

ESTUDIO INMUNOELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS SERICAS EN NIÑOS SEVERAMENTE QUEMADOS

ALEX RÍOS HUERTA y MANUEL BOCANEGRA CARRASCO

INTRODUCCION

En los últimos 20 años se han realizado considerables avances en el tratamiento de los pacientes con quemaduras severas (más del 10% del área de la superficie corporal), fundamentalmente en lo que respecta a la terapia del shock (1, 11, 14, 16, 21, 22), que han traído como consecuencia una apreciable reducción de la mortalidad temprana (dentro de las primeras 60 horas después del trauma).

Este avance se debe a un mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos del shock traumático, lo que ha permitido nuevos enfoques terapéuticos, especialmente referibles al uso adecuado de soluciones balanceadas de cloruro de sodio solas o suplementadas con plasma, lo cual ha permitido la disminución de la mortalidad en esta fase temprana y ha prolongado la supervivencia de los pacientes quemados severamente.

Sin embargo, este notable progreso ha traído nuevos problemas, pues, los pacientes que morían por alteraciones agudas de sus fluidos, superviven ahora amenazados por otras complicaciones, fundamentalmente las infecciones.

Es así que, visto el problema de una manera global, panorámica, comprobamos que éste se mantiene casi invariable, puesto que la mortalidad total no se ha modificado sustancialmente, especialmente en pacientes adultos (11, 14, 21, 22).

Las investigaciones realizadas en nuestro país, han demostrado lo afirmado anteriormente y han analizado el rol de la infección sistémica-

tica en la mortalidad tardía, comprobando su incremento precisamente por la alta incidencia de septicemias a *Pseudomona Aeruginosa* (10).

Es por todas estas razones y porque, además, poco se conoce del por qué de la disminución de la resistencia a las infecciones ocasionadas por las quemaduras severas (11, 55, 56), que las investigaciones desde el punto de vista inmunológico han cobrado en la actualidad gran importancia con la finalidad de dar mayores luces y mejor solución al problema (24, 27, 29, 30, 33, 40).

El presente estudio, realizado en niños quemados severamente, mediante la aplicación de la inmunolectroforesis, método para estudiar elementos antigénicos, de gran poder analítico, con el cual se han podido estudiar unas 30 diferentes proteínas del suero humano (2, 3, 57), está orientado en ese sentido.

Nuestros hallazgos: gran incremento de la haptoglobina en el suero de los niños severamente quemados; normalidad inmunolectroforética de las inmunoglobulinas en estos pacientes, y ausencia de antígenos circulantes anormales, probablemente originados en las áreas quemadas, creemos contribuyen en alguna forma al esclarecimiento de algunos puntos muy debatidos en la actualidad, como, por ejemplo, el por qué de la disminución de la resistencia a las infecciones de los pacientes severamente quemados, y el problema de la "toxina post-quemadura" (24, 27, 29, 30, 33, 40).

En el presente estudio se aplicó el Micrométodo Inmunolectroforético, variante ideada por Scheidegger, que aventaja al método originalmente descrito porque economiza tanto sueros como antisueros y ahorra tiempo, tanto para la fase de electroforesis como para la de difusión en el gel. (7).

Antisueros: para el presente trabajo se utilizaron dos clases de antisueros:

1. Antisueros producidos en conejos contra sueros de pacientes quemados y preparados especialmente en el Laboratorio de Investigaciones del Hospital del Niño para el presente estudio.

2. Antisueros producidos en conejos y cabras contra sueros humanos normales (totales y específicos adquiridos en las casas Behringwerke (Hoechst) y Hyland (Travenol).

En el presente trabajo se ha empleado el método de identificación mediante antisueros específicos comerciales y el método de identificación por la posición, que nos sirvió de pauta preliminar al método anterior.

MATERIAL Y METODOS

A) Se estudiaron un total de 12 niños quemados que presentaban 2 características generales:

1. Todos presentaban quemaduras que sobrepasan el 10% del área de la superficie corporal.

2. Todos estuvieron comprendidos entre 0 y 12 años.

Se les agrupó bajo un único criterio: el tiempo transcurrido después del trauma térmico. Esto sirvió para reunirlos en 4 grupos:

- I. Pacientes con quemadura reciente (primeras 24 horas).
- II. Pacientes en el 3er. día post-quemadura.
- III. Pacientes en el 5º día post-quemadura.
- IV. Pacientes en el 7º día post-quemadura.

