

# Reacción de fase aguda tras agresión inflamatoria. Estudio experimental

L. Sánchez\* / M. C. Solares\* / J. M. Zozaya\* / M. Muñoz\* / P. Liso\*

## RESUMEN

Es un hecho bien conocido que la agresión inflamatoria produce importantes alteraciones en los niveles de proteínas plasmáticas. De entre ellas, la haptoglobina y la fracción C<sub>3</sub> del complemento, proteínas reactantes de fase aguda, se consideran importantes mediadores de la respuesta inflamatoria aunque no es bien conocida la especificidad de su comportamiento.

En el presente trabajo hemos estudiado las variaciones plasmáticas de dichas proteínas tras una agresión inflamatoria inducida

experimentalmente en ratas, relacionando su comportamiento con el estado de las lesiones. Nuestros resultados demuestran que aunque los niveles plasmáticos de ambas proteínas se encuentran elevados durante la agresión inflamatoria, la haptoglobina traduce con mayor fiabilidad los fenómenos locales que ocurren en el foco inflamatorio, sugiriendo una especificidad de cada reactante de fase aguda dependiente del tipo de agresión sufrida.

## Introducción

Cuando el organismo sufre una agresión, independientemente del tipo y características de ésta, reacciona dando lugar a una serie de cambios metabólicos que forman parte del proceso morboso<sup>1, 2</sup>. Estas alteraciones generales afectan a muchas vías metabólicas y entre ellas a la síntesis proteica. En general se establece un balance nitrogenado negativo con un aumento del catabolismo proteico como medio de obtención de la energía necesaria para conseguir el trabajo químico, eléctrico y térmico necesario para mante-

ner la homeostasia, logrando una reacción eficaz contra el proceso morboso<sup>2, 3</sup>.

Algunas de las modificaciones incluidas en este esquema general varían con la intensidad de la agresión, pudiendo ser por tanto utilizadas como parámetros evolutivos de las lesiones producidas.

Existe un grupo de proteínas, denominadas reactantes de fase aguda (PRFA), que ven aumentada su síntesis hepática durante la fase aguda del trauma, constituyendo los componentes proteicos de la reacción de fase aguda (RFA)<sup>4, 5</sup>.

La intensidad de la RFA varía con la importancia de la agresión, por lo que las PRFA han sido utilizadas en el diagnóstico y seguimiento de numerosas enfermedades de diferente etiología<sup>6-19</sup>.

Aunque la reacción de fase aguda es considerada un mecanismo inespecífico de respuesta del organismo, los nuevos descubrimientos que sobre las acciones biológicas de las PRFA se van describiendo, demuestran la acción específica sobre determinados mediadores biológicos de la respuesta inflamatoria. Esto realza la importancia de un estudio detallado y por separado de cada reactante ante diversas formas de agresión con el fin de establecer los diferentes comportamientos de cada proteína y su valor en el diagnóstico y seguimiento de lesiones específicas.

Por ello, realizamos una lesión inflamatoria en la rata y determinamos los niveles de haptoglobina (Hp) y la fracción C<sub>3</sub> del complemento en plasma a lo largo de un mes, comparando los resultados con el estado de las lesiones.

## Material y métodos

Se utilizaron 30 ratas Wistar, hembras, de unos 200 g de peso, con una

edad aproximada de 8 semanas, todas ellas procedentes del animalario de la Universidad de Navarra. Durante el experimento recibieron una dieta común, "ad libitum".

Agresión inflamatoria: se obtuvo mediante inyección subcutánea en la pata del animal de aceite de trementina a la dosis de 0,5 ml/100 g de peso.

Obtención y conservación del suero: se realizó por punción intracardiaca, tras la retracción del coágulo, el suero fue almacenado en nevera a -30 °C hasta su posterior manipulación. Con el fin de espaciar la toma de muestras, el total de ratas se dividió en dos grupos de 15 animales cada uno que se pincharon, antes de la lesión, y a días alternativos cuando habían transcurrido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 22 y 29 días de la inyección de trementina.

