ET: 0,7	3,60 ET: 0,6	7
Vitamina C	6,94 ET: 1,2	7,60 ET: 1,5	6,40 ET: 1,0	7,62 ET: 1,4	6,27 ET: 1,0	6,50 ET: 0,2	8

* Diferencias entre el grupo placebo (A) y el grupo tratado con NAC (B): T2: p=0.006, T3: p=0.006, T4: p=0.018, T5: p=0.011 y T6: p=0.010

* Diferencias entre el grupo tratado con NAC (B) y el grupo tratado con vitamina C (C): T2: p=0.027, T3: p=0.086, T4: p=0.086, y T6: p=0.02

Figura 21.-Evolución de los niveles plasmáticos de IL-2 (pg/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles plasmáticos de IL-2 en los pacientes del **grupo A** se mantienen muy constantes a lo largo de todo el seguimiento postoperatorio, si bien, son significativamente superiores a los valores basales ($p < 0,033$).

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de IL-2 descienden hasta las 84 h (T1-T3), si bien, aumentan hasta alcanzar un máximo a las 132 h (T5), y posteriormente descienden hasta valores inferiores a los iniciales. Este grupo presenta niveles de IL-2 inferiores a los de los pacientes del grupo A, observándose un comportamiento paralelo en ambos grupos. Las diferencias son estadísticamente significativas a partir de las 60 horas después de la cirugía (T2) y hasta el final del estudio (T6). Los valores de IL-2 en este grupo son similares o incluso algo inferiores a los de los individuos sanos.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de IL-2 se mantienen constantes durante todo el seguimiento. Este grupo presenta niveles de IL-2 inferiores a los del grupo A excepto a las 108 horas después de la intervención quirúrgica (T4), si bien, las diferencias no son estadísticamente significativas.

-Los pacientes del grupo **B** presentan niveles de IL-2 inferiores a los del grupo **C** excepto a las 132 horas después de la intervención (T5), en que se produce un máximo en el grupo B. Las diferencias son estadísticamente significativas o tienden a la significación desde las 60 h después de finalizar la intervención quirúrgica (T2) hasta el final del seguimiento, excepto a las 132 h (T5).

4.2.6.-Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α):

-Los niveles plasmáticos de TNF- α obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 4,4 pg/ml (ET: 1,0).

Los valores de TNF- α (pg/ml) correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 14 y se encuentran representados gráficamente en la figura 22.

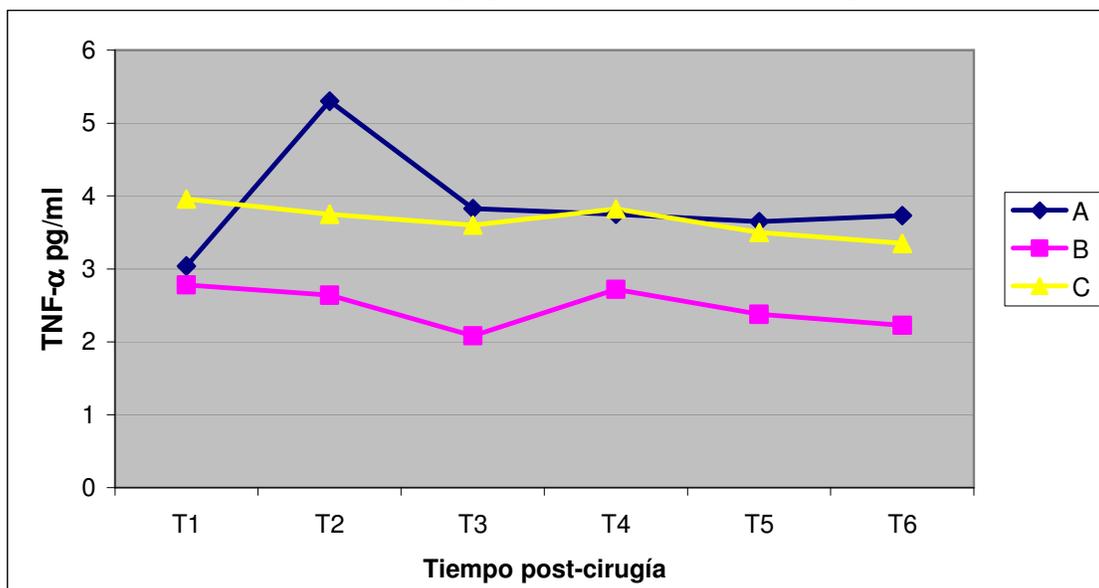
Tabla 16.- Valores de TNF- α (pg/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	*T2	*T3	T4	*T5	*T6	N
PLACEBO	3,04 ET : 0,3	5,30 ET: 0,9	3,83 ET: 0,4	3,75 ET: 0,4	3,65 ET: 0,3	3,73 ET: 0,3	8
NAC	2,78 ET: 0,6	2,64 ET: 0,4	2,08 ET: 0,2	2,72 ET: 0,6	2,37 ET: 0,4	2,22 ET: 0,2	7
Vitamina C	3,96 ET: 0,4	3,75 ET: 0,5	3,60 ET: 0,5	3,82 ET: 0,6	3,50 ET: 0,4	3,35 ET: 0,7	8

* Diferencias entre el grupo placebo (A) y el grupo tratado con NAC (B): T2: p=0.017, T3: p=0.018, T5: p=0.054 y T6: p=0.054

* Diferencias entre el grupo tratado con NAC (B) y el grupo tratado con vitamina C (C): T2: p=0.084 y T3: p=0.05

Figura 22.-Evolución de los niveles plasmáticos de TNF- α (pg/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



Los niveles plasmáticos de TNF- α se mantienen constantes a lo largo del seguimiento, especialmente en los grupos tratados.

-Los niveles plasmáticos de TNF- α en los pacientes del **grupo A** son similares a los valores basales. En el grupo A se observa un aumento entre las 36 y las 60 h después de la cirugía (T1-T2), volviendo a descender entre las 60 y las 84 h (T2-T3) manteniéndose constantes a partir de ese momento, en valores superiores a los iniciales de este grupo.

-En el grupo de pacientes del **grupo B**, los niveles de TNF- α descienden hasta las 84 h (T1-T3), manteniéndose constantes hasta el final del seguimiento, mostrando valores inferiores a los iniciales. Este grupo presenta niveles de TNF- α inferiores a los de los pacientes del grupo A, desde las 60 horas después de la cirugía. Las diferencias son estadísticamente significativas a las 60 y 84 horas después de la cirugía (T2-T3) y tienden a la significación al final del seguimiento (T5-T6).

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de TNF- α descienden ligeramente durante todo el seguimiento. Presentan niveles de TNF- α muy similares a los del grupo A, especialmente a partir de las 84 horas después de la intervención quirúrgica (T3).

-Los pacientes del grupo **B** presentan niveles de TNF- α inferiores a los del grupo **C**, que tienden a la significación entre las 60 y las 84 h después de la cirugía (T2-T3).

4.3.- Apoptosis leucocitaria

4.3.1.1.-Expresión de Fas (CD95) en linfocitos CD3⁺

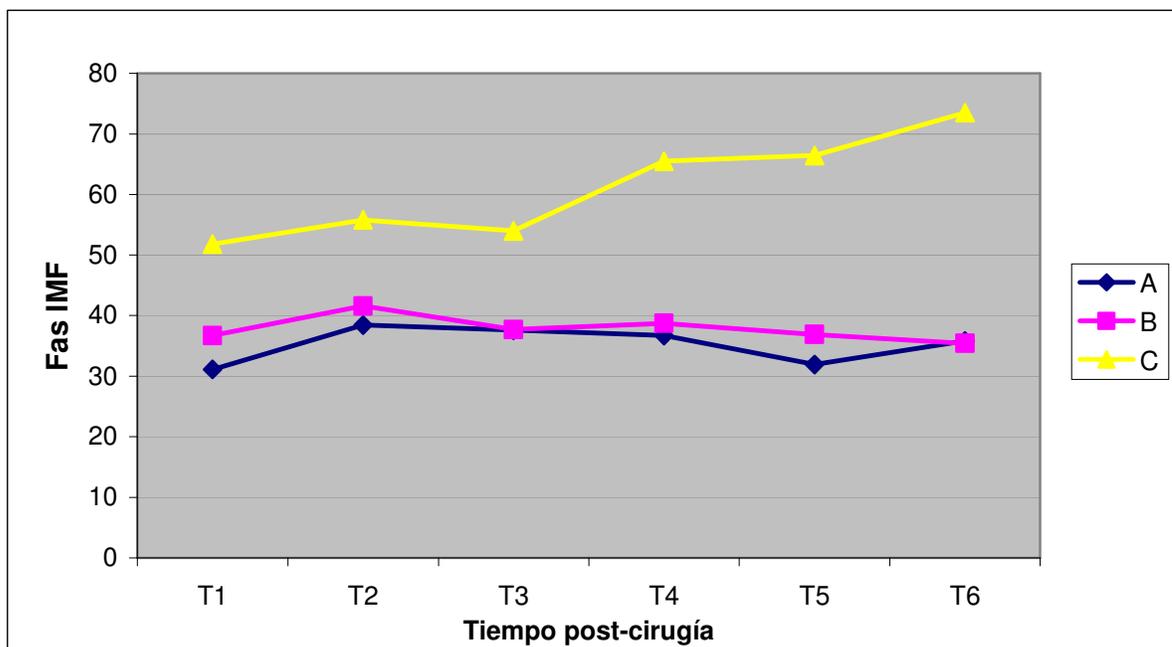
Los niveles de expresión de Fas en linfocitos CD3⁺ obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 28 IMF (ET: 0,7).

-Los valores de Fas de linfocitos, expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF), correspondientes a cada tiempo de toma de muestras y su error típico (ET) en los 3 grupos de estudio se muestran en la tabla 15 y se encuentran representados gráficamente en la figura 23.

Tabla 17.- Valores de Fas (IMF) en linfocitos CD3⁺ durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	n
PLACEBO	31,1 ET: 6,1	38,4 ET: 7,9	37,6 ET: 8,5	36,7 ET: 8,1	31,9 ET: 10,3	35,8 ET: 10,5	8
NAC	36,7 ET: 9,9	41,6 ET: 10,7	37,7 ET: 10,3	38,7 ET: 10,3	36,9 ET: 15,7	35,4 ET: 13,7	7
Vitamina C	51,8 ET: 17,3	55,8 ET: 23,9	54,0 ET: 16,4	65,5 ET: 31,6	66,4 ET: 21,1	73,5 ET: 23,9	8

Figura 23.-Evolución de los niveles de Fas (IMF) en linfocitos CD3⁺ en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles del receptor Fas en los linfocitos de los pacientes del **grupo A** son superiores a los valores basales. Los niveles aumentan entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2), manteniéndose constantes hasta las 108 h (T4).

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de Fas son similares aunque algo mayores que en el grupo A, manteniéndose constantes durante el postoperatorio.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de Fas tienden a ascender durante todo el seguimiento, con un aumento más pronunciado a partir de las 84 h (T3). En este grupo, los niveles de Fas son mayores que los de los pacientes del grupo A, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

-Los pacientes del grupo **B** presentan niveles de Fas inferiores a los del grupo **C**, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

4.3.1.2.-Expresión de Fas (CD95) en PMNs CD15⁺

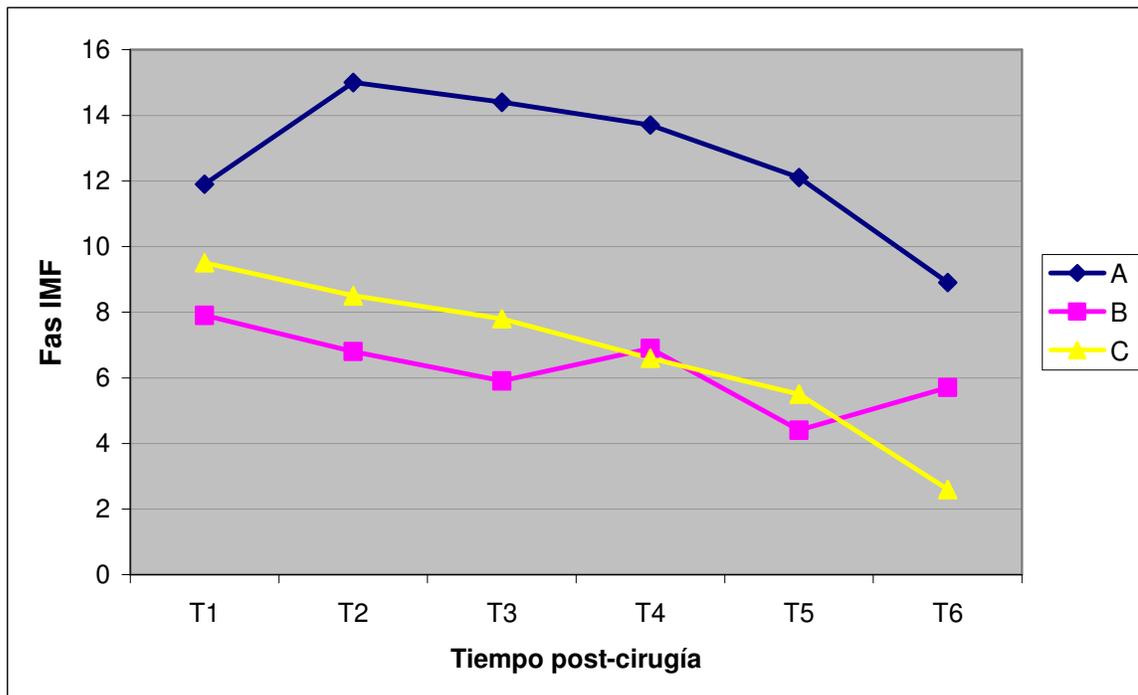
-Los niveles de Fas de PMNs CD15⁺ obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 15,3 IMF (ET: 0,9).

Los valores de Fas de PMNs, expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF), correspondientes a cada tiempo de toma de muestras y su error típico (ET) en los 3 grupos de estudio se muestran en la tabla 16 y se encuentran representados gráficamente en la figura 24.

Tabla 18.- Valores de Fas (IMF) en PMNs CD15⁺ durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	11,9 ET: 3,3	15,0 ET: 4,4	14,4 ET: 3,7	13,7 ET: 3,5	12,1 ET: 3,4	8,9 ET: 4,3	8
NAC	7,9 ET: 1,3	6,8 ET: 1,9	5,9 ET: 1,8	6,9 ET: 2,6	4,4 ET: 1,1	5,7 ET: 1,6	7
Vitamina C	9,5 ET: 1,2	8,5 ET: 1,8	7,8 ET: 1,9	6,6 ET: 0,9	5,5 ET: 1,9	2,6 ET: 1,8	8

Figura 24.-Evolución de los niveles de Fas (IMF) en PMNs CD15⁺ en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



Se puede observar que en todos los grupos de estudio hay una tendencia similar, de forma que los niveles de Fas disminuyen durante el postoperatorio. Sin embargo, las diferencias entre los grupos de estudio no son estadísticamente significativas:

-Los niveles del receptor Fas en los PMNs de los pacientes del **grupo A** son similares a los valores basales. Presentan un aumento entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2) y a partir de ese momento descienden de forma acusada hasta el final del seguimiento.

-En los pacientes del **grupo B** se observa una tendencia al descenso en los niveles de Fas, durante el seguimiento, con valores siempre por debajo de los iniciales. En este grupo, los niveles de Fas son inferiores a los de los pacientes del grupo A.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de Fas muestran una tendencia descendente muy acusada durante todo el seguimiento. En este grupo, los niveles de Fas son inferiores a los de los pacientes del grupo A.

4.3.2.1.-Porcentaje de linfocitos en apoptosis

-Los porcentajes de linfocitos en apoptosis obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 8,4 % (ET: 2,1).

Los porcentajes de linfocitos en apoptosis correspondientes a cada tiempo de toma de muestras y su error típico (ET) en los 3 grupos de estudio se muestran en la tabla 17 y se encuentran representados gráficamente en la figura 25.

