

# Influencia del trauma térmico y de la administración de colina y cianocobalamina sobre la respuesta celular del exudado peritoneal en ratones

AARÓN LECHTIG<sup>1</sup> y MANUEL BOCANEGRA C.<sup>2</sup>  
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP),  
Guatemala, C.A.

## RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio para determinar la influencia de la quemadura severa y del tratamiento con colina y cianocobalamina sobre la proporción de células polimorfonucleares (PMN%) del exudado peritoneal. Se utilizaron ratones albinos suizos: "normales", "quemados" y "quemados tratados" y un modelo estandarizado de quemadura que compromete 30% del área corporal. El tratamiento consistió en la administración por vía intraperitoneal de colina (1 mg/100 g/12 horas) y cianocobalamina (50 mcg/100 g/24 horas) a partir de las 4 horas postquemadura. A las 72 horas del trauma cada grupo fue subdividido en dos, según el tipo de inóculo intraperitoneal: solución salina (NaCl 0.9%) o *Pseudomonas aeruginosa* (PsA). Tres horas después del inóculo dos observadores independientes determinaron el PMN% sobre un total de 200 células del exudado peritoneal. Se estudió, además, la actividad de anticuerpos séricos anti-PsA por hemaglutinación pasiva.

No hubo diferencia entre los grupos de "normales" y "quemados" en cuanto al porcentaje de PMN en respuesta al inóculo de solución salina. En cambio el grupo de "quemados tratados" mostró un incremento significativo de dicha proporción. Comparado con el inóculo de solución salina, el inóculo de PsA se asoció con un incremento del PMN%, tanto en los

1 Actualmente, Oficial Médico de la División de Desarrollo Humano, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.

2 Profesor Asociado del Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Publicación INCAP E-507

Recibido: 24 2-1971

"normales" como en los "quemados tratados", no así en el grupo de "quemados", en el cual disminuyó significativamente.

Los resultados sugieren que la quemadura reduce la capacidad de los polimorfonucleares para afluir al foco inflamatorio; que este efecto es uno de los mecanismos de disminución de la resistencia contra la infección, y que el tratamiento neutraliza tal efecto. Los datos indican además, que el estudio de la proporción de polimorfonucleares del exudado peritoneal es un método útil para estudiar los cambios producidos por la quemadura en los mecanismos celulares de defensa.

## INTRODUCCION

Los progresos logrados en el tratamiento del shock causado por quemaduras graves, han permitido reducir significativamente la mortalidad precoz, es decir, la que se produce en las 48 horas subsiguientes al trauma (1, 2). Sin embargo, se ha observado que aproximadamente el 40% de los pacientes que sobreviven a esta fase aguda mueren más tarde por infección sistemática, un 60 a 80% de la cual es producida por *Pseudomonas aeruginosa* (PsA) (3, 4).

Esta elevada frecuencia de infección se debería a dos factores: la aparición de una extensa "puerta de entrada", y la alteración de los mecanismos inespecíficos de defensa (1, 4-7). Entre estos últimos se ha demostrado que la capacidad fagocítica del sistema reticuloendotelial (SRE) disminuye notablemente (1, 8), y esto sugiere que los activadores inespecíficos del SRE, administrados después de la quemadura, podrían ser de utilidad para prevenir la infección. Dos de tales agentes, la colina y la cianocobalamina, son capaces de contrarrestar la disminución de la capacidad fagocítica del SRE que se produce en ratones por el tratamiento con altas dosis de cortisona (9). El objetivo de este trabajo fue observar la influencia del trauma térmico y de la administración de colina y cianocobalamina sobre la proporción de polimorfonucleares (PMN%) en el exudado peritoneal de ratones. Se estima que el estudio de los efectos y mecanismos de acción de estas sustancias puede proporcionar información útil para reducir la elevada mortalidad por infección que se presenta en pacientes con quemaduras graves.

## MATERIAL Y METODOS

El diseño experimental a que se ciñó el estudio aquí descrito se resume en el Cuadro No. 1.