Estudio anatómico: se realizó mediante disección de la lesión y toma de muestras para estudio microscópico con tinción de hematoxilina y eosina, cuando habían transcurrido 48 horas y un mes de la inyección.

Metodología y antisueros empleados en la valoración cuantitativa de Hp y C<sub>3</sub>: la determinación se hizo por inmunodifusión radial cuantitativa de Mancini. Para valorar la Hp se utilizó un antisuero monoespecífico fabricado por nosotros mismos en conejo tras la inyección de Hp 1-1 humana, aislada mediante una técnica modificada de precipitación por fenol de un "pool" de sueros normales. Para el C<sub>3</sub> se utilizó antisuero monoespecífico de los laboratorios Cappel (USA), a una concentración en el agar de 2 %.

Estudio estadístico: se realizó con un ordenador IBM 4341, mediante la aplicación del programa BMDP (California. USA. Brown MB 1981), utilizándose el test de la t de Student y su variante para datos pareados.

\* Servicio de Digestivo. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

## Resultados

1. Lesión producida por el aceite de trementina: a las 24 horas aparecía una tumoración local de unos 2 cm, dura, dolorosa, caliente y que provocaba una clara impotencia funcional (cojera) en el animal. A las 48 horas la lesión era más evidente y su estudio microscópico reveló la existencia de una densa banda formada por restos de tejidos necrosados, entremezclados con leucocitos y polimorfonucleares, que se continuaba con un tejido de granulación rico en vasos, células mononucleadas (histiocitos, células plasmáticas, linfocitos) y fibroblastos (Fig. 1).

A los 30 días de la inyección las lesiones macroscópicas habían desaparecido casi en su totalidad, persistiendo únicamente unas formaciones nodulares de 2-3 mm, formadas por un área de necrosis central y una banda inflamatoria de similares características a las descritas anteriormente (Fig. 2).

2. Valores plasmáticos de Hp: se incrementaron precozmente, alcanzando el pico máximo a las 48 horas, con valores 5 veces por encima del basal ( $p < 0,001$ ). Posteriormente descendieron paulatinamente. Cuando habían transcurrido 4 semanas de producido el estímulo inflamatorio, persistían valores de Hp significativamente por encima del basal ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3).

3. Valores plasmáticos de  $C_3$ : presentaron una elevación significativa a las 48 horas ( $p < 0,001$ ), alcanzando el pico máximo entre el octavo y noveno día. A las 4 semanas de producido el estímulo los valores plasmáticos habían descendido, pero permanecían significativamente elevados respecto al basa ( $p < 0,001$ ) (Fig. 4).

## Discusión

La posibilidad de determinar la Hp en la rata por un antisuero frente a la subclase Hp 1-1 de la haptoglobina humana se debe a la existencia de antigenicidad cruzada entre la Hp del animal y la Hp 1-1 humana. Esta circunstancia no ha podido encontrarse para las subclases Hp 2-1 y Hp 2-2 posiblemente debido a que la Hp 1-1 es la única físico-químicamente homogénea<sup>20, 21</sup>.

Si bien es frecuente utilizar como modelo experimental para la producción de una lesión inflamatoria la laparotomía o fractura de una extremidad, la inyección de trementina por vía subcutánea produce una lesión inflamatoria típica, como lo demuestra el



Fig. 1.—Lesión inflamatoria a las 48 horas de la agresión, provocada por inyección subcutánea de aceite de trementina.



Fig. 2.—Formaciones nodulares presentes a los 30 días de la agresión inflamatoria.

estudio histológico realizado en el presente trabajo, siendo su ejecución y dosificación sencillas y obteniéndose a nuestro parecer una agresión más fácil de valorar cuantitativamente y un grupo de estudio más homogéneo y previsiblemente más asequible a un estudio comparativo.

En general, la valoración de Hp y  $C_3$  plasmáticos tras el estímulo inflamatorio con trementina permitió reconocer una elevación de ambas proteínas, más importantes en el caso de Hp, con descenso posterior conforme mejoraban las lesiones tanto desde el punto de vista clínico como anátomo-patológico.