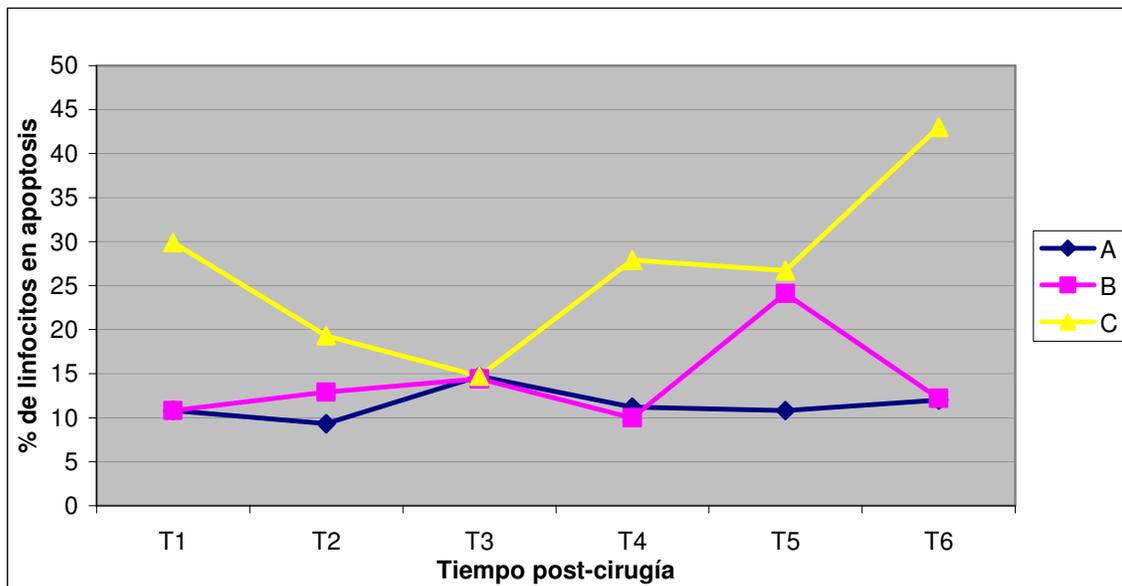
Tabla 19.- Porcentajes de linfocitos en apoptosis durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	*T2	T3	*T4	*T5	*T6	N
PLACEBO	10,8 ET: 2,2	9,3 ET: 1,7	14,7 ET: 1,4	11,2 ET: 2,0	10,8 ET: 1,4	12,0 ET: 1,9	8
NAC	10,8 ET: 3,8	12,9 ET: 3,3	14,4 ET: 2,2	10,0 ET: 6,5	24,1 ET: 4,7	12,2 ET: 7,7	7
Vitamina C	29,9 ET: 14,9	19,3 ET: 2,8	14,7 ET: 6,2	27,9 ET: 1,7	26,7 ET: 5,0	43,0 ET: 11,0	8

* Diferencias entre el grupo placebo (A) y el grupo tratado con vitamina C (C): T2: $p=0.053$, T4: $p=0.053$, T5: $p=0.053$ y T6: $p=0.053$

* Diferencias entre el grupo tratado con NAC (B) y el grupo tratado con vitamina C (C): T4: $p=0.083$

Figura 25.-Evolución del porcentaje de linfocitos en apoptosis en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los porcentajes de linfocitos en apoptosis en los pacientes del **grupo A** son superiores a los valores basales y dichas diferencias tienden a la significación estadística (T1: $p=0.092$, T2: $p=0.171$, T3: $p=0.020$, T4: $p=0.079$, T5: $p=0.065$ y T6: $p=0.065$). Los valores del grupo A se mantienen constantes durante todo el seguimiento excepto por un aumento a las 84 h después de finalizar la intervención quirúrgica (T3).

-En los pacientes del **grupo B**, el porcentaje de linfocitos en apoptosis se mantiene constante con un máximo a las 132 h (T5). Los porcentajes de linfocitos en apoptosis son similares a los de los pacientes del grupo A, si bien, el grupo B presenta un máximo a las 132 horas de finalizar la intervención quirúrgica (T5). Las diferencias entre estos dos grupos (A y B) no son estadísticamente significativas.

-En los pacientes del **grupo C**, el porcentaje de linfocitos en apoptosis desciende hasta las 84 h (T1-T3), aumentando desde ese momento de forma acusada hasta el final del seguimiento. Los porcentajes de linfocitos en apoptosis son mayores que los de los pacientes del grupo A. Las diferencias entre estos dos grupos (A y C) son estadísticamente significativas a partir de las 60 horas después de la cirugía (T2) y hasta el final del estudio (T6), excepto a las 84 horas (T3).

-Los pacientes del grupo **B** presentan niveles de Fas inferiores a los del grupo **C**, que tienden a la significación a las 108 horas después de la cirugía (T4).

4.3.2.2.-Porcentaje de PMNs en apoptosis

La separación de los PMNs previa a la determinación de los niveles de fosfatidilserina presentó dificultades en los pacientes críticos y no fue posible su aislamiento, de modo que la apoptosis no fue determinada de forma directa.

En los individuos sanos sí fue posible el aislamiento. Los porcentajes de neutrófilos en apoptosis obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 17,9 pg/ml (ET: 3,0).

4.3.3.1.-Niveles leucocitarios de caspasa-3

-Los niveles de caspasa-3 obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 1,2 U/ml (ET: 0,1).

Los niveles de caspasa-3 correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los tres grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 18 y se encuentran representados gráficamente en la figura 26.

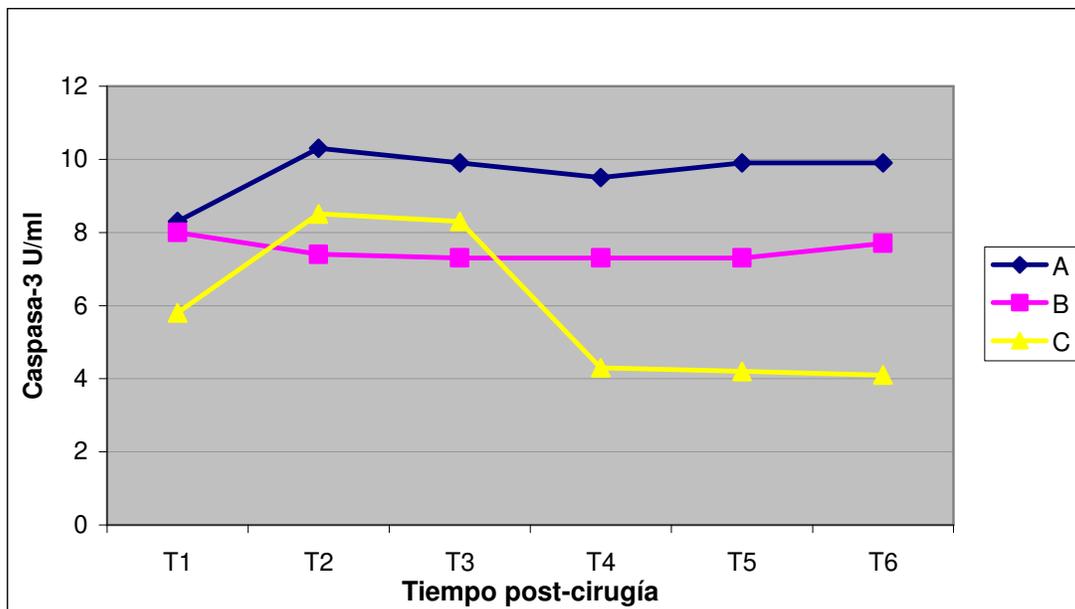
Tabla 20.- Valores de caspasa-3 (U/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	*T4	*T5	*T6	N
PLACEBO	8,3 ET: 2,8	10,3 ET: 2,8	9,9 ET: 3,0	9,5 ET: 2,2	9,9 ET: 2,9	9,9 ET: 3,0	8
NAC	8,0 ET: 2,8	7,4 ET: 2,9	7,3 ET: 2,7	7,3 ET: 2,8	7,3 ET: 2,3	7,7 ET: 2,3	7
Vitamina C	5,8 ET: 1,5	8,5 ET: 1,0	8,3 ET: 2,8	4,3 ET: 0,2	4,2 ET: 0,2	4,1 ET: 0,3	8

* Diferencias entre el grupo placebo (A) y el grupo tratado con vitamina C (C): T4: p=0.05 y T5: p=0.05

* Diferencias entre el grupo tratado con NAC (B) y el grupo tratado con vitamina C (C): T6: p=0.05

Figura 26.-Evolución de los niveles de caspasa-3 (U/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles de caspasa-3 en los pacientes del **grupo A** son significativamente superiores a los niveles basales ($p < 0,033$). En el grupo A se observa un aumento entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2) manteniéndose a continuación constantes hasta el final del seguimiento.

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de caspasa-3 disminuyen ligeramente entre las 36 y las 60 h (T1-T2), manteniéndose constantes durante todo el seguimiento. Estos niveles son inferiores a los de los pacientes del grupo A y presentan un comportamiento paralelo a éstos, a partir de las 60 horas después de la intervención quirúrgica (T2). Sin embargo, las diferencias entre ambos grupos (A y B) no son estadísticamente significativas.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de caspasa-3 presentan un aumento entre las 36 y las 60 h (T1-T2), que se mantiene en niveles altos hasta las 84 h (T3) y a partir de ese momento descienden hasta valores por debajo de los iniciales donde se mantienen hasta el final del seguimiento. Estos niveles son inferiores a los de los pacientes del grupo A. Las diferencias entre estos dos grupos (A y C) son estadísticamente significativas a las 108 y 132 horas después de la cirugía (T4 y T5).

4.3.3.2.-Niveles leucocitarios de PARP

-Los niveles de PARP obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 1,42 U/ml (ET: 0,2).

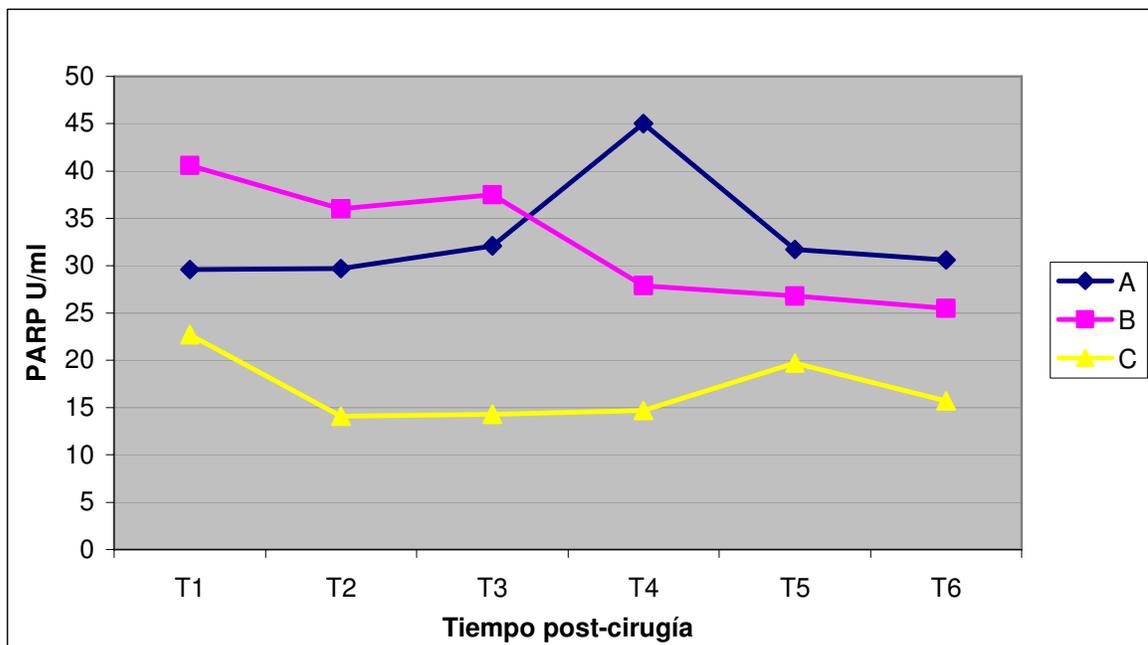
Los niveles de PARP correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 19 y se encuentran representados gráficamente en la figura 27.

Tabla 21.- Valores de PARP (U/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	*T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	29,6 ET: 10,5	29,7 ET: 11,5	32,1 ET: 14,6	45,0 ET: 13,4	31,7 ET: 14,8	30,6 ET: 12,4	8
NAC	40,6 ET: 16,1	36,0 ET: 12,6	37,5 ET: 15,2	27,9 ET: 13,6	26,8 ET: 9,4	25,5 ET: 11,6	7
Vitamina C	22,7 ET: 6,3	14,1 ET: 3,7	14,3 ET: 3,5	14,7 ET: 2,6	19,7 ET: 9,3	15,7 ET: 3,1	8

* Diferencias entre el grupo placebo (A) y el grupo tratado con vitamina C (C): T3: p=0.05

Figura 27.-Evolución de los niveles de PARP (U/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles de PARP en los pacientes del **grupo A** son significativamente superiores a los valores basales ($p < 0,033$). En el grupo A los valores se mantienen constantes durante el seguimiento con un máximo a las 108 h después de la cirugía (T4).

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de PARP descienden de modo constante a lo largo del seguimiento. Estos niveles, aunque algo menores al final del postoperatorio, son similares a los de los pacientes del grupo A. Las diferencias entre ambos grupos (A y B) no son estadísticamente significativas.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de PARP descienden entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2) manteniéndose constantes con un ligero incremento a las 132 h de finalizar la intervención quirúrgica (T5). Estos niveles son inferiores a los de los pacientes del grupo A durante todo el postoperatorio. Las diferencias entre estos dos grupos (A y C) únicamente son estadísticamente significativas a las 132 h después de la cirugía (T5).

4.3.3.3.-Niveles leucocitarios de Bcl-2

-Los niveles de Bcl-2 obtenidos en 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 3,9 U/ml (ET: 1,2).

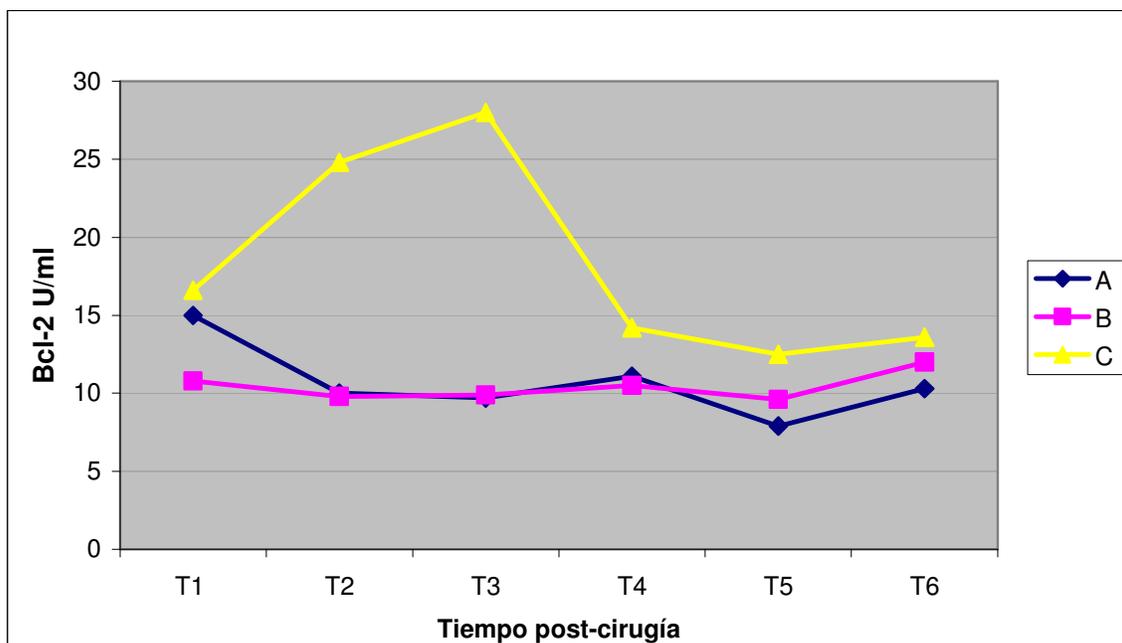
Los niveles de Bcl-2 correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 20 y se encuentran representados gráficamente en la figura 28.

Tabla 22.- Valores de Bcl-2 (U/ml) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	*T4	T5	T6	N
PLACEBO	15,0 ET: 3,7	10,0 ET: 2,30	9,7 ET: 2,2	11,1 ET: 3,1	7,9 ET: 2,5	10,3 ET: 3,1	8
NAC	10,8 ET: 4,3	9,8 ET: 4,1	9,9 ET: 4,2	10,5 ET: 4,7	9,6 ET: 4,2	12,0 ET: 5,9	7
Vitamina C	16,6 ET: 5,3	24,8 ET: 16,8	28,0 ET: 10,8	14,2 ET: 5,7	12,5 ET: 6,4	13,6 ET: 6,1	8

* Diferencias entre el grupo placebo (A) y el grupo tratado con vitamina C (C): T4: p=0.05

Figura 28.-Evolución de los niveles de Bcl-2 (U/ml) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



-Los niveles de Bcl-2 en los pacientes del **grupo A** son significativamente superiores a los valores basales ($p < 0,033$). En el grupo A los valores descienden entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2) y se mantienen constantes hasta el final del seguimiento con un ligero descenso a las 132 h (T5).

-En los pacientes del **grupo B**, los niveles de Bcl-2 se mantienen constantes durante todo el seguimiento, con un ligero aumento a las 156 h (T6). Los niveles son muy similares a los de los pacientes del grupo A y presentan evoluciones paralelas.

-En los pacientes del **grupo C**, los niveles de Bcl-2 aumentan entre las 36 y las 84 h (T1-T3). Posteriormente, descienden entre las 84 y las 108 h (T3-T4) y a partir de ese momento se mantienen constantes en valores por debajo de los iniciales. Los niveles son mayores que los de los pacientes del grupo A durante todo el postoperatorio, especialmente hasta las 84 h después de la intervención quirúrgica (T3), siendo estadísticamente significativa la diferencia en este tiempo.

