

Estudio comparativo morfológico y funcional de los granulocitos neutrófilos humanos obtenidos por los métodos de filtración y de centrifugación a flujo continuo

Francisco Cardellach López

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO COMPARATIVO MORFOLOGICO Y FUNCIONAL DE LOS
GRANULOCITOS NEUTROFILOS HUMANOS OBTENIDOS POR LOS
METODOS DE FILTRACION Y DE CENTRIFUGACION A FLUJO
CONTINUO

Tesis presentada por
D. Francisco CARDELLACH LOPEZ
para aspirar al Grado de
Doctor en Medicina
Octubre, 1979

UNIVERSIDAD DE BARCELONA



Fig. 16.- Reacción de la peroxidasa (con contraste muy débil).
N = Núcleo. La vesícula fagocítica (F) alberga dos estafiloco-

Fig. 15.- Otro fagosoma conteniendo una partícula de zimosán.
Con las flechas quedan señalados algunos gránulos que han pene-
trado en el interior del fagosoma. (Aumento original 20.000x)

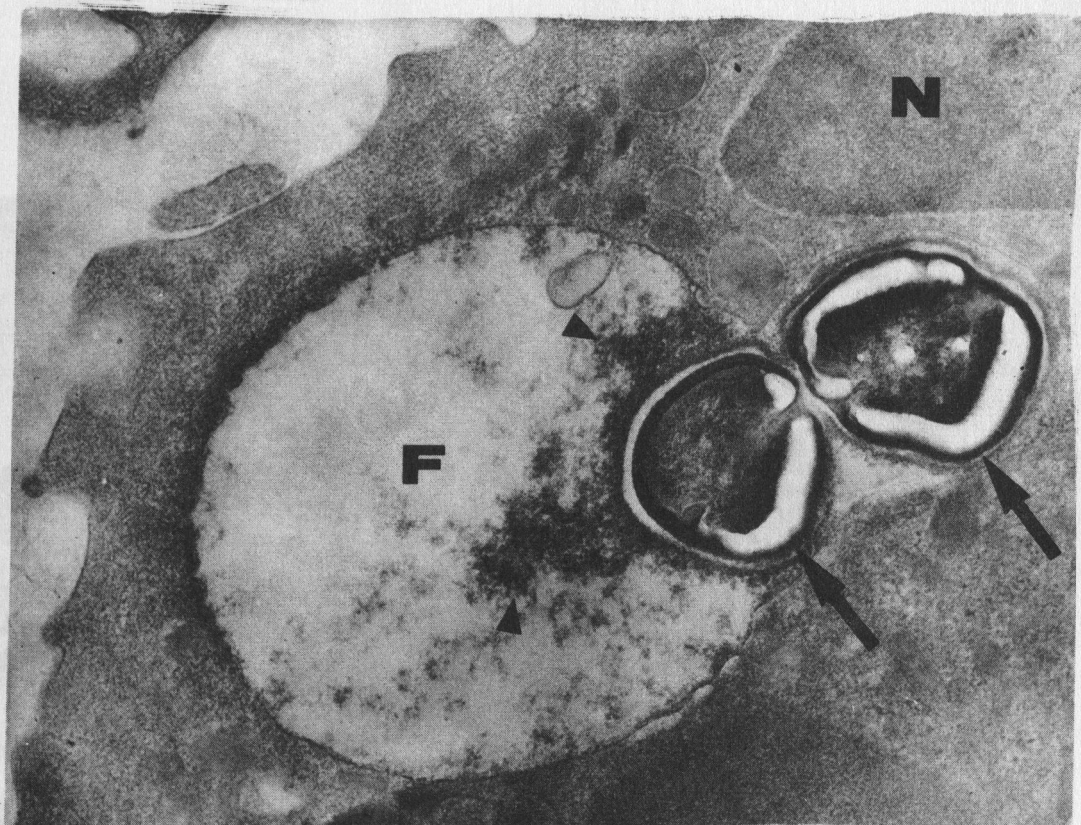


Fig. 16.- Reacción de la peroxidasa (con contraste muy débil). N = Núcleo. La vesícula fagocítica (F) alberga dos estafilococos (flechas). Uno de ellos está rodeado de material peroxidasa-positivo (puntas de flecha), procedente de los gránulos primarios o azurófilos. (Aumento original 30.000x).

Fig. 17.- El citoplasma de un macrófago que contiene gránulos de zimosán (2). Advierense la casi total desgranulación citoplasmática. Los orgánulos que restan son principalmente mitocondrias (flechas). (Aumento original 12.000x)

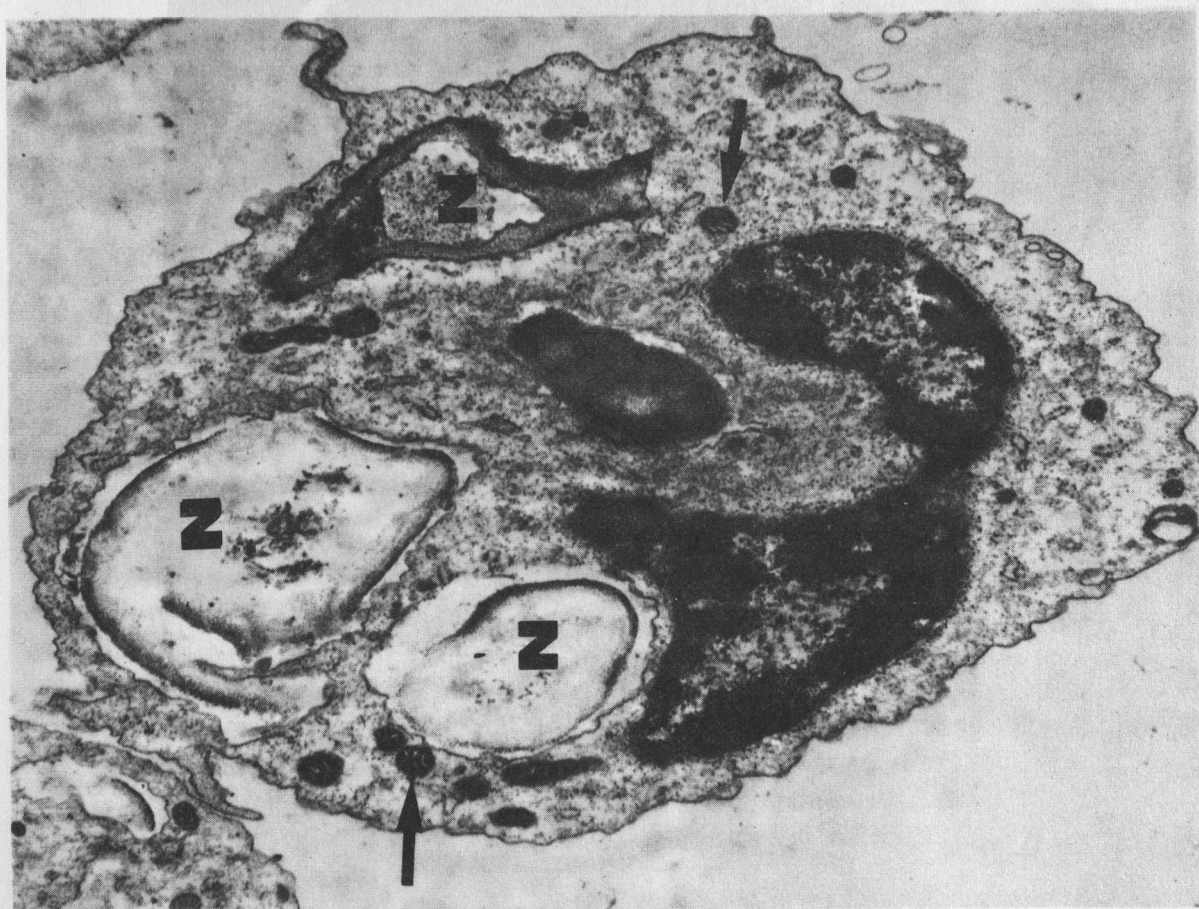


Fig. 16.- Fenómeno de desgranulación provocado por la ingestión de partículas de látex (algunas señaladas con asteriscos). (Aumento original 12.000x)

Fig. 17.- En el citoplasma de este GN se alojan tres partículas de zimosán (Z). Adviértase la casi total desgranulación citoplásmática. Los orgánulos que restan son principalmente mitocondrias (flechas). (Aumento original 12.000x)

QUIMIOTAXIS O MOVILIDAD DIRIGIDA

A. FACTORES EXTRAGRANULOCITARIOS

A.1. Fac

A.1.1

A.1.2

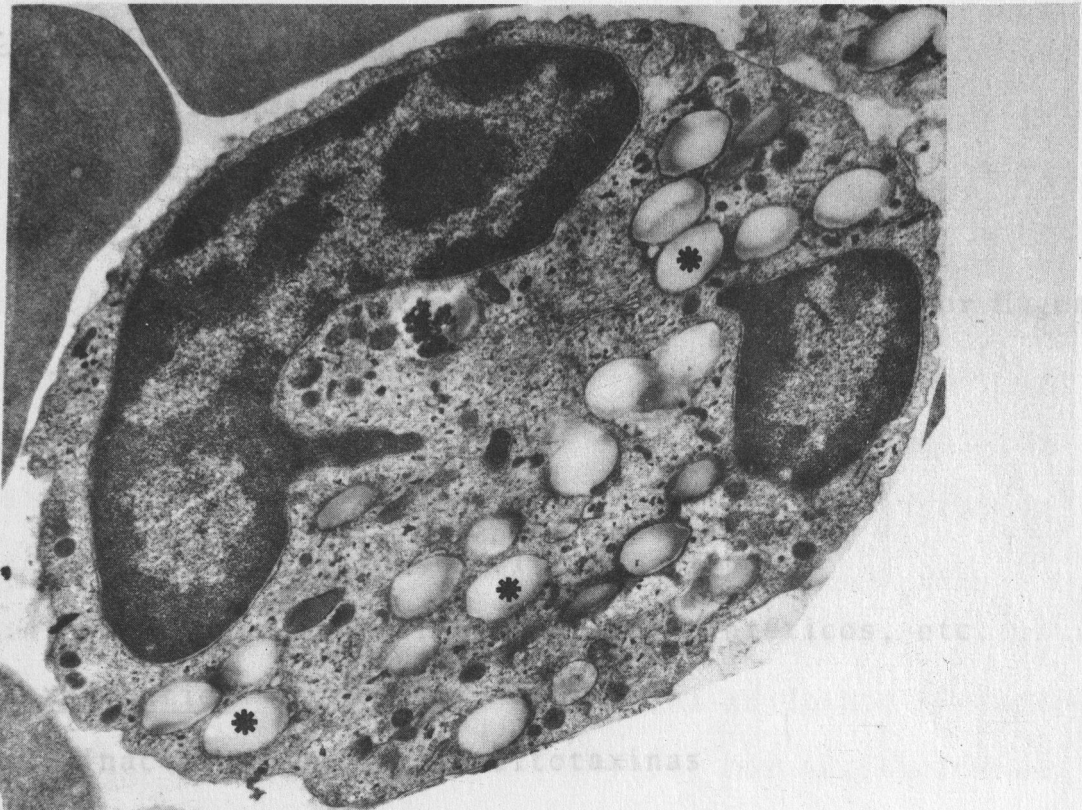
A.1.3

A.1.4

A.2. Fac

A.2.1

A.2.2. Inhibidores de la quimiotaxis



B. FACTORES GRANULOCITARIOS

B.1. Receptores de la superficie celular

B.2. Serín-esterasas

Fig. 18.- Fenómeno de desgranulación provocado por la ingestión de partículas de látex (algunas señaladas con asteriscos). (Aumento original 12.000x)

B.3.2. Microfilamentos

B.3.3. Cationes

B.3.4. Metabolismo energético

B.3.5. Nucleótidos cíclicos

TABLA II

QUIMIOTAXIS O MOVILIDAD DIRIGIDA

A. FACTORES EXTRAGRANULOCITARIOS

A.1. Factores Quimiotácticos

A.1.1. Bacterianos

A.1.2. Séricos

A.1.2.1. Derivados del complemento

A.1.2.2. Derivados de la activación del factor Hageman

A.1.3. Celulares

A.1.3.1. Derivados de los GN

A.1.3.2. Derivados de los linfocitos

A.1.3.3. Derivados de los macrófagos

A.1.4. Otros: leucoegresina, péptidos sintéticos, etc.