El comportamiento de ambas proteínas es coherente con su función como PRFA. La explicación se encuentra en que existe un incremento de su síntesis por el hígado<sup>22, 23</sup>, sin que esté claramente establecido si el incremento ocurre por aumento del número de hepatocitos dedicados a esta función o por mayor actividad de los que trabajan en condiciones basales<sup>23</sup>. Es posible que se den ambas circunstancias llegando así a quintuplicar el valor basal en el caso de la Hp. En lo que concierne a la Hp, se sabe que durante la agresión inflamatoria existe una disminución de su catabolismo, como

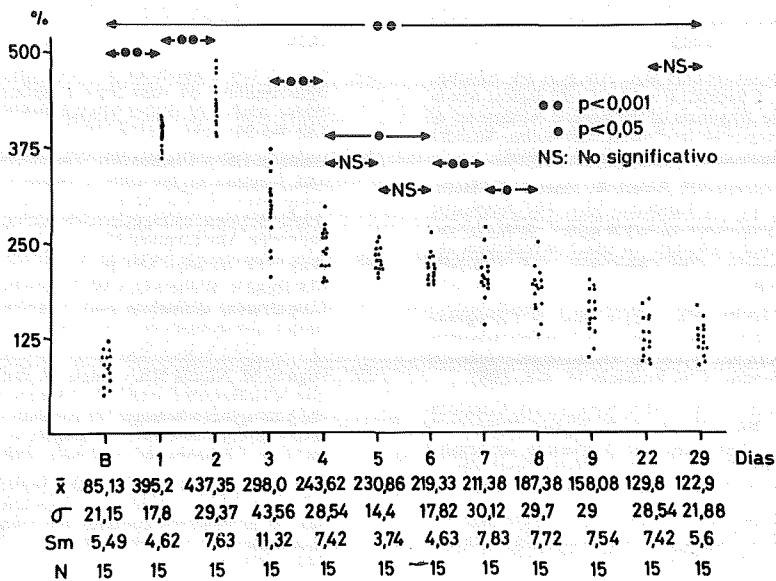


Fig. 3.—Valores plasmáticos de haptoglobina en la rata tras la agresión inflamatoria.

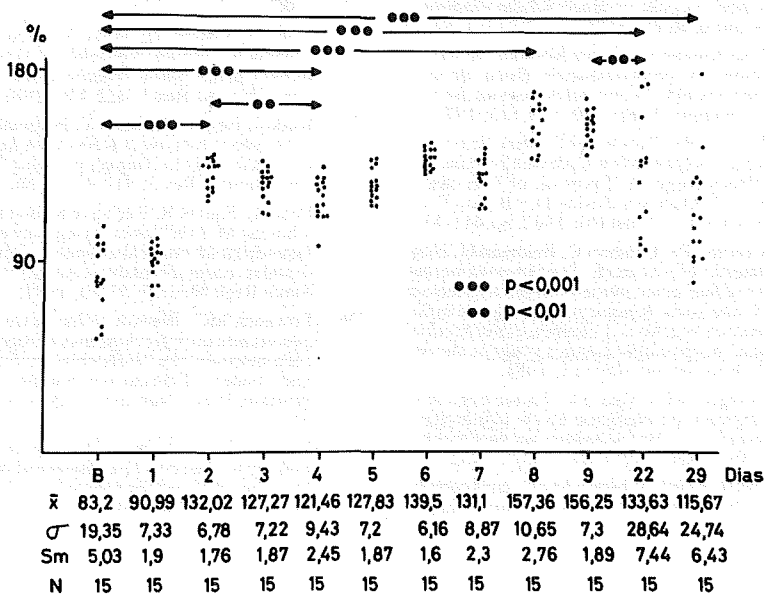


Fig. 4.—Valores plasmáticos de C<sub>3</sub> en la rata tras agresión inflamatoria.

consecuencia de un descenso de la capacidad de la membrana hepatocitaria para captar su forma desializada<sup>24-26</sup>. Este fenómeno puede también explicar el incremento plasmático de Hp y los altos valores que alcanza en sangre.