CUADRO Nº 1  
DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupos	Quemadura	Tratamiento <sup>1</sup>	Inóculo <sup>2</sup>	Número de casos	Estudios realizados (3 horas postinóculo)	
"Normales"	No	No	Solución salina*	(13)	} PMN% en exudado peritoneal	
			PsA**	(18)		
"Quemados"	Sí	No	Solución salina	(10)		
			PsA	(19)		
"Quemados tratados"	Sí	Sí	Solución salina	(20)		} Anticuerpos anti-PsA en suero
			PsA	(22)		

<sup>1</sup> Administrado por vía intraperitoneal a partir de las 4 horas postquemadura: colina (1 mg/100 g/12 horas) + cianocobalamina (50 mcg/100 g/24 horas).

<sup>2</sup> Aplicado por vía intraperitoneal a las 72 horas postquemadura.

\* 0.5 ml de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.

\*\* 0.5 ml de *Pseudomonas aeruginosa* T 488, 2 x 10<sup>8</sup> bacterias/ml.

### *Ratones*

Se utilizaron ratones albinos suizos de ambos sexos, de dos a tres semanas de edad, cuyo peso fluctuaba entre 17 y 21 gramos. Todos recibieron alimentación normal *ad libitum*, siendo la distribución por sexo similar en todos los grupos. Al final del experimento el número de animales en cada grupo varió forzosamente debido a pequeñas diferencias en cuanto a mortalidad precoz por quemadura.

### *Quemadura*

Se utilizó un modelo estandarizado de quemadura experimental (1). Según este método, y previo anestesia con éter, los ratones se cogen de la región posterior del cuello con una pinza y se sumergen hasta el borde superior de los ilíacos en agua a 70° C durante 5 segundos. De esta manera se obtiene una quemadura que compromete 30% de la superficie corporal. Luego se les inyecta por vía subcutánea 2 ml de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% a fin de contrarrestar las alteraciones hidroelectrolíticas precoces derivadas del trauma (1, 2).

### *Tratamiento*

Concretamente, consistió en la administración de colina (1 mg/100 g/12 horas) y cianocobalamina (50 mcg/100 g/24 horas) por vía intraperitoneal. El tratamiento se inició a las 4 horas postquemadura, y continuó por un período total de 72 horas.

### *Inóculo*

Al final de las 72 horas postquemadura se administró por vía intraperitoneal 0.5 ml de una suspensión de PsA, cepa T 488 (10) que es uno de los agentes que con más frecuencia causan septicemia en el Servicio de Quemados del Hospital del Niño de Lima, Perú (4). El inóculo se obtuvo a partir de cultivos de 18 horas en caldo nutritivo, lavados con solución de NaCl al 0.9% y resuspendidos en la misma solución hasta obtener una concentración aproximada de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml (densidad óptica: 0.45 a 650 mu).

### *Exudado Peritoneal*

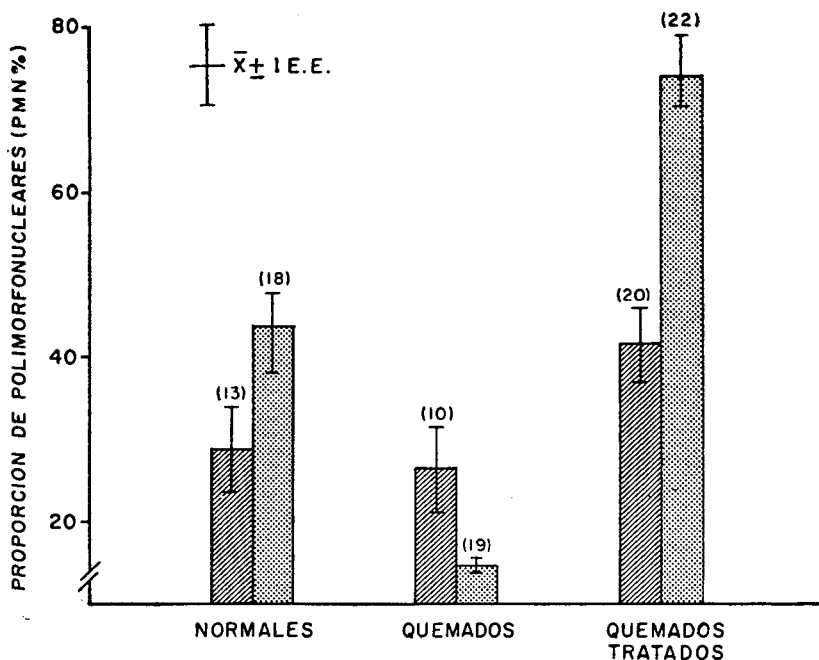
Tres horas después del inóculo y previa anestesia con éter, se abrió la cavidad peritoneal, evitando la ruptura de vasos sanguíneos, y valiéndose de una pipeta capilar se tomó una muestra del exudado. Con esta muestra se efectuaron dos ex-

tensiones en lámina, las que fueron coloreadas por el método de Wright, y en cada lámina se calculó el PMN% contándose el número de polimorfonucleares sobre un total de 200 células. Los criterios de clasificación para identificar una célula como polimorfonuclear fueron la presencia de núcleo lobulado (sin nucléolo) y la observación de granulaciones en el citoplasma.



#### Anticuerpos Anti-PsA

Luego de extender el exudado peritoneal los animales fueron decapitados para obtener una muestra de sangre en la cual se determinó el título de anticuerpos contra PsA cepa T 488. Por su mayor sensibilidad, se utilizó para el efecto la técnica de hemaglutinación pasiva (3, 11).

FIGURA I



INCAP 71-1

Influencia de la quemadura y del tratamiento sobre la proporción de polimorfonucleares (PMN%) del exudado peritoneal en ratones. Número de casos entre paréntesis (solución salina:  inóculo:  *Pseudomonas aeruginosa*). Las diferencias son significativas ( $P < 0.05$ ): a) entre los dos inóculos de cada grupo; b) entre los tres subgrupos inoculados con PsA, y c) entre los "quemados tratados" inoculados con solución salina y los otros dos subgrupos del mismo inóculo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del experimento se presentan en la Fig. 1. Del total de 102 ratones estudiados ninguno mostró anticuerpos detectables por hemaglutinación pasiva, por lo que es razonable considerar que esta variable no influyó en los resultados finales.

En cuanto al PMN%, en cada uno de los tres grupos hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la respuesta al inóculo salino y al inóculo bacteriano. Sin embargo, tal como se observa en la Fig. 1 esas variaciones se producen en sentidos diferentes, según el grupo experimental. El PMN% obtenido con el inóculo de solución salina representaría la proporción normal o "basal" de estas células en la cavidad peritoneal. En el grupo de "normales" con inóculo de PsA se aprecia un aumento en el PMN% en relación a la proporción "basal". En el grupo de "quemados", la presencia de PsA en la cavidad peritoneal se asocia con un descenso de esta proporción. Por último, en el grupo de "quemados tratados" ocurre un fenómeno similar al de los "normales", ya que la presencia bacteriana en la cavidad peritoneal se asocia con un aumento significativo en el PMN%.

Comparando los tres subgrupos con inóculo de solución salina, se observa que no existe mayor diferencia entre los "normales" y los "quemados". En cambio el PMN% se encuentra significativamente elevado en los "quemados tratados" ( $p < 0.05$ ). Igual resultado se obtuvo en este grupo cuando el tratamiento se administró por vía subcutánea, lo cual descarta la posibilidad de una respuesta inflamatoria al trauma de la inyección (1). En consecuencia, los datos obtenidos parecen indicar que la quemadura no afecta el PMN% "basal", y que el tratamiento con colina y cianocobalamina incrementa significativamente dicha proporción, sin necesidad de un estímulo infeccioso.