A.2. Factores Antiquimiotácticos

A.2.1. Inactivadores de las citotaxinas

A.2.2. Inhibidores de la quimiotaxis

B. FACTORES GRANULOCITARIOS

B.1. Receptores de la superficie celular

B.2. Serín-esterasas

B.3. Mecanismos contráctiles

B.3.1. Microtúbulos

B.3.2. Microfilamentos

B.3.3. Cationes

B.3.4. Metabolismo energético

B.3.5. Nucleótidos cíclicos

4.4.1.1. Factores extragranulocitarios.- Según que favorezcan o se opongan a la función quimiotáctica pueden ser divididos en dos grandes grupos: quimiotácticos y anti-quimiotácticos.

A. Factores quimiotácticos. Han sido hallados en gran número y su génesis es muy variada. Keller y Sorkin (100) distinguen entre citotaxinas, con actividad quimiotáctica por sí mismas y citotaxinógenos, que inducen a la formación de citotaxinas.

En orden a su origen, los factores quimiotácticos pueden ser:

Bacterianos. Muchos gérmenes generan factores quimiotácticos bien sea directamente o bien por medio de la activación del complemento (100). Esta a su vez puede producirse por diferentes mecanismos: a) activación de la vía clásica a través de los complejos inmunes compuestos por los antígenos bacterianos y los anticuerpos específicos (101); b) por activación de la vía alternativa; ó c) por actuación directa de ciertas proteasas bacterianas no específicas sobre el C3 y C5. La consecuencia final de los diferentes tipos de activación será la producción de los factores quimiotácticos de C3a y C5a.

Generan actividad quimiotáctica también, la endotoxina de los gérmenes gramnegativos en presencia de suero (102), las proteínas y lípidos de algunas bacterias como el E. coli y S. albus y los filtrados de cultivos bacterianos (100).

Séricos:

a) Derivados del complemento: La activación del complemento

por diversos agentes, ya sea por la vía clásica o alterantiva, produce cuatro factores quimiotácticos (Tabla III) (94): el complejo trimolecular $\overline{C567}$, el C3a, el C5a y la C3 convertasa.

El complejo trimolecular $\overline{C567}$ es termoestable, no dializable y no es específico de especie. La ausencia de actividad quimiotáctica del suero de ratón con déficit de C5 y del suero de conejo con déficit de C6 se debe a la no formación de este complejo (103).

El C3a es una sustancia termolábil, dializable y que se obtiene al actuar la plasmina, la tripsina o ciertas proteasas tisulares, bacterianas o leucocitarias, sobre la fracción C3 (104).

El C5a es un fragmento peptídico, termoestable, con actividad quimiotáctica y anafilatóxica (105). Se libera en el curso de la activación del complemento por diversos agentes o por escisión proteolítica del C5 al actuar sobre él, la tripsina, ciertas proteasas o un factor generado durante la agregación plaquetaria.

La C3 convertasa es una enzima con propiedad quimiotáctica formada a partir de la interacción del C3-proactivador y del C3-proactivador convertasa, con un factor obtenido del veneno de cobra o con el C3b (106).

b) Derivados de la activación del factor Hageman: Cuando se deja la sangre en contacto con el vidrio, colágena u otras sustancias se produce la activación del factor Hageman, el cual activa a su vez los fenómenos de la coagulación, formación de quininas y la fibrinólisis. En el curso de estos procesos se

TABLA III

FACTORES QUIMIOTACTICOS DERIVADOS DEL COMPLEMENTO

<u>MECANISMO DE ACTIVACION</u>	<u>FACTOR GENERADO</u>
Complejos inmunes	C $\bar{5}$ 67
<hr/>	
Plasmina	
Proteínas tisulares	
Tripsina	C3a
Proteínas bacterianas	
Proteínas leucocitarias	
<hr/>	
Activación secuencial del complemento:	
Complejos inmunes	C5a
Endotoxina, zimosán	
Factor del veneno de cobra	
Escisión proteolítica del C5:	
Tripsina	
Proteínas leucocitarias	
Proteínas bacterianas	
Factor plaquetario	
<hr/>	
Factor del veneno de cobra	
C3b	C3 convertasa
<hr/>	

generan factores quimiotácticos tales como la kalikreína (107), el activador del plasminógeno (108), el C3a resultante de la acción de la plasmina sobre el C3 ya mencionado, el fibrinopéptido B, derivado del fibrinógeno (109) y los productos de degradación de la fibrina (110).

Celulares:

- a) Derivados de los GN: Los extractos **granulocitarios** o sus fracciones lisosómicas muestran propiedades quimiotácticas en presencia o ausencia de suero (111, 112). También posee actividad quimiotáctica el sobrenadante del medio en el cual los GN ingieren diferentes tipos de partículas.
- b) Derivados de los linfocitos: Las linfoquinas, sustancias producidas por los linfocitos sensibilizados con antígenos específicos o bajo estimulación mitogénica (113, 114) y el "transfer factor" (115) también muestran actividad quimiotáctica para los GM.
- c) Derivados de los macrófagos: Los macrófagos activados por el proceso de la fagocitosis o por su adherencia al vidrio generan factores quimiotácticos (116).

Otros:

Se ha descrito además un amplio y heterogéneo grupo de sustancias con actividad quimiotáctica entre las que destacan: la leucoegresina, producto aislado a partir de focos inflamatorios cutáneos de conejos que presentan reacción de Arthus o una quemadura y generada por la acción de una proteasa sobre la inmunoglobulina G (117), péptidos sintéticos (118), lípidos (119), colágeno (120), colagenasa bacteriana (121), AMP cíclico

(122) y GMP cíclico (123), prostaglandinas como la PGE-1 (124) y el tromboxano B-2 (125), caseína (126), un fragmento derivado de la fracción Fc de la IgM (127) y mellitina, sustancia derivada del veneno de abeja (128).

Factores antiquimiotácticos.- Son sustancias que bloquean la quimiotaxis inactivando los factores quimiotácticos (inactivadores de las citotaxinas) y/o inmovilizando directamente a los GN (inhibidores de la quimiotaxis).

Inactivadores de las citotaxinas: En el suero humano normal han sido hallados agentes que inactivan los principales factores quimiotácticos derivados del complemento, de la kalikreína y del activador del plasminógeno (129), alguno de los cuales puede actuar también directamente sobre los GN.

Inhibidores de la quimiotaxis: Entre las sustancias que disminuyen directamente la respuesta quimiotáctica de los GN se citan: el AMP cíclico (130), un factor obtenido de los GN y monocitos (131), agentes que interfieren con la función de los microtúbulos (colchicina, vincristina y vinblastina) y de los microfilamentos (citochalcasina B), numerosos fármacos entre los que destacan los glucocorticoides, antiinflamatorios y algunos antibióticos (132), el alcohol (133), ciertos productos bacterianos (134), sustancias séricas que se hallan en sujetos normales o en los afectos de mieloma IgA (135), la hemoglobina (136), los inhibidores de las esterasas (137) y la tuftsina (138). También desarrollan esta acción ciertas alteraciones físico-químicas tales como los cambios de pH, osmolaridad, temperatura y las radiaciones ionizantes (139, 140).

4.4.1.1. Factores granulocitarios.- El normal desarrollo de la respuesta quimiotáctica de los GN requiere la integridad de los sistemas celulares que se analizan a continuación:

Receptores localizados en la superficie celular: El mecanismo de acción de los factores quimiotácticos se supone parecido al de algunas hormonas. Los factores quimiotácticos, al contactar con la superficie de los GN, activarían sus receptores y así se iniciaría el desplazamiento. A pesar de algunos recientes avances (141), la naturaleza y el mecanismo de acción de los citados receptores se ignoran en gran medida.

Serín-esterasas: En los GN de conejo se han identificado dos esterasas que desarrollan un papel importante en la quimiotaxis (142) ya que los ésteres fosfónicos, inhibidores específicos de dichas enzimas, inhiben también la movilidad de los GN (143). Una de ellas, la esterasa activada, se halla en la célula en forma activa y la otra, la esterasa activable, se encuentra en forma de precursor inactivo o proesterasa 1 y se convierte en esterasa activa 1 al establecerse el contacto entre el GN y el factor quimiotáctico. Con la conversión progresiva de la proesterasa en esterasa, la célula pierde su capacidad de desplazarse hasta que finalmente se convierte en una célula desactivada. El mecanismo de acción por el que la activación de la esterasa se transforma en movimiento es desconocido.