No se tomó en cuenta el sexo, la raza, el agente traumático, la presencia o no de shock, ni la evolución posterior.

B) Como grupo comparativo normal se tomó a niños comprendidos entre 0 y 12 años, hospitalizados en el Servicio de Cirugía, Pab. 4, del Hospital del Niño, para practicárseles cirugía reparadora (plastia del paladar, hernioplastia inguinal, incontinencia urinaria post-traumática), y que no presentaban evidencias de proceso infeccioso actual.

C) A todos, quemados y normales, se les extrajo aproximadamente 7 cc. de sangre con material esterilizado en seco por punción venosa, en condiciones asépticas de la yugular externa, femoral o venas de la flexura del codo.

Una alícuota (2 cc.) fue cultivada en un medio infusión corazón cerebro. Todos los cultivos fueron observados durante una semana.

El resto de sangre fue colectado en un tubo seco, estéril y sin anticoagulante. Luego de haber dejado en reposo durante unos 15 minutos se centrifugó la muestra para separar el suero. Este fue siempre sin evidencias de hemólisis. Los que presentaron éste fenómeno fueron descartados.

Inmediatamente obtenido el suero, fue almacenado en tubo estéril, herméticamente taponado con tapones de jebe, hasta su posterior utilización, en un lapso no mayor de 75 días.

Las muestras que presentaron hemocultivos positivos, fueron igualmente eliminadas.

D) De cada grupo de pacientes se recolectaron 4 muestras. Una vez reunidas todas, se descongelaron y mezclaron las 4 muestras en forma alícuota. De esta manera, cada grupo de pacientes estaba representado por un pool de sueros de 4 muestras cada uno. Estos pool se guardaron también a -12°C hasta el momento de ser utilizados en el próximo paso (inmunización en conejos).

E) Antisueros: para el presente trabajo se utilizaron dos clases de antisueros:

1) Antisueros producidos en conejos contra sueros de pacientes quemados y preparados especialmente en el Laboratorio de Investigaciones del Hospital del Niño para el presente estudio.

2) Antisueros producidos en conejos y cabras contra sueros humanos normales (totales y específicos) adquiridos en la casa Behringwerke (Hoechst).

F) Se adquirieron 10 conejos machos, mestizos, adultos que pesaban entre 2 y 3 kilos, para ser inmunizados contra las mezclas de sueros en estudio (2 conejos para cada pool).

G) La técnica de inmunización fue la siguiente: (12, 17).

a) Cada vez se aplicó 1 cc. de la siguiente mezcla:

— 0.5 cc. del pool de sueros correspondiente.

— 0.5 cc. de coadyuvante de Freund completo (35, 49, 52). Antes de aplicar esta mezcla se homogenizó perfectamente con la misma jeringa de aplicación; para ello se colocó el suero y el coadyuvante en un pequeño recipiente estéril y mediante repetidos movimientos del émbolo, aspirando y eliminando dentro del recipiente la mezcla, se logró este objetivo.

b) La vía de aplicación fue la subcutánea (51), en las zonas interdigitales, administrando cada vez 0.5 cc. de la mezcla preparada, en cada una de dos extremidades. A su vez, en cada extremidad los 0.5 cc. se distribuyeron en pequeñas aplicaciones de 0.1 cc. para cada zona interdigital.

c) Cada aplicación se hizo con 4 días de intervalo.

d) Número total de aplicaciones: 4.

H) Sangrado total en condiciones estériles 10 días después de la 4ta. aplicación inmunizante, por punción cardíaca con aguja N^o 18, (51).

Luego de recolectar la sangre de cada conejo en frascos estériles, se puso en reposo por aproximadamente 15 minutos, al cabo de los cua-

les por centrifugación se separó el suero (que en adelante denominaremos Antisuero).

Inmediatamente obtenidos los antisueros (unos 20 cc. de cada conejo), se guardaron a una temperatura de -12°C (53).

1) En el presente trabajo se usó el Micrométodo Inmunolectroforético, variante ideada por Scheideger, y se procedió a desarrollar los siguientes pasos:

- a) Eliminar las albúminas de estos antisueros.
- b) Concentración 10 veces.

Con la finalidad de potenciar sus efectos:

a) El método usado para separar las albúminas de los antisueros fue el de la precipitación de las globulinas por el Sulfato de Amonio (18):

Se mezcló 1 volumen de antisuero con 1 volumen igual de solución saturada de Sulfato de Amonio.