De forma general y a la vista de los resultados podemos decir que el comportamiento de la fracción C<sub>3</sub> del complemento es más irregular que el de la Hp, y su valor menor en el seguimiento de la lesión, si bien posee cierta sensi-

bilidad, pues cuando ha transcurrido un mes del estímulo y existen aún lesiones microscópicas, se hallan valores significativamente por encima del basal.

Las diferencias de comportamiento entre ambas proteínas pueden explicarse si tenemos en cuenta algunas de las peculiaridades del metabolismo del C<sub>3</sub>. Su valor plasmático es el resultado de un equilibrio entre la síntesis, que indudablemente está aumentada, y la activación de la molécula con ruptura

de la misma en los fragmentos C<sub>3a</sub> y C<sub>3b</sub><sup>27</sup>. Algunos de los productos liberados en el foco inflamatorio, como las proteasas, son capaces de activar el C<sub>3</sub><sup>28</sup>. Por ello ante una agresión inflamatoria inespecífica, el control del valor plasmático del C<sub>3</sub> posee un cierto interés diagnóstico en cuanto a la existencia o no de lesiones; pero su valor como parámetro evolutivo es muy discutible, pues su valor plasmático depende de diversos factores que hacen muy complicada la interpretación de los resultados.

El comportamiento de la Hp es más sencillo, con incrementos mayores y evolución posterior más homogénea, tendiendo a la normalidad al disminuir las lesiones, siendo su valor diagnóstico y evolutivo mayor que el del C<sub>3</sub>.

Se debe tener en cuenta que de todas las PRFA la Hp es la que posee más funciones, comportándose como anti-proteasa<sup>29</sup>, peroxidasa y antioxidante<sup>22</sup>; activa los procesos reparadores tisulares, estimulando la síntesis del colágeno, lo que explicaría su aumento en etapas tardías de la inflamación<sup>30</sup>; inhibe la síntesis de prostaglandinas, sustancias de alto valor flogógeno, que a su vez estimulan la síntesis de Hp<sup>31</sup>; ejerce un papel modulador sobre la respuesta inmunológica, inhibiendo la proliferación linfocitaria en respuesta a diversos mitógenos<sup>32-35</sup>; inhibe la migración leucocitaria<sup>32</sup>, hecho de gran importancia si se tiene en cuenta que el estímulo para la síntesis de PRFA probablemente se elabora en el foco inflamatorio consistiendo en una serie de sustancias sintetizadas por los leucocitos y entre las que se encuentra el mediador endógeno leucocitario (MEL)<sup>36, 37</sup>.

Así pues, la Hp posee importantes acciones, controlando la actividad inflamatoria en el foco, que a su vez estimula su síntesis, e inhibiendo la aparición de complicaciones inmunológicas que podrían perpetuar las lesiones. Por todo ello sus valores plasmáticos, al contrario de lo que ocurre con el C<sub>3</sub>, traducen con bastante fiabilidad los fenómenos locales del foco inflamatorio.

Estudios parecidos al realizado en este trabajo nos llevan a la conclusión de que si bien existe una elevación en los valores plasmáticos de PRFA tras una agresión, los patrones de respuesta para cada proteína son diferentes y su utilidad en el seguimiento de las lesiones distinta. Todo ello confiere a la reacción de fase aguda una cierta especificidad dependiente del tipo de agresión sufrida y que puede explicarse por las diferentes acciones de los reactantes de fase aguda.