4.4.- Fórmula leucocitaria

4.4.1.-Leucocitos totales

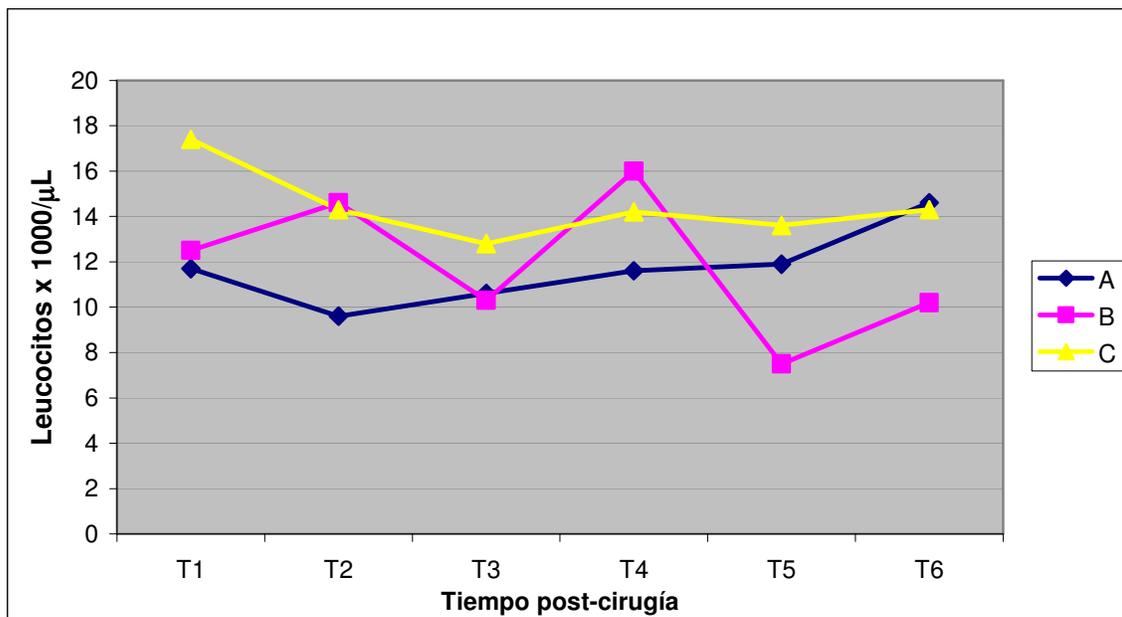
-El número de leucocitos totales obtenido de 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de $6,7 \times 1000 / \mu\text{L}$ (ET: 1,6).

El número de leucocitos correspondiente a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 21 y se encuentran representados gráficamente en la figura 29.

Tabla 23.-Número de leucocitos ($\times 1000 / \mu\text{L}$) durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	11,7 ET: 2,3	9,6 ET: 2,1	10,6 ET: 2,9	11,6 ET: 3,4	11,9 ET: 3,3	14,6 ET: 4,8	8
NAC	12,5 ET: 3,9	14,6 ET: 4,2	10,3 ET: 4,9	16,0 ET: 10,9	7,5 ET: 4,4	10,2 ET: 4,6	7
Vitamina C	17,4 ET: 3,1	14,3 ET: 1,9	12,8 ET: 1,9	14,2 ET: 1,8	13,6 ET: 2,0	14,3 ET: 1,5	8

Figura 29.-Evolución del número de leucocitos ($\times 1000 / \mu\text{L}$) en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



El número de leucocitos totales no muestra diferencias significativas entre los grupos de estudio. En todos los grupos, el número de leucocitos se mantiene en niveles significativamente elevados en comparación con los individuos sanos ($p < 0,033$).

-El número de leucocitos en los pacientes del **grupo A** desciende entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2) y a partir de ese momento se va recuperando hasta superar los valores iniciales a las 156 h (T6).

-En los pacientes del **grupo B**, el número de leucocitos presenta altibajos durante el seguimiento pero con una tendencia al descenso.

-En los pacientes del **grupo C**, el número de leucocitos desciende entre las 36 y las 84h después de la intervención quirúrgica (T1-T3) y a partir de ese momento se mantiene constante hasta el final del seguimiento.

4.4.2.-Porcentaje de linfocitos

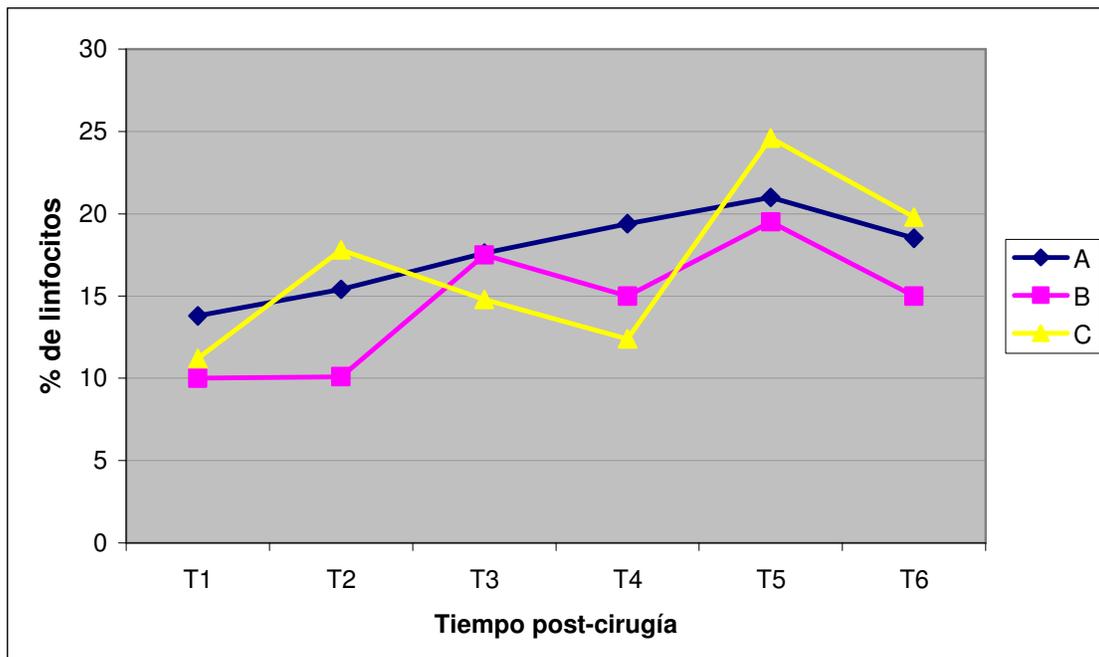
-El porcentaje de linfocitos obtenido de 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 34,3 % (ET: 5,2).

Los porcentajes de linfocitos correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 22 y se encuentran representados gráficamente en la figura 30.

Tabla 24.- Porcentaje de linfocitos durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	13,8 ET: 3,1	15,4 ET: 4,1	17,6 ET: 4,6	19,4 ET: 3,1	21,0 ET: 3,5	18,5 ET: 4,1	8
NAC	10,0 ET: 1,7	10,1 ET: 1,4	17,5 ET: 4,3	15,0 ET: 3,6	19,5 ET: 9,5	15,0 ET: 3,7	7
Vitamina C	11,2 ET: 2,4	17,8 ET: 3,5	14,8 ET: 2,0	12,4 ET: 3,0	24,6 ET: 12,4	19,8 ET: 4,8	8

Figura 30.-Evolución de los porcentajes de linfocitos en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



Los porcentajes de linfocitos de la fórmula leucocitaria no muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio, observándose una tendencia ascendente durante el seguimiento postoperatorio. En todos los grupos, sus porcentajes se mantienen en niveles significativamente disminuidos en comparación con los de los individuos sanos ($p < 0,033$).

-Los porcentajes de linfocitos en los pacientes del **grupo A** aumentan de forma continua hasta las 132 h después de la intervención quirúrgica (T5), descendiendo ligeramente a las 156 h (T6), aunque los niveles siguen siendo superiores a los iniciales.

-En los pacientes del **grupo B**, los porcentajes linfocitos presentan una tendencia ascendente durante el seguimiento.

-En los pacientes del **grupo C**, los porcentajes linfocitos aumentan entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2) y posteriormente descienden hasta las 108 h (T2-T4) para a continuación volver a aumentar y quedar finalmente por encima de los valores iniciales.

4.4.3.-Porcentaje de PMNs

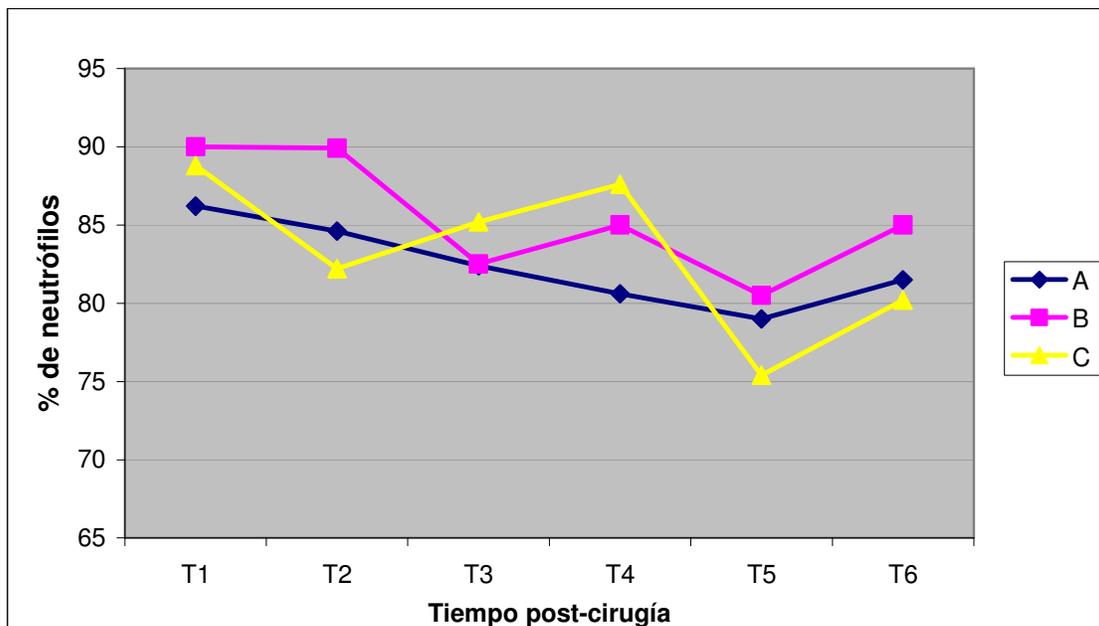
-El porcentaje de PMNs obtenido de 10 **voluntarios sanos**, considerados como valor basal, presentan un promedio de 65,1 % (ET: 5,9).

Los porcentajes de PMNs correspondientes a cada tiempo de toma de muestras en los 3 grupos de estudio y su error típico (ET) se muestran en la tabla 23 y se encuentran representados gráficamente en la figura 31.

Tabla 25.- Porcentaje de PMNs durante el seguimiento postoperatorio.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	N
PLACEBO	86,2 ET: 3,3	84,6 ET: 4,0	82,4 ET: 4,7	80,6 ET: 3,3	79,0 ET: 3,6	81,5 ET: 4,5	8
NAC	90,0 ET: 1,9	89,9 ET: 1,3	82,5 ET: 4,0	85,0 ET: 3,8	80,5 ET: 7,5	85,0 ET: 3,9	7
Vitamina C	88,8 ET: 2,6	82,2 ET: 3,3	85,2 ET: 2,1	87,6 ET: 3,1	75,4 ET: 9,4	80,2 ET: 5,0	8

Figura 31.-Evolución de los porcentajes de PMNs en cada grupo de estudio: A=Placebo; B=NAC (75 mg/kg/día); C=Vitamina C (450 mg/día).



Los porcentajes de PMNs de la fórmula leucocitaria no muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio, observándose una tendencia descendente durante el seguimiento postoperatorio. En todos los grupos, las concentraciones se mantienen en niveles significativamente elevados en comparación con los de los individuos sanos ($p < 0,033$).

-Los porcentajes de PMNs en los pacientes del **grupo A** descienden de forma continua hasta las 132 h después de la intervención quirúrgica (T5), aumentando ligeramente a las 156 h (T6), aunque los niveles siguen siendo inferiores a los iniciales.

-En los pacientes del **grupo B**, los porcentajes PMNs presentan una tendencia descendente durante el seguimiento con un marcado descenso a las 84 h (T3).

-En los pacientes del **grupo C**, los porcentajes PMNs descienden entre las 36 y las 60 h después de la intervención quirúrgica (T1-T2), si bien, parecen aumentar hasta las 108 h (T2-T4), para a continuación volver a descender y quedar finalmente por debajo de los valores iniciales.

5- DISCUSIÓN

5.1.-Efecto de la administración de NAC o vitamina C sobre los niveles plasmáticos de citoquinas

El MODS es un resultado siempre perjudicial para el paciente, que una vez establecido es difícil de controlar y es responsable de la mayoría de las muertes de los enfermos de UCI (249) y en nuestro caso, de la mayoría de las muertes de los pacientes del Servicio de Cirugía del que proceden los sujetos de este estudio. Puesto que es de común acuerdo que la mejor forma de combatirlo es su prevención (250), la intervención temprana en la respuesta inflamatoria sistémica que tiene lugar tras la cirugía en pacientes sépticos, es de gran interés para prevenir el MODS y la mortalidad.

Está descrito que durante los procesos inflamatorios se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) en gran cantidad, debido a la activación de las células endoteliales y PMNs (48). N-acetilcisteína (NAC) y vitamina C son moléculas que actúan disminuyendo la producción de ROS o neutralizando los ya existentes (50, 52). De este modo se evita la acción de los ROS como mediadores secundarios que generan sustancias quimiotácticas y citoquinas e inducen la expresión de moléculas de adhesión, activando de este modo nuevas células productoras de mediadores, amplificando el proceso inflamatorio (48).

Los niveles plasmáticos de citoquinas en investigación quirúrgica tienen un gran valor para la identificación de la inflamación sistémica, su evolución e incluso para la supervivencia (166, 251). Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral confirman que, independientemente del tratamiento administrado, los niveles plasmáticos de IL-6, IL-10, IL-4, IL-2, IFN- γ y TNF- α son mayores en los pacientes quirúrgicos de alto riesgo con sepsis, que en el grupo de voluntarios sanos, resultados que coinciden con los referidos en trabajos previos (9, 26, 252). La explicación que se propone a estos niveles elevados de citoquinas se basa en que dichos pacientes presentan procesos inflamatorios severos ocasionados por sus patologías, que además se ven agravados por el propio proceso quirúrgico produciéndose un exceso de mediadores inflamatorios. Sin embargo, el SIRS supone una respuesta del organismo a lesiones inespecíficas, de forma que a través de los niveles de citoquinas no es posible distinguir si es de origen infeccioso (sepsis) o no infeccioso (150). Así, por ejemplo, Reinhart y col., en el año 2002 (12), propusieron que la elevación de los niveles de IL-6 para el diagnóstico de la sepsis estaba limitada en pacientes críticos, por la elevación inespecífica causada por la inflamación independiente de la infección. Por otra parte, además de la severidad del

proceso inflamatorio, los niveles de citoquinas se han relacionado con las **complicaciones postquirúrgicas** (251-254).

El ambiente proinflamatorio que predomina en la sepsis, es responsable de una sobreactivación de los leucocitos y células endoteliales, que se asocian con el daño en los tejidos. Así, por ejemplo, el mantenimiento de niveles sanguíneos elevados de IL-6 debe revertir de forma adecuada ya que estas las elevaciones se corresponden en el tiempo con la preactivación de los PMNs y su secuestro, y son potenciales mediadores en la lesión precoz de tejidos (6, 173), lo cual puede agravar la inflamación sistémica a causa de la liberación crónica de productos tóxicos en el lugar de la inflamación (255) que pueden contribuir al fallo de órganos y al desarrollo del MODS (191). Existen numerosos trabajos que relacionan los niveles de citoquinas con el desarrollo de **disfunción orgánica**: niveles elevados de IL-6, IL-10 y TNF- α se han relacionado con el MODS en pacientes con SIRS o sepsis (166, 251, 256). Asimismo, se ha descrito que los niveles de IL-6 se encuentran elevados en los pacientes traumatizados que desarrollan MODS (173), lo cual abre la posibilidad de discriminar, según los niveles de IL-6, a los pacientes que podrían sufrir posteriormente dicho síndrome. Igualmente, niveles plasmáticos elevados de TNF- α e IL-1 β , en el momento de admisión en UCI, en pacientes sometidos a cirugía mayor cardiovascular, se han relacionado con el riesgo de desarrollar MODS (172). Por otra parte, las citoquinas se han relacionado con la **mortalidad**: niveles plasmáticos elevados de TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 y el cociente IL-6/IL-10 se han relacionado con la mortalidad en pacientes de UCI, pacientes quirúrgicos, pacientes con infecciones y sepsis y pacientes con SIRS (26, 169, 172, 257-262)

Por tanto, niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, podrían mediar efectos perjudiciales en el paciente crítico y tendrían un valor pronóstico para el desarrollo del MODS y la mortalidad. Por su parte, la elevación de las citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4 se ha descrito como un intento del organismo para compensar la elevación de las citoquinas proinflamatorias, y por tanto se están produciendo de forma secundaria (36, 256), y no serían responsables de los efectos negativos de la inflamación sistémica. Así, se ha observado un aumento de IL-6 proporcionalmente mayor que el de IL-10, en los pacientes que desarrollaron MODS y en los que fallecieron, de modo que, en estos casos, la respuesta anti-inflamatoria de IL-10 no puede compensar el aumento exagerado de IL-6, lo cual se ha relacionado con un mal pronóstico (262).