Luego de agitar la mezcla se dejó en reposo por 12 horas a una temperatura de 4°C .

Luego se centrifugó (en centrífuga refrigerada) durante 20 minutos.

En el fondo de cada tubo se formó un precipitado blanquecino. El sobrenadante se eliminó por decantación.

Al precipitado se agregó la menor cantidad posible de solución de cloruro de sodio al 9 por mil, para disolverlo.

En seguida se procedió a dializar estos antisueros así tratados para eliminar el sulfato de amonio. Cada muestra se colocó en bolsitas de celofán, dializando frente a 3 litros de una solución isotónica de cloruro de sodio a una temperatura de 4°C . Un agitador electromagnético se utilizó para facilitar el proceso.

El líquido lavado de la diálisis se cambió el número de veces necesario hasta que su reacción con el Cloruro de Bario en solución saturada fue negativa (6 cambios en total en un lapso de 72 horas).

b) Luego de tratar con el sulfato de amonio los antisueros, se procedió a su concentración (10 veces aproximadamente).

El método utilizado fue el de la concentración mediante goma arábiga (9, 54).

Las bolsitas de celofán conteniendo los antisueros ya sin albúminas ni sulfato de amonio, se sumergieron en goma arábiga en polvo disuelta en poquísima cantidad de agua. El tiempo que estuvieron así fue el necesario como para que el volumen final fuese 10 veces menos que el inicial (ej: si fueron 20 cc. de antisuero los tomados al inicio, al final de la concentración quedaron 2 cc. del mismo).

En el presente trabajo se ha empleado el método de identificación mediante antiseros específicos comerciales y el método de identificación por la posición.

RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS AL PAPEL Y DEL DOSAJE DE PROTEINAS

	N	I	III	V	VII
Proteínas totales gm.	7	7.15	7.52	7.37	6.78
Albúmina	50.7% 3.54 gm.	35.3% 2.52 gm.	41.7% 3.13 gm.	36.3% 2.67 gm.	34.0% 2.30 gm.
Alfa 1	3.9% 0.27 gm.	6.9% 0.49 gm.	9.8% 0.73 gm.	9.4% 0.69 gm.	10.7% 0.72 gm.
Alfa 2	12.3% 0.86 gm.	16.2% 1.15 gm.	19.9% 1.49 gm.	24.0% 1.76 gm.	21.2% 1.43 gm.
Beta	11.15% 0.80 gm.	18.9% 1.35 gm.	11.0% 0.82 gm.	10.7% 0.78 gm.	11.9% 0.80 gm.
Gamma	21.6% 1.51 gm.	22.7% 1.62 gm.	17.8% 1.32 gm.	19.6% 1.44 gm.	22.2% 1.50 gm.

DISCUSION

Desarrollaremos esta discusión, analizando los hallazgos inmunoelectroforéticos de nuestro estudio, con el fin de darles una cabal interpretación. El orden de este análisis será el siguiente:

- I. Incremento de la Haptoglobina.
- II. Normalidad Inmunoelectroforética de las Inmunoglobulinas.
- III. Ausencia de un antígeno circulante extraño, en el suero de los niños severamente quemados estudiados, producido por la quemadura.

I. INCREMENTO DE LA HAPTOGLOBINA.

En primer lugar, revisaremos todo lo que se conoce hasta la actualidad sobre esta proteína.

En 1938, Jayle y Plonowski, demostraron la presencia, en el plasma sanguíneo, de una proteína que tiene la propiedad de combinarse con la Hemoglobina (Hb), a la que denominaron Haptoglobina (Hp) (del griego Haptein, fijar; y globina, fracción proteica de la Hb).

En 1940, el mismo Jayle describió un método de determinación, basado en la actividad peroxidásica del complejo Hb-Hp que permite determinar la concentración de ésta última.

Su importante papel fisiológico, como reguladora del aclaramiento renal y tisular de la Hemoglobina, fue establecido merced a las experiencias de Laurel y Nyman en 1955. (38). Ese mismo año Smithies, mediante electroforesis en gel de almidón, descubrió la existencia de 3 tipos genéticos de haptoglobina, representativos de 3 fenotipos, originados por un par de genes alelomorfos autosómicos designados Hp^1 y Hp^2 (15).