## Bibliografía

1. Sánchez L, de Oca J, Voltas J y Liso P. *Reactantes de Fase Aguda: Fisiología y relación con el estado nutricional*. Nutrición hospitalaria 10: 45-52, 1984.
2. Gann DS. *Endocrine and metabolic responses to injury*. En "Principles of Surgery". Editado por Schwartz, S.I., Shirs, G.T., Spencer, F.C. y Storer, E.H. Mc Graw-Hill Book Co. Nueva York 1982, pp. 276-279.
3. Crane CW, Picou D, Smith A y Waterlow JC. *Protein turnover in patients before and after elective orthopedic operations*. Brit J Surg 64: 129-131, 1977.
4. Koj A. *Acute-phase reactants. Their synthesis, turnover and biological significance*. En "Structure and function of plasma protein". Editado por Allison, A.C. Pleumun Press. Londres 1974, vol. I, pp. 73-125.
5. Grann W y Rodger A. *Endocrinology*. En "Pathophysiology. The biological principles of diseases". Editado por Smith y Ther. Saunders Co. Londres 1981, pp. 653-754.
6. Amiguet JA, Bueno J, Llorente P, Muñoz M, Jiménez A y Liso P. *Antiproteasas séricas en el carcinoma de colon. Estudio de la alfa 1-antitripsina*. N Arch Fac Med 42: 295-297, 1984.
7. Paolaggi JB, Chacout D, Barres D, Hoffman H y Auquier L. *Etude des variations comparées de la vitesse de sédimentation de l'haptoglobine et de l-orosomucoide au cours de l'évolution des pseudopolyarthrites rhizoméliques et arterites temporales*. Sem Hop Paris 59: 523-528, 1983.
8. Perier C, Chamson A, Engler R y Frey J. *Evolutionary changes in acute-phase proteins in alcoholic hepatocellular diseases*. Clin Chem 29: 45-47, 1983.
9. Arnand JR y Comet B. *Pattern of serum proteins involved in the inflammatory reaction that accompanies obliterating arteriopathies of the lower limbs, stage II*. Sem Hop 58: 1.983-1.988, 1982.
10. Chu C, Lai L y Potrala MP. *Value of plasma alpha-1 acid glycoprotein assay in the detection of human colorectal cancer: comparison with carcinoembryonic antigen*. JNCI 68: 75-79, 1982.
11. Edwards JD, Lalka D, Cerra F y Slaughter RL. *Alpha-1 acid glycoprotein concentration and protein binding in trauma*. Clin Pharmacol Ther 31: 62-67, 1982.
12. Gobbi P, Merlini G, Attardo Parrinello G, Cavalli P y Ascari E. *Serum alpha-1-acid-glycoprotein, haptoglobin, and C3 in Hodgkin's disease*. Acta haemat 67: 255-262, 1982.
13. Jones GL. *Plasma anti-proteases in Duchenne muscular dystrophy*. Biochem Med 27: 1-7, 1982.
14. Muñoz Navas MA, Amiguet JA, Sánchez L, Conchillo F y Liso P. *Biological test in the diagnosis of the hepatic metastases of the gastric and colon carcinoma*. Scand J Gastroent 17, supl. 78: 334, 1982.
15. Chapelle JP, Albert A, Smeets JP, Heusghem C y Kulbertus ME. *The prognostic significance of serum alpha-1-acid glycoprotein changes in acute myocardial infarction*. Clin Chim Acta 115: 199-209, 1981.
16. Fish RG, Yap AKL y James K. *Changes in serum acute phase proteins in breast cancer patients receiving methotrexate infusion therapy*. Clin Biochem 15: 4-8, 1981.
17. Muñoz Navas MA, Amiguet JA, Conchillo F, Prieto J y Liso P. *Biological diagnosis of the hepatocellular carcinoma associated with liver cirrhosis: Clinical and experimental study*. Gut 22: 443-444, 1981.
18. Klasen EC, Biemond I y Weterman IT. *Alfa-1-antitripsin levels and phenotypes in Crohn's disease in the Netherlands*. Gut 21: 840-842, 1980.
19. Sánchez L, de Oca J, Muñoz M, Zozaya J y Liso P. *Niveles plasmáticos de C3 durante la desnutrición y el stress inflamatorio. Estudio experimental en rata*. N Arch Fac Med 41: 351-353, 1983.
20. Liso Irurzun P y Pérez-Miranda M. *Aislamiento de una subclase de haptoglobina sérica y su caracterización física e inmunológica*. Rev Esp Fisiol 31: 207-211, 1975.
21. Liso Irurzun P y Pérez Miranda M. *Aislamiento y caracterización física de una fracción alfa-1-ácido glicoproteína del suero humano*. Sangre 20: 113-116, 1975.
22. Moore DH y Koelessar D. *Hepatic synthesis and degradation of plasma proteins*. En "Hepatology. A Textbook of liver diseases". Editado por Zakim, D. y Boyer, T. D. Saunders Co. Filadelfia 1982, pp. 411-432.
23. Courtoy PJ, Lombart C, Feldman G, Hoghilersky N y Rogier E. *Synchronous increase of four acute phase proteins synthesized by the same hepatocytes during the inflammatory reaction. A combined biochemical and morphologic kinetics study in the rat*. Lab Invest 44: 105-115, 1981.
24. Weigel PH y Oka JA. *Endocytosis and degradation mediated by the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes*. J Bio Chem 257: 1.201-1.207, 1982.
25. Wong MWC y Jaimeson JC. *Evidence for reduced uptake of asialo alpha-1-acid glycoprotein during the acute phase response to inflammation*. Life Sci 25: 827-830, 1979.
26. Kaplan HA y Jamieson JC. *The effect of inflammation on rat liver B-galactosidase and B-N acetyl glycosaminidase*. Life Sci 21: 1.311-1.316, 1977.
27. Isenman DE y Cooper NR. *The structure and function of the third component of complement I. The nature and extent of conformational changes accompanying C3 activation*. Mol Immunol 18: 331-339, 1981.
28. Widier JT, Baresmes MP, Brown R, Cooper MJ, Read R, Walters G. y Willianson RCN. *Complement activation and complement control proteinases in acute pancreatitis*. Gut 23: 944-950, 1982.
29. Pagano M, Nicola NA y Engler R. *Inhibition of cathepsin L and B by haptoglobin, the haptoglobin-hemoglobin complex and asialohaptoglobin. In vitro studies in the rat*. Can J Biochem 60: 631-637, 1982.
30. Vieillard A, Lombart C, Borel JP, Jayle ME y Leroux MRS. *Influence of haptoglobin and its hemoglobin complex on collagen biosynthesis in vitro*. Pathol Biol 22: 741-742, 1974.
31. Shim BS y Hong KJ. *The effect of prostaglandin I2 and 6-Keto-prostaglandin F1 on serum haptoglobin level in rabbits*. Korean J Biochem 13: 93-97, 1981.
32. Samak R, Edelstein R e Israel L. *Immuno-suppressive effect of acute-phase reactant proteins in vitro and its relevance to cancer*. Cancer Immunol Immunother 13: 38-43, 1982.
33. Kudo J, Ohudo H, Ikuta T, Inoue T y Shibata K. *Inmunoregulatory function of human acute phase reactive (APR) proteins*. Biomed Res 3: 422-428, 1982.
34. Kudo J, Ohudo H e Ikuta T. *Interaction of acute phase reactive proteins with lecithins: its relationship to lymphocyte transformation*. Biomed Res 3: 417-421, 1982.
35. Israel L, Samak R, Edelstein R, Bogucki D y Samak M. *Inhibition of lymphocyte blastogenesis and monocite chemotaxis by acute phase reactant proteins*. Colloq-Inst Natl Sante Rech Med 97: 53-63, 1981.
36. Powanda MC. *The role of leucocyte endogenous mediator (endogenous pyrogens) in inflammation*. En "Inflammatory diseases and copper". Editado por Sorenson JRI. Humana Press, New Jersey 1982, pp. 31-34.
37. Ritchie DG y Fuller GM. *An in vitro bioassay for leucocytic endogenous mediator using cultured rat hepatocytes*. Inflammation 5: 275-287, 1981.

## ACUTE-PHASE REACTION AFTER INFLAMMATORY INJURY. AN EXPERIMENTAL STUDY

### Summary

It is well known that inflammatory aggression makes important changes in plasma proteins levels. Among all of these proteins, C<sub>3</sub> fragment of the complement system and haptoglobin, Acute Phase Reactants Proteins, are considered important mediators of the inflammatory response although their specific behaviour is not completely understood.

In this work we have studied the modification of both proteins after an inflammatory aggression, which was experimentally induced in rats, trying to connect their behaviour with the lesion stages.

Our data show that the plasmatic level of both proteins is increased during the inflammatory aggression, although haptoglobin level gives a more accurate approach to the local phenomena which occur in the inflammatory focus. This fact suggests that each acute phase reactant has a certain specificity depending on the kind of aggression suffered by a patient.