Mecanismos contráctiles: La naturaleza íntima de los mecanismos contráctiles que causan la emisión de pseudópodos, la corriente polarizada de elementos citoplásmicos y en definitiva el movimiento celular aún se desconoce, aunque se cree están involucrados los siguientes sistemas:

a) Microtúbulos: Su participación en la quimiotaxis se apoya en las siguientes observaciones: los estudios ultraestructurales ya mencionados; la acción inhibidora de la quimiotaxis por agentes como la colchicina y los alcaloides de la vinca que comprometen la integridad de los microtúbulos (88,144); el efecto inductor del montaje de los microtúbulos producidos por varios agentes quimiotácticos (145); las observaciones que sugieren que la colchicina y los factores quimiotácticos tienen efectos opuestos sobre el montaje de los microtúbulos (146); y, por último, la intervención de los iones calcio en el mantenimiento de la estructura de los microtúbulos y en la quimiotaxis (147).

b) Microfilamentos: La participación de los microfilamentos de acto miosina en la quimiotaxis la apoyan las observaciones ultraestructurales ya mencionadas; la acción inhibidora o estimulante de la quimiotaxis por la citochalasin B a diferentes concentraciones, agente que compromete la integridad de los microfilamentos aunque también inhibe la glucólisis (148); la intervención de los iones calcio en la quimiotaxis y, por último, la descripción de un paciente con déficit de quimiotaxis asociado a una disfunción de la acto-miosina leucocitaria (96).

c) Cationes: Los cationes divalentes, principalmente el calcio y magnesio son necesarios para el normal desarrollo de la quimiotaxis de los GN "in vitro" (147). Su mecanismo de acción es desconocido aunque se supone que intervienen en la polimerización de los microtúbulos (149), en la contracción de los microfilamentos (150) y en los cambios eléctricos de la membra-

na citoplásmica (151). El papel que desempeñan los iones sodio y potasio es más incierto.

d) Metabolismo energético: El desplazamiento del GN requiere un suministro energético en forma de ATP que procede de la glucólisis anaerobia. Esta afirmación se apoya en los siguientes hechos: en condiciones anaerobias, la quimiotaxis "in vitro" se produce normalmente (152), pero es bloqueada por los inhibidores de la glucólisis (153). Además, no se inhibe en ausencia de sustratos energéticos incluyendo la glucosa, mientras el GN disponga de su reserva energética en forma de glucógeno (153). La estimulación del shunt de la hexosa monofosfato durante la quimiotaxis parece ser un hecho concomitante pero no esencial (154).

e) Nucleótidos cíclicos: El AMP cíclico y los agentes que aumentan su concentración intracelular inhiben la quimiotaxis (122), mientras que el GMP cíclico y las sustancias que incrementan su concentración intracelular, la estimulan (155). Su mecanismo de acción se desconoce aunque es posible que actúen en la polimerización de los microtúbulos. Asimismo, junto con otros factores granulocitarios regularían la liberación de enzimas lisosómicas que tiene lugar durante el desplazamiento de los GN inducido por diferentes factores quimiotácticos (156).

4.4.2. Ingestión.- Una vez que los GN han llegado al foco infeccioso y han reconocido a los gérmenes como digeribles, procederán a su ingestión. Del mismo modo que la quimiotaxis, la ingestión requiere la participación de dos grupos de factores: extragranulocitarios (opsoninas) y granulocitarios (Tabla IV).

TABLA IV

INGESTION

A. FACTORES EXTRAGRANULOCITARIOS: OPSONINAS

A.1. Inmunoglobulinas

A.2. Derivados del complemento

B. FACTORES GRANULOCITARIOS

B.1. Membrana citoplásmica

B.2. Microfilamentos

B.3. Microtúbulos

B.4. Nucleótidos cíclicos

B.5. Metabolismo energético

C. FACTORES AMBIENTALES

Calcio, temperatura, pH, osmolaridad, etc.

4.4.2.1. Factores extragranulocitarios: Opsonización.

WRIGHT y DOUGLAS (157) observaron que el suero fresco promovía la ingestión de microorganismos por los fagocitos y crearon el término "opsonizar" (palabra griega que significa "preparar para comer"). Una opsonina es toda sustancia sérica que actúa sobre las partículas para hacerlas más susceptibles a la fagocitosis. Existen dos clases de opsoninas: termoestables (inmunoglobulinas) y termolábiles (derivadas del complemento) (Fig. 19) (158).

Las opsoninas termoestables son anticuerpos específicos, principalmente IgG (IgG1 e IgG2) (159, 160) que recubren los gérmenes, uniéndose a los antígenos de superficie por medio de su fragmento $F(ab')_2$ quedando su fracción F_c libre para unirse a los receptores de superficie del GN. La mayoría de estudios realizados han establecido claramente la capacidad opsónica de los anticuerpos IgG. Para algunos también desempeñaría esta función la IgM (161), aunque en este caso sería imprescindible la presencia del complemento.

Aunque en general las inmunoglobulinas con capacidad opsónica reconocen antígenos específicos de los microorganismos, las gammaglobulinas pueden opsonizar partículas inertes y bacterias en forma no específica (162).

Las opsoninas termolábiles derivan de la activación del complemento (163). La activación por vía clásica (C142) resulta de la previa exposición del huésped al microorganismo con la consiguiente producción de anticuerpos específicos que reaccionan con el antígeno de superficie bacteriano formando un complejo antígeno-anticuerpo responsable de esta activación.

OPSONIZACION

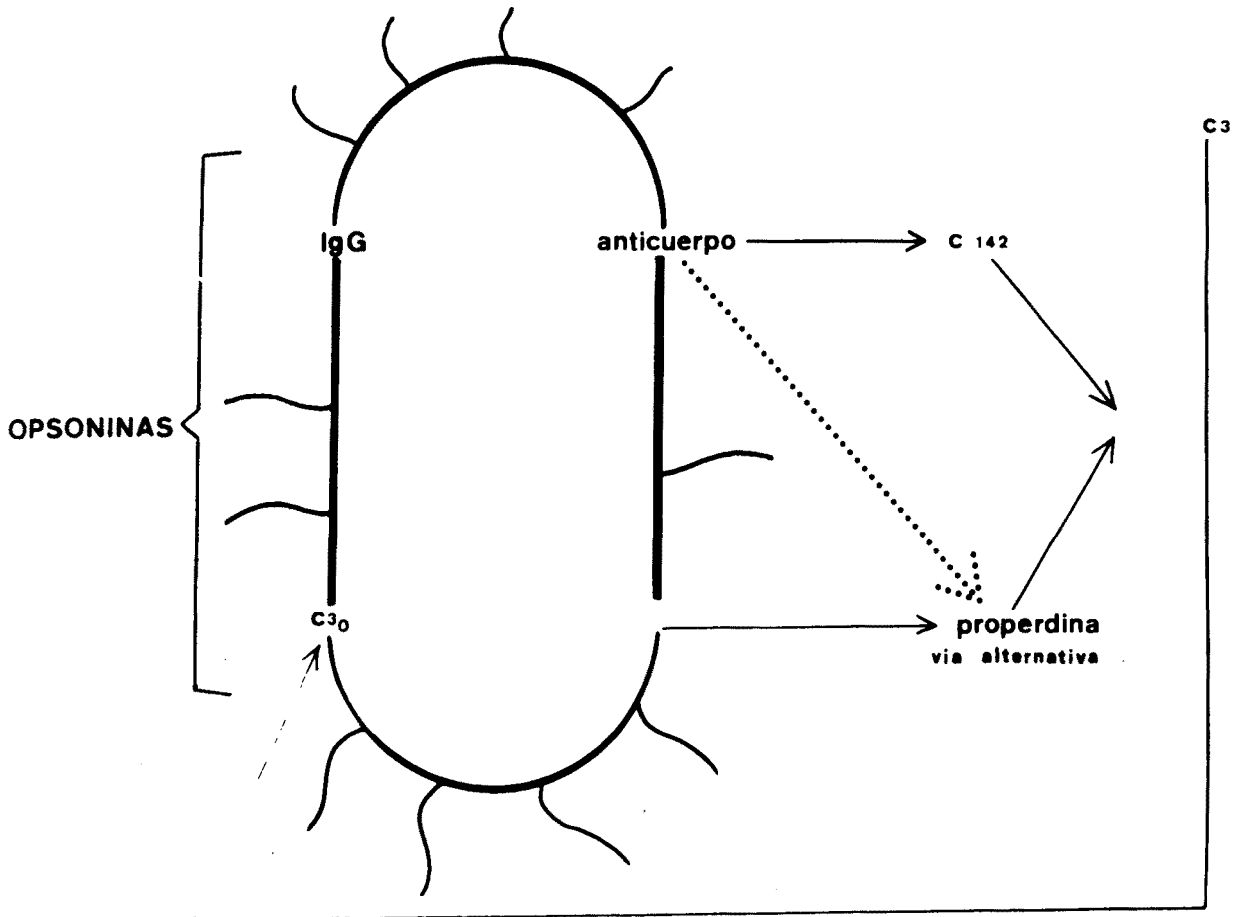


Fig. 19.- Opsonización

La activación por vía alternativa puede producirse de dos formas: por los mismos componentes de la pared bacteriana o por los anticuerpos específicos.

Las opsoninas termolábiles formadas a partir de la activación del complemento, derivan principalmente del C3. Esta activación, ya sea por vía clásica o alternativa, producirá la escisión del C3 en un fragmento de bajo peso molecular, C3a, con actividad anafilatóxica y quimiotáctica y en un fragmento opsonizante de elevado peso molecular, C3b, que recubrirá a las bacterias facilitando su unión a los receptores específicos de superficie de los GN. Recientemente STOSSEL y cols. (164) han sugerido que el fragmento opsonizante activo del C3 no es el C3b sino un derivado de peso molecular inferior.

4.4.2.2. Factores granulocitarios:

Membrana citoplásmica.- Interviene en las tres primeras fases de la ingestión: reconocimiento, opsonización y adherencia. El reconocimiento de las partículas como ingeribles se debe a finas características de la membrana citoplásmica, aún poco conocidas (58). En ella asientan también los receptores para la fracción Fc de la IgG y para el C3 que facilitarán la adherencia circunferencial entre los GN y las partículas debidamente opsonizadas (165). Además, la interacción entre las opsoninas y los receptores altera las propiedades físico-químicas de la membrana (tensión superficial y carga eléctrica) (166, 167), lo que aumenta notablemente la adhesividad de los GN entre sí y a la partícula, favoreciendo la ingestión (168).

Microfilamentos.- La red de microfilamentos tiene una función importante tanto en la formación de pseudópodos que engloban a la partícula como en su internalización. Según STOSSEL (169) en la ingestión participan los siguientes elementos: actina-miosina, un cofactor proteico y la proteína ligadora de la actina. La secuencia de hechos que tendrían lugar sería la siguiente: el contacto entre la partícula y la membrana de la célula originaría la activación de la proteína ligadora de actina, la cual sería responsable del montaje y de la gelificación de la actina en la periferia de la célula. La contracción de este gel y la consiguiente formación de pseudópodos sería inducida por la miosina y un cofactor proteico en presencia de iones magnesio y ATP. La adherencia circunferencial de la membrana citoplásmica a la partícula y la gelificación de la actina en la región submembranosa del citoplasma formarían los pseudópodos que se extenderían gradualmente alrededor de la partícula. Pese a que este esquema es todavía altamente hipotético, la intervención de las proteínas contráctiles en los mecanismos fagocíticos del GN parece evidente según se desprende de numerosos estudios (76, 95).

Microtúbulos.- En la ingestión, estas estructuras no desarrollan un papel tan importante como los microfilamentos, aunque se ha sugerido que facilitarían la internalización al disminuir la microviscosidad de la membrana del GN. Sin embargo, los estudios del efecto de la colchicina, inhibidor del montaje

de los microtúbulos, sobre la fagocitosis son contradictorios (170, 171).

Nucleótidos cíclicos intracelulares.- Los efectos del AMP cíclico y del GMP cíclico sobre la ingestión son idénticos a los descritos previamente en la quimiotaxis (172,173).