Desde entonces han sido numerosos los estudios comunicados intentando esclarecer sus propiedades fisicoquímicas, fisiológicas, su mecanismo genético e importancia médico legal, así como el interés de su determinación cuantitativa para el diagnóstico y pronóstico de muchas enfermedades (15, 18, 20).

Los extensos trabajos de Jayle y col. llevaron a caracterizar las Haptoglobinas por su movilidad electroforética como Globulinas Alfa₂ y como glucoproteínas por su contenido en glúcidos (20% aproximadamente). (39).

Función de la Haptoglobina: La función fundamental, prácticamente la única conocida actualmente, consiste en el aclaramiento renal y tisular de la Hemoglobina, demostrado por Laurell y Nyman (38, 13). Calcularon la capacidad del suero para fijar Hb y, a partir de ella y calculando el volumen plasmático en relación al peso corporal, determinaron la capacidad para fijar Hb de la Hp de todo el plasma circulante. Así se hicieron idea de la cantidad de Hb que es necesario administrar a dos individuos normales (en los que experimentaron) para saturar la totalidad de la Hp circulante y aun elevar a 30 mg/100 cc. de plasma, la tasa de Hb libre. Realizaron con intervalo de 8 horas dos inyecciones intravenosas de 3.35 gr. de Hb y estudian la tasa del complejo Hb-Hp y de Hb libre en el plasma y en la orina obteniendo que, después de la primera administración se encuentran niveles altos del complejo en sangre, cuyo aclaramiento sigue una marcha lineal de 12-18 mg/hora. Al final de las 8 horas no quedan en la sangre mas que pequeños niveles del complejo y ninguna Hb libre. Durante estas

8 horas no aparece Hb en la orina, ni como complejo Hb-Hp ni como Hb libre. La segunda administración, agotada ya la Hp del plasma, va seguida de niveles altos de Hb libre en sangre, que desaparece del plasma más rápidamente que la que forma parte del complejo y es eliminada por la crina de tal forma que en las dos horas siguientes, a pesar de la reabsorción tubular, aparece en la orina un 10% de la administrada.

Estas experiencias demuestran:

a) La Hb libre, de un peso molecular de 68,000 aproximadamente atraviesa bien el filtro renal y, por tanto, es eliminada por la orina cuando la filtrada excede la capacidad de reabsorción tubular.

b) El complejo Hb-Hp, de mayor peso molecular, no atraviesa el filtro renal, por lo que su aclaramiento ha de hacerse por otras vías, quizá mediante el RES. como sostienen muchos autores (13, 15, 20).

c) El aporte de Hb a dosis altas no estimula la producción de Hp, ya que hasta el octavo día después de la experiencia no se recuperan los niveles normales de la misma.

d) La Hp es el principal agente regulador del aclaramiento renal de la Hb y ésta última no aparece en la orina hasta que sus niveles plasmáticos rebasan la capacidad fijadora de aquella.

Origen de las Haptoglobinas: En la literatura se señala al hígado como lugar de su síntesis. Owen y Smith (37) señalan la proporcionalidad existente entre la disminución de las glucoproteínas y la cantidad de parénquima hepático destruido. Hever O. y col. (20) haciendo un estudio en niños con infecciones hepáticas llega a la conclusión que en las hepatitis crónicas el nivel de Hp permanece constantemente muy bajo.

Niveles Normales de Haptoglobinas y sus Variaciones.

La mayoría de autores coinciden al afirmar que sólo el 10% de muestras de sangre obtenidas del cordón umbilical contienen haptoglobinas, y de éstas sólo el 50% coinciden con las de la madre, lo que demuestra que su presencia no se debe a su pasaje a través de la placenta.

Esta anhaptoglobulinemia puede ser considerada normal hasta los 4 meses (15, 13).

Valores Normales. El valor medio encontrado en los 98 casos normales estudiados por S. Castro y col. (18), fue de 115 mgrs. %. Considerando por separado los varones y hembras, encontraron para los primeros (58 casos) un valor medio de 122.6 mgrs.% y para las hembras (40 casos) un valor medio de 105.6 mgrs.%. Ahora, entre los sujetos estudiados por este autor, menores de 20 años, encontraron un valor medio de 94.6 mgrs.%, y en los demás de 20 años, de 122.4 Mgrs.%.

Según la revisión hecha por el mismo Castro, señala que Allison y col. encontraron 130 mgrs.%, como valor medio; Nyman, en hombres 113 y en mujeres 90 mgrs.%; Hever, en hombres 111.3 y en mujeres 106.1 mgrs.% y Schumacher y Schulumberger, en 22 mujeres, 117 mgrs.%.

Variaciones Patológicas: Del estudio de Castro y col, en 122 pacientes que sufrían enfermedades diversas, se desprende lo siguiente:

En el mieloma múltiple, los valores no son homogéneos. En las leucemias agudas oscilan entre 55 y 302 mgr.%, dependiendo de la situación del paciente en el momento de la determinación. En las leucemias crónicas encontraron valores moderadamente elevados y en dos casos de plasmocitoma, muy elevados. También son elevados en la enfermedad de Hodgkin en la que proporcionan valiosa información acerca de la actividad del proceso. En nefrosis pielonefritis y neoplasias malignas observaron también valores altos de Hp. en general. En los reumáticos y colagenosis las cifras de Hp se elevan paralelamente a la velocidad de sedimentación. Las inflamaciones dan lugar a elevaciones considerables de las Hp. En dos casos de infarto de miocardio, registraron, asimismo, valores altos. Además comprobaron que la inflamación traumática, provocada por intervenciones quirúrgicas, determina elevaciones considerables del nivel de Hp sérica.

En la amplísima revisión que hace el mismo Castro y col. aparte de los resultados de su propio estudio que hemos mencionado, este autor encuentra que también todos los autores sostienen que toda intervención quirúrgica, así como los traumas que ocasionan necrosis tisular, cursan con elevación del nivel de Hp, mayor cuanto más destrucción tisular se haya producido.

Teniendo en cuenta lo revisado anteriormente, creemos nosotros que, en primer lugar, el aumento de la Haptoglobina en el suero de los niños severamente quemados estudiados por nosotros, es debido a la destrucción tisular ocasionada por el trauma térmico; y que el aumento de la fracción Alfa₂ globulina puede que haya sido determinada por este incremento de la haptoglobina (39).

NORMALIDAD INMUNOELECTROFORETICA DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Si recordamos que la Inmunoelectroforesis es un método de estudio de elementos antigénicos que fundamentalmente determina la calidad de los mismos y, a grosso modo, su cantidad (por la intensidad de los inmunoprecipitados), es por ello, que al encontrar nosotros que las Inmunoglobulinas de los pacientes quemados que hemos estudiado están presentes y no difieren inmunoelectroforéticamente con las Inmunoglobulinas de los niños normales que han servido de comparación, afirmamos su normalidad desde este punto de vista.

Ahora bien, teniendo en cuenta que los anticuerpos se limitan a las inmunoglobulinas, debido a lo cual éstas están directamente relacionadas con la Resistencia Específica, hagamos una revisión de estas globulinas para tratar de relacionar nuestros hallazgos con la disminución de la resistencia a las infecciones que presentan los pacientes severamente quemados.

Las Inmunoglobulinas: Consisten en por lo menos 3 familias (26).

Estas proteínas pueden distinguirse por sus propiedades físicas y químicas diferentes. A pesar de estas diferencias se parecen más entre sí que con cualquier otra clase de proteína, originándose probablemente todas ellas en una clase de células cuyo miembro más maduro es la célula plasmática (23).

La gran atención que han merecido estas proteínas ha sido debida precisamente a causa de los anticuerpos.

Estas inmunoglobulinas emigran en un campo eléctrico, en la región correspondiente a las globulinas gamma. Pero, un pequeño porcentaje, imposible de distinguir antigénica y químicamente, se extiende en cantidades progresivamente decrecientes a través de la globulina Beta y en la región electroforética de la globulina Alfa₂. Las definiciones corrientes inmunológicas e inmuoquímicas de las globulinas Gamma se basan en sus propiedades antigénicas y su conducta biológica más que en su movilidad electroforética.

En general, la ausencia o disminución intensa de la concentración de las Inmunoglobulinas (y por lo tanto de anticuerpos) ocasiona mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas repetidas. Esto ha sido perfectamente estudiado y la demostración más evidente la dan los pacientes agammaglobulinémicos que son susceptibles a una amplia va-

riedad de enfermedades causadas por bacterias comunes, como el estafilococo, neumococo y estreptococo (25).

Por otra parte, otros trabajos (55, 56), demuestran que los pacientes y animales quemados severamente responden con títulos de anticuerpos mucho más elevados que los normales, cuando reciben estímulos bacterianos.

Estos conceptos, aunados a nuestros hallazgos inmunoeléctroforéticos en lo que se refiere a las inmunoglobulinas, nos orientan a pensar que la disminución de la resistencia a las infecciones de los pacientes quemados severamente, no estaría dada por deficiencia de anticuerpos circulantes en el plasma, sino más bien por compromiso de la resistencia inespecífica o de otro tipo de inmunidad. (60).

AUSENCIA DE UN ANTIGENO CIRCULANTE EXTRAÑO PRODUCIDO POR LA QUEMADURA EN EL SUERO DE LOS NIÑOS SEVERAMENTE QUEMADOS.

El interés por esclarecer la posibilidad que la piel quemada contenga sustancias tóxicas, ha sido motivo últimamente de una serie de trabajos.

Jones R. J. (24) demostró que extractos de piel calentada inyectada en ratones origina una secuencia de reacciones que son sorprendentemente similares a aquellos causados por las quemaduras, y que extractos comparables de piel normal carecen de estos efectos.

Estos hechos también han sido corroborados por Rosenthal Sol Roy (27), Koslowski L. (30) y otros investigadores.

Que estos efectos tóxicos de la piel quemada son debidos o no a tromboplastinas es tema de discusión. Así, Rosenthal S. R. (27) encuentra que los efectos letales del sobrenadante obtenido del homogenizado de piel calentada a 90°C y luego centrifugada, no fueron modificados por la adición de heparina sódica; además, encuentran que mezclando este sobrenadante con etanol (80%) se logra suspender o reducir su letalidad. Por ello, este autor afirma que estos efectos no son producidos por tromboplastinas.

Por su parte Fox Charles L. (33) encuentra que los extractos de piel quemada que causaron ataxia, convulsiones y muerte, generalmente dentro de 5 minutos, a ratones inyectados endovenosamente, son privados de sus acciones por la administración de heparina. Además, de-

muestra la puesta en libertad de factores tóxicos utilizando 2 grupos de ratones a uno de los cuales se le aplica torniquete en las extremidades que iban a ser quemadas luego. En el otro grupo, con igual quemadura pero sin torniquete, la mortalidad fue significativamente mayor que en el otro grupo.

A su vez, Weir D. M. (29) basado en las referencias de otros autores que encuentran en pacientes quemados, anticuerpos séricos con actividad específica contra la piel, desarrolló la siguiente experiencia:

Mediante tetracloruro de carbono provocó lesiones hepáticas en ratas.

Más tarde encontró en ellas anticuerpos del tipo 19S macroglobulina (Gamma M) y antígenos asociados a la fracción mitocondrial del citoplasma de las células hepáticas.

Weir D., afirma que estos resultados muestran que hay una respuesta inmunológica a un componente subcelular liberado luego del daño celular y la posibilidad de que esto pueda ser un fenómeno general que sigue a las injurias de tejidos de muchos tipos (incluyendo piel traumatizada por quemadura).

Los resultados de nuestro estudio, creemos contribuye en algo al esclarecimiento de estos debatidos conceptos.

Al no hallar nosotros mediante nuestros estudios inmunoelectroforéticos que abarcan los 7 primeros días después del trauma, un inmunoprecipitado desconocido, correspondiente a un antígeno extraño presente en los sueros de los niños severamente quemados, detectable sólo por los antisueros contra dichos sueros de quemados (porque en ellos estarían sus anticuerpos correspondientes), opinamos que si, a partir de la quemadura se liberan sustancias extrañas, éstas no son de naturaleza antigénica.

CONCLUSIONES

1. En los niños severamente quemados, la haptoglobina sérica se encuentra bien incrementada.

2. Las inmunoglobulinas son normales desde el punto de vista inmunoelectroforético.

3. Con la inmunoelectroforesis no fue posible demostrar que a partir de las regiones quemadas, se liberan a la circulación sustancias con capacidad antigénica.