En este trabajo, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de IL-6, IL-10, IL-4, IL-2 y TNF- α durante el postoperatorio son más elevados en los pacientes placebo que en el grupo de **pacientes tratados con NAC**. Dichos resultados coinciden con los descritos previamente en trabajos tanto en modelos experimentales como en individuos sanos y pacientes sépticos que observaron el efecto inhibitor de la NAC en los niveles de citoquinas (213, 228, 237-239, 263). Sin embargo, otros autores, han observado un aumento de los niveles de IL-2 al tratar células linfoides con NAC (263, 264), si bien, no son experimentos *in vivo* o con pacientes quirúrgicos o sépticos. En nuestro estudio, las diferencias en los niveles plasmáticos de IL-6, IL-10 e IL-4 entre el grupo tratado con NAC y el grupo placebo no llegan a ser significativas; no obstante, las diferencias en las tendencias observadas son notables y podrían tener un significado clínico especialmente en el caso de IL-6 e IL-10. Así, aunque los niveles plasmáticos de IL-6 en los pacientes quirúrgicos estudiados siguen siendo muy superiores a los de los individuos sanos, los pacientes placebo presentan valores más de dos veces superiores a los del grupo tratado con NAC, a partir de las 24 horas de comenzar su administración (T1). En cuanto a los niveles plasmáticos de IL-10, los pacientes tratados con NAC presentan niveles similares a los de los individuos sanos, mientras que en los pacientes placebo los niveles son el doble de los de los individuos sanos durante todo el postoperatorio.

Igualmente, los niveles plasmáticos de IL-2 y TNF- α son más bajos en los pacientes tratados con NAC siendo dichas diferencias significativas o próximas a la significación durante todo el seguimiento.

En los **pacientes tratados con vitamina C** también se ha observado un efecto inhibitor en los niveles plasmáticos de citoquinas. Así, los niveles de IL-6 e IL-10 y en menor medida los de IL-2 y TNF- α son menores en los pacientes tratados con vitamina C que en los pacientes del grupo placebo. Dichas observaciones coinciden con resultados previos publicados por otros autores, que han mostrado que la vitamina C puede producir una disminución en la producción de citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en diferentes ensayos realizados tanto *in vitro* (210, 211) como *in vivo* (212, 213). En este estudio, las diferencias no llegan a ser significativas excepto en el caso de la IL-6, aunque la diferencia es igualmente apreciable en los niveles plasmáticos de IL-10. En el resto de citoquinas no parece producirse una modulación clara por efecto de la vitamina C.

A la vista de los resultados de nuestro estudio referentes a los niveles plasmáticos de citoquinas, la NAC parece ejercer un efecto inhibitor más acusado y sobre una mayor variedad de mediadores, mientras que la vitamina C, aunque presenta también un efecto inhibitor, no permite hallar diferencias significativas excepto en los niveles de IL-6. Por tanto, hay diferencias entre los dos tipos de tratamiento, de modo que los niveles plasmáticos de citoquinas son más bajos en el grupo tratado con NAC respecto al tratado con vitamina C, y estas diferencias entre los dos tipos de tratamientos antioxidantes son significativas o tienden a la significación en los niveles plasmáticos de IL-2, IL-4 y TNF- α , durante casi todo el seguimiento postoperatorio. Sería pues necesario determinar de los niveles plasmáticos de estas citoquinas en un número más amplio de pacientes para observar de una forma más concluyente el efecto modulador de la vitamina C.

El efecto inhibitor de la producción de citoquinas, por parte de los fármacos antioxidantes utilizados en este trabajo, podría ser debido a una disminución de los ROS ya que éstos son, al menos en parte, responsables de la sobreproducción de citoquinas, pues actúan sobre las células que las producen, modulando factores nucleares como NF- κ B, implicado en la síntesis de citoquinas (49, 237). Nuestros resultados sugieren que la retirada de ROS mediante la administración de barredores como NAC y vitamina C producen una atenuación de la respuesta inflamatoria sistémica que tiene lugar en los pacientes quirúrgicos sépticos. Esta intervención farmacológica podría ser beneficiosa para su recuperación durante el postoperatorio y para prevenir el desarrollo de posibles complicaciones y de MODS. Sin embargo, la disminución de IL-2 que hemos observado en los pacientes tratados con antioxidantes y especialmente en el caso de la NAC, aunque podría justificar en parte la inhibición de los niveles de las otras citoquinas, al producir IL-2 un efecto estimulador en la producción de la cascada de estos mediadores, por otro lado, podría tener efecto en la competencia inmunológica, ya que IL-2 es el principal promotor de la proliferación y diferenciación de linfocitos T (25). En el resto de las citoquinas, el hecho de que se produzca una disminución de sus niveles plasmáticos, es beneficioso puesto que atenúa la respuesta inflamatoria que, como hemos visto, se relaciona con un mal pronóstico en los pacientes sépticos.

5.2.-Efecto de la administración de NAC o vitamina C sobre la apoptosis de linfocitos y PMNs

Durante la activación y proliferación de las células del sistema inmune, que se produce en respuesta a una agresión, así como para el cese de la respuesta inflamatoria y reestablecimiento de las condiciones iniciales, es necesario un proceso correcto y eficiente de apoptosis. Los leucocitos son un elemento fundamental del proceso inflamatorio, y es necesario que se produzca un control de la eliminación de las células senescentes y no funcionales como parte de su resolución. En la respuesta inflamatoria sistémica que tiene lugar en los pacientes sépticos, puede producirse una desregulación del proceso de apoptosis, que contribuye al desarrollo de enfermedades o síndromes como el MODS (185, 187).

Los ROS están íntimamente relacionados con la apoptosis. Además de formar parte de los mecanismos internos de ésta, los ROS pueden inducir apoptosis en muchos tipos de células humanas afectando a diferentes fases del proceso (265).

Apoptosis de linfocitos:

Los **pacientes del grupo placebo** presentan niveles de fosfatidilserina y del receptor Fas más elevados que los de los individuos sanos estudiados. Estos resultados coinciden con los de estudios previos que han demostrado en pacientes quirúrgicos y sépticos un aumento de la expresión de Fas y FasL y mayor susceptibilidad a apoptosis por esta vía (60, 266) en células mononucleares periféricas (PBMC), así como un marcado incremento de la caspasa-3 activa (187) y una disminución de Bcl-2 (64). En pacientes con MODS también se han descrito aumentos de Fas/FasL en PBMC que se relacionaban con la severidad del síndrome y con la mortalidad (267) aunque también se ha relacionado la mortalidad con niveles de FasL disminuidos, dependiendo de la gravedad de los pacientes estudiados (268).

Hemos comprobado cómo los niveles del receptor Fas en la superficie de los linfocitos T CD3⁺ son más elevados en los **pacientes tratados con vitamina C** y, aunque en menor medida, en los **pacientes tratados con NAC**, respecto a los niveles detectados en los pacientes placebo (figura 23). Dichas observaciones coinciden con las referidas por Puskas y col., en el año 2002 (216), que observaron que el dihidroascorbato (DHA), la forma oxidada de la vitamina C, producía un aumento de la

expresión del receptor Fas en células Jurkat y linfocitos T humanos e incrementaba su susceptibilidad a la apoptosis mediada por el receptor Fas, al interferir en el metabolismo del H_2O_2 . De acuerdo con estos resultados, la apoptosis de linfocitos, en nuestros sujetos de estudio, determinada por la detección de fosfatidilserina en la membrana plasmática mediante Anexina V, se encuentra significativamente elevada en los pacientes tratados, especialmente con vitamina C, respecto a los pacientes placebo. Bergman y col., en el año 2004 (211), observaron que las células mononucleares periféricas aisladas de individuos sanos, sufrían un incremento muy marcado de la apoptosis cuando eran incubadas con vitamina C, sugiriendo un efecto supresivo de esta vitamina en la síntesis de ADN. Del mismo modo, Lepri y col, en el año 2000 (243), observaron que la NAC producía un aumento de la expresión de FasL y un aumento de la apoptosis de células 3DO, de origen linfoide, inducida por H_2O_2 . Acorde con estos resultados, Kim y col., en 2005 (217), observaron que el H_2O_2 producía una inhibición de la apoptosis, de células Jurkat T, que estaba asociada con una inhibición de la maquinaria apoptótica de la mitocondria. Dicho efecto antiapoptótico del H_2O_2 era inhibido por la NAC, sugiriendo un efecto proapoptótico de la misma.

Sin embargo, también existen otros estudios sobre este tema que generan controversia: hay trabajos que proponen, por el contrario, un efecto antiapoptótico de la vitamina C (219) y la NAC (269) en células linfoides. Estos estudios, al igual que los mencionados a favor de la inducción de la apoptosis de linfocitos, son ensayos realizados con células en cultivo o en ratones y por tanto, no se corresponden exactamente con las condiciones ambientales que se producen en los pacientes sépticos.

El aumento de los niveles de fosfatidilserina y del receptor Fas que hemos detectado en los pacientes tratados con antioxidantes, implican un efecto proapoptótico en linfocitos T de sangre periférica, que tiende a la significación en el caso del grupo tratado con vitamina C, mientras que en el grupo tratado con NAC apenas muestra diferencias respecto al grupo placebo. Por tanto, la vitamina C ejerce un efecto proapoptótico más potente que la NAC, y de hecho, se aprecian diferencias en los niveles de fosfatidilserina entre los dos grupos tratados con antioxidantes, que tienden a la significación, a las 108 horas después de finalizar la intervención quirúrgica (T4) (ver figura 25).

El efecto proapoptótico podría justificarse en parte por los resultados obtenidos en la modulación de los niveles de citoquinas, ya que ambos tipos de antioxidantes produjeron un efecto inhibitor de los niveles de IL-2 y, en el caso de la NAC, de los

niveles de IFN- γ . Estas citoquinas presentan propiedades linfoproliferativas (25, 41), de modo que su disminución por los antioxidantes podría tener un efecto proapoptótico. Por otra parte, las células T son muy sensibles a la apoptosis, especialmente las Th1, de forma que en caso de una disfunción de los linfocitos, las cantidades de IL-2 e IFN- γ liberadas por estas células estarían disminuidas agravándose la depleción de linfocitos, es decir, que no está claro si la apoptosis de linfocitos es causa o efecto de la disminución de estas citoquinas. Por otro lado, el efecto proapoptótico de la vitamina C sobre los linfocitos también podría ser debido al daño que puede producir en el ADN, debido a su capacidad de inducir la descomposición de hidroperóxidos lipídicos que pueden generar genotoxinas, tal y como mostraron Lee y col. en el año 2001 (218).

Como se ha comentado anteriormente, en los individuos sanos, los niveles del receptor Fas y de fosfatidilserina de los linfocitos son inferiores respecto a los que se han detectado en los sujetos de estudio, especialmente en los tratados con vitamina C. Por tanto, los altos niveles de Fas y fosfatidilserina en los linfocitos de los sujetos de estudio, los alejan de la normalidad de los valores de los individuos sanos, y esta diferencia se hace aún mayor al tratar los pacientes con vitamina C, lo cual no parece ser un indicador de que esta vitamina tenga un papel protector sobre la inmunidad del paciente séptico tal y como observaron previamente Bergman y col., en el año 2004 (211). Es decir, que el tratamiento con vitamina C podría estar mermando la capacidad defensiva de los pacientes ya que se ha descrito que una reducción del número de linfocitos o su disfunción tras la cirugía y traumatismos puede producir una inmunosupresión (270), que puede ser debida a alteraciones en la producción de citoquinas y que algunos autores relacionan con el aumento de la apoptosis (17, 60). Sin embargo, en nuestros pacientes este aumento de la apoptosis no está provocando una reducción del número de linfocitos circulantes, que de hecho va aumentando durante el postoperatorio tanto en los pacientes tratados como en los no tratados (figura 30). Por otro lado, un mayor porcentaje de linfocitos en apoptosis podría tener un efecto beneficioso en cuanto que son los principales productores de citoquinas que de este modo se liberarían en menor cantidad (271), lo cual se corresponde con la reducción de los niveles plasmáticos de estos mediadores en los pacientes tratados.

Apoptosis de PMNs:

En los **individuos sanos** hemos encontrado niveles de Fas en PMNs similares e incluso algo mayores a los de los pacientes del grupo placebo, pero que no se corresponden con un elevado porcentaje de apoptosis. Esto podría ser debido a que niveles elevados del receptor Fas no implican una mayor apoptosis si no existen ligandos de muerte o incluso otros factores, como los ROS (72, 221, 272), que al contrario de lo que ocurre en los pacientes quirúrgicos graves, no se encuentran aumentados en los individuos sanos, y podrían ser necesarios para que Fas sea funcional, tal y como ha sido descrito en el caso de linfocitos T de sangre periférica (273, 274) y en células tumorales (272).

Los niveles de caspasa-3 y PARP en individuos sanos son muy inferiores a los detectados en el grupo placebo y los pacientes tratados. En los pacientes quirúrgicos estudiados, aunque siguen siendo elevados, los niveles de caspasa-3 y PARP son menores en los pacientes tratados con NAC y vitamina C respecto al grupo placebo, de modo que estos tratamientos estarían produciendo una normalización de los niveles de estas proteínas acercándolos a los niveles detectados en los individuos sanos.

Los niveles de Bcl-2 en los pacientes placebo y en los pacientes tratados también son superiores a los de los individuos sanos, lo cual podría indicar una reacción antiapoptótica en los PMNs o linfocitos para contrarrestar los niveles elevados de caspasa-3, ya que se ha observado una correlación directa entre ambas proteínas en nuestros pacientes, es decir, que caspasa-3 y Bcl-2 aumentan de forma conjunta.

Los **pacientes tratados con NAC** y los **pacientes tratados con vitamina C** presentan una inhibición en los mecanismos de apoptosis de PMNs: los niveles del **receptor Fas** (CD95), de la superficie de los PMNs CD15⁺, son menores en los pacientes tratados con ambos tipos de antioxidante que en el grupo placebo (figura 24). Además, los niveles leucocitarios de **caspasa-3** son igualmente menores en los pacientes que recibieron NAC y en los que recibieron vitamina C respecto al grupo placebo (figura 26) y los niveles de **PARP** son menores en los pacientes que recibieron vitamina C respecto al grupo placebo (figura 27). Por otro lado, en nuestros pacientes, los niveles de la proteína antiapoptótica **Bcl-2**, se encuentran significativamente elevados en los pacientes tratados con vitamina C (figura 28).

Coincidiendo con nuestros resultados, en PMNs de ratón, otros autores han observado que los ROS producen un aumento de la apoptosis que se produce vía Fas, lo

cual coincide con una disminución de los niveles de GSH (220). Por otra parte, la NAC puede disminuir la apoptosis mediada por el receptor Fas, inhibir la actividad de caspasa-3 y caspasa-8 y ejercer un efecto estabilizador de la mitocondria de los PMNs humanos en cultivo (119, 242).

Los PMNs acumulan grandes cantidades de vitamina C que actúa como protector frente a los productos liberados en el estallido respiratorio que tiene lugar al activarse estas células en el ambiente inflamatorio (275). Sin embargo, los escasos trabajos que han tratado de determinar el efecto de la vitamina C en la apoptosis de PMNs, se han realizado con células en cultivo (223) o en PMNs de ratones (222). Al contrario de nuestros resultados, estos estudios han observado un efecto proapoptótico de la vitamina C. Este efecto se justifica por la acción pro-oxidante de la vitamina C, al aumentar la producción de ROS (223), lo cual en el caso de los PMNs en cultivo estaría determinado por las condiciones de los experimentos, que no tienen por qué coincidir con las que se producen en la circulación de los pacientes sépticos de nuestro estudio, que igualmente serán diferentes a las condiciones que se producen en ratones con déficit de vitamina C utilizados en el trabajo de Vissers y col. (222).

Si bien en nuestro estudio los niveles de caspasa-3, PARP y Bcl-2 han sido determinados en leucocitos totales de sangre periférica y podrían ser de origen mononuclear, en su mayor parte deberían provenir de los PMNs, ya que se encuentran en un porcentaje de alrededor del 85 % en la fórmula leucocitaria de los pacientes estudiados. Además el porcentaje de PMNs se encuentra directamente relacionado con los niveles de caspasa-3 y Bcl-2, y los niveles de Fas en PMNs se correlacionan con los de caspasa-3 y PARP, es decir, que los niveles de caspasa-3 y Bcl-2 son más elevados en los pacientes con un mayor porcentaje de PMNs en su fórmula leucocitaria y tanto caspasa-3 como PARP aumentan de forma paralela al CD95 de los PMNs, lo cual lleva a pensar que estas células son las que están contribuyendo en mayor medida a los niveles detectados de caspasa-3, PARP y Bcl-2 en los sujetos de estudio.

Asimismo, en este estudio se ha pretendido analizar la apoptosis directa de los PMNs mediante la detección de fosfatidilserina de la superficie celular, como marcador de la apoptosis temprana (145). Para realizar esta técnica es preciso realizar previamente una separación de los leucocitos de los eritrocitos, lo cual ha llevado a cabo mediante centrifugación en gradiente de Ficoll, ya que no se pueden utilizar reactivos de lisis eritrocitaria que podrían alterar la apoptosis de los leucocitos (276). Sin embargo, tal y

como otros autores han descrito previamente (277), la separación de los PMNs presenta dificultades en los pacientes críticos y no ha sido posible su aislamiento, de modo que la apoptosis no se ha determinado de forma directa aunque sí se cuantificaron los niveles de proteínas y receptores implicados en la misma. Por el contrario sí ha podido cuantificarse la apoptosis de PMNs en individuos sanos, ya que en éstos sí fue posible su aislamiento.

Como consecuencia de la interacción del receptor Fas con su ligando FasL u otros agonistas solubles, se pone en marcha la maquinaria interna de la célula que lleva a la activación de la caspasa-3 (72), que ejerce su actividad proteolítica sobre el PARP entre otros sustratos (102), produciéndose la apoptosis celular. Puesto que en nuestro estudio los pacientes tratados con antioxidantes presentan PMNs con niveles del receptor Fas disminuidos, los PMNs de estos pacientes tendrían menos probabilidades de entrar en apoptosis vía Fas, es decir, en respuesta a estímulos proapoptóticos de tipo FasL (68). Además, se ha descrito que la forma soluble de FasL está elevada en pacientes críticos, pacientes con SIRS y MODS (82, 93, 96, 278), por lo que una disminución de los niveles del receptor Fas podría ejercer un efecto protector de la apoptosis de PMNs en estos pacientes. De acuerdo con esto, el aumento de la apoptosis de linfocitos que hemos observado en los pacientes tratados con NAC o vitamina C, en caso de afectar a su función, podría contribuir a una menor interacción del FasL de su membrana con el receptor Fas de los PMNs produciéndose una menor apoptosis de los mismos por esta vía.

De acuerdo con unos niveles menores del receptor Fas en PMNs, los pacientes tratados con antioxidantes presentan unos niveles menores de caspasa-3 y ésta es menos activa, tal y como demuestran los niveles disminuidos de PARP. De este modo hemos probado que la administración de antioxidantes produce una disminución de los principales factores implicados en la apoptosis de PMNs: Fas y caspasa-3. Por tanto, aunque la disminución de la apoptosis no se ha cuantificado de forma directa, sí lo ha sido la disminución de la actividad proteasa de caspasa-3, a través de los niveles de PARP, lo cual implicaría una menor ejecución de la apoptosis por este efector en el que convergen la mayor parte de los mecanismos de apoptosis que se han descrito. Asimismo, hemos observado que la vitamina C produce un aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-2, de forma que se estaría contribuyendo también, por ésta vía, a una

disminución de la apoptosis de PMNs, lo cual implicaría un efecto de la vitamina C en la mitocondria aumentando los niveles de Bcl-2.

La disminución de los parámetros de apoptosis de PMNs que se ha observado en el grupo tratado con vitamina C podría ser debida a un efecto antioxidante, retirando ROS, ya que estos son importantes en la activación de la apoptosis mediada a través de receptores de muerte incluso de forma independiente de sus ligandos (220, 221, 278, 279). Por tanto, aunque se ha descrito que la vitamina C puede actuar como agente pro-oxidante, los efectos antiapoptóticos observados en PMNs parecen deberse más bien a un efecto antioxidante de esta vitamina.

Si comparamos el efecto antiapoptótico de NAC y vitamina C, se observa que al igual que ocurría en el caso de los linfocitos, la vitamina C tiene un efecto más evidente. En los niveles del receptor Fas, apenas hay diferencias entre los dos grupos tratados, que son inferiores a los no tratados. Sin embargo, en los niveles de caspasa-3 sí se aprecia un efecto inhibitor más acusado en el grupo tratado con vitamina C respecto al tratado con NAC. De este modo, además de existir diferencias entre los niveles de caspasa-3 del grupo tratado con vitamina C y el grupo placebo, existen también diferencias entre los dos grupos tratados, y dichas diferencias tienden a la significación a las 156 h (T6) (figura 26). Los niveles de PARP y Bcl-2 son similares en el grupo tratado con NAC y el grupo placebo, mientras que se encuentran más elevados en el grupo tratado con vitamina C, aunque las diferencias entre los dos grupos tratados no son significativas.

Puesto que los fármacos utilizados tienen propiedades antioxidantes, sus efectos sobre la apoptosis leucocitaria deben estar relacionados con su capacidad para eliminar ROS que están aumentados en los pacientes críticos (265). Los ROS endógenos son importantes en la activación de la apoptosis mediada a través de receptores de muerte de la familia de TNF, y se ha observado que pacientes con patologías que producen déficit en la producción de ROS, tienen disminuida la apoptosis de PMNs inducida por estas vías (278, 279). La acumulación de ROS inicia señales a través de receptores de muerte de forma independiente de los ligandos y es un importante limitador de la vida de PMNs (220, 221). Además, se ha demostrado, que los ROS pueden producir la sobrerregulación de receptores de muerte (280, 281), lo que justificaría la disminución de los niveles del receptor Fas en los pacientes tratados con NAC o vitamina C por su efecto antioxidante. Los ROS también intervienen en el acoplamiento de los receptores y en la acción de las caspasas (51), por lo que la acción antioxidante de los medicamentos administrados

justificaría una disminución de los niveles de caspasa-3 y de su actividad mediada por el PARP. Además, los ROS pueden estar actuando por mecanismos independientes de las caspasas, como la degradación directa del ADN (51, 73), de forma que los antioxidantes estarían inhibiendo también estos mecanismos.

Bcl-2, que se encuentra principalmente en la cara externa de la membrana mitocondrial donde se producen gran cantidad de ROS, por sí misma posee propiedades antioxidantes (51) y previene el daño oxidativo de los constituyentes celulares (125). Además, ejerce sus efectos antiapoptóticos a través del mantenimiento de la integridad de la mitocondria e impide la liberación de componentes proapoptóticos (128-130). De este modo, el aumento que hemos observado de los niveles de Bcl-2 en los pacientes tratados con vitamina C contribuiría a una menor apoptosis celular y una potenciación de su actividad antioxidante, mientras que la NAC, aunque se ha descrito anteriormente como estabilizador de la mitocondria (119), no ha mostrado un efecto en los niveles de Bcl-2.

Además de reducir la apoptosis de PMNs, como se ha mencionado anteriormente, la NAC y la vitamina C también han producido una disminución de los niveles de las citoquinas analizadas. El proceso de apoptosis está regulado por citoquinas y puede ser modulado tanto *in vivo* como *in vitro* (281). Diversos estudios han demostrado la inhibición de la apoptosis de PMNs al ser cultivados con diversas citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ y con LPS y moléculas de adhesión (30, 242, 282-284). Otros autores han demostrado un efecto antiapoptótico en los PMNs al ser incubados con plasma procedente de pacientes quirúrgicos o pacientes con SIRS (97, 186, 285-288). Sin embargo, los resultados de los estudios *in vitro* no siempre se corresponden con lo que ocurre en el medio interno (289). De hecho, otros estudios proponen algunos de estos mismos mediadores como inductores de la apoptosis de PMNs (290, 291). Así por ejemplo TNF- α e IL-6 se han sugerido como estimuladores de la apoptosis de PMNs (292-294) considerándose como factores importantes en la resolución normal de la inflamación y prevención del daño tisular.

Por el contrario, una aceleración de la apoptosis de PMNs ha sido observada en el ambiente inflamatorio local que se produce en la artritis reumatoide (295). Los PMNs presentes en las articulaciones de estos pacientes (PMNs inflamatorios) presentan una mayor apoptosis que los que se encuentran en la circulación aunque no se detectaron alteraciones de Fas o FasL de superficie. Una apoptosis acelerada de los PMNs fue demostrada también por Nwakoby y col. en el año 2001 (296), que comprobaron cómo

los PMNs de pacientes con infecciones de diferentes tipos entraban en apoptosis de forma acelerada y el suero de estos pacientes inducía la apoptosis de PMNs en cultivo. Dicha apoptosis fue atribuida a la presencia de niveles elevados de FasL, que procedían principalmente de monocitos en el suero de estos pacientes, que interactuaban con el receptor Fas de los PMNs, tal y como propusieron Papathanasoglou y col. (268) en pacientes críticos.

Por tanto, aunque predominan los trabajos que proponen una inhibición de la apoptosis de PMNs por las citoquinas, existen trabajos que por el contrario muestran un efecto proapoptótico de las mismas. En nuestro caso, hemos observado que los pacientes tratados con antioxidantes presentan niveles disminuidos de citoquinas y una menor apoptosis de PMNs que los pacientes placebo. Por tanto, en nuestro estudio la disminución de citoquinas podría estar ejerciendo un efecto antiapoptótico, lo cual se opondría a la hipótesis mayoritariamente propuesta que sugiere un papel antiapoptótico de las citoquinas en los PMNs. Sin embargo, no tiene por que ser así, ya que se ha observado que la capacidad de las citoquinas para modular la apoptosis *in vitro*, se produce especialmente en PMNs de individuos sanos, mientras que el efecto sobre PMNs aislados de pacientes sépticos u obtenidos tras agresiones en modelos experimentales es mínimo o nulo (253, 294, 297), es decir, que los pacientes de nuestro estudio, podrían tener una resistencia a la acción moduladora de la apoptosis por parte de las citoquinas. Por tanto, la hipótesis más factible para justificar la disminución de la apoptosis de PMNs en los pacientes tratados, es el efecto de los antioxidantes como barredores de ROS que son necesarios en los mecanismos de apoptosis, más que su efecto sobre los niveles de citoquinas, sugiriendo que en nuestros sujetos de estudio los ROS están contribuyendo en mayor medida que las citoquinas a la apoptosis de PMNs o al menos este es el mecanismo predominante de la NAC y la vitamina C, mientras que la disminución de las citoquinas que producen dichos antioxidantes, no es suficiente para que aumente la apoptosis o incluso como proponían otros autores, está ejerciendo un efecto antiapoptótico adicional.

En los pacientes quirúrgicos y especialmente en los más graves que padecen SIRS o sepsis, se producen alteraciones leucocitarias que se traducen en un aumento de los leucocitos en sangre periférica con un predominio muy marcado de PMNs y una reducción de los linfocitos circulantes (270). Nuestros resultados han mostrado unos niveles de leucocitos superiores en pacientes quirúrgicos de alto riesgo respecto a los de

los controles sanos y un mayor porcentaje de PMNs. La acumulación de PMNs en los lugares de la inflamación debe estar regulada por su reclutamiento de la sangre y por su supervivencia en estos lugares, ya que no se ha probado que puedan volver a la sangre una vez hayan actuado (283), de modo que la apoptosis es fundamental en el número de PMNs en la circulación. Tanto la neutropenia como el exceso de PMNs predisponen a la morbilidad en las infecciones, siendo necesario un adecuado balance (298). En el caso del SIRS/Sepsis son más importantes las consecuencias de la actividad excesiva de los PMNs que pueden producir daño tisular (298). Así, por ejemplo, se ha demostrado su capacidad de inducir apoptosis en epitelio gástrico (87). En el desarrollo del MODS en pacientes sépticos se ha propuesto que el ambiente de mediadores inflamatorios entre los que destacan las citoquinas, produce una sobreactivación de los PMNs, cuya consecuencia es producir un retraso en la apoptosis de los PMNs (119), que de esta manera permanecen más tiempo en la circulación ejerciendo sus efectos lesivos sobre el endotelio y otros tejidos y podrían de este modo contribuir a la disfunción orgánica (187).

La administración de antioxidantes como la NAC o la vitamina C debería contribuir, al retirar los ROS y disminuir los niveles de citoquinas, a una menor activación de los PMNs y por tanto una menor supervivencia de los mismos. Sin embargo, hemos mostrado una disminución de la apoptosis de los PMNs más que un aumento de la misma, lo cual parece indicar que pese al efecto beneficioso de los antioxidantes al disminuir la inflamación sistémica, el efecto antiapoptótico que producen en los PMNs podría ser perjudicial. Sin embargo, creemos que al retirar ROS y citoquinas, aunque la apoptosis de los PMNs quede disminuída, estamos normalizando el ambiente proinflamatorio que se considera responsable de su sobreactivación, permitiéndoles ejercer sus funciones defensivas con más efectividad, reduciendo su actividad indiscriminada, lo cual podría ser positivo para combatir la infección al menos en los pacientes sépticos. De acuerdo con esta hipótesis, Hotchkiss y col. (187), consideran que el retraso en la apoptosis podría ser también una respuesta beneficiosa a la sepsis, ya que se ha demostrado que la administración de G-CSF, que retrasa la apoptosis de PMNs (186), mejora la supervivencia en pacientes no inmunodeprimidos con neumonía. Por otra parte, en pacientes con sepsis o shock séptico, en pacientes traumatizados y en pacientes de edad avanzada se han descrito efectos beneficiosos de la NAC y/o la vitamina C en la función del sistema respiratorio y cardiovascular y en la aparición de complicaciones infecciosas y MODS, y una mejora de la supervivencia (184, 203, 229,

230, 233). Por otro lado, aunque la NAC y la vitamina C producen una disminución de la apoptosis de PMNs, hemos observado que su proporción en la fórmula leucocitaria va disminuyendo durante el postoperatorio del mismo modo que en el grupo placebo, aunque en el grupo tratado con vitamina C se ha observado un retraso en la recuperación de dichos porcentajes (figura 31). Sin embargo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de PMNs entre los tres grupos de estudio, por lo que el efecto antiapoptótico de estos antioxidantes no se traduce en un número mayor de PMNs respecto al grupo placebo, sino que estarían disminuyendo igualmente al ir recuperándose el paciente de su proceso infeccioso, debido probablemente a que se eliminan por necrosis. Así, otros autores han mostrado que a pesar de disminuir la producción de moléculas oxidantes en los PMNs, la NAC produce un aumento de su capacidad de fagocitosis en pacientes sépticos (231) e igualmente la vitamina C produce una mejora de su función defensiva de los PMNs (209, 211).

En el caso de la NAC aunque el efecto antiapoptótico es menor que el de la vitamina C, se produce esta misma tendencia en los PMNs, si bien las diferencias respecto al grupo placebo son menores y sería necesario incluir un mayor número de pacientes para confirmar dichas tendencias.

En definitiva, la vitamina C ha producido un aumento del porcentaje de linfocitos en apoptosis y de sus niveles de expresión del receptor Fas, mientras que en el caso de los PMNs ha producido el efecto contrario, es decir, que se ha observado una actividad antiapoptótica determinada por la atenuación de los niveles de expresión del receptor Fas y de las proteínas proapoptóticas caspasa-3 y PARP y un aumento los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

En cuanto a la incidencia del MODS y la mortalidad postoperatoria de los pacientes estudiados, las diferencias observadas entre los tres grupos de estudio no son estadísticamente significativas. Para evaluar el efecto del tratamiento con NAC o vitamina C en dichos parámetros sería necesario analizar una mayor población de pacientes.

6- CONCLUSIONES

6.-CONCLUSIONES

1) El tratamiento con NAC de pacientes quirúrgicos sépticos con riesgo de mortalidad superior al 30% durante el postoperatorio produce una disminución de los niveles plasmáticos de IL-2 y TNF- α y, en menor medida, de los niveles plasmáticos de IL-4, IL-6, IL-10, mientras que la administración de vitamina C ejerce un efecto menos acusado y únicamente se aprecia en los niveles de IL-6 e IL-10.

2) El tratamiento con vitamina C de estos pacientes quirúrgicos durante el postoperatorio produce un efecto proapoptótico en linfocitos de sangre periférica determinado por unos niveles más elevados de fosfatidilserina en su superficie y mayores niveles de expresión del receptor Fas, mientras que la administración de NAC no ha producido un efecto apreciable en estos parámetros.

3) El tratamiento con vitamina C en estos pacientes quirúrgicos durante el postoperatorio produce un efecto antiapoptótico en PMNs de sangre periférica determinado por unos menores niveles de expresión del receptor Fas y por unos menores niveles intracelulares de las proteínas caspasa-3 y PARP, así como unos niveles más elevados de Bcl-2. La administración de NAC disminuye los niveles de expresión del receptor Fas y los niveles intracelulares de la proteína caspasa-3, aunque el efecto es menos acusado que el producido por la vitamina C.

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Deutschman C.S., Konstantinides F.N., Tsai M., Simmons R.L., Cerra F.B. Physiology and metabolism in isolated viral septicemia. Further evidence of an organism-independent, host-dependent response. *Arch. Surg.* 1987; 122: 21-25.
2. Haj M.A., Neilly I.J., Robbie L.A., Adey G.D., Bennett B. Influence of white blood cells on the fibrinolytic response to sepsis: studies of septic patients with or without severe leucopenia. *Br. J. Haematol.* 1995; 90: 541-547.
3. Graves D.T., Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1995; 6:109-118.
4. Savill J., Wyllie A.H., Henson J.E., Walport M.J., Henson P.M., Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 865-875.
5. Partrick D.A., Moore F.A., Moore E.E., Barnett C.C. Jr, Silliman C.C. Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz.* 1996; 4: 194-210.
6. Botha A.J., Moore F.A., Moore E.E., Kim F.J., Banerjee A., Peterson V.M. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. *Surgery.* 1995; 118: 358-364; discussion 364-365.
7. Botha A.J., Moore F.A., Moore E.E., Sauaia A., Banerjee A., Peterson V.M. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J. Trauma.* 1995; 39: 411-417.
8. Wiernik P.H. Neutrophil functions in infection. En: Andriole V.T. *Mediguide to Infectious Diseases*, vol 9. New York: Lawrence DellaCorte Publications; 1989. p. 1-8.
9. Davis M.G., Hagen P.O. Systemic inflammatory response syndrome. *Br. J. Surg.* 1997; 84: 929-935.
10. Nelson N.J., Belosevic M., Green S.J., Turpin J., Nacy C.A. Interleukin-2 and the regulation of macrophage cytotoxic activities. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992: 319: 77-88.
11. Slotman G.J., Burchard K.W., Williams J.J., D'Arezzo A., Yellin S.A. Interaction of prostaglandins, activated complement, and granulocytes in clinical sepsis and hypotension. *Surgery.* 1986; 99: 744-751.
12. Reinhart K., Bayr O., Brunkhorst F., Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit. Care Med.* 2002; 30: S302-S312.
13. Albelda S.M., Smith C.W., Ward P.A. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994; 8: 504-512.
14. Hamblin A.S. Cytokines. En: Rickwood D., Male D. *Cytokines and cytokine receptors*. New York: Oxford University Press; 1993. p. 1-19.
15. Baue A.E., Gunther B., Hartl W., Ackenheil M., Heberer G. Altered hormonal activity in severely ill patients after injury or sepsis. *Arch. Surg.* 1984; 119: 1125-1132.
16. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to a different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 1989; 7: 145-173.
17. Hensler T., Hecker H., Heeg K., Heidecke C.D., Bartels H., Barthlen W., Wagner H., Siewert J.R., Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect. Immun.* 1997; 65: 2283-2291.
18. Rumalla V., Lowry S.F. Counterregulation of severe inflammation: When more is too much and less is inadequate. En: Baue A.E., Faist E., Fry D.E. *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, prevention and therapy*. New York: Springer; 2000. p. 155-166.
19. Fong Y., Lowry S. Cytokines and the cellular response to infection. En: Fong Y., Lowry S. *Care in de ICU*. Vol 2. New York: Scientific American; 1996.

20. Loppnow H., Bil R., Hirt S., Schonbeck U., Herzberg M., Werdan K., Rietschel E.T., Brandt E., Flad H.D. Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood*. 1998; 91: 134-141.
21. Fong Y., Moldawer L.L., Shires G.T., Lowry S.F. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1990; 170: 363-378.
22. Lang C.H., Fan J., Wojnar M.M., Vary T.C., Cooney R. Role of central IL-1 in regulating peripheral IGF-I during endotoxemia and sepsis. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: R956-962.
23. Lang D., Knop J., Wesche H., Raffetseder U., Kurrle R., Boraschi D., Martin M.U. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J. Immunol.* 1998; 161: 6871-6877.
24. Eisenberg S.P., Evans R.J., Arend W.P., Verderber E., Brewer M.T., Hannum C.H., Thompson R.C. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*. 1990; 343: 341-346.
25. Saltini C., Richeldi L., Holroyd K.J. et al. Lymphocytes. En: Crystal R.G., West J.B. *The Lung: Scientific foundations*. New York: Raven Press; 1991. p. 459-482.
26. Torre D., Tambini R., Aristodemo S., Gavazzeni G., Goglio A., Cantamessa C., Pugliese A., Biondi G. Anti-inflammatory response of IL-4, IL-10 and TGF-beta in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Mediators Inflamm.* 2000; 9: 193-195.
27. Wortel C.H., van Deventer S.J., Aarden L.A., Lygidakis N.J., Buller H.R., Hoek F.J., Horikx J., ten Cate J.W. Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. *Surgery*. 1993; 114: 564-570.
28. Deitch E.A., Xu D., Franko L., Ayala A., Chaudry I.H. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock*. 1994; 1: 141-145.
29. Meyer T.A., Wang J., Tiao G.M., Ogle C.K., Fischer J.E., Hasselgren P.O. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery*. 1995; 118: 336-342.
30. Biffl W.L., Moore E.E., Moore F.A., Barnett C.C. Jr. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *J. Trauma*. 1996; 40: 575-578.
31. Fong Y., Moldawer L.L., Marano M. et al. Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man. *J. Immunol.* 1989; 142: 2321-2324.
32. Castell JV, Gomez-Lechon M.J., David M., Andus T., Geiger T., Trullenque R., Fabra R., Heinrich P.C. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989; 242: 237-239.
33. Moore K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., Mosmann T.R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 165-90.
34. Van der Poll T., Jansen J., Levi M., ten Cate H., ten Cate J.W., van Deventer S.J. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1985-1988.
35. Wanidworanun C., Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J. Immunol.* 1996; 151: 6853-6861.
36. Howard M., Muchamuel T., Andrade S., Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1205-1208.
37. Standiford T.J., Strieter R.M., Lukacs N.W., Kunkel S.L. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 1995; 155: 2222-2229.

38. Van der Poll T., Marchant A., Buurman W.A., Berman L., Keogh C.V., Lazarus D.D., Nguyen L., Goldman M., Moldawer L.L., Lowry S.F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J. Immunol.* 1995; 155: 5397-5401.
39. Gerard C., Bruyts C., Marchant A., Abramowicz D., Vandenabeele P., Delvaux A., Fiers W., Goldman M., Velu T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 547-550.
40. Oberholzer A., Oberholzer C., Moldawer L.L. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit. Care Med.* 2002; 30: S58-S63.
41. Lin E., Calvano S.E., Lowry S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000; 127: 117-126.
42. Docke W.D., Randow F., Syrbe U., Krausch D., Asadullah K., Reinke P., Volk H.D., Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* 1997; 3: 678-681.
43. Wasserman D., Ioannovich J.D., Hinzmann R.D., Deichsel G., Steinmann G.G. Interferon-gamma in the prevention of severe burn-related infections: a European phase III multicenter trial. The Severe Burns Study Group. *Crit. Care Med.* 1998; 26: 434-439.
44. Greenfield L.J., Mulholland M., Oldham K. *Surgery: Scientific Principles and Practice.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
45. Bevilacqua M.P., Pober J.S., Majeau G.R., Fiers W., Cotran R.S., Gimbrone MA Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1986; 83: 4533-4537.
46. Ayala A., Herdon C.D., Lehman D.L., Ayala C.A., Chaudry I.H. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood.* 1996; 87: 4261-4275.
47. Hiramatsu M., Hotchkiss R.S., Karl I.E., Buchman T.G. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock.* 1997; 7: 247-253.
48. Halliwell B., Gutteridge J.M. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
49. Clossa D., Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life.* 2004; 56: 185-191.
50. Goode H.F., Webster N.R. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit. Care Med.* 1993; 21: 1770-1776.
51. Melley D.D., Evans T.W., Quinlan G.J. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin. Sci. (Lond).* 2005; 108: 413-424.
52. Bulger E.M., Maier R.V. Antioxidants in Critical Illness. *Arch. Surg.* 2001; 136: 1201-1207.
53. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C.. Flow Cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. methods.* 2000; 243: 167-190.
54. Buchman T.G. Untimely apoptosis in human SIRS, sepsis, and MODS. En: Baue A.E., Faist E., Fry D.E. *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, prevention and therapy.* New York: Springer; 2000. p. 131-133.
55. Szodoray P., Jellestad S., Nakken B., Brun J.G., Jonsson R. Programmed cell death in rheumatoid arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry. *Lab. Invest.* 2003; 83: 1839-1948.

56. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267: 1456-1462.
57. Haanen C., Vermes I. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1996; 64: 129-133.
58. Koopman G., Reutelingsperger C.P.M., Kuijten G.A.M., Keehnen R.M.J., Pals S.T., van Oers M.H.J. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84: 1415-1420.
59. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281: 1309-1312.
60. Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, Lizuka N, Hazama S, Suzuki T, Kobayashi N. Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann. Surg.* 1996; 223: 434-440.
61. Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993; 75: 1169-1178.
62. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1308.
63. Hodge G., Hodge S., Han P. Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production. *Cytokine*. 2000; 12: 1763-1768.
64. Bilbault P., Lavaux T., Lahlou A., Uring-Lambert B., Gaub M.P., Ratomponirina C., Meyer N., Oudet P., Schneider F. Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med.* 2004; 30: 408-415.
65. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88: 355-365.
66. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267: 1449-1456.
67. Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., y col. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 10709-10715.
68. Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991; 66: 233-243.
69. Robertson M.J., Manley T.J., Pichert G., Cameron C., Cochran K.J., Levine H., Ritz J. Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leuk. Lymphoma*. 1995; 17: 51-61.
70. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996; 87: 171.
71. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85: 803-815.
72. Ashkenazi A., Dixit V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11: 255-260.
73. Akgul C., Edwards S.W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 2003; 60: 2402-2408.
74. Tanaka M., Suda T., Takahashi T., Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO Journal*. 1995; 14: 1129-1135.

75. Suda T., Okazaki T., Naito Y., Yolota T., Arai N., Ozaki., Nakao K., Nagata S. Expression of the Fas Ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol.* 1995; 154: 3806-3813.
76. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., Ferguson T.A. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995; 270: 1189-1192.
77. French L.E., Hahne M., Viard I., Radlgruber G., Zanone R., Becker K., Muller C., Tschopp J. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J. Cell Biol.* 1996; 133: 335-343.
78. Sata M., Walsh K. TNF α regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat. Med.* 1998; 4: 415-420.
79. Liles W.C., Kiener P.A., Ledbetter J.A., Aruffo A., Klebanoff S.J. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 429-440.
80. Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature.* 1995; 377: 630-632.
81. Yamaguchi S., Yamaoka M., Okuyama M., Nitoube J., Fukui A., Shirakabe M., Shirakawa K., Nakamura N., Tomoike H. Elevated circulating levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1999; 83: 1500-1503.
82. Tanaka M., Suda T., Haze K., Nakamura N., Sato K., Kimura F., Motoyoshi K., Mizuki M., Tagawa S., Ohga S., Hatake K., Drummond A.H., Nagata S. Fas ligand in human serum. *Nat. Med.* 1996; 2: 317-322.
83. Suda T., Hashimoto H., Tanaka M., Ochi T., Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 2045-2050.
84. Schneider P., Holler N., Bodmer J.L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1205-1213.
85. Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K.M., Krammer P.H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature.* 1995; 373: 438-441.
86. Suda T., Tanaka M., Miwa K., Nagata S. Apoptosis of mouse native T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J. Immunol.* 1996; 157: 3918-3924.
87. Kim J.M., Kim J.S., Jung H.C., Song I.S., Kim C.Y. Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor alpha and soluble Fas ligands. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000; 35: 40-48.
88. Nozawa K., Kayagaki N., Tokano Y., Yagita H., Okumura K., Hasimoto H. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1126-1129.
89. Hasegawa D., Kojima S., Tatsumi E., Hayakawa A., Kosaka Y., Nakamura H., Sako M., Osugi Y., Nagata S., Sano K. Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 1998; 91: 2793-2799.
90. Toyozaki T., Hiroe M., Tanaka M., Nagata S., Ohwada H., Marumo F. Levels of soluble Fas ligand in myocarditis. *Am. J. Cardiol.* 1998; 82: 246-248.
91. Taieb J., Mathurin P., Poynard T., Gougerot-Pocidallo M.A., Chollet-Martin S. Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease. *Lancet.* 1998; 351: 1930-1931.
92. Cheng J., Zhou T., Liu C. et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994; 263: 1759-1762

93. Papathanassoglou E.D., Moynihan J.A., Vermillion D.L., McDermott M.P., Ackerman M.H. Soluble fas levels correlate with multiple organ dysfunction severity, survival and nitrate levels, but not with cellular apoptotic markers in critically ill patients. *Shock*. 2000; 14: 107-112.
94. Endo S., Inada K., Takakuwa T., Kasai T., Yamada Y., Wakabayashi G., Niimi M., Suzuki T., Taniguchi S. Nitrite/nitrate (NOx) and sFas antigen levels in patients with multiple organ failure. *Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol.* 1996; 92: 253-256.
95. Marsik C., Halama T., Cardona F., Wlassits W., Mayr F., Pleiner J., Jilma B. Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. *Shock*. 2003; 20: 493-496.
96. Torre D., Tambini R., Manfredi M., Mangani V., Livi P., Maldifassi V., Campi P., Speranza F. Circulating levels of FAS/APO-1 in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 45: 233-236.
97. Iwase M., Kondo G., Watanabe H., Takaoka S., Uchida M., Ohashi M., Nagumo M. Regulation of Fas-Mediated Apoptosis in Neutrophils after Surgery-Induced Acute Inflammation. *J. Surg. Res.* 2006; 134: 114-23.
98. Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science*. 1998; 281: 1312-1316.
99. Hakem R., Hakem A, Duncan G.S., Henderson J.T., Woo M., Soengas M.S., Elia A., de la Pompa J.L., Kagi D., Khoo W., Potter J., Yoshida R., Kaufman S.A., Lowe S.W., Penninger J.M., Mak T.W. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*. 1998; 94: 339-352.
100. Kuida K., Zheng T.S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P., Flavell R.A. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 1996; 384: 368-372.
101. Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995; 376: 37-43.
102. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997; 326: 1-16.
103. Kauffmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E., Pirier G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993; 53: 3976-3985.
104. Casciola-Rosen L., Nicholson D.W., Chong T., Rowan K.R., Thornberry N.A., Miller D.K., Rosen A. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1957-1964.
105. Song Q., Lees-Miller S.P., Kumar S., Zhang Z., Chan D.W., Smith G.C., Jackson S.P., Alnemri E.S., Litwack G., Khanna K.K., Lavin M.F. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* 1996; 15: 3238-3246.
106. Waterhouse N., Kumar S., Song Q., Strike P., Sparrow L., Dreyfuss G., Alnemri E.S., Litwack G., Lavin M., Watters D. Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 29335-29341.
107. Wang X., Zelenski N.G., Yang J., Sakai J., Brown M.S., Goldstein J.L. Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J.* 1996; 15: 1012-1020.
108. Na S., Chuang T.H., Cunningham A., Turi T.G., Hanke J.H., Bokoch G.M., Danley D.E. D4-GDI, a substrate of CPP32, is proteolyzed during Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 11209-11213.
109. Janicke R.U., Walker P.A., Lin X.Y., Porter A.G. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* 1996; 15: 6969-6978.

110. Enari M., Talanian R.V., Wong W.W., Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature*. 1996; 380: 723-726.
111. Woo M., Hakem R., Soengas M.S., Duncan G.S., Shahinian A., Kagi D., Hakem A., McCurrach M., Khoo W., Kaufman S.A., Senaldi G., Howard T., Lowe S.W., Mak T.W. Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*. 1998; 12: 806-819.
112. Xue D., Horvitz H.R. *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature*. 1997; 390: 305-308.
113. Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., Ueno K., Hardwick J.M. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 1997; 278: 1966-1968.
114. Adams J.M., Cory S. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*. 1998; 281: 1322-1326.
115. Wang Z.Q., Auer B., Stingl L., Berghammer H., Haidacher D., Schweiger M., Wagner E.F. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev*. 1995; 9: 509-520.
116. Wang K., Yin X.M., Chao D.T., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 1996; 10: 2859-2869.
117. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94: 481-490.
118. Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998; 94: 491-501.
119. Watson R.W., O'Neill A., Brannigan A.E., Coffey R., Marshall J.C., Brady H.R., Fitzpatrick J.M. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent [Erratum in: *FEBS Lett*. 2006; 580: 996]. *FEBS Lett*. 1999; 453: 67-71.
120. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu. Rev. Immunol*. 1995; 13: 513-543.
121. Chao D.T., Korsmeyer S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol*. 1998; 16: 395-419.
122. Yang E., Korsmeyer S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*. 1996; 88: 386-401.
123. Van Engeland M., Nieland L., Ramaekers F., Schutte B., Reutelingsperger C. Annexin-V affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998; 31: 1-9.
124. Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A., Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*. 1998; 16: 2265-2282.
125. Korsmeyer S.J., Shutter J.R., Veis D.J., Merry D.E., Oltvai Z.N. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol*. 1993; 4: 327-332.
126. Zhong L.-T., Sarafian T., Kane D.J., Charles A.C., Mah S.P., Edwards R.H., Bredesen D.E. BCL-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 4533-4537.
127. Sentman C.L., Shutter J.R., Hockenbery D., Kanagawa O., Korsmeyer S.J. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*. 1991; 67: 879-888.
128. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med*. 1996; 184: 1331-1341.

129. Yang J., Liu X., Bhalla K. Y. col. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*. 1997; 275: 1129-1132.
130. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91: 479-489.
131. Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gomez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1533-1544.
132. Xiang J., Chao D.T., Korsmeyer S.J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1996; 93: 14559-14563.
133. Baffy G., Miyashita T., Williamson J.R., Reed J.C. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 6511-6519.
134. Strasser A., Harris A.W., Huang D.C., Krammer P.H., Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 1995; 14: 6136-6147.
135. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17: 1675-1687.
136. Itoh N., Tsujimoto Y., Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* 1993; 151: 621-627.
137. Boise L.H., Minn A.J., Noel P.J., June C.H., Accavitti M.A., Lindsten T., Thompson C.B. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995; 3: 87-98.
138. Rodriguez I., Matsuura K., Khatib K., Reed J.C., Nagata S., Vassalli P. A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1031-1036.
139. Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Daugas E., Wang H.G., Geley S., Fassy F., Reed J.C., Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 25-37.
140. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Knudson C.M., Chang K.C., Cobb J.P., Osborne D.F., Zollner K.M., Buchman T.G., Korsmeyer S.J., Karl I.E. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* 1999; 162: 4148-4156.
141. Martin J.S., Reutelingsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C.A.A., LaFace D.M., Green D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Ab1. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1545-1556.
142. Bevers E.M., Tilly R.H., Senden J.M., Comfurius P., Zwaal R.F. Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity. *Biochemistry*. 1989; 28: 2382-2387.
143. Connor J., Pak C.C., Schroit A.J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 2399-2404.
144. Fadok V.A., Savill J.S., Haslett C., Bratton D.L., Doherty D.E., Campbell P.A., Henson P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol. Methods*. 1992; 149: 4029-4035.

145. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohem J.J., Bratton D.L., Henson P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol. Methods.* 1992; 148: 2207-2216.
146. Inaba N., Sato N., Ijichi M., Fukazawa I., Nito A., Takamizawa H., Luben G., Bohn H. The immunocytochemical location of two membrane associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placentae. *Tumor Biol.* 1984; 5: 75-85.
147. Reutelingsperger C.P., Hornstra G., Hemker H. C. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur. J. Biochem.* 1985; 151: 625-629.
148. Tait J.F., Gibson D., Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 7944-7949.
149. Morlans K., Santos J., Gonzalez-Prendes C.M., Rodriguez F., García B., Sainz H. Falla organica multiple: Acercamiento al tema. *Rev. Cubana Cardiol. Cir. Cardiovasc.* 1999; 13: 61-71.
150. Deitch E.A. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.* 1992; 216: 117-134.
151. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101: 1644-1655.
152. Bone R.C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann. Intern. Med.* 1996; 125: 680-687
153. Bone R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* 1996; 24: 1125-1128.
154. Marshall J.C. SIRS, MODS, and the brave new world of ICU acronyms: Have they help us?. En: Baue A.E., Faist E., Fry D.E. *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, prevention and therapy.* New York: Springer; 2000. p. 14-22.
155. Gando S., Kameue T., Nanzaki S., Hayakawa T., Nakanishi Y. Participation of tissue factor and thrombin in posttraumatic systemic inflammatory syndrome. *Crit. Care Med.* 1997; 25: 1820-1826.
156. Munster A.M. Gut: Clinical importance of bacterial translocation, permeability, and other factors. En: Baue A.E., Faist E., Fry D.E. *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, prevention and therapy.* New York: Springer; 2000. p. 86-91.
157. Lemaire L.C., van Lanschot J.J., Stoutenbeek C.P., van Deventer S.J., Wells C.L., Gouma D.J. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br. J. Surg.* 1997; 84: 1340-1350.
158. Fry D.E., Pearlstein L., Fulton R.L., Polk H.C. Jr. Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch. Surg.* 1980; 115: 136-140.
159. Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P., Zimmerman J.E. Prognosis in acute organ-system failure. *Ann. Surg.* 1985; 202: 685-693.
160. Baker K., Nasraway S.A. Multiple organ failure during Critical Illness: how organ failure influences outcome in liver disease and liver transplantation. *Liver Transplantation.* 2000; 6 (4 Suppl 1): S5-S9.
161. Marshall J.C, Cook D.J, Christou N.V, Gordon R, Sprung C.L, Sibbald W.J. Multiple organ dysfunction score. A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit.Care Med.* 1995; 23: 1638-1652.

162. Vincent J.L., de Mendonca A., Cantraine F., Moreno R., Takala J., Suter P.M., Sprung C.L., Colardyn F., Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit. Care Med.* 1998; 26: 1793-1800.
163. Le Gall J.R., Klar J., Lemeshow S., Saulnier F., Alberti C., Artigas A., Teres D. The Logistic Organ Dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. *JAMA.* 1996; 276: 802-810.
164. Bernar G.R., Doig G., Hudson L.D., Lemeshow S., Marshall J.C., Russell J. et al. Quantification of organ failure for clinical trials and clinical practice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151: A323.
165. Haga Y., Beppu T., Doi K., Nozawa F., Mugita N., Ikei S., Ogawa M. Systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction following gastrointestinal surgery. *Crit. Care Med.* 1997; 25: 1994-2000.
166. Pinsky M.R., Vincent J.L., Deviere J., Alegre M., Kahn R.J., Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* 1993; 103: 565-575.
167. Calandra T., Gerain J., Heumann D., Baumgartner J.D., Glauser M.P. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am. J. Med.* 1991; 91: 23-29.
168. Hisano S., Sakamoto K, Ishiko T, Kamohara H., Ogawa M. IL-6 and soluble IL-6 receptor levels change differently after surgery both in the blood and in the operative field. *Cytokine.* 1997; 9: 447-452.
169. Casey L.C., Balk R.A., Bone R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1993; 119: 771-778.
170. Frieling J.T., van Deuren M., Wijdenes J., van der Meer J.W., Clement C., van der Linden C.J., Sauerwein R.W. Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *J. Infect. Dis.* 1995; 172: 607-608.
171. Bueno P., García-Navarro A., Mansilla A., Garrote D., Muffaak K., Ramia J.M., Villar J.M., Ferrón J.A. IL-6 y IL-10 como factores predictivos de la evolución clínica de pacientes quirúrgicos. *Cir. Esp.* 2003; 74 Supl 1: 105-206.
172. Roumen R.M., Hendriks T., van der Ven-Jongekrijg J., Nieuwenhuijzen G.A., Sauerwein R.W., van der Meer J.W., Goris R.J. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann. Surg.* 1993; 218: 769-776.
173. Partrick D.A., Moore F.A., Moore E.E., Biffi W.L., Sauaia A., Barnett C.C. Jr. Jack A. Barney Resident Research Award winner. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. *Am. J. Surg.* 1996; 172: 425-429.
174. Shenkin A., Fraser W.D., Series J., Winstanley F.P., McCartney A.C., Burns H.J., Van Damme J. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res.* 1989; 8: 123-127.
175. Gomez-Jimenez J., Martin M.C., Sauri R., Segura R.M., Esteban F., Ruiz J.C., Nuvials X., Boveda J.L., Peracaula R., Salgado A. Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 472-475.
176. De Vega R., Perez R., Martín M.C., Bustamante J., Bustamante A., Mendil A., Bustamante E. Study of the activity of glutathione-reductase in renal transplants. *Transplantation Proceedings.* 2003; 35: 1346-1350.

177. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991; 91: 14S-22S.
178. Alonso de Vega J.M., Diaz J., Serrano E., Carbonell L.F. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 1782-1786.
179. De Vega R., Perez R., Martín M.C., Bustamante J., Bustamante A., Mendil A., Bustamante E. Study of the activity of glutathione-reductase in renal transplants. *Transplantation Proceedings.* 2003; 35: 1346-1350.
180. Motoyama T., Okamoto K., Kukita I., Hamaguchi M., Kinoshita Y., Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 1048-1052.
181. Pascual C., Karzai W., Meier-Hellmann A., Oberhoffer M., Horn A., Bredle D., Reinhart K. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit. Care Med.* 1998; 26: 705-709.
182. Kimmel J.R., Markowitz H., Brown D.M. Some chemical and physical properties of erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 46-50.
183. Brown S., Heinisch I., Ross E., Shaw K., Buckley C.D., Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature.* 2002; 418: 200-202.
184. Porter J.M., Ivatury R.R., Azimuddin K., Swami R. Antioxidant therapy in the prevention of organ dysfunction syndrome and infectious complications after trauma: early results of a prospective randomized study. *Am. Surg.* 1999; 65: 478-483.
185. Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci.* 1992; 83: 639-648.
186. Jimenez M.F., Watson R.W., Parodo J., Evans D., Foster D., Steinberg M., Rotstein O.D., Marshall J.C. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch. Surg.* 1997; 132: 1263-1269.
187. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D., Tinsley K.W., Cobb J.P., Matuschak G.M., Buchman T.G., Karl I.E. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 1999; 27: 1230-1251.
188. Kobayashi E., Yamauchi H. Interleukin-6 and delay of neutrophil apoptosis after major surgery. *Arch. Surg.* 1997; 132: 209-210.
189. Minnich D.J., Moldawer L.L. Anti-cytokine and anti-inflammatory therapies for the treatment of severe sepsis: progress and pitfalls. *Proc. Nutr. Soc.* 2004; 63: 437-341.
190. Cheng T., Liu D., Griffin J.H., Fernandez J.A., Castellino F., Rosen E.D., Fukudome K., Zlokovic B.V. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.* 2003; 9: 338-342.
191. Fry D.E. Microcirculatory arrest theory of SIRS and MODS. En: Baue A.E., Faist E., Fry D.E. *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, prevention and therapy.* New York: Springer; 2000. p. 92-100.
192. Motycka V., Havlicek K., Siller J., Grofova Z., Vanac J., Fortova M. Pharmacologic prevention of SIRS (systemic inflammatory response syndrome) in severe thoracic injuries. *Rozhl. Chir.* 2003; 82: 473-479.
193. Riedmann N. C., Gou Ren-Fen, Ward P. A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Medicine.* 2003; 9: 517-524.
194. Alexander H.R., Doherty G.M., Fraker D.L., Block M.I., Swedenborg J.E., Norton J.A. Human recombinant interleukin-1 alpha protection against the lethality of endotoxin and experimental sepsis in mice. *J. Surg. Res.* 1991; 50: 421-424.

195. Sheppard B.C., Fraker D.L., Norton J.A. Prevention and treatment of endotoxin and sepsis lethality with recombinant human tumor necrosis factor. *Surgery*. 1989; 106: 156-161.
196. Gough D.B., Moss N.M., Jordan A., Grbic J.T., Rodrick M.L., Mannick J.A. Recombinant interleukin-2 (rIL-2) improves immune response and host resistance to septic challenge in thermally injured mice. *Surgery*. 1988; 104: 292-300.
197. Tellez L., Rosello A.M., Collado A., Moreno R.L., Ferron-Orihuela J.A. Modulation of soluble phases of endothelial/leukocyte adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 with interleukin-1beta after experimental endotoxic challenge. *Crit. Care Med*. 2001; 29: 776-781.
198. Mansilla-Rosello A., Ferron-Orihuela J.A., Ruiz-Cabello F., Garrote-Lara D., Fernandez-Mondejar E., Delgado-Carrasco M.L. Differential effects of IL-1 beta and ibuprofen after endotoxic challenge in mice. *J. Surg. Res*. 1997; 67: 199-204.
199. Tellez-Gil L., Mansilla-Rosello A., Collado-Torres A., Villar-del-Moral J., Garrote-Lara D., Villegas-Herrera T., Alvarez-Martin M.J., Ferron-Orihuela J.A. Effect of pretreatment with interleukin-1 beta on inflammatory infiltrates and tissue damage after experimental endotoxic challenge. *Crit. Care Med*. 2002; 30: 1820-1825.
200. Mansilla-Rosello A., Ferron-Orihuela J.A., Ruiz-Cabello F., Garrote-Lara D., Delgado-Carrasco S., Tamayo-Pozo F. Interleukin-1beta and ibuprofen effects on CD4/CD8 cells after endotoxic challenge. *J. Surg. Res*. 1996; 65: 82-86.
201. Romito RA. Early administration of enteral nutrients in critically ill patients. *AACN Clin. Issues*. 1995; 6: 242-256.
202. Preiser J.C., Van Gossum A., Berre J., Vincent J.L., Carpentier Y. Enteral feeding with a solution enriched with antioxidant vitamins A, C, and E enhances the resistance to oxidative stress. *Crit. Care Med*. 2000; 28: 3828-3832.
203. Hunt C., Chakravorty N.K., Annan G., Habibzadeh N., Schorah C.J. The clinical effects of vitamin C supplementation in elderly hospitalised patients with acute respiratory infections. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 1994; 64: 212-219.
204. Goode H.F., Cowley H.C., Walker B.E., Howdle P.D., Webster N.R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit. Care Med*. 1995; 23: 646-651.
205. Schorah C.J., Downing C., Piripitsi A., Gallivan L., Al-Hazaa A.H., Sanderson M.J., Bodenham A. Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. *Am. J. Clin. Nutr*. 1996; 63: 760-765.
206. Borrelli E., Roux-Lombard P., Grau G.E., Girardin E., Ricou B., Dayer J., Suter P.M. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit. Care Med*. 1996; 24: 392-397.
207. Chojkier M., Houglum K., Solis-Herruzo J., Brenner D.A. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? *J. Biol. Chem*. 1989; 264: 16957-16962.
208. Galley H.F., Davies M.J., Webster N.R. Ascorbyl radical formation in patients with sepsis: effect of ascorbate loading. *Free Radic. Biol. Med*. 1996; 20: 139-143.
209. Leibovitz B., Siegel B.V. Ascorbic acid, neutrophil function, and the immune response. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 1978; 48: 159-164.
210. Hartel C., Strunk T., Bucsky P., Schultz C. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine*. 2004; 27: 101-106.
211. Bergman M., Salman H., Djaldetti M., Fish L., Punsky I., Bessler H. In vitro immune response of human peripheral blood cells to vitamins C and E. *J. Nutr. Biochem*. 2004; 15: 45-50.

212. Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjoberg L.B, Pedersen B.K. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2004; 558: 633-645.
213. Vassilakopoulos T., Karatza M.H., Katsaounou P., Kollintza A., Zakynthinos S., Roussos C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 2003; 94: 1025-1032.
214. Jeng K.C., Yang C.S., Siu W.Y., Tsai Y.S., Liao W.J., Kuo J.S. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 64: 960-965.
215. Perez-Cruz I., Carcamo J.M., Golde D.W. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood.* 2003; 102: 336-343.
216. Puskas F., Gergely P., Niland B., Banki K., Perl A. Differential regulation of hydrogen peroxide and Fas-dependent apoptosis pathways by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *Antioxid. Redox Signal.* 2002; 4: 357-369.
217. Kim H., Kim Y.N., Kim H., Kim C.W. Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene.* 2005; 24: 1252-1261.
218. Lee S.H., Oe T., Blair I.A. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science.* 2001; 292: 2083-2086.
219. Campbell J.D., Cole M., Bunditruvorn B., Vella A.T. Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis. *Cell Immunol.* 1999; 194: 1-5.
220. Scheel-Toellner D., Wang K., Craddock R., Webb P.R., McGettrick H.M., Assi L.K., Parkes N., Clough L.E., Gulbins E., Salmon M., Lord J.M. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood.* 2004; 104: 2557-2564.
221. Kasahara Y., Iwai K., Yachie A., Ohta K., Konno A., Seki H., Miyawaki T., Taniguchi N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood.* 1997; 89: 1748-1753.
222. Vissers M.C., Hampton M.B. The role of oxidants and vitamin C on neutrophil apoptosis and clearance. *Biochem. Soc. Trans.* 2004; 32: 499-501.
223. Sharma P., Raghavan S.A., Saini R., Dikshit M. Ascorbate-mediated enhancement of reactive oxygen species generation from polymorphonuclear leukocytes: modulatory effect of nitric oxide. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 1070-1078.
224. Leff J.A., Wilke C.P., Hybertson B.M., Shanley P.F., Beehler C.J., Repine J.E. Postinsult treatment with N-acetyl-L-cysteine decreases IL-1-induced neutrophil influx and lung leak in rats. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: L501-506.
225. Bernard G.R., Lucht W.D., Niedermeyer M.E., Snapper J.R., Ogletree M.L., Brigham K.L. Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J. Clin. Invest.* 1984; 73: 1772-1784.
226. Walsh T.S., Lee A. N-acetylcysteine administration in the critically ill. *Intensive Care Med.* 1999; 25: 432-434.
227. Agustí A.G.N., Togoires B., Ibañez J., Raurich J.M., Maimó A., Bergada J., Marse P., Jorda R. Effects of N-Acetyl-L-cysteine on tissue oxygenation in patients with multiple organ failure and evidence of tissue hypoxia. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1962-1966.
228. Zhang H., Spanen H., Nguyen D.N., Benlabed M., Buurman W.A., Vicent J.L. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.).* 1994; 266: H1746-H1754.

229. Spapen H., Zhang H., Demanet C., Vleminckx W., Vicent J.L., Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock?. *Chest*. 1998; 113: 1616-1624.
230. Galley H.F., Howdle P.D., Walker B.E., Webster N.R. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23: 768-774.
231. Heller A.R., Groth G., Heller S.C., Breikreutz R. et al. N-Acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 272-276.
232. Spies C.D., Reinhart K., Witt I., Meier-Hellmann A., Hannemann L., Bredle D.L., Schaffartzik W. Influence of N-acetylcysteine on indirect indicators of tissue oxygenation in septic shock patients: results from a prospective, randomized, double-blind study. *Crit. Care Med.* 1994; 22: 1738-1746.
233. Sawyer M.A.J., Mike J.J., Chavin K. et al. Antioxidant therapy and survival in ARDS. *Crit. Care Med.* 1989; 17: S153.
234. Molnar Z., MacKinnon K.L., Shearer E., Lowe D., Watson I.D. The effect of N-acetylcysteine on total serum anti-oxidant potential and urinary albumin excretion in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 1998; 24: 230-235.
235. Molnar Z., Shearer E., Lowe D. N-acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: A prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit. Care Med.* 1999; 27: 1100-1104.
236. Ortolani O., Conti A., De Gaudio A.R., Moraldi E., Cantini Q., Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 1907-1911.
237. Paterson R.L., Galley H.F., Webster N.R. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 2574-2578.
238. Peristeris P., Clark B.D., Gatti S., Faggioni R., Mantovani A., Mengozzi M., Orencole S.F., Sironi M., Ghezzi P. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol.* 1992; 140: 390-399.
239. Bengtsson A., Lundberg M., Avila-Carino J., Jacobsson G., Holmgren A., Scheynius A. Thiols decrease cytokine levels and down-regulate the expression of CD30 on human allergen-specific T helper (Th) 0 and Th2 cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2001; 123: 350-360
240. Emet S., Memis D., Pamukcu Z. The influence of N-acetyl-L-cystein infusion on cytokine levels and gastric intramucosal pH during severe sepsis. *Crit. Care.* 2004; 8: R172-179.
241. Treitinger A., Spada C., Masokawa I.Y., Verdi J.C., Van Der Sander Silveira M. et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on lymphocyte apoptosis, lymphocyte viability, TNF-alpha and IL-8 in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral treatment. *Braz. J. Infect. Dis.* 2004; 8: 363-371.
242. Watson R.W., Rotstein O.D., Jimenez M., Parodo J., Marshall J.C. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. *Blood.* 1997; 89: 4175-4181.
243. Lepri E., Gambelunghe C., Fioravanti A., Pedini M., Micheletti A., Rufini S. N-acetylcysteine increases apoptosis induced by H₂O₂ and mo-antiFas triggering in a 3DO hybridoma cell line. *Cell Biochem. Funct.* 2000; 18: 201-208.
244. Copeland G.P., Jones D., Walters M. POSSUM: a scoring system for surgical audit. *Br. J. Surg.* 1991; 78: 355-360.
245. Clemens M.R., Waladkhani A.R., Bublitz K., Ehninger G., Gey K.F. Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation. *Wien Klin Wochenschr.* 1997; 109: 771-776.

246. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin-V. *J. Immunol. Methods.* 1995; 184: 39-51.
247. Ferrante A, Thong Y.H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. *J. Immunol. Methods.* 1980; 36: 109-117.
248. Böyum A. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 97: 77-89.
249. Zimmerman J.E., Knaus W.A., Sun X., Wagner D.P. Severity stratification and outcome prediction for multisystem organ failure and dysfunction. *World J. Surg.* 1996; 20: 401-405.
250. Baue A.E. Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome-where do we stand? *Shock.* 1994; 2: 385-397.
251. Oda S., Hirasawa H., Shiga H., Nakanishi K., Matsuda K., Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine.* 2005; 29: 169-175.
252. Miyaoka K., Iwase M., Suzuki R., Kondo G., Watanabe H., Ito D., Nagumo M. Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. *J. Surg. Res.* 2005; 125: 144-150.
253. Mokart D., Capo C., Blache J.L., Delpero J.R., Houvenaeghel G., Martin C., Mege J.L. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br. J. Surg.* 2002; 89: 1450-1456.
254. Mokart D., Merlin M., Sannini A., Brun J.P., Delpero J.R., Houvenaeghel G., Moutardier V., Blache J.L. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br. J. Anaesth.* 2005; 94: 767-773.
255. Weiss S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 365-376.
256. Friedman G., Jankowski S., Marchant A., Goldman M., Kahn R.J., Vincent J.L. Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *J. Crit. Care.* 1997; 12: 183-187.
257. Van der Poll T., de Waal Malefyt R., Coyle S.M., Lowry S.F. Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *J. Infect. Dis.* 1997; 175: 118-122.
258. Waage A., Halstensen A., Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet.* 1987; 1: 355-357.
259. Grau G.E., Taylor T.E., Molyneux M.E., Wirima J.J., Vassalli P., Hommel M., Lambert P.H. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 1586-1591.
260. Debets J.M., Kampmeijer R., van der Linden M.P., Buurman W.A., van der Linden C.J. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit. Care Med.* 1989; 17: 489-494.
261. Hack C.E., De Groot E.R., Felt-Bersma R.J., Nuijens J.H., Strack Van Schijndel R.J., Eerenberg-Belmer A.J., Thijs L.G., Aarden L.A. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood.* 1989; 74: 1704-1710.
262. Taniguchi T., Koido Y., Aiboshi J., Yamashita T., Suzaki S., Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care. Med.* 1999; 27: 1262-1264.
263. Jeannin P., Delneste Y., Lecoanet-Henchoz S., Gauchat J.F., Life P., Holmes D., Bonnefoy J.Y. Thiols decrease human interleukin (IL) 4 production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1785-1792.

264. Eylar E.H., Baez I., Vazquez A., Yamamura Y. N-acetylcysteine (NAC) enhances interleukin-2 but suppresses interleukin-4 secretion from normal and HIV+ CD4+ T-cells. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 1995; 41 Suppl 1: S35-40.
265. Lundqvist-Gustafsson H., Bengtsson T. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65: 196-204.
266. Ungethum U., Keel M., Trentz Q., et al. Increased expression of apoptosis-inducing proteins Fas antigen and Fas ligand on mononuclear cells of septic patients. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd.* 1997; 114: 623-625.
267. Papathanassoglou E.D., Movnihan J.A., Dafni O., Mantzoros C.S., Ackerman M.H. Association of proinflammatory molecules with apoptotic markers and survival in critically ill multiple organ dysfunction patients. *Biol. Res. Nurs.* 2003; 5: 129-141.
268. Papathanassoglou E.D., Moynihan J.A., McDermott M.P., Ackerman M.H. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 709-718.
269. Delneste Y., Jeannin P., Sebille E., Aubry J.P., Bonnefoy J.Y. Thiols prevent Fas (CD95)-mediated T cell apoptosis by down-regulating membrane Fas expression. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2981-2988.
270. Rajan G., Sleigh J.W. Lymphocyte counts and the development of nosocomial sepsis. *Intensive Care Med.* 1997; 23: 1187.
271. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Cobb J.P., Jacobson A., Buchman T.G., Karl I.E. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit. Care Med.* 1997; 25: 1298-1307.
272. Mamdooh G., Sastry G. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. *Cancer Letters.* 2003; 201: 41-49.
273. Owen-Schaub L.B., Yonehara S., Crump W.L. 3rd, Grimm E.A. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol.* 1992; 140: 197-205.
274. Miyawaki T., Uehara T., Nibu R., Tsuji T., Yachie A., Yonehara S., Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J. Immunol.* 1992; 149: 3753-3758.
275. Winterbourn C.C., Vissers M.C. Changes in ascorbate levels on stimulation of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983; 763: 175-179.
276. Tait J.F., Smith C., Wood B. Measurement of phosphatidylserine exposure in leukocytes and platelets by whole-blood flow cytometry with AnnexinV. *Blood cells, molecules and Diseases.* 1999; 25: 271-278.
277. Hasper H.J., Weghorst R.M., Richel D.J., Meerwaldt J.H., Olthuis F., Schenkeveld C. A new four-color flow cytometric assay to detect apoptosis in lymphocyte subsets of cultured peripheral blood cells. *Cytometry.* 2000; 40: 167-171.
278. Van den Berg J.M., Weyer S., Weening J.J., Roos D., Kuijpers T.W. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 69: 467-473.
279. Maianski N.A., Roos D., Kuijpers T.W. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood.* 2003; 101: 1987-1995.
280. Hug H., Strand S., Grambihler A., Galle J., Hack V., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 28191-28193.
281. Squier M.K., Sehnert A.J., Cohen J.J. Apoptosis in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 2-10.

282. Keel M., Ungethüm U., Steckholzer U., Niederer E., Hartung T., Trentz O., Ertel W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood*. 1997; 90: 3356-3363.
283. Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992; 80: 2012-2020.
284. Pericle F., Liu J.H., Diaz J.I., Blanchard D.K., Wei S., Forni G., Djeu J.Y. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 440-444.
285. Fanning N.F., Kell M.R., Shorten G.D., Kirwan W.O., Bouchier-Hayes D., Cotter T.G., Redmond H.P. Circulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor in plasma of patients with the systemic inflammatory response syndrome delays neutrophil apoptosis through inhibition of spontaneous reactive oxygen species generation. *Shock*. 1999; 11: 167-174.
286. Fanning N.F., Porter J., Shorten G.D., Kirwan W.O., Bouchier-Hayes D., Cotter T.G., Redmond H.P. Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery*. 1999; 126: 527-534.
287. Biffl W.L., Moore E.E., Zallen G., Johnson J.L., Gabriel J., Offner P.J., Silliman C.C. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. *Surgery*. 1999; 126: 198-202.
288. Asensi V., Valle E., Meana A., Fierer J., Celada A., Alvarez V., Paz J., Coto E., Carton J.A., Maradona J.A., Dieguez A., Sarasua J., Ocana M.G., Arribas J.M. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect. Immun.* 2004; 72: 3823-3828.
289. Weiss M., Elsharkawi M., Welt K., Schneider E.M. Transient leukocytosis, granulocyte colony-stimulating factor plasma concentrations, and apoptosis determined by binding of annexin V by peripheral leukocytes in patients with severe sepsis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 1010: 742-747.
290. Matute-Bello G., Liles W.C., Radella F. 2nd, Steinberg K.P., Ruzinski J.T., Jonas M., Chi E.Y., Hudson L.D., Martin T.R. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 1969-1977.
291. Matute-Bello G., Liles W.C., Radella F. 2nd, Steinberg K.P., Ruzinski J.T., Hudson L.D., Martin T.R. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 2000; 28: 1-7.
292. Afford S.C., Pongracz J., Stockley R.A., Crocker J., Burnett D. The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21612-21616.
293. Takeda Y., Watanabe H., Yonehara S., Yamashita T., Saito S., Sendo F. Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int. Immunol.* 1993; 5: 691-694.
294. Tsuchida H., Takeda Y., Takei H., Shinzawa H., Takahashi T., Sendo F. In vivo regulation of rat neutrophil apoptosis occurring spontaneously or induced with TNF-alpha or cycloheximide. *J. Immunol.* 1995; 154: 2403-2412.
295. Renshaw S.A., Timmons S.J., Eaton V., Usher L.R., Akil M., Bingle C.D., Whyte M.K. Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67: 662-668.
296. Nwakoby I.E., Reddy K., Patel P., Shah N., Sharma S., Bhaskaran M., Gibbons N., Kapasi A.A., Singhal P.C. Fas-mediated apoptosis of neutrophils in sera of patients with infection. *Infect. Immun.* 2001; 69: 3343-3349.

-
297. Murray J., Barbara J.A., Dunkley S.A., Lopez A.F., Van Ostade X., Condliffe A.M., Dransfield I., Haslett C., Chilvers E.R. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*. 1997; 90: 2772-2783.
298. Marshall J.C. Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit. Care Med*. 2005; 33: S502-S505.

8- ANEXOS

8.1.-Anexo 1

DOCUMENTO INFORMATIVO DE PARTICIPACION EN ENSAYO CLINICO

Redactado según el Real Decreto 561/1993 de 16 de abril, BOE de 13 de mayo de 1993, y teniendo en consideración los requerimientos establecidos en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD 15/1999 de 13 de diciembre, BOE de 14 de diciembre de 1999).

PROYECTO DE INVESTIGACION: Prevención del Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple mediante la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica a través de la administración de N-acetilcisteína o Vitamina C en pacientes quirúrgicos de alto riesgo.

El objetivo de este estudio es profundizar en el conocimiento y prevención, mediante el empleo de compuestos antioxidantes de los fenómenos de apoptosis (muerte celular programada) y fracaso multiorgánico (mal funcionamiento de varios organos a la vez) susceptibles de producirse en pacientes operados de alto riesgo. Así como estudiar las repercusiones que los procesos sépticos tienen sobre el organismo (procesos que dan lugar a una respuesta inflamatoria en todo el organismo, pudiendo ocasionar la muerte), con objeto de valorar las posibilidades de controlarlos.

Metodología:

El estudio se realizará en muestras de sangre, procediéndose a determinar los parámetros bioquímicos habituales, mediadores inflamatorios y enzimas pro- y antiapoptósicas implicadas en este tipo de procesos.

La participación en el estudio, como paciente, consiste en que se me puede administrar además del tratamiento estándar una de las sustancias del estudio: N-acetilcisteína o Vitamina C a las dosis de 75 mg/Kg/día y 450 mg/día, respectivamente. Así mismo, se

me extraerá un volumen de sangre (25 ml) en los días 0, 1º, 2º, 3º, 4º, 6º y 8º después de la intervención quirúrgica, para proceder a determinar distintos parámetros bioquímicos. Las muestras de sangre sólo y exclusivamente se utilizarán para el estudio de este proyecto.

Los resultados obtenidos en el estudio no podrán ser utilizados más que con el fin de profundizar en el conocimiento del objetivo de trabajo.

Beneficios esperados y Riesgos Potenciales:

Hasta el momento y por la literatura científica disponible, la administración de N-acetilcisteína en pacientes quirúrgicos de alto riesgo se ha manifestado como beneficiosa reduciendo el riesgo de isquemia que se presenta en estos casos. Así mismo, ensayos experimentales con ácido ascórbico (Vitamina C) han mostrado su eficacia en la reducción del fenómeno de apoptosis.

Riesgos potenciales no se han descrito utilizando este tipo de sustancias. La utilización de N-acetilcisteína o ácido ascórbico pueden ser ampliamente beneficiosas al tratarse de moléculas bien conocidas y de bajo coste económico.

Voluntariedad en la Participación:

La negativa a participar en este estudio NO tiene ninguna repercusión en la atención médica que se necesita.

La participación en este estudio es absolutamente VOLUNTARIA y, en cualquier momento del estudio, puede interrumpirse a voluntad del participante.

Confidencialidad:

La información de este estudio es CONFIDENCIAL y solamente será utilizada a efectos de publicaciones científicas.

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del ensayo: Prevención del Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple mediante la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica a través de la administración de N-acetilcisteína o Vitamina C en pacientes quirúrgicos de alto riesgo.

Yo

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1. Cuando quiera**
- 2. Sin tener que dar explicaciones**
- 3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos**

Presto libremente mi conformidad para participar en el ensayo

Fecha

Firma del participante

SERVICIO CIRUGÍA GENERAL

8.2.-Anexo 2

ESCALA POSSUM

PARÁMETROS FISIOLÓGICOS:

Edad: hay cuatro niveles que puntúan de 1 a 4 en orden creciente de edad, teniendo la puntuación máxima los mayores de 71 años.

Glasgow: tiene en cuenta la capacidad verbal (si el paciente conversa o no, si se expresa de forma comprensible o si está ausente), función motora (si obedece, tiene dolor localizado, si flexiona, si tiene rigidez o capacidad de extensión o si esta ausente) y si abre los ojos (de forma espontánea, al hablarle, con el dolor o está ausente). De este modo, se obtiene una puntuación de 3 a 15, de forma que cuanto menor sea, mayor es la gravedad del enfermo y por tanto mayor puntuación recibe en el POSSUM.

Función respiratoria: teniendo en cuenta la presencia o ausencia de disnea, y en su caso el grado de ésta hasta la situación más grave de disnea en reposo o fibrosis).

Urea: en función de los moles/L (entre menos de 7,5 a más de 15,1) se obtiene una puntuación de 1 a 8.

Pulso cardiaco (puntuando más alto tanto la bradicardia como la taquicardia), **signos cardiacos** (necesidad de diuréticos o antihipertensivos, edema, presencia y grado de cardiomegalia y presión yugular aumentada) y alteraciones del **electrocardiograma**, puntuando los tres de 1 a 8.

Hemoglobina: expresada en g/dL, puntúa de 1 a 8, pudiendo recibir puntuaciones máximas tanto los valores altos como los bajos.

Leucocitos: expresados en leucocitos /mm³, puntúan de 1 a 4, recibiendo puntuaciones altas tanto los valores anormalmente elevados como los bajos.

Potasio y sodio: que puntúan de 1 a 8 según los mEq/L detectados, que en el caso del potasio pueden puntuar de forma máxima tanto los valores anormalmente altos como los anormalmente bajos.

Presión sistólica: expresada en mmHg, puntúa de 1 a 8, obteniendo puntuaciones altas tanto los valores anormalmente bajos como los anormalmente altos.

PARÁMETROS QUIRÚRGICOS:

Severidad de la intervención: puntúan de 1 a 8, en función de que la patología que indica la intervención quirúrgica se considere cirugía menor, moderada o mayor.

Intervenciones múltiples: puntúan de 1 a 8 en función de que se trate de 1, 2 o más de 2 intervenciones.

Perdida de sangre: puntuando de 1 a 8, en función de los ml de sangre que se pierden durante la intervención quirúrgica.

Secreción peritoneal: puntúa de 1 a 8 en función de si se produce o no, y en su caso, la cantidad y el tipo de secreción.

Presencia de cáncer: puntúa de 1 a 8 en función de si hay o no cáncer, y en su caso si se trata de un cáncer primario o si presentan metástasis nodulares o distales.

Tipo de cirugía: puntúa de 1 a 8 en función de que se trate de cirugía electiva o de urgencia y según su tiempo de evolución.

8.3.-Anexo 3

ESCALA DE CALIFICACIÓN DEL SÍNDROME DE DISFUNCIÓN ORGÁNICA MÚLTIPLE BRUSELAS.

Órgano	Normal	Leve	Moderada	Disfunción orgánica clínicamente significativa	
				Grave	Extrema
Cardiovascular (presión sistólica)	> 90	< 90 respuesta a líquidos	< 90 sin respuesta a líquidos	< 90 pH < 7.3	< 90 pH < 7.2
Pulmonar (PaO ₂ /FiO ₂)	> 400	301-400	201-300 Lesión pulmonar aguda	101-200 SIRA	< 100 SIRA grave
SNC (Glasgow)	15	13-14	10-12	6-9	< 5
Coagulación (plaquetas)	> 120	81-120	51-80	21-50	< 20
Renal (creatinina mg/dL)	< 1.5	1.5-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	> 5
Hepático (bilirrubina mg/dL)	< 1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	> 12