Metabolismo energético.- La energía que precisa el GN para la ingestión, la obtiene del ATP producido en la glucólisis anaerobia. Prueba de ello es el hecho de que la ingestión es bloqueada por los inhibidores de la glucólisis (174, 175) y no influyen sobre ella la hipoxia ni los inhibidores de la fosforilación oxidativa como el KCN (168, 174).

4.4.23. Factores ambientales: En el proceso de la ingestión, intervienen ciertos factores ambientales entre los que destacan: los cationes Ca y Mg, que actuarían de forma semejante a como lo hacen la fibra muscular, es decir, activando el sistema de microfilamentos (168, 175, 176); el pH (168); la temperatura (177); la osmolaridad (178) y otros factores. Así, por ejemplo, la tuftsina, tetrapéptido aislado a partir de una fracción de la IgG por acción sobre ella de una enzima de origen esplénico o granulocitario, parece estimular la ingestión (179).

En la exploración clínica de esta faceta funcional del GN nos es útil la prueba combinada de la ingestión de partículas de látex y reducción del NAT (180-182).

4.4.3. Desgranulación.- Un fenómeno celular interpuesto entre la ingestión del microorganismo y los mecanismos bactericidas es la desgranulación. En efecto, el contenido de los gránulos (Tabla I) es imprescindible para que los mecanismos bactericidas puedan realizarse correctamente.

La desgranulación suele ser intracelular (97,183), es decir, el contenido de los gránulos es vaciado hacia el interior de los fagosomas. Pero en algunas circunstancias aparece la desgranulación extracelular (183,184), o sea, su vaciado al medio externo. Ello acontece si se destruye la membrana del GN o cuando la desgranulación se inicia antes del cierre completo del fagosoma. Esta circunstancia se da, sobre todo, cuando las partículas a ingerir son de gran tamaño. Por último, favorecen asimismo la desgranulación extracelular la citochalasina B y algunos factores quimiotácticos.

Los factores que regulan el fenómeno de la desgranulación son principalmente los siguientes:

4.4.3.1. Microtúbulos: Parecen intervenir fundamentalmente en el desplazamiento de los gránulos hacia el fagosoma y también en la desgranulación extracelular. En efecto, de estudios farmacológicos y ultraestructurales parece desprenderse una estrecha relación entre la presencia de microtúbulos montados y la capacidad de desgranulación (184-186).

4.4.3.2. Microfilamentos: Su intervención no parece demostrada. Únicamente las experiencias realizadas con GN incubados con partículas de zimosán y tratados con citochalasina B (96,187), agente que compromete la integridad de los microfi-

lamentos, señalan que simultáneamente al bloqueo de la ingestión se produce la desgranulación extracelular.

4.4.3.3. Nucleótidos cíclicos: La acción estimulante (GMP y agonistas colinérgicos) o inhibidora (AMP y agonistas adrenérgicos) (185) de los nucleótidos cíclicos sobre la desgranulación es idéntica a la que realizan en las diferentes etapas de la fagocitosis y por ello su acción específica sobre la desgranulación es discutible (Tabla V). Se ha sugerido que el efecto de los nucleótidos cíclicos sobre la desgranulación se debe a su acción inhibidora (AMP-c) o estimulante (GMP-c) del montaje de los microtúbulos, posiblemente a través de la acción de una protein-kinasa que sería estimulada sólo por el AMP.

4.4.3.4. Metabolismo energético: La desgranulación requiere energía que el GN obtiene fundamentalmente de la glucólisis, por cuanto aquélla es bloqueada por los inhibidores de ésta (188). En cambio, el metabolismo oxidativo postfagocítico no parece intervenir en los fenómenos de desgranulación.

4.4.3.5. Otros: El flujo de iones, principalmente de calcio; las serín-esterasas; los receptores de superficie de los GN y determinados fármacos como los corticoides, salicilatos y antiinflamatorios pueden influir también en el proceso de la desgranulación.

TABLA V

MECANISMOS QUE REGULAN LA SECRECIÓN DE ENZIMAS LISOSÓMICAS EN LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES HUMANOS

CONTROL	SECRECIÓN ↓	SECRECIÓN ↑
AGONISTAS AUTONÓMICOS	BETA - ADRENERGICO	COLINERGICO
AGONISTA BLOQUEADO POR	PROPRANOLOL	ATROPINA
NUCLEOTIDO CICLICO EXÓGENO	AMP - CICLICO	GMP - CICLICO
ACUMULO DE NUCLEOTIDO CICLICO ENDOGENO	AMP - CICLICO	GMP - CICLICO
ENZIMA ACTIVADA POR EL NUCLEOTIDO CICLICO	PROTEIN - KINASA	DESCONOCIDA
ESTADO DE LOS MICROTUBULOS	"DESMONTADOS" EFECTO COCHICINA, VINBLASTINA,	"MONTADOS" EFECTO D ₂ O

4.4.4. Mecanismos bactericidas

4.4.4.1. Generalidades: En el GN en reposo, la actividad bactericida permanece inactiva. Su activación se inicia en el mismo instante en que los microorganismos entran en contacto con la membrana (GN estimulado). Paralelamente a la activación de estos mecanismos bactericidas, se producen los siguientes fenómenos morfológicos: 1) desplazamiento de las granulaciones intracitoplasmáticas de los GN (primero las secundarias y después las primarias) hacia el lugar de la membrana donde se ha producido el estímulo; 2) invaginación de la membrana a nivel de esta región, con inclusión de la partícula en un espacio cerrado intragranulocitario, denominado fagosoma, y 3) fusión de las granulaciones intracitoplasmáticas a la membrana del fagosoma y vertido del contenido intragranular en el interior del mismo. Este fenómeno se denomina desgranulación (158,189,190).

En el GN neutrófilo humano existen dos tipos de sistemas bactericidas (191) (Tabla VI): uno dependiente del oxígeno (O_2) y otro O_2 -independiente. La puesta en marcha del sistema O_2 -dependiente ocurre en pocos segundos y de forma muy intensa, por lo que recibe el calificativo de "explosión oxidativa" (192). Los factores que intervienen en esta explosión oxidativa se localizan en la membrana, en el citoplasma y en las granulaciones. El sistema O_2 -independiente funciona paralelamente al anterior e inicia su actividad con la desgranulación, en la cual, a partir de las granulaciones se liberan moléculas con actividad bactericida. Los productos tóxicos producidos o liberados por estos dos sistemas bactericidas son vertidos en su mayoría al interior del fagosoma, aunque parte de estas sus

TABLA VI

SISTEMAS BACTERICIDAS DE LOS GN

I. DEPENDIENTES DEL OXIGENO

A. MIELOPEROXIDASA -DEPENDIENTES

1. MIELOPEROXIDASA
2. H_2O_2 . Metabolismo granulocitario
Metabolismo bacteriano
3. Cofactor. Yoduro, bromuro, cloruro
Tiocinato, tiroxina
Triyodotironina
4. pH ácido
5. Inhibidores. Catalasa
 H_2O_2
Otros

B. MIELOPEROXIDASA-INDEPENDIENTES

1. H_2O_2
2. Anión superóxido
3. Radicales hidroxilo
4. Oxígeno singlete

II. NO DEPENDIENTES DEL OXIGENO

- A. pH ACIDO
- B. LOSOZIMA
- C. LACTOFERRINA
- D. PRCTEINAS CATIONICAS DE LAS GRANULACIONES

tancias difunde o es vertida al medio extracelular.

4.4.4.2. Sistemas bactericidas O_2 -dependientes: Desde el mismo momento en que el microorganismo contacta con la pared del GN se produce un aumento en el consumo de O_2 y una estimulación del shunt de las hexoxas-monofosfato (Fig. 20). Este aumento en el consumo de O_2 se realiza a través de la glucólisis anaerobia (vía Embden-Meyerhoff), se produce incluso en presencia de cianuro y puede ser fácilmente determinado mediante polarografía (175, 193). El hecho de que el cianuro potásico (CNK), potente inhibidor de la fosforilación oxidativa, no influya en las reacciones metabólicas que van a conducir a la muerte bacteriana, indica que los mecanismos bactericidas del GN humano son independientes de la respiración mitocondrial, es decir, del ciclo de Krebs.

Este aumento del consumo de O_2 se debe a la presencia de unas sustancias mal identificadas, oxidasas (NAD(P)H₂-oxidasas) o no (192, 194-197) que actuarían sobre los sustratos nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) procedente del SHM, o bien sobre la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) procedente de la glucólisis anaerobia, transfiriendo un electrón de estos al O_2 , con lo cual éste queda reducido. Este O_2 que ha sufrido una reducción monovalente se le denomina radical superóxido (O_2^-), es decir, que la molécula posee un número impar de electrones, y de por sí ya es bactericida. Los dinucleótidos, al perder 2 electrones se transforman en sus correspondientes formas oxidadas, NAD^+ y $NADP^+$, las cuales son a su vez nuevamente reducidas a nivel de glucólisis anaerobia en el caso del NAD^+ y de la vía de las hexoxas monofosfato en el caso de la $NADP^+$. La activación de estas