La comparación de los tres subgrupos en los que se aplicó el inóculo bacteriano (PsA), revela que el PMN% es menor en los "quemados" que en los "normales" y que en éstos es aún inferior al de los "quemados tratados". El alto porcentaje de PMN que acusa este último grupo se debería al aumento en la proporción "basal" y a la afluencia de polimorfonucleares al foco inflamatorio en respuesta al daño bacteriano. Los autores de este trabajo observaron en forma independiente mayor frecuencia de formas jóvenes en este grupo, que en los otros dos.

Experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que los polimorfonucleares que afluyen al foco inflamatorio, migran a partir del torrente sanguíneo por quimiotactismo positivo en respuesta a determinados polipéptidos producidos en el proceso de inflamación (1, 12). Aun cuando el mecanismo íntimo de este fenómeno y su variabilidad en función del agente bacteriano son poco conocidos, existe común acuerdo en cuanto a su importancia como uno de los mecanismos celulares inespecíficos de defensa (13). Algunos productos metabólicos de PsA ejercen acción antimigratoria *in vitro*, la cual sería normalmente neutralizada *in vivo* por los mecanismos de defensa del huésped (14). A juzgar por el PMN% en el grupo de "quemados" inoculados con PsA, el trauma térmico alteraría esta capacidad de neutralización reduciendo la afluencia de polimorfonucleares. Se ha logrado demostrar que las dos sustancias usadas estimulan *in vitro* la proliferación de células del SRE (9), efecto que probablemente se debe al papel que, como cofactores, desempeñan en la síntesis de ácidos nucleicos (15). De esta manera, el incremento del PMN% se debería al estímulo proliferativo ejercido por el tratamiento, consideración que es reforzada por la corta vida media — de 3 a 4 días — de los polimorfonucleares (16). Si se establece analogía con la situación en humanos, la dosis de colina es similar a la que habitualmente se ingiere en dietas normales (17), en tanto que la de B<sub>12</sub> es mil veces mayor que la recomendación nutricional (18). El incremento del PMN% asociado al inóculo de PsA en los "quemados tratados" sugiere que el tratamiento produjo una reversión del efecto de la quemadura, y que los animales de este grupo recuperaron su capacidad para responder al daño infeccioso con una mayor afluencia de polimorfonucleares. Tal efecto no ha sido descrito previamente e indicaría que el tratamiento mejora la capacidad de defensa contra la infección en ratones con quemaduras severas.

Estos resultados fueron observados 72 horas después de la quemadura y en ningún caso se detectaron anticuerpos anti-PsA, lo que descarta la posibilidad de que hayan sido producidos por cambios hemodinámicos post-trauma o por diferencias en la respuesta inmune específica. Los datos expuestos sugieren nuevas posibilidades en el rol de estos factores nutricionales en los mecanismos celulares de defensa, y muestran que la proporción celular del exudado peritoneal podría ser un indicador útil para

el estudio de las alteraciones de la capacidad de defensa contra la infección.

### SUMMARY

**Influence of burn trauma and of treatment with choline and cyanocobalamin on the cellular response of the peritoneal exudate in mice.**

A study was carried out to determine the influence of burns and treatment with choline and cyanocobalamin on the proportion of polymorphonuclear cells (PMN) in the peritoneal exudate of Swiss albino mice. Three groups were formed: "normal", "burned" and "burned subject to treatment". A standardized model of experimental burn involving 30% of total body surface area was used. Treatment began 4 hours post-burn and consisted in the intraperitoneal administration of choline (1 mg/100 g/12 hours) and cyanocobalamin (50 mcg/100 g/24 hours). At the end of a 72-hour post-trauma period, each group was divided into two subgroups, according to the type of intraperitoneal inoculum administered: saline solution (NaCl 0.9%) or *Pseudomonas aeruginosa* (PsA).

Three hours after inoculation, the PMN% was determined by two independent observers over a total of 200 cells of the peritoneal exudate. Serum antibodies anti-PsA were also measured by passive hemagglutination.

No difference was observed between "normal" and "burned" mice in regard to the percentage of PMN in response to the saline solution inoculum, while the group of "burned subject to treatment" showed a significant increase in the PMN%. As compared to the saline solution, the inoculum of PsA was associated with an increase of the PMN% in both "normal" and "burned subject to treatment" mice, as well as with a decrease of PMN% in the "burned" group.

The results suggest that burn trauma decreases the polymorphonuclear capacity to migrate to the inflammatory zone. They also lead to believe that diminished capacity of migration is one of the mechanisms of the decrease in the resistance to infection, and that treatment counteracts this effect.

In addition, data indicate that the PMN% of peritoneal exudate is useful for the study of cellular mechanisms of resistance to infection.

### BIBLIOGRAFIA

- 1 Lechtig Gutiérrez, A. Respuesta celular al trauma térmico y su modificación por activadores inespecíficos del RES. Estudio experimental en ratones. Tesis. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú, 1965, 81 p. (Trabajo realizado en el Laboratorio de Investigación de Quemaduras del Hospital del Niño, Lima, Perú).
- 2 Markley, K. M., M. Bocanegra, A. Bazan, R. Temple, M. Chiavonri, G. Morales & A. Carrión. La evaluación clínica de la terapia salina en el shock por quemaduras. *An. Fac. Med. (Lima)*, **38**: 1182-1194, 1955.
- 3 Bocanegra C., M. Comunicación personal, 1965.

- 4 Bocanegra C., M., M. Kiyon T., F. Hinostroza N., N. Velarde Z. & A. Bazan A. Septicemia a *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluación experimental de la seroterapia hiperinmune. **An. Fac. Med. (Lima)**, **50**: 355-375, 1967.
- 5 Rosenthal, S. M. Local and systemic therapy of *Pseudomonas* septicemia in burned mice. **Ann. Surg.**, **165**: 97-103, 1967.
- 6 McRipley, R. J. & D. W. Garrison. Increased susceptibility of burned rats to *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **115**: 336-341, 1964.
- 7 Fox, J. E. & E. J. L. Lowbury. Immunity to *Pseudomonas pyocyanea* in man. **J. Pathol. Bacteriol.**, **65**: 519-531, 1953.
- 8 Dobson, E. L. & G. F. Warner. Liver blood flow changes in thermal injury. **Fed. Proc.**, **13**: 36-37, 1954 (Abstract 120).
- 9 Heller, H. Stimulation of the reticuloendothelial system with choline. **Science.**, **118**: 353-354, 1953.
- 10 Verderer, E. & J. Evans. A proposed antigenic schema for the identification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Infect. Dis.**, **109**: 183-193, 1961.
- 11 Landy, M. On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharide and protein antigens. **Am. J. Pub. Health**, **44**: 1059-1064, 1954.
- 12 Menkin, V. Modern concepts of inflammation. **Science**, **105**: 538-540, 1947.
- 13 Miles, A. A. Nonspecific defense reactions in bacterial infections. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **66**: 356-369, 1956.
- 14 Martin, S. P. & S. N. Chaudhuri. Effect of bacteria and their products on migration of leukocytes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **81**: 286-288, 1952.
- 15 Crosbie, G. W. Biosynthesis of pyrimidine nucleotides (Chapter 36). En: **The Nucleic Acids**. Ed. Chargaff, E. & J. N. Davison. Vol III. New York, Academic Press, Inc., 1960, p. 323-348.
- 16 Kline, D. L. & E. E. Clifton. The life span of leukocytes in the human. **Science**, **115**: 9-11, 1952.
- 17 National Academy of Sciences - National Research Council. **Recommended Dietary Allowances**. Seventh revised ed., Washington, D.C., 1968. (Publication 1694).
- 18 Food and Agriculture Organization of the United Nations - World Health Organization. **Requirements of Ascorbic Acid, Vitamin D, Vitamin B<sub>12</sub>, Folate and Iron**. Rome, Italy, FAO/WHO, 1970, p. 36-41.