BIBLIOGRAFIA

1. Phillips, A. W., Cope, O. Analysis of the effect of burn therapy on burn mortality. *Research in Burns*. pág. 1 Edit. by Curtis P. Artz. Amer. Inst. Biol. Sc. Wash. D. C. 1962.
2. Schwick, G. y Storiko, K. La Inmunolectroforesis. Hojas de Laboratorio Pág. 1. Behringwerke May. 1962.
3. Granado, Jaroslav, Pérez. La Inmunolectroforesis. *Rev. Cub. Ped.* 37: 331-338 Jun. 1965.
4. Grabar, P. Burtin, G. Inmunolectrophoretic Analysis Pág. 3. Elsevier Publishing, 1964.
5. Turbiana, R. Second Inter. Congr. for Research in Burns. Set. 1965. Pág. 37. Linsay & Co. Edinburgh.
6. Fjellstron, K. E. Second Inter. Congr. for Research in Burns. Set. 1965. Pág. 68. Linsay & Co. Edinburgh.
7. Scheidegger, J. Une Micro-Methode de L'immune-Electrophorese. *Int. Arch. Allergy* 7: 103-10, 1955.
8. Hawk-Oser-Summerson. *Practical Physiological Chemistry*, pág. 174, 1951.
9. Dos Reis, J. Electroforesis Das Proteinas Do liquido Cefalorraqueano e seu valor pratico en clinica neurológica.
10. Markley, K. y col. Fatal Pseudomonas Septicemias in Burned patients. *Ann of Surgeons* 145 N° 2, Feb. 1957.
11. Bocanegra, M. y col. A long-term study of early fluid therapy in severely burned adults. *Jama*, Jan 24, 1966 Vol. 195 N° 4, pp. 268-74.
12. Merrill, W. Chase. Efecto Coadyuvante de la Mycobacterias. *Clin. Med. Norteamerica*. p. 1637, Nov. 1965.
13. Arribas y Col. Haptoglobinas. *Med. Clin. (Barcelona)* XLII: 3-15, 1964.
14. Markley, K. La Necesidad de Agua, Sodio y Proteínas en Sujetos quemados. *Acad. Per. Cirugía*, 8: 23, 1955.
15. Blumberg. Alterations in Haptoglobin level. *JAMA* 184: 1021-3, Jun. 29, 1963.
16. Markley, K.; Bocanegra, M. y Col. La Evaluación clínica de la terapia salina en el Shock por Quemaduras. *Ann. Fac. Med. (Perú)* 38: 1182, 1955.
17. Boyd, W. C. Fundamentos de Inmunología. Coadyuvantes y Bacilos y Bacilos tuberculosos en la hipersensibilidad. Eudeba pág. 414-16.
18. Castro y Col. Valores normales y modificaciones patológicas de la Haptoglob. *Med. Clin. (Barcelona)* XLII: 261-70, 1964.
19. Bocanegra, M. y Col. Tratamiento de niños severamente quemados con plasma humano normal y de quemados convalescientes. *Rev. Per. Pediat. (ver)*.
20. Hever, O. Haptoglobin in children whith infectious hepatitis. *J. Pediatric*, 67: 1156-62. 1965.
21. Markley, K. Bocanegra, M. y Col. Clinical evaluation of saline solution therapy in burn shock. *Jama*, 170: 1633-40. Aug. 1, 1959.
22. Markley, K. Kefalides, N. Further studies in the Evaluation of saline solutions in the treatment of Burn Shock. *Research in Burns*, Publication N° 9, Am. Inst. of Biol. Sc. 1962.

23. Humphrey, J. & White, R. *Inmunología Médica. Anticuerpos y Complemento* Pág. 92 Ed. Toray S. A. Barcelona 1964.
24. Lawrence, J. C. Biological effects of Burned skin on mice. Second Internat. Congr. for Research in Burns Set. 1965. Linsay & Co. Edinburgh.
25. Boyd, W. C. *Fundamento de Inmunología. Agammaglobulinemias* Pág. 80-1. Eudeba Bs. As. 1963.
26. Fudenberg, H. Hirschhorn, K. *Clin. Med. N. A. Agammaglobulinemia* Pág. 1533-52. Ed. Interamericana S. A. Nov. 1965.
27. Rosenthal, Sol. R. Human "burn Toxin" and its neutralization. Second Internat. Congr. for research in Burns Set. 1965. Pág. 72. Linsay & Co. Edinburgh.
28. Uriel, J. El Análisis Inmunolectroforético y la Electroforesis Simple en Agar. *Clin. y Lab. N° 357. Tomo LX: 448-54, 1955.*
29. Weir, D. M. Immunological reactions after tissue injury. Second Internat. Congr. for Research in Burns Set. 1965 Pág. 68. Linsay & Co. Edinburgh.
30. Koslowski, L. Toxicity and Bacteria content in homogenates of normal and burned skin. Second Inter. Congr. for research in Burns Set. 1965. Linsay & Co. Edinburgh.
31. Williams, C. A. and Grabar, P. Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. *J. of Immunol. 74: 158-68, 1955.*
32. Grabar, P. Williams, C. Méthode Immuno-electrophorétique D'analyse de substances Antigeniques. *Biochimica et Biophysica Acta 17: 67-74, 1955.*
33. Fox Charles, L. Stimulation of the Burn Syndrome by toxic tromboplastic Extracts of skin and muscle. Second Internat Congr. for Research in Burns Set. 1965. Linsay & Co. Edinburgh.
34. Williams, C. A. Immunoelectrophoresis. *Scientific Amer. 202:130-40, 1960.*
35. Geogrey, Edsall. Aplicación de principios inmunológicos a prácticas de Inmunización. *Clin. Med. N. A. Nov. 1965 p. 1729.*
36. Shinton, N. y Col. Diagnostic value of serum Haptoglobin. *J. Clin. Path. 18: 114-18, 1965.*
37. Smith, H. Owen, J. Haptoglobins in Human Serum. *Biochem J. 78:723, 1961.*
38. Laurell, C. B.; Nyman, M. Studies on the serum Haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin *Blood: 12:493, 1957.*
39. Jayle, M.; Brussier, G. Isolement A'Letat pur de L'haptoglobine mucoproteine Alfa 2 du serum. *Presse Med. 1954, 62/85 (1752-53).*
40. Pavkova, L. Attemp to isolate the antigen from thermaly injuries skin Second Internat. Congres. for research in burns Set. 1965. Linsay & Co. Edinburgh.
41. Grabar, P. ;Burtin, G. Immunoelectrophoretic Analysis. Pág. 23. Elsevier Pub. Co. 1964.
42. Schwick, G. Störko, K. Hojas de Laboratorio. págs. 16-17. Behringwerke-Hoechst.

43. Grabar, P.; Burtin, G. *Immuno-electrophoretic Analysis*. Pág. 26. Elsevier Pub. Co. 1964.
44. Schwick, G.; Störiko, K. *Hojas de Laboratorio. Coloración de imágenes*. Behringwerke-Hoechst.
45. Schwick, G.; Störiko, K. *Hojas de Laboratorio. La I.E.F. Fotografiado*. Behringwerke-Hoechst.
47. Schwick, G.; Störiko, K. *Hojas de Laboratorio. La I.E.F. Identificación de las líneas de precipitación*. Behringwerke-Hoechst.
48. Grabar, P.; Burtin, G. *Immuno-electrophoretic Analysis. Interpretation of the results of immuno-electrophoretic analysis*. Pág. 17. Elsevier Pub. Co. 1964.
49. Boyd, W. C. *Fundamentos de Inmunología. Coadyuvantes y bacilos tuberculosos en la hipersensibilidad*. Pág. 414-16. Edit. Eudeba (Bs. As.) 1963.
50. Boyd, W. C. *Fundamentos de Inmunología. Esquema de inyecciones en la práctica de inmunización*. Pág. 589. Edit. Eudeba (Bs. As.) 1963.
51. Boyd, William C. *Fundamentos de Inmunología. Técnica para la inyección y sangría de animales*. Pág. 585. Edit. Eudeba 1963.
52. Boyd, W. C. *Fundamentos de Inmunología. Empleo de Coadyuvantes*. Pág. 587-8. Edit. Eudeba 1963.
53. Boyd, W. C. *Fundamentos de Inmunología. Conservación del suero inmune*. p. 589. Edit. Eudeba 1963.
54. Spina Franca, A. *Electroforesis de proteínas del líquido cefalorraquídeo*. *Arq. Neuro-Psiquiat.* 16: 155-70 Jun. 1958.
55. Alexander Wesley. *Severe Burns Alter Immune response*. Central Surgical Association-Chicago.
56. Millican, C. R. *Susceptibility of Burned Mice to Pseudomonas aeruginosa and protection by vaccination*. *Annals of Surgery* 163: April, 1966.
57. Grabar-Burtin. *Immuno-electrophoretic Analysis* pág. 94 (the proteins of normal human plasma).
58. Schwick y Störiko. *Hojas de Laboratorio*, pág. 11.
59. Schwick y Störiko. *Hojas de Laboratorio*, pág. 16-17.
60. Marquis Converse, J. *Alterations in Immunological responsiveness associated with severe thermal injury*. Pág. *Second International Congress for Research in Burns*. Edinburgh.