FIGURA II

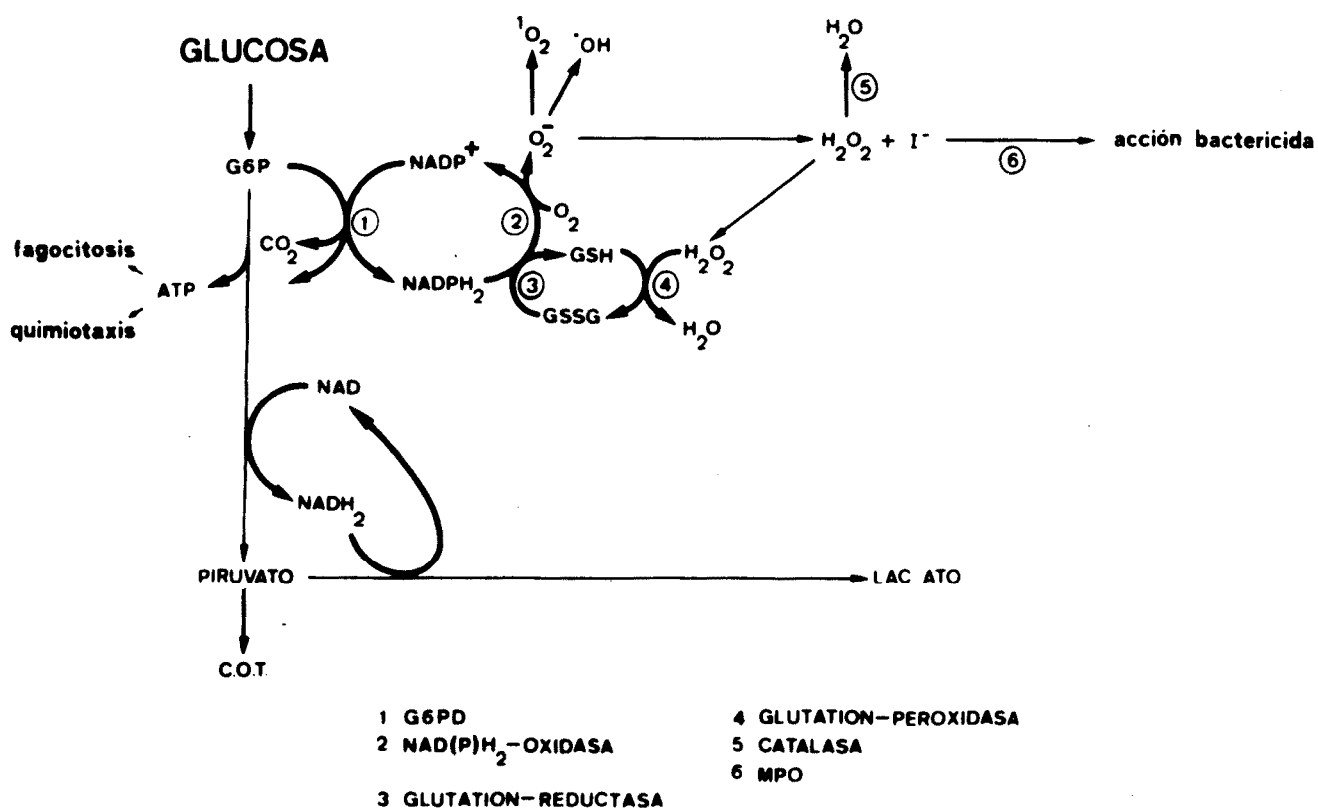


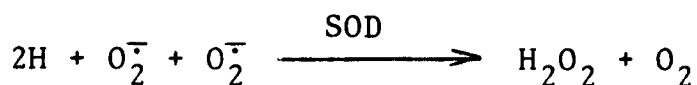
Fig. 20.- Metabolismo oxidativo del GN

vías metabólicas puede ser cuantificada mediante técnicas que utilizan glucosa marcada con carbono 14 (198).

Los mecanismos de acción de estas "oxidasas" continúan siendo muy controvertidos (199), y recientemente se ha demostrado en la membrana del GN un nuevo sistema oxidásico formado por una enzima (NAT-reductasa) y el citocromo b (200-202).

Por captación sucesiva de un electrón, pueden producirse otras formas reducidas de O_2 , como la forma protonada del radical superóxido o radical perhidroxilo (HO_2^-), el peróxido dianiónico (O_2^{--}) y su forma protonada o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y por último el radical hidroxilo ($H\cdot$). El carácter radical que poseen estas moléculas les confiere una gran reactividad, y su presencia puede determinarse mediante técnicas adecuadas. Así el O_2^- a través de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT) (193, 203) y mediante la reducción del citocromo C (193, 204), la producción de H_2O_2 mediante fluorescencia (205), polarografía (193) o por oxidación de la escopolamina (206), y el 1O_2 (oxígeno singlete) otra forma activada del O_2 , por bioluminiscencia (207).

Quizás el compuesto más importante es el peróxido de hidrógeno, originado a partir del O_2^- por dismutación espontánea o gracias a la acción de una superoxidismutasa (SOD) a través de la siguiente reacción:

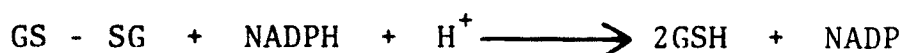


Se han detectado dos tipos distintos de SOD en las células eucariotas: una citoplásmica, con dos átomos de cobre (Cu^{2+}) y dos átomos de zinc (Zn^{2+}) por molécula, y otra mitocondrial, con dos átomos de manganeso (Mn^{2+}) (208,209). Esta enzima la poseen algunos microorganismos, lo que les confiere cierta resistencia frente a la acción tóxica del O_2^- . La inhibición de una reacción por la SOD se usa como evidencia de la presencia y utilización del O_2^- .

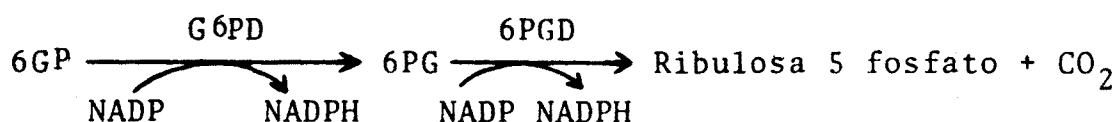
Una parte del H_2O_2 formado oxida al glutati6n reducido (GSH) bajo la acci6n de la glutati6n peroxidasa (GPX):



El glutati6n oxidado (GS-SG) formado es a su vez reducido por el NADPH en presencia de la glutati6n reductasa (GR)



El aumento de la relaci6n entre el NADP^+ y el NADPH activa la glucosa-6-fosfato y por la v1a de las hexosas monofosfato se reconstituyen los niveles intracelulares de NADPH:



Aunque por s1 mismo el H_2O_2 tiene actividad bactericida, 6sta resulta muy potenciada en presencia de un halogenuro (Cl^- o I^-) y una enzima, la mieloperoxidasa (MPO), muy abundante en las granulaciones azur6filas o primarias del GN (210-212). Este sistema MPO- H_2O_2 -halogenuro presente en el interior de la vacuola fagoc1tica tras el fen6meno de la desgranulaci6n, tiene

una potente actividad bactericida (210-218), fungicida (219-221), virucida (222) y micoplasmicida y también es tóxico para algunas células tumorales de mamíferos (223). El mecanismo de acción de este sistema todavía no está aclarado (213,224-227) y su actividad puede ser cuantificada mediante el test de la yodación (228), que mide la cantidad de yodo que se une a las proteínas después de la estimulación de los GN.

De todo lo expuesto se deduce que el sistema bactericida O_2 -dependiente está compuesto por las diferentes formas activadas del O_2 , diversas enzimas entre las que destacan la mieloperoxidasa, la glutatión-peroxidasa, la glutatión-reductasa, las enzimas de la vía de las hexosas monofosfato (principalmente la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfato-gluconato deshidrogenasa) y de la glucólisis anaerobia, así como un conjunto de sistemas aún poco conocidos que han recibido la denominación de "oxidasas primarias".

4.4.4.3. Sistema bactericida O_2 -independiente: Su actuación depende básicamente de la actividad de las enzimas liberadas por las granulaciones secundarias, como la lactoferrina, la lisozima y las proteínas catiónicas granulares, cuya actuación se realiza a pH ácido (191). Interviene fundamentalmente en la degradación de los componentes del microorganismo muerto por acción de los fenómenos bioquímicos antes mencionados.

4.5. REVISION DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES REALIZADOS EN LOS GN OBTENIDOS POR LEUCAFERESIS

La valoración de las transfusiones del GN debe ir dirigida en primer lugar a determinar su eficacia clínica, si bien ello es difícil cuando se trata de realizar estudios comparativos

con pacientes que no reciben transfusiones de GN, debido a las diferentes enfermedades de base que presentan los pacientes granulocitopénicos (neoplasias hematológicas o no hematológicas bajo tratamiento con citostáticos, aplasias medulares, agranulocitosis, etc.) y a la diversidad de agentes infecciosos y tipos de infección (1-10,15-19).

La valoración del funcionalismo de los GN obtenidos por los sistemas de centrifugación (CF) y filtración (FL) puede realizarse "in vivo" e "in vitro". Los estudios "in vivo" consisten en valorar los incrementos postransfusionales en el receptor, así como la vida media de los GN transfundidos. Los estudios "in vitro" se basan fundamentalmente en la valoración funcional de las diferentes etapas de la fagocitosis (quimiotaxis, ingestión y capacidad bactericida).

Para la mayoría de autores, la eficacia clínica de los GN (FL) es similar a la de los GN (CF) (21,23,28,33,52,53) aunque algunos hallan diferencias (41, 42) en favor de los (CF). Estas diferencias se objetivan cuando se transfunde el mismo número de GN, lo cual no es frecuente debido a que los rendimientos obtenidos con el procedimiento de centrifugación son dos o tres veces superiores a los obtenidos con el procedimiento de filtración (40, 41). Ello es importante puesto que la respuesta clínica está en relación con la precocidad de las transfusiones (21) y con el número de GN transfundidos (26, 41). Así, con el método de centrifugación se obtienen entre 10 y 30 x 10⁹ GN en cada proceso, mientras que con el de filtración la cifra de GN obtenidos es superior a 40 x 10⁹. Se estima que para restablecer el pool marginal y circulante de

GN en un individuo sano se necesita administrar entre 50 y 60 x 10⁹GN. Debido a ello, algunos autores combinan ambos procedimientos, con lo que obtienen cifras de 59,6 x 10⁹GN (229) o bien administran a los donantes determinados fármacos con lo que aumenta el número de GN obtenidos (230).

Los estudios realizados "in vitro" sobre el funcionalismo de los GN obtenidos mediante leucaféresis han sido los más numerosos. En general, los GN obtenidos por ambos procedimientos presentan una viabilidad superior al 90% con el azul de tripán (23,28,42,44,47,50,231-234).

Mientras que el quimiotactismo de los GN (CG) parece ser normal "in vitro" (40,45,47) e "in vivo" (235), los resultados son discordantes en cuanto a los GN (FL). Así WRIGHT y cols. (45) entre otros autores (28,233,236) hallan un defecto del quimiotactismo de los GN (FL) con respecto a los GN(CF) y a los obtenidos de sangre periférica, mientras que otros autores no hallan tales diferencias "in vitro" (43,47,50,234). Algunos estudios demuestran que el quimiotactismo de los GN (FL) depende de varios factores. En este sentido WRIGHT y cols. (45) objetivan una normalización de la quimiotaxis de los GN(FL) al disminuir el tiempo e intensidad de su adherencia a los filtros. Cuando se tratan los donantes con corticoides también sucede lo mismo, debido probablemente más a un efecto de disminución de la adhesividad que a una estimulación de la quimiotaxis (40, 232, 237). Sin embargo, APPELBAUM y cols. (236), en un estudio efectuado en perros, objetivan una disminución del quimiotactismo de los GN (FL) incluso administrando corticoides y disminuyendo el tiempo de adherencia a los filtros. Para igualar la capacidad de migración (MLL = migración leucocitaria

localizada) de los GN obtenidos mediante ambos procedimientos, concluyen que es necesario un número de GN (FL) ocho veces superior al de GN (CF).

McCULLOUGH y cols. (40) hallan resultados contradictorios según empleen plasma o medio Tc199 para resuspender los GN. DEBELACK y cols. (28) en un estudio efectuado en perros, hallan una disminución del quimiotactismo de los GN (FL) que se normaliza cuando la determinación se realiza en los GN una vez recuperados del receptor. Este hecho lo justifican aduciendo un aclaramiento precoz de los GN alterados o debido a la exposición de dichos GN a un ambiente "in vivo" normal en cuanto a su contenido en iones Mg^{++} y otros factores necesarios para desarrollar correctamente sus funciones, así como a una normalización de las esterasas de la membrana, que se habrían alterado por el mismo proceso de adherencia a las fibras de nylon. La importancia de los cationes (Ca^{++} y Mg^{++}) es discutida por WRIGHT y cols. (45). Para ellos, los cationes no corregirían las alteraciones funcionales de los GN (FL) como también apuntan SANEL y cols. en su trabajo (238) aunque según estos últimos sí se normalizarían algunos de los trastornos morfológicos producidos. WRITHT y cols. (49) observan una normalización del quimiotactismo de los GN (FL) tratando previamente el donante con colchicina, debido probablemente a una disminución de su adhesividad a las fibras de nylon. Las alteraciones del quimiotactismo debidas al almacenamiento de los GN (239,240) y a los anticoagulantes (241) no son objeto de discusión en nuestro trabajo puesto que las alteraciones no se objetivan hasta pasadas 24 horas, y todos nuestros estudios han sido realizados inmediatamente después de haber obtenido los

GN.

Los resultados del estudio de la capacidad de ingestión son parecidos a los del quimiotactismo. Mientras algunos autores, utilizando *Estafilococo aureus* marcado con ^{14}C , hallan una disminución significativa de la misma en los GN (FL) con respecto a los GN de sangre periférica (45), otros solamente objetivan una disminución poco importante (10%) con respecto a los GN (CF) o de sangre periférica (28,33, 44) e incluso hay autores que no observan diferencias, empleando diversos agentes como *Estafilococo aureus* (50), gotas de aceite de parafina (47) y partículas de bactolátex(42,46,242,243). Estas diferencias podrían ser en parte explicables por la distinta metodología empleada: tipo de sustancia eluyente (ACD,EDTA) y concentración de la misma, velocidad de centrifugación al concentrar los GN, etc. (29, 81). También influye el tiempo de adherencia de los GN a las fibras de nylon, como se desprende del trabajo de WRIGHT y cols. (45) al observar que los GN que permanecen menos tiempo adheridos a los filtros y con menor intensidad no presentan diferencias en cuanto a su capacidad de ingestión con respecto a los GN de sangre periférica. Las alteraciones morfológicas que se observan (238,244) incluso en los GN menos adheridos a los filtros son debidas probablemente a un aumento de la fragilidad de los GN debido al plasma-ACD, puesto que al añadir anestésicos catiónicos (lidocaína, tetracaína), estos desaparecen (244). El efecto de los corticoides ha sido muy debatido. Cuando el donante es tratado previamente con dexametasona, la diferencia entre la capacidad de ingestión de los GN (FL) y los GN de sangre periférica tiende a desaparecer. SHAGI y VOGLER (231), estudiando GN (CF)

concluyen que los corticoides (hidrocortisona) no influyen en la capacidad de ingestión ni en la actividad bactericida. LAZZARIN y cols (245), objetivan una inhibición de la ingestión por la betametasona, mientras que MONDELL y cols. (246) atribuyen a la hidrocortisona un efecto inhibidor de la NADH oxidasa que repercutiría sobre toda la "explosión" oxidativa. Para MacGREGOR y cols. (247) los corticoides (prednisona) únicamente actuarían "in vivo" y no "in vitro" a través de una inhibición de la adhesividad granulocitaria.

La normal capacidad de ingestión de los GN (FL) cuando no se administran corticoides y la deficiente actividad bactericida de los mismos en relación a los GN (CF) y de sangre periférica, hace suponer a KLOCK y BAINTON (47) que esta última no se debe a un trastorno de la ingestión sino a un defecto de la desgranulación. Apoyan esta hipótesis en un estudio ultraestructural llevado a cabo paralelamente al estudio funcional, que comentaremos ampliamente más adelante.

El estudio de la actividad bactericida de los GN (FL) con respecto a los GN (CF) y a los obtenidos directamente por punción venosa, pone de manifiesto una disminución no significativa de dicha actividad en los GN (FL) (40, 42, 44, 45, 49, 238). KLOCK y BAINTON (47) observan una disminución significativa de la actividad bactericida de los GN (FL) principalmente cuando la relación células/microorganismos (St. aureus y E. coli) es de 1:1 (disminución del 55% en relación a los GN (CF)). Sin embargo, otros autores no hallan diferencias entre los GN obtenidos por ambos procedimientos (23,43, 50). Las diferencias entre la actividad bactericida de los GN (FL) y (CF) po-

drían ser debidas a diversos factores, como por ejemplo, el empleo de microorganismos distintos y a diferentes concentraciones, la administración de fármacos, etc. Así, DEBELACK y cols. (28) en un estudio efectuado en perros objetivan una disminución de la capacidad bactericida de los GN (FL) frente a *Candida*, que sin embargo es normal frente a *Pseudomonas aeruginosa*. HIGBY y cols. (23) no hallan diferencias entre los GN (FL) y (CF), empleando diversos tipos de gérmenes como *E. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, aunque observan una discreta disminución cuando incuban los GN (FL) con *St. aureus*. SANEL y cols. (238) obtienen resultados parecidos. Para otros autores, la disminución de la actividad bactericida de los GN (FL) se normalizaría si se obtienen al cabo de una hora en el receptor (28) o administrando colchicina (49) o corticoides (45), por su efecto inhibitorio de la adhesividad granulocitaria a las fibras de nylon, aunque ello no es aceptado por todos los autores (248). El efecto de los corticoides sobre la actividad bactericida también es discutido. SHAGI y VOGLER (231) hallan una discreta disminución de la actividad bactericida de los GN (CF) obtenidos a partir de donantes tratados con hidrocortisona con respecto a los de sujetos que no recibieron dicho fármaco. STEIGBIGEL y cols. (233) hallan resultados parecidos en los GN (FL), obtenidos de donantes tratados con dexametasona, frente a *E. coli* y *S. aureus*, aunque no hallan diferencias cuando incuban los GN con *S. typhimurium*. A nivel experimental, la administración de 25 mgr. de hidrocortisona a perros granulopénicos e infectados, antes de la transfusión de GN, tampoco parece influir en su supervivencia (41). Probablemente en la actividad bactericida de los GN (FL) influyan

otros factores como la temperatura (249), el pH (233), el tiempo de adherencia a las fibras de nylon (40) y el período de conservación (233).

También han sido realizados diversos estudios sobre el metabolismo oxidativo de los GN (FL) y (CF). Mientras McCULLOUGH y cols (40) hallan un discreto aumento del consumo de O_2 por parte de los GN (FL) y (CF) en relación a los GN de sangre periférica, KLOCK y BAINTON (47) no hallan diferencias al estudiar la actividad del shunt de las hexosas monofosfato (SHM) ya sea en reposo o tras estimulación fagocítica. Tales observaciones son también constatadas por ROY y cols (243). HARRIS y cols. (50) estudian la oxidación de la glucosa en reposo y después de la fagocitosis de partículas de zimosán, y tampoco hallan diferencias entre los GN (FL) y los obtenidos de sangre periférica. La reducción del NAT ha sido hallada normal, tanto en los GN (FL) como en los (CF) (40, 47). Sin embargo, HERZIG (44), utilizando partículas de bactolátex objetiva una disminución no significativa (20%) de la actividad del SHM de los GN (FL) en relación a la de los GN (CF) y COOK y cols. (43) en un estudio efectuado en perros, observan una disminución de la actividad basal del SHM en los GN (CF) mientras que los GN (FL) muestran una actividad dos o tres veces superior. Al incubar dichos GN con partículas de látex tal actividad aumenta unas dos veces y media en ambos casos, mientras que en los GN obtenidos directamente de la sangre aumenta aproximadamente siete veces y media.

ROY y cols. (243) relacionan la normalidad del SHM de los GN (FL) con el tamaño de las fibras de nylon. Según ellos, para que aumente la actividad del SHM, los GN deben englobar

totalmente las partículas, como lo demuestran en un estudio efectuado en ratas, utilizando partículas de látex de distinto tamaño. Las fibras de nylon serían demasiado grandes para ser englobadas por lo que la actividad del SHM no se modificaría. Sin embargo, esta hipótesis no concuerda con los resultados de COOK y cols. (43), que hallan en un estudio efectuado en perros, un aumento de la actividad SHM de los GN(FL):

De entre todos los trabajos que hemos revisado, únicamente en el de HARRIS y cols. (50) se estudia la capacidad de yodación de los GN (FL), no hallando diferencias con los GN obtenidos directamente de la sangre periférica.

Las alteraciones enzimáticas de los GN(FL) han sido también motivo de diversos estudios. WRIGHT y cols. (250) incubando GN con filtros de nylon objetivan en primer lugar una liberación de lisozima y posteriormente de B-glucuronidasa. Estos hallazgos han sido corroborados por otros autores (43, 49) en GN(FL) y se correlacionan con una disminución intracelular de las citadas enzimas, de fosfatasa ácida (43, 47) y de mieloperoxidasa (233) aunque la actividad de esta última ha sido hallada normal por AISNER y SANEL (46); únicamente cuando se aumenta el tiempo de incubación y los miligramos de fibra de nylon se observa la liberación de LDH (250), aunque SCHIFFER y cols. (244) también la han detectado en el medio de suspensión de los GN(FL). La normalidad de ciertas enzimas citoplasmáticas (47, 250) como la LDH y la catalasa (43) y el hecho de que la liberación de enzimas intragranulares (B-glucuronidasa, lisozima, fosfatasa ácida) sea inhibida por la colchicina (47, 49), la hidrocortisona (47) y los anestésicos catiónicos

(tetracaína y lidocaína) (244) aboga en favor de que los GN (FL) sufran un proceso de desgranulación y no de lisis al adherirse a las fibras de nylon. Esta observación es apoyada por diversos estudios ultraestructurales que comentaremos más adelante. La adhesión a las fibras de nylon por parte de los GN es con mucha seguridad la causa de esta desgranulación, la cual parece limitarse únicamente a los GN puesto que el hecho de no haber observado aumentos de histamina en la sangre efluente de los filtros, sugiere que los granulocitos basófilos no sufren este proceso de desgranulación (250).

Desde el punto de vista clínico se ha intentado relacionar los incrementos postransfusionales de GN en el receptor con la eficacia clínica de las transfusiones de GN. Cuando se transfunden GN (CF) se obtienen buenos incrementos postransfusionales (26, 235). No ocurre lo mismo con los GN (FL) ya que para la mayoría de autores estos aumentos son menores (21, 33, 42, 243) e incluso con diferencia significativa con respecto a los GN (CF) (40, 41, 44, 52). Solamente DEBELACK y cols (28) en un estudio efectuado en perros con GB (FL) obtienen incrementos parecidos a los que obtienen otros autores con GN (CF).

Para algunos autores, el tratamiento de los donantes con corticoides repercutiría en un aumento de los incrementos postransfusionales de GN (51, 242), mientras que para otros (242) estos incrementos se reducen notablemente cuando se transfunden GN entre individuos HLA incompatibles. Esta última observación no es admitida por otros autores (21, 23, 52, 54). Con todo, aún se discute si los bajos incrementos postransfusionales

que se obtienen con los GN (FL) tienen relación con la eficacia clínica de los mismos (33, 52, 54).

Paralelamente, a los bajos incrementos postransfusionales de GN (FL), la mayoría de autores objetivan una vida media postransfusional disminuida (40, 44, 240, 242) con respecto a los GN (CF); sin embargo, DEBELACK y cols. (28) no hallan tal disminución o bien la vida media de los GN se normaliza cuando se trata previamente a los donantes con prednisona (242). Los estudios de la vida media intravascular de los GN (FL) muestran, a diferencia de los (CF), un patrón de distribución bimodal (40, 242); es decir, que una parte de los GN (FL) desaparece rápidamente de la sangre periférica y el resto tiene una supervivencia más prolongada. Ello puede explicarse o bien por un aclaramiento de las células "dañadas" a nivel del bazo (44) o por una marginación de las que no presentan alteraciones. La vida media de los GN (FL), según FLIEDNER y cols. (242), aumenta incluso por encima de los valores normales cuando se trata previamente a los donantes con corticoides.

Además de estas alteraciones funcionales de los GN (FL), también se han descrito efectos secundarios o reacciones adversas, tanto en el donante como en el receptor. Así, el donante puede presentar, al igual que en la hemodiálisis, granulopenia importante en la primera media hora del proceso. Su aparición no es atribuible únicamente a la adhesión de los GN a los filtros, sino que también podría ser debido a la activación del complemento secundaria a la citada adhesión y que a su vez provocaría un aumento de la agregación de los GN con posterior secuestro a nivel pulmonar (251, 252). Ello explicaría parte de la sintomatología que experimenta el donante en el curso de

la leucaféresis. Entre otros efectos secundarios cabe citar: una disminución de la hemoglobina, de las plaquetas y un aumento transitorio de los GN (23, 44, 229,242), mientras que no se han observado variaciones de la haptoglobina, fibrinógeno, fibrina y PDF (23). Asimismo, se han descrito dolor abdominal, escalofríos, herpes zoster, fiebre, astenia, sensación lipotímica, diaforesis e hiperemia conjuntival (23, 51). Estos efectos adversos que pueden darse en el donante así como el síndrome postaféresis (51), disminuyen sensiblemente cuando se trata previamente con dexametasona, lo cual sugiere que la mayoría son debidos a la activación del complemento secundaria a la adhesión de los GN al nylon (250-253).

En el receptor se han descrito también importantes reacciones adversas, como escalofríos, fiebre y distrés respiratorio que no se han podido relacionar claramente con la presencia de incompatibilidad HLA (21, 23, 33, 42,51, 242), aunque algunos autores las atribuyen a la presencia de leucoaglutininas circulantes (23, 51,254). Por otra parte, las alteraciones morfológicas halladas en los GN (FL), con la consiguiente activación del complemento, podrían jugar un papel importante en la aparición de tales reacciones adversas (250). Algunas de estas reacciones han sido también referidas en los receptores de GN (CF), aunque con mucha menor frecuencia e intensidad (21,34 229).

V. MATERIAL Y METODO

5.1. ESTUDIO MORFOLOGICO

Se han estudiado los granulocitos (GN) de doce donantes sanos obtenidos mediante un proceso de separación celular por centrifugación a flujo continuo en seis casos y por filtración en los seis restantes. La edad de los donantes estaba comprendida entre 23 y 58 años. Todos ellos recibieron la medicación habitual, a base de: prednisolona 1mg/Kg de peso vía endovenosa, treinta minutos antes de iniciar el proceso y 5.000 u de heparina Na vía endovenosa, en "push". Para mantener una descoagulación correcta durante la leucaféresis, se administró a los donantes una solución de heparina Na (10.000 u en 500 ml de suero fisiológico) a razón de 2-3 ml/min, así como una segunda dosis de heparina sódica (2.500 u) en "push" a los 45 minutos de iniciarse el proceso.

La leucaféresis mediante centrifugación a flujo continuo ha sido realizada con un modelo de centrífuga NCI-IBM-2990. La duración del proceso en todos los casos ha sido de 3 h. 15 min., el flujo medio de aspiración de sangre de 30 ml/min, y la velocidad de centrifugación de 750 r.p.m..

La separación celular por filtración a flujo continuo se ha realizado según la técnica de DJERASSI y cols. (255), modificada por HERZIG y cols. (44) utilizando un modelo de separadora Fenwal. Una vez adheridos a las fibras de vidrio los GN han sido liberados de ellas por acción de una sustancia (plasma ACD) quelante de los iones calcio y magnesio y por la compre-

si3n manual sobre los filtros. Finalmente, los GN en suspensi3n en el plasma-ACD han sido centrifugados a 2500 r.p.m. durante quince minutos a 22°C de temperatura. La duraci3n media de la leucaféresis en todos los casos ha sido aproximadamente de tres horas.

Con la finalidad de comprobar si las alteraciones potencialmente observables en las células podían ser originadas por el propio proceso de leucaféresis, o solamente debidas al tiempo empleado en el mismo, hemos realizado el estudio de los GN obtenidos directamente de los donantes una vez estos habían recibido la medicaci3n, dejando la sangre a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de este período de tiempo, la sangre total ha sido depositada sobre una mezcla de dextranopielograf durante 45 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de sedimentar los hematíes y obtener los GN a partir del sobrenadante según el método de Boyum (256). La técnica desarrollada se expone en el apartado de estudio funcional.

Asimismo, para comprobar la influencia que la compresi3n manual puede tener sobre la morfología de las células en el procedimiento de filtraci3n, hemos realizado un segundo "blanco" obtenido mediante una punci3n del filtro y aspiraci3n de los GN directamente desde su interior (Fig. 21).

La inclusi3n de los GN para su análisis ultraestructural ha sido realizada del siguiente modo: se han centrifugado fracciones de 5 cc de la suspensi3n de GN a 500 r.p.m. durante 8 min. a temperatura ambiente. Una vez decantado el sobrenadante, el botón celular ha sido fijado en glutaraldehído al 1,25% en tamp3n cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante noventa

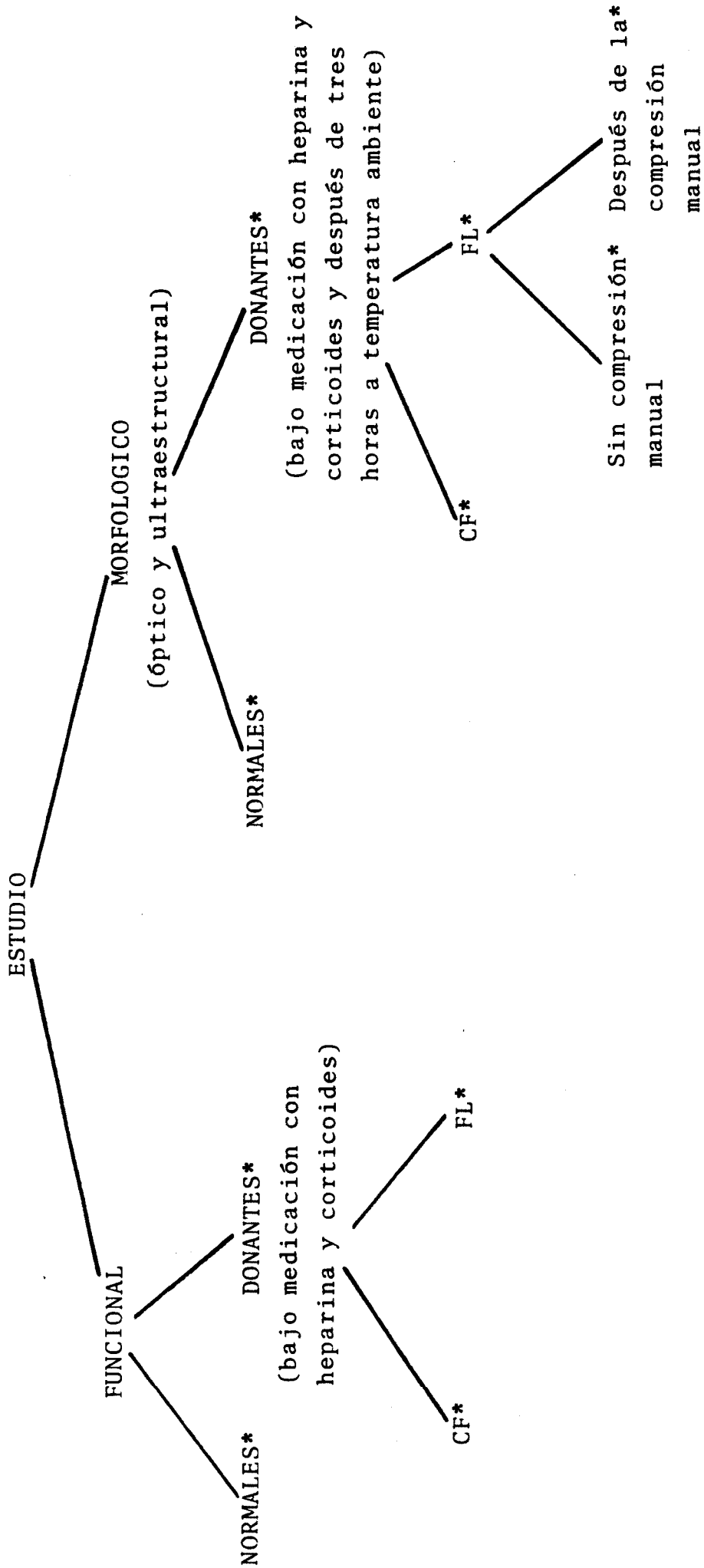


Fig. 21 .- Esquema general de los estudios practicados. CF = procedimiento de centrifugación; FL = procedimiento de filtración. Los asteriscos indican el nivel donde se ha practicado el estudio.

minutos. Después de un segundo lavado en tampón cacodilato 0,1 M, la deshidratación se ha efectuado en alcoholes a concentración progresivamente creciente y finalmente se ha procedido a su inclusión en Araldyt y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo.

En todos los casos se han efectuado cortes semifinos de aproximadamente 1 μ m de espesor, procediéndose a la práctica de tinción de Humphrey (257) para su valoración óptica y cortes ultrafinos con el ultramicrotomo Reichert, modelo OMU II para su estudio al microscopio electrónico de transmisión, JEOL-100B.

5.1.1. Exámen óptico.- Mediante la observación óptica se han valorado 500 GN de cada muestra, diferenciando los que mostraban un aspecto morfológico normal de aquellos que presentaban alteraciones evidentes, bien en forma de células dislaceradas o núcleos desnudos, bien en forma de pérdida de la estructura cromatínica del núcleo, el cual ofrecía un aspecto de núcleo "hinchado", aumentado de tamaño y de perfil redondeado.

En los "blancos", la valoración ha sido efectuada sobre 1.000 GN.

5.1.2. Examen ultraestructural.- Se han valorado a 8.000 aumentos, 50 GN de cada muestra, elegidos al azar. Han sido estudiados los siguientes parámetros morfológicos:

A nivel celular: a) presencia de bolsillos nucleares o "pockets", b) presencia de hendiduras nucleares o "clefts", c) alteración de la cromatina nuclear en forma de picnosis, desaparición de la estructura cromatínica, o alteración distributiva de la misma, d) existencia de núcleos desnudos.

A nivel citoplasmático: a) presencia de vacuolas degenerativas, b) presencia de "microvilli", considerando como tales las prolongaciones vellosas citoplasmáticas de una longitud superior a 3 mm, c) presencia de figuras mielínicas, d) alteración en la distribución de las granulaciones, definida por la existencia de áreas granulares junto a áreas desprovistas de granulaciones y e) desgranulación, valorada cualitativamente.

Asimismo, se han considerado entre las células estudiadas, el porcentaje de aquellas que no presentaban ninguna alteración morfológica.

5.1.3. Análisis estadístico.- El análisis estadístico ha sido realizado mediante el test de la chi cuadrado (χ^2) con corrección de Yates, según la fórmula

$$\chi^2 = \frac{[|(axd) - (bxc)| - 1/2(a+b+c+d)]^2}{(a+b) \times (c+d) \times (a+c) \times (b+d)} \times (a+b+c+d)$$

Se han considerado con significado estadísticos los resultados con una $p < 0,02$.

5.2. ESTUDIO FUNCIONAL

Se ha estudiado en primer lugar el funcionalismo granulocitario de 44 sujetos sanos, miembros del personal del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, con el fin de establecer las normalidades de todas las técnicas que se han utilizado. En una segunda fase estas mismas técnicas se han aplicado en el estudio del funcionalismo de los GN obtenidos por leucaféresis mediante centrifugación a flujo continuo (20 casos) y mediante filtración (28 casos) a partir de donantes normales voluntarios. En ambos casos dicho estudio se ha realizado antes de iniciar el proceso de separación celular, una vez que al donante se le había administrado la medicación habitual y después del mismo

a partir de una muestra de la bolsa recogida (Fig. 23).

El estudio del funcionalismo de los GN una vez separados de los restantes elementos celulares se ha realizado mediante cinco técnicas.

1. Quimiotactismo

2. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT) (método citoquímico)

3. Reducción del NAT (método colorimétrico)

4. Producción de radical superóxido

5. Yodación

5.2.1. Aislamiento de los GN

5.2.1.1. Método de sedimentación en Dextrano (256): Este método se ha utilizado para realizar las pruebas funcionales bioquímicas.

Se extraen 30 ml de sangre con heparina sódica al 1% (20 U/ml) con jeringa de plástico. Se mezclan 20 ml con un volumen equivalente de Dextrano T-500 al 2% y se dejan reposar con la jeringa en posición vertical durante 45 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo habrán sedimentado los hematíes y en la parte superior quedará el plasma rico en leucocitos. Se extrae dicho sobrenadante y se fracciona en varios tubos de plástico. La hemólisis de los hematíes contaminantes se realiza con cloruro amónico al 0,87% y después de centrifugar a temperatura ambiente durante 8 minutos a 500 r.p.m., se efectúan los lavados con tampón fosfato Krebs-Henseleit (Tabla VI). Finalmente, se resuspenden los GN con dicho tampón a una concentración de 10.000/ μ l y se realizan varias extensiones

TABLA VII

COMPOSICION DEL TAMPON KREBS-HENSELEIT

	ml
ClNa (0,15M) 9% 18 g en 21. de H ₂ O	1.600
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (0,1M) 17,8 g en 10 ml de ClH 1N, completar hasta 500 ml con H ₂ O	336
Mg SO ₄ 7H ₂ O (0,154M) 1,91 g en 50 ml de H ₂ O	16
KH ₂ PO ₄ (0,154M) 1,05 g en 50 ml de H ₂ O	16
KCl (0,154M) 1,15 g en 100 ml de H ₂ O	64

pH = 7,2

para efectuar un recuento previa tinción con May Grunwald-Giemsa. Con este procedimiento, el porcentaje de GN obtenidos es del orden del 88% de la totalidad celular, siendo las células contaminantes principalmente linfocitos.

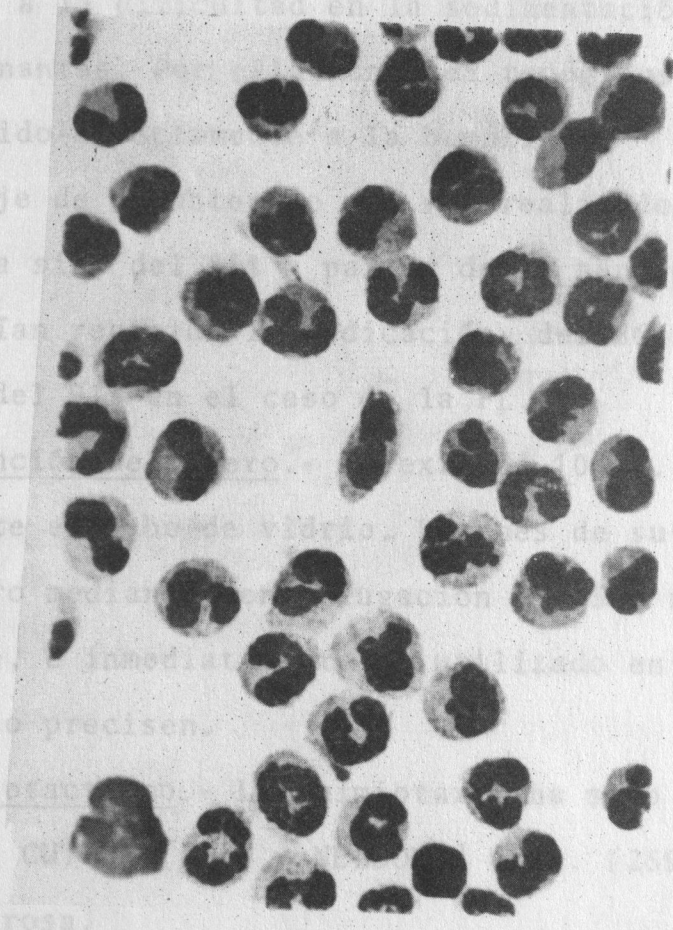
La sangre obtenida después de administrar la medicación y los GN de la bolsa de recogida han sido sometidos al mismo proceso de separación. El rendimiento de GN obtenido en el primer caso ha sido del 85% y en el segundo, del 94% para la FL y del 81% para la CF (Fig. 22).

5.2.1.2. Método de sedimentación en una mezcla de Dextrano-Pielograf (256): Este método se ha utilizado para estudiar la quimiotaxis.

Se extraen 10 ml. de sangre venosa con heparina sódica (10-20 U/ml de sangre) y se depositan sobre la superficie de una mezcla compuesta por 24 ml. de dextrano T-500 (9%) y 10 ml. de Pielograf (35%). A los 45-60 minutos, a temperatura ambiente, se habrá producido la sedimentación de los hematíes. Se aspira el sobrenadante, que queda separado de los hematíes por la mezcla dextrano-pielograf, y se provoca la hemólisis de los hematíes contaminantes con cloruro de amonio (0,87%). A continuación se centrifuga durante 8 minutos a 600 r.p.m. y se realizan dos lavados en tampón Krebs-Henseleit fosfato. Los GN se resuspenden finalmente en el mismo tampón, ajustándolos a una concentración aproximada de $60.000/\mu\text{l}$. Con este procedimiento se evita que los GN se pongan en contacto con el dextrano, dado que este ejerce un efecto inhibitorio del quimiotactismo. El porcentaje de GN obtenidos es del orden del 87% de la totalidad celular, siendo las células contaminantes, al igual que ocurre con el anterior método de separación,

principalmente linfocitos. La sangre obtenida después de administrar la medicación a los donantes y la muestra de la bolsa de recogida de ambos sistemas de leucaféresis se someten al mismo proceso que para la sangre obtenida del grupo control por punción venosa. Los GN obtenidos por el procedimiento de filtración no se han depositado sobre la muestra de Dextrano-Pielograf debido a la dificultad en la sedimentación de los hematíes contaminados. De la muestra de la bolsa, se ha procedido a la preparación de la muestra CF y de la muestra CN.

El porcentaje de GN obtenidos por el proceso de aislamiento ha sido del 100% en los casos de los donantes que habíamos estudiado. A partir de la muestra CF y de la muestra CN, se ha procedido a la preparación de la muestra GN.



5.2.2. Obtencción de GN: Se toma un tubo de sangre sin anticoagulante y se deja coagular a temperatura ambiente. Después de la coagulación, se separa el suero por centrifugación a 1000 r.p.m. a temperatura ambiente. El sedimento obtenido se utiliza en las pruebas funcionales que lo precisen.

5.2.3. Quimipunto: Se prepara un medio de cultivo según la técnica de C. G. (1959), usando un soporte de agarosa.

5.2.3.1. Preparación del medio de soporte: El medio de cultivo de partículas de latex (quimipunto) en un soporte está compuesto por 22,5 ml de agarosa disuelta al 1,5% en agua destilada a temperatura de ebullición durante 5 minutos y enfriada posteriormente a 47°C; 22,5 ml. de medio Tc-199 y 5 ml. de suero bovino fetal descomplementado. La temperatura del medio se estabiliza a 47°C y a continuación se

Fig. 22.- Aspecto al microscopio óptico de un aislamiento de GN

principalmente linfocitos. La sangre obtenida después de administrar la medicación a los donantes y la muestra de la bolsa de recogida de ambos sistemas de leucaféresis se someten al mismo proceso que para la sangre obtenida del grupo control por punción venosa. Los GN obtenidos por el procedimiento de filtración no se han depositado sobre la mezcla de Dextrano-Pielograf debido a la dificultad en la sedimentación de los hematíes contaminantes. Por ello, una vez recogidos de la bolsa, se ha procedido directamente a la hemólisis.

El porcentaje de GN obtenido una vez realizado el proceso de aislamiento ha sido del 81% a partir de la sangre de los donantes que habían recibido la medicación, del 86% a partir de la muestra CF y del 91% en el caso de la FL.

5.2.2. Obtención del suero.- Se extraen 10 ml. de sangre sin anticoagulante en tubo de vidrio. Después de su coagulación, se separa el suero mediante centrifugación a 4.500 r.p.m. a temperatura ambiente, e inmediatamente es utilizado en las pruebas funcionales que lo precisen.

5.2.3. Quimiotactismo.- La quimiotaxis ha sido medida según la técnica de CUTLER (258) y NELSON y cols. (259), usando un soporte de agarosa.

5.2.3.1. Preparación del medio de soporte: El medio de soporte está compuesto por 22,5 ml de agarosa disuelta al 1,5% en agua destilada a temperatura de ebullición durante 5 minutos y enfriada posteriormente a 47°C; 22,5 ml. de medio Tc-199 y 5 ml. de suero bovino fetal descomplementado. La temperatura del medio se estabiliza a 47°C y a continuación se

depositan fracciones de 10 ml. en placas de petri de 8,5 cm. de diámetro, dejándolo solidificar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El pH del medio se equilibra durante 3 horas en una estufa a 37°C con atmósfera saturada en humedad y con 93% de O₂ y 7% de CO₂.

5.2.3.2. Preparación de los pozos: Se preparan una serie de pozos de 2,4 mm de diámetro, en grupos de tres, separados entre sí por una distancia equivalente. En el pozo central se depositan 5 ml. de la suspensión de GN, en el pozo externo la sustancia con actividad quimiