

CIUDAD SANITARIA «1.º DE OTUBRE». MADRID
Servicio de Traumatología. Prof. MUNUERA MARTÍNEZ

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Prof. REY CALERO

Valoración inmunológica humoral y de base celular en pacientes con fractura de tibia

A. LOPEZ ALONSO, A. AZNAR, V. DOMINGUEZ ROJAS, C. FERNANDEZ CRIADO,
L. MUNUERA y J. REY CALERO

RESUMEN

Se realiza una valoración de la inmunidad de base celular-test de Rosetas y test de Inhibición de la Migración (MIT) y de base humoral Ig G, Ig A e Ig M, en 10 pacientes jóvenes adultos, portadores de fracturas diafisarias de tibia de trazo único, en comparación con 10 sujetos adultos jóvenes sanos.

Descriptores: Fractura de la diáfisis de la tibia. Test de inmunidad celular y humoral.

SUMMARY

We study un 10 Young patients with factures of the tibia.

We do a comparative study between 10 young adults with patients of tibia fractures and 10 healthy adults, making a valoration of the immunity base celular-test of Rosetas and test of inhibition of Migration (MIT) and of base humoral-IgG, IgA e IgM.

Key words: Fractures of the shaft of tibia Immunity test.

Introducción

Numerosos estudios clínicos y de laboratorio han podido demostrar una disminución del sistema inmunitario, así como de la resistencia tisular local después de traumatismos accidentales y quirúrgicos.

LÓPEZ ALONSO (1973, 1974) (13, 14), en perros intervenidos obtiene una deplección inmunoglobulínica anti-BSA, significativa.

HOWARD y SIMMONS (1974) (12), encuentran deficiencias inmunológicas adquiridas, después del trauma y de procederes quirúrgicos.

MAC LEAN y cols. (1975) (15), encuen-

tran en politraumatizados, una disminución de linfocitos T durante las primeras 24-48 horas, volviendo a la normalidad al quinto día.

NEILAN, TADDEINI y STRATE (1977) (17), encuentran en quemados, deplección inmunológica de base humoral y de base celular.

BAUBER, MC NEIL, TRENTelman, SWIFT y MASON (1978) (1), encuentran una disminución de linfocitos T, después del trauma dentro de las primeras horas recuperándose a los 5 días en la serie de enfermos por ellos estudiada.

El presente trabajo tiene como objetivo,

valorar la respuesta inmunológica de base celular y humoral, en pacientes adultos jóvenes, portadores de fracturas diafisarias de tibia.

Material y método

Se han utilizado 10 pacientes adultos jóvenes portadores de fracturas diafisarias de tibia y 10 sujetos adultos jóvenes sin patología ni antecedentes traumáticos óseos.

Nada más ser ingresados en el Servicio de Urgencia, todos los pacientes de la serie, fueron sometidos a reducción e inmovilización en inguinopélico.

Aquellos enfermos que por el carácter de la fractura, tuvieron que ser anestesiados no se incluyeron en la serie por nosotros presentada.

Entre las 18-24 horas del traumatismo que había generado la fractura, se procedió a una extracción de sangre de 30 ml.

A las 72 horas, una segunda extracción de sangre fue realizada, practicándoseles una tercera a los 6 días.

De los 30 ml. de sangre, 5 ml., fueron colocados en tubos de vidrio que contenía 5 ml. de «Hanks balanced salt solution» y heparina al 5 por 100, 1 ml. de solución, para la técnica de Rosetas.

20 ml. de sangre, se colocaron en tubos de vidrio que contenía Dextrano 25 o al 5 por 100 (2'5 ml.) y 1 ml. de heparina para el test de la inhibición de la migración (MIT).

La concentración de la BSA y de PHT utilizado ha sido de 2'5 ml. ya que por encima de esta concentración se objetivó citotoxicidad.

Los 5 ml. restantes se colocaron en tubos de vidrio para la determinación de inmunoglobulinas.

Para la valoración de la respuesta inmunológica de base celular se utilizaron dos técnicas:

1) Test de Rosetas «E».

2) Test de la Inhibición de la Migración (MIT) (ROSENBERG) (1970) (22).

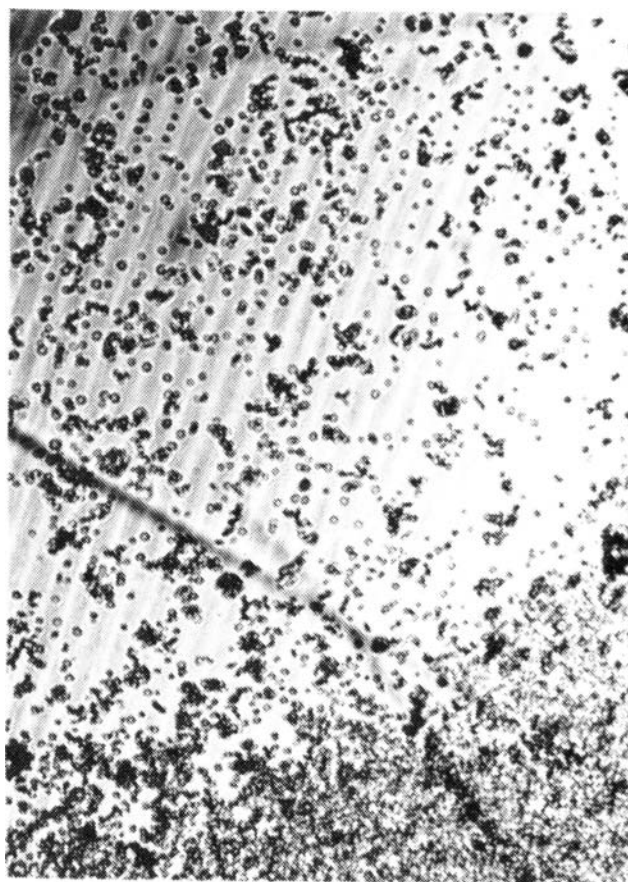
Para la determinación inmunoglobulínica, se realizó la técnica standart, valorando Ig G, Ig A e Ig M.

Test de rosetas «E»: la técnica utilizada para valoración de linfocitos T fue la de las Rosetas formadas espontáneamente por los linfocitos T con eritrocitos de carnero.

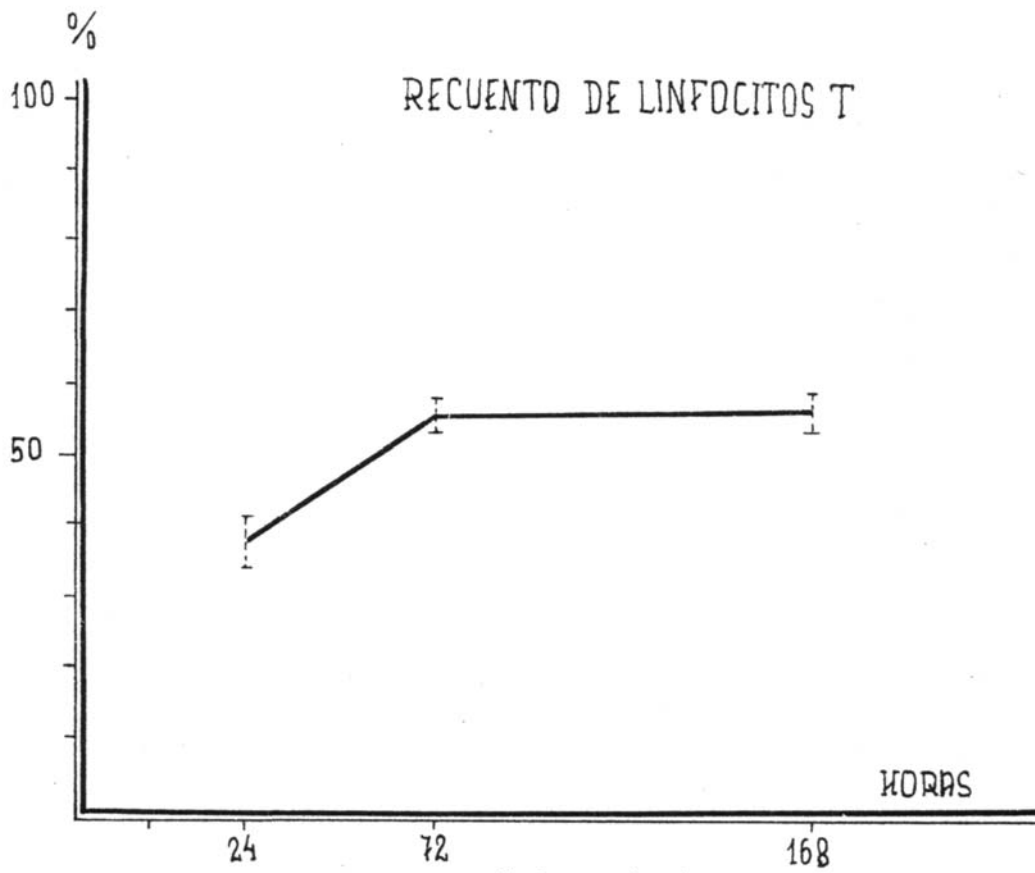
La valoración se ha hecho por recuento porcentual, al microscopio HOx en cámara de Neubaner, contando por campo el número de Rosetas formadas y el número de linfocitos que no formaron Rosetas. Esta técnica no detecta subpoblaciones de linfocitos T.

Test de la inhibición de la migración (MIT)

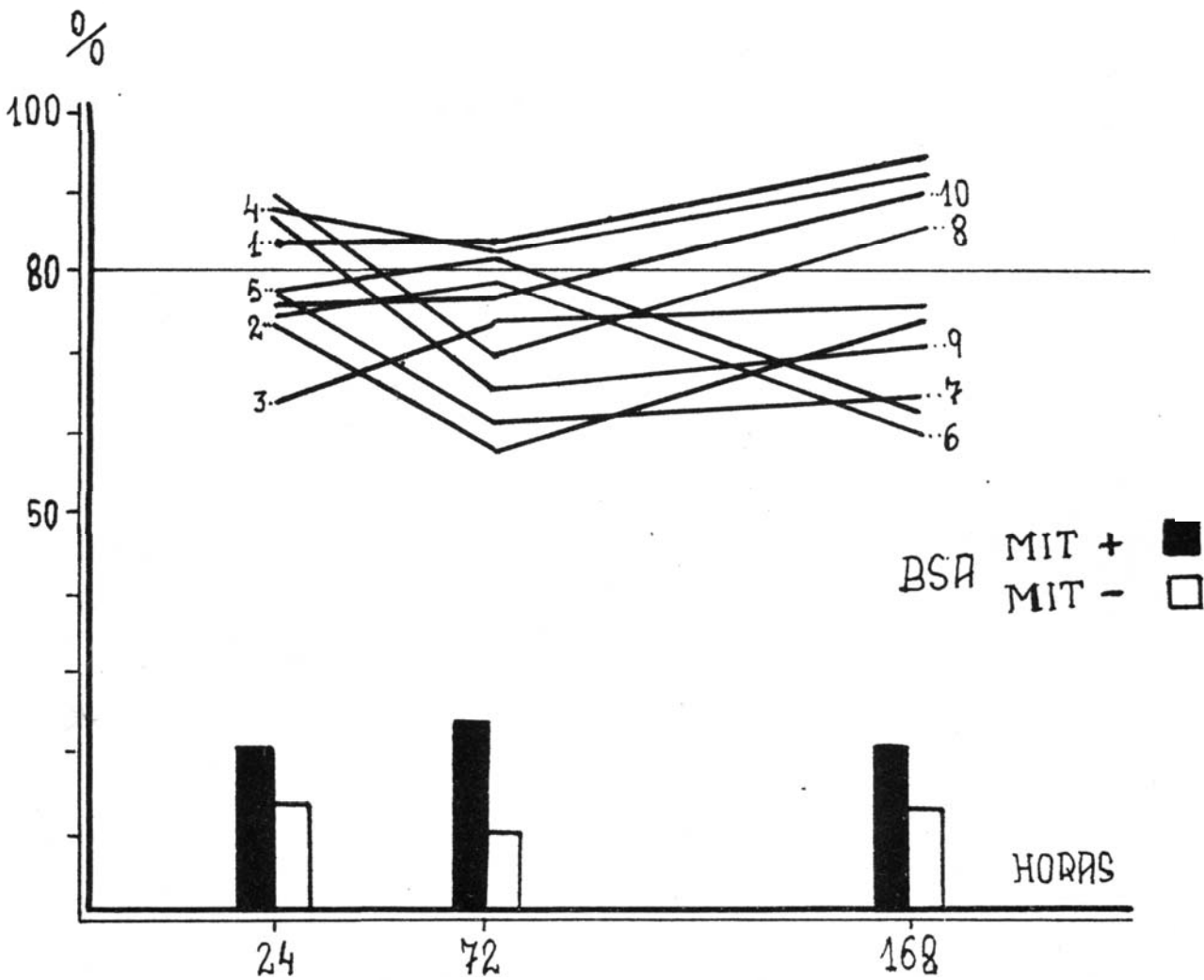
Una vez centrifugada la sangre y separados los leucocitos, éstos eran lavados con la finalidad de suprimir el plasma y las proteí-



Test de inhibición de migración (MIT), en un paciente portador de fractura diafisaria de tibia, con dispersión de células blancas (MIT negativa).



GRÁFICA NÚM. 1



GRÁFICA NÚM. 2

nas plasmáticas. El lavado se hacía tres veces con Hanks, procediéndose inmediatamente después al recuento de células.

Para ello, se mezclaban 25 ul. de la suspensión de células en Hanks con 475 ul. de líquido de Turk; conocido el número de células se le añadía 30 ul. de medio por cada 6^{10} de células; se resuspendieron y se procedió después al relleno de capilares.

Los capilares, cerrados al fuego, y fríos, fueron centrifugados durante 10 minutos a 2.000 r.p.m.

Tras la centrifugación, los capilares presentan tres partes fácilmente objetivables:

- Una zona rosa, cercana al extremo del capilar, que contiene leucocitos con hemáties.

- Una franja blanca en la interfase, donde dominan las plaquetas y

- Un líquido sobrenadante, en la parte superior que se corresponde con el medio de cultivo.

Los capilares eran cortados con una sierra metálica entre la zona rosa y blanca; de esta forma se habían desechado el medio de cultivo y las plaquetas.

Posteriormente se usó en contacto, el concentrado celular y el medio de cultivo y a concentraciones diferentes del antígeno BSA y PHT, para proceder en una última fase a la comprobación microscópica de las células en cultivo y a la medición de los diámetros de los halos de migración celular, considerándose como positivos cuando: 1) había frente nítido y 2) cuando el porcentaje de migración con respecto al control (no contiene antígeno en el medio de cultivo), era igual o menor al 80 por 100.

En el MIT, al añadirle al medio de cultivo el antígeno frente al cual los linfocitos T se encuentran sensibilizados, inducirá a éstos a liberar una linfokina (LIF), que inhibirá la libre migración de los leucocitos (RODKLIN) (1974) (21) (DOMINGUEZ ROJAS) (1980) (5).

Resultados

Los estudios realizados con el test de Rosetas, pusieron de manifiesto un porcentaje de formación de Rosetas a las 24 horas de cerca del 40 por 100, alcanzando porcentajes de cerca del 60 por 100 a las 72 horas (véase gráfica n.º 1).

Los porcentajes obtenidos a las 24 horas, han sido estadísticamente significativos con respecto a los valores estimados a las 72 y 168 horas ($p < 0.05$).

Los estudios realizados con el test de inhibición de la Migración, ponen de manifiesto, MIT positivos frente a BSA y PHT a las 24 horas de 6 y 6 respectivamente, de 7 y 8 a las 72 horas y de 6 y 7 a las 168 horas (véase gráficas n.º 2, 3, 4).

Con respecto a los 10 testigos, éstos dieron MIT negativos en el 100 por 100 de los casos para el antígeno B.S.A. y positivos en el 100 por 100 de los casos para el antígeno PHT (véase gráfica n.º 4).

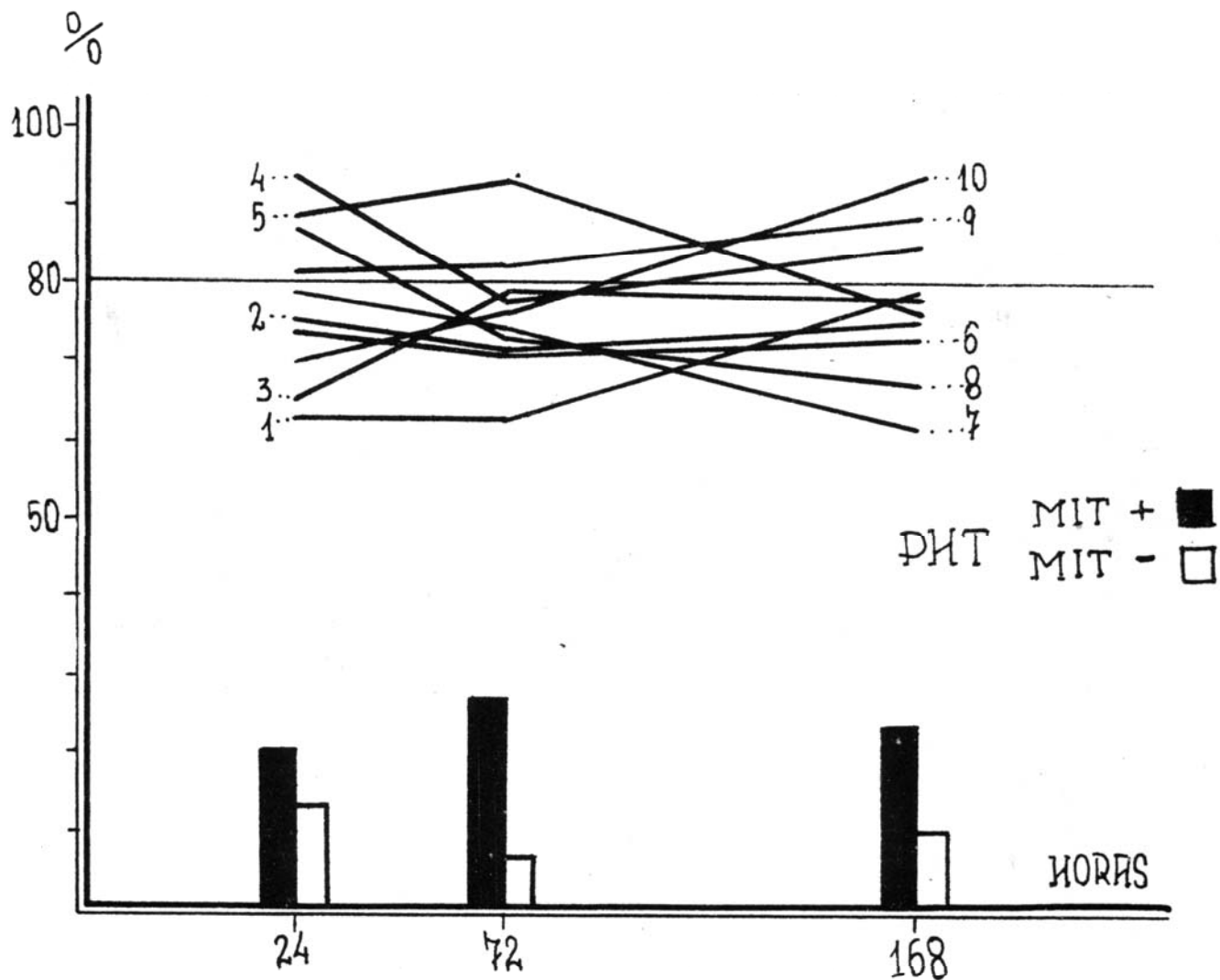
La determinación de inmunoglobulinas con métodos habituales evidenciaron cifras normales séricas de Ig G e Ig A y un aumento significativo de Ig M en las determinaciones hechas (valores por encima de 250) (véase gráfica n.º 5).

Discusión

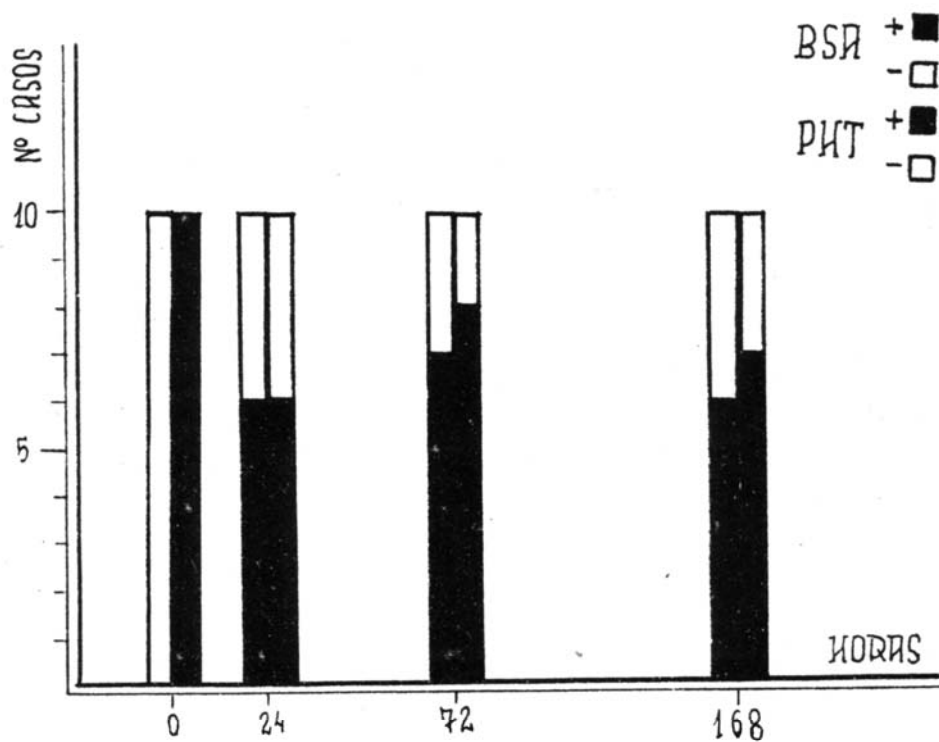
El estado de anergia, definido como un fracaso del paciente a la reacción antigénica, depende de los linfocitos T y de los macrófagos y está sujeto a la supresión por factores séricos.

MC LEAN (1975) (15), establece una estrecha relación entre la inmunidad de base celular y la edad, estando altamente deteriorada en un porcentaje estimativo de personas ancianas y siendo la mortalidad más alta en personas de edad con este defecto, que en aquéllas de la misma edad pero que presentan una función inmune celular normal.

HOWARD y SIMMONS (1974) (12), entre



GRÁFICA NÚM. 3



GRÁFICA NÚM. 4

otros, encuentran deficiencias inmunológicas adquiridas después de proceder quirúrgicos. SLADE, SIMMONS, JUNIS y GREENBERG (1975) (23) obtienen los mismos hallazgos. DAVIDSON, CLARK y SMITH (1971) (4); FLOERSHEIN, HOPFF y GASSER (1971) (8) y MC LEAN (1975) (15), encuentran deficiencias inmunológicas relacionadas con linfocitos T en infecciones severas y en el curso de septicemias. Contrariamente en estudios experimentales se objetiva respuesta de base celular cuando los animales son inmunizados con microorganismos causantes de sepsis (*Serratia marcescens*) (DOMÍNGUEZ ROJAS) (1980) (5) y DOMÍNGUEZ ROJAS, FERNÁNDEZ CRIADO y REY CALERO (1981) (6).

Un empeoramiento adquirido de la inmunidad celular se ha descrito en otras situaciones que incluyen sarcoidosis, enfermedad de Hodgkin (HERSH, OPPENHEIN) (1965) (11), así como, en la lepra, candidiasis mucocutánea crónica, mononucleosis infeccio-

sa, sífilis, muermo y talaremia (OMS) (1973) (20).

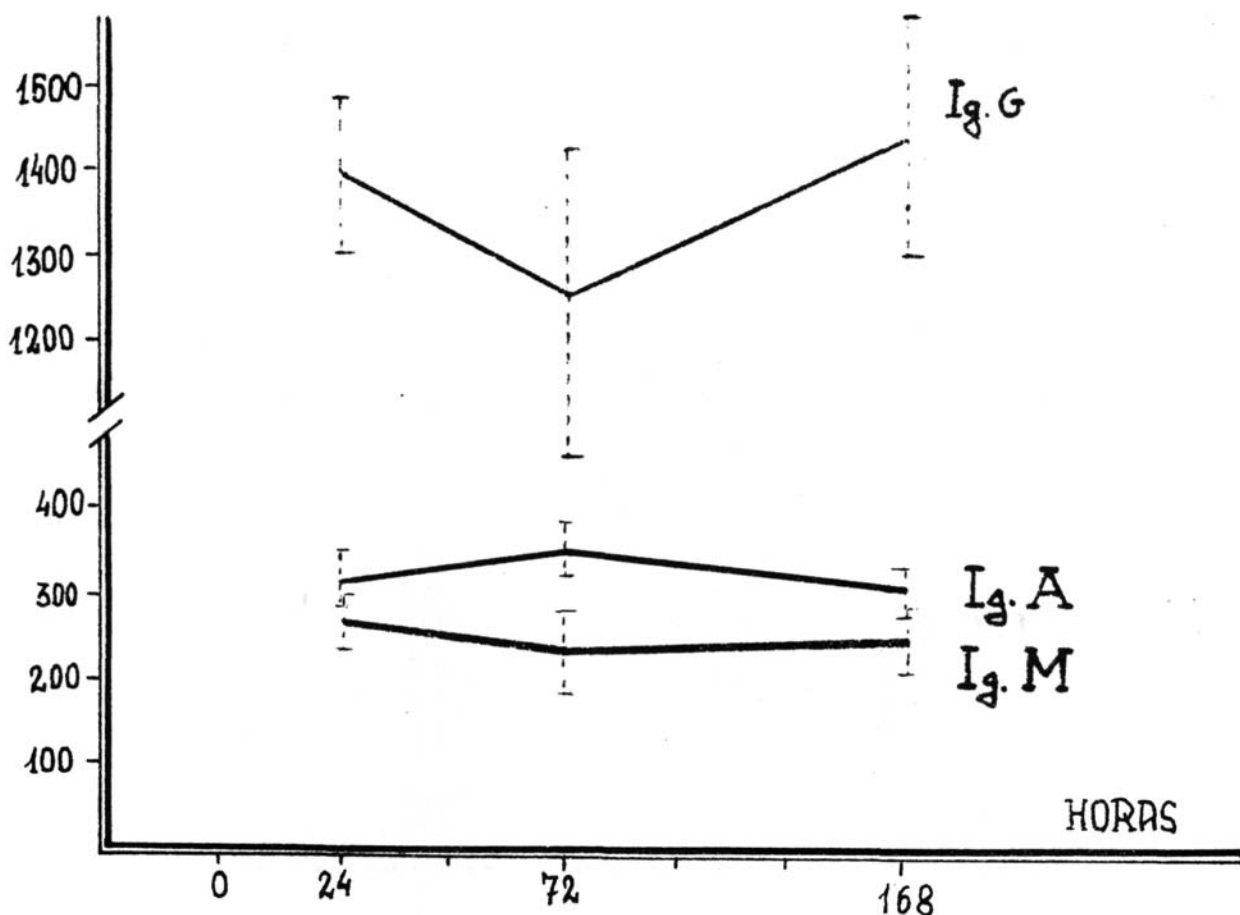
GLASGOW, NIMBERG y MENZOIAN (1974) (9), entre otros, encuentran deplección linfocitaria en pacientes con cáncer.

FARREL, DAY, TSAKRAKLIDES, GOOD y DAY (1973) (7) y NEILAN, TADDEINI y STRATE (1977) (17) obtienen una depresión de linfocitos T en pacientes quemados, y que HAKIN (1973) (10) había relacionado con la existencia de un factor inhibidor en el suero de estos enfermos.

En la última década, se han venido publicando trabajos que relacionan los traumatismos accidentales con la inmunidad de base celular.

HOWARD y SIMMONS (1974) (12), encuentran deficiencias inmunológicas adquiridas después del trauma.

MC LEAN y cols. (1975) (15), encuentran en lesiones traumáticas severas una disminución de linfocitos T, durante las primeras



GRÁFICA NÚM. 5

48 horas, con restauración a la normalidad, al quinto día.

BAUBER, MC NEIL, TRENTELMAN, SWIFT y MASON (1978) (1), encuentran depleción linfocitaria en las primeras horas después del trauma, recuperándose hacia el quinto día.

En el trabajo por nosotros efectuado se obtienen datos significativos de depresión de linfocitos T dentro de las primeras 24 horas después del trauma, recuperándose a porcentajes muy próximos a la normalidad a las 72 horas del traumatismo y siendo la recuperación completa a los 6 días.

BAVER, encuentra una relación entre la disminución sérica de linfocitos y la intensidad del trauma.

En la serie por nosotros presentada al ser homogénea en cuanto al sustrato lesional (fracturas diafisarias de tibia de trazo único, la intensidad del trauma que ha generado la fractura, se supone también homogénea).

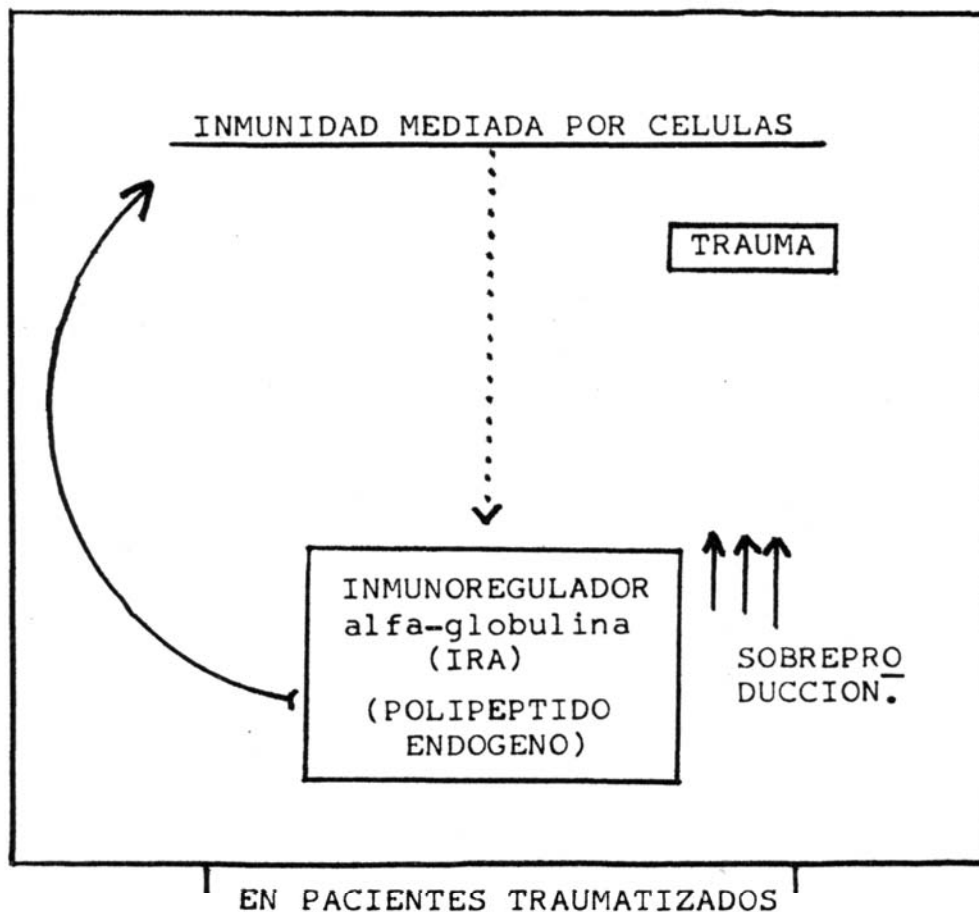
El mecanismo que genera esta depresión transitoria postraumática, ha venido siendo cuestionado.

La literatura tiene muchas referencias en cuanto a la asociación en la secreción adrenal de cortisol o su administración exógena con la depresión de la inmunidad, linfopenia y disminución directa del timo (NORTH) (1972) (18); (COHEN) (1971) (2); (LOPEZ ALONSO) (1973) (13, 14) y más recientemente por BAVER (1978) (1).

El trauma inicial, como situación stressante, estimularía la corteza suprarrenal, liberándose cortisol, quien depleccionaría los linfocitos T.

CONSTANTIAN y cols. (1977) (3) durante gran número de años, han estado ocupados en la purificación y caracterización de un agente inmuno supresor que normalmente se encuentra en el suero humano, llamado «inmunorregulador alpha-globulina (IRA)».

Originariamente se creyó que el IRA era



ESQUEMA NÚM. 1.—CONSTANTIAN y cols., 1977.

una subfracción proteica de una alpha-globulina perteneciente a la fracción IV de Colm (MANNICK y SCHMID) (1967) (16), pero más tarde se ha demostrado que es un péptido de bajo peso molecular asociado o transportado por la alpha-globulina (OCCI-HINO, GLASGOW y COOPERBAND) (1973) (19).

El IRA inhibe una amplia variedad de linfocitos T mediadores de reacciones inmunológicas, incluyendo la reacción cutánea y aloinjertos y tumores trasplantables. Quizás el IRA disminuye la fagocitosis y la resistencia a la infección bacteriana experimental.

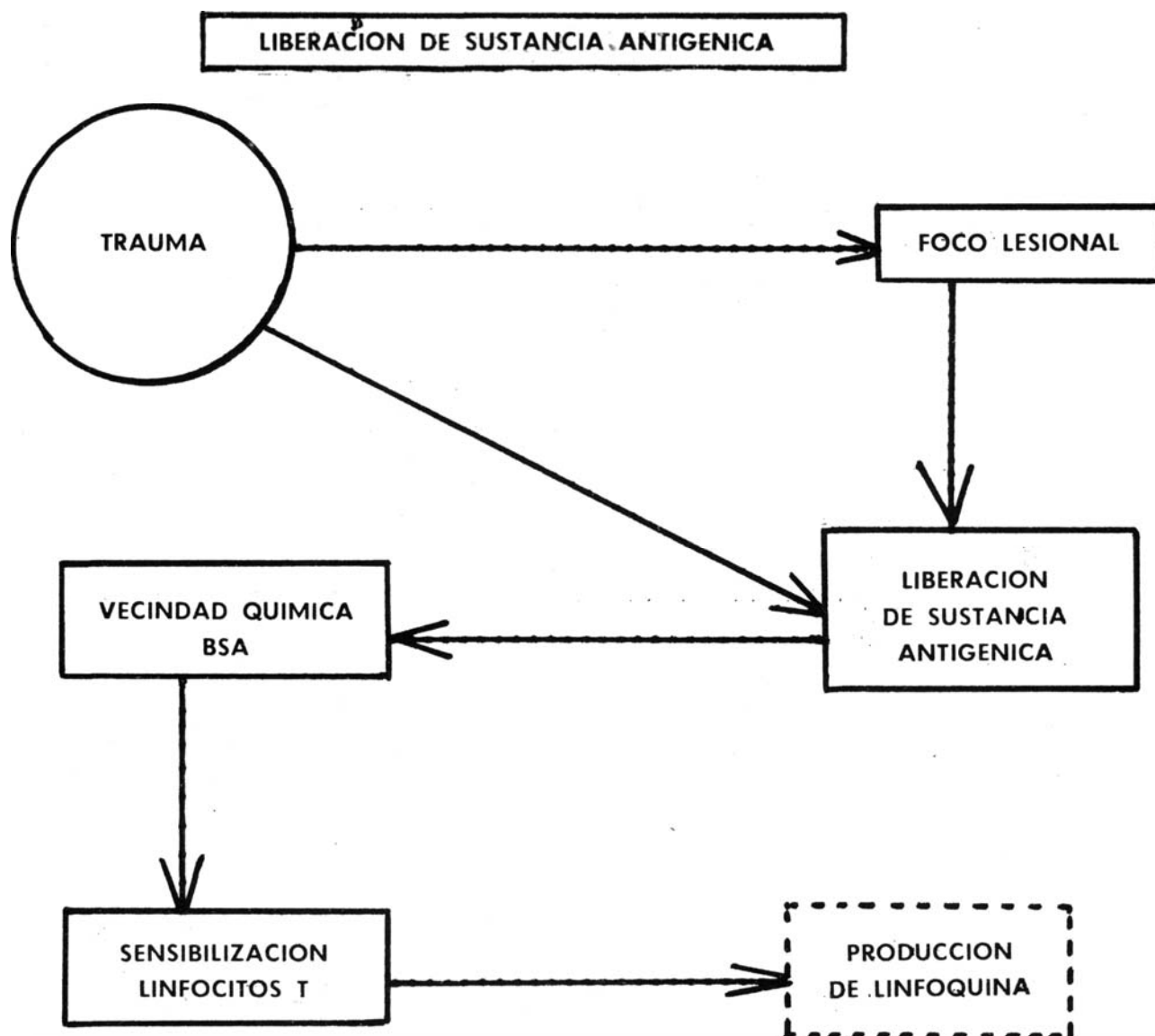
Tales datos pueden hacer sugerir que el IRA actúa como un regulador de la inmunidad mediada por células.

Una superactividad del mecanismo *feed-back* normal con excesiva producción de IRA podría ocurrir por empeoramiento de la inmunidad celular postraumática y esto se reflejaría por la existencia de un suero inmunosupresor y altas concentraciones de un polipéptido (IRA) circulante después del traumatismo (véase esq. n.º 1).

CONSTANTIAN (1977) (3), ha observado que el suero de pacientes traumatizados es inmunosupresor, pero no citotóxico.

En nuestro trabajo, no hemos encontrado depresión transitoria de las inmunoglobulinas séricas, hecho que sí ha sido evidenciado a continuación de traumatismos térmicos. NEILAN (1977) (17).

Sí que hemos obtenido cifras altas en



ESQUEMA NÚM. 2.- LÓPEZ ALONSO y cols., 1981.

cuanto a concentraciones de Ig M, no habiendo encontrado datos en la bibliografía consultada que justifique tal hallazgo.

No obstante el traumatismo térmico podría poner en marcha otros mecanismos biológicos que justificasen la deplección inmunoglobulínica y no despertados por traumatismos mecánicos.

Por otro lado, en nuestra muestra, que consideramos pequeña, hemos evidenciado, la existencia de test de migración positivo en 6 de 10 pacientes frente a PHT y BSA, no habiéndose evidenciado cambios en estos parámetros en ninguno de los ensayos «in vitro» realizados.

Nos llama la atención, la negatividad de dicho test para la BSA en el grupo control —de 10 jóvenes adultos— y así mismo no nos ha sorprendido la positividad en el mencionado grupo, cuando se empleó la PHT.

Ante estos hallazgos, pudiéramos pensar que bien por el trauma, considerado éste en un concepto amplio, o bien por cualquiera de las partes que se dan cita en el foco lesional, se pudiera liberar una sustancia, llamémosle antigénica, emparentada químicamente con la BSA que sensibilizara a los linfocitos T y de esta forma justificase la producción de linfoquina. (Esquema n.º 2).

No obstante, lo que hoy nosotros sospechamos, quizás con un estudio más amplio y detallado, pudiéramos concluir que se produce la sustancia antigénica que hoy cuestionamos.

Conclusiones

1.º En pacientes jóvenes adultos, con fractura diafisaria de tibia, de trazo único, existe una deplección de linfocitos T en las primeras 24 horas después de haberse generado el traumatismo, recuperándose a las 72 horas y alcanzando cifras normales a las 168 horas.

2.º Parece ser que esta disminución de linfocitos T, estaría en relación con la exis-

tencia de un polipéptido endógeno «inmunorregulador-globulina» (IRA) (CONSTANTIAN, 1977) (3).

3.º La inmunidad humoral no parece afectarse, obteniéndose valores de inmunoglobulinas Ig G e Ig A dentro de los límites de la normalidad y cifras altas de Ig M, cuya significación desconocemos.

4.º Por otro lado, en nuestra muestra, hemos evidenciado la existencia de test de migración positivo en 6 de 10 pacientes frente a PHT y BSA. Nos llama la atención la negatividad del MIT para la BSA en el grupo control de 10 jóvenes adultos, sanos.

5.º Cuestionamos la anterior sugerencia, relacionando la existencia de un 60 por 100 de MIT positivos en pacientes con fractura de tibia frente a la BSA, frente a un 100 por 100 de MIT negativos en sujetos jóvenes adultos sanos, con la existencia probable de una sustancia antigénica vecina en su estructura química a la BSA, que provocase una sensibilización previa en los linfocitos T y de esta forma justificase la producción de linfoquina.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAVER, A. R.; Mc NEIL, C.; TRENTELMAN, E.; SWIFT, S. A. y MASON, J. D. (1978). *Am. J. of Surg.* Vol. 136, 674-680.
2. COHEN, J. J. (1971): The effects of hydrocortisone on the immune response. *Am. Allerges*, 29, 358-367.
3. CONSTANTIAN, M. B.; MENZOIAN, J. O.; NIMBERG, R. B.; SCHMID, K. y MANNICK, J. A. (1977): Association of a circulating immunosuppressive polypeptide with operative and accidental trauma. *Am Surg.*, 185, 73-79.
4. DAVIDSON, A. I. G.; CLARK, C. y SMITH, G. (1971): Postoperative wound infection: A computer analysis. *Br. J. Surg.* 58, 333-342.
5. DOMÍNGUEZ ROJAS, V. (1980): Infección a Serratia: epidemiología, tipación e inmunología. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid.
6. DOMÍNGUEZ ROJAS, V.; FERNÁNDEZ CRIADO, V. y REY CALERO J. (1981): En prensa.
7. FARREELL, M. F.; DAY, N. K.; TSAKRALIDES, V.; GOOD, R. A. y DAY, S.D. (1973): Study of lymphocyte depletion and serum

- complement perturbations following acute buru trauma. *Surgery*. 73, 697-703.
8. FLOERSHEIM, G. L.; HOPFF, W. N. y GASSER, M. (1971): Impairment of cell mediated immune responses by pseudonomes aeruginosa. *Clin. Exp. Inmulog*. 9: 241-247.
 9. GLASGOW, A. H.; NIMBERG, R. B. y MENZOIAN, J. O. (1974): Association of anergy with an Immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. *New. Engl. J. Med.* 291, 1263-1268.
 10. HAKIM, A. A. (1973): Thermal injury: release of a cytotoxic factor. *Experientia* 29; 865-867.
 11. HERSH, E. M. and OPPENHEIM, J. J. (1965): Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkins disease. *New. Engl. J. Med.* 273, 1006-1012.
 12. HOWARD, R. J. y SIMMONS, R. L. (1974): Acquired immunologic deficiencies after trauma and surgical procedures, collective review. *Sur. Gynecol. Obstet.* 139: 771.
 13. LÓPEZ ALONSO, A. (1973): Respuesta inmunitaria primaria y secundaria en el perro después de la derivación espleno-cava. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
 14. LÓPEZ ALONSO, A. (1974): Enfermedad postoperatoria e inmunidad humoral. *Archivos de la Facultad de Medicina de Madrid*.
 15. Mc LEAN, LL.; MEAKINS, J. L.; TAGUCHI, K.; DUIGNAN, J. P.; DHILLON, K. S. y GORDON, J. (1975): Host resistance in sepsis and trauma. *Am. Surg.* 182, 207-216.
 16. MANNICK, J. A. y SCHMID, K. (1967): Prolongation of allograft survival by an alpha-globulin isolated from normal blood. *Transplantation*. 5; 1231-1237.
 17. NEILAN, B. A.; TADDEINI, L. y STRATE, R. G. (1977): Tlymphocyte rosette formation after major burus. *JAMA*. 238: 493-496.
 18. NORTH, R. J. (1972): The action of cortisone acetate on cell-mediated immunity to infection. *Cell Inmulog*. 3, 501-507.
 19. OCCHINO, J.; GLASGOW, A. M. y COOPERBAND, S.R. (1973): Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from human plasma. *J. Immunol.* 110, 685-691.
 20. O. M. S. (1973): Serie informes técnicos. N.º 519.
 21. RODKLIN, R. E. (1974): «Products of activated lymphocytes: Leucocytes inhibitory factor (LIF), distint from inhibitory factor (MIF), *J. Inmmul.* 112, 1461.
 22. ROSENBERG, S. A. y DAVID, J. R. (1970): Inhibition of leucokocysts migration: an evaluation of this «in vitro» assay of delayed hypersensitivity in man to soluble antigen». *J. Inmmul.* 105, 1447.
 23. SLADE, M. S.; SIMMONS, R. L.; YUNIS, E. y GREENBERG, L. J. (1975): Inmonodepression after major ain normal patients. *Surgery*, 78, 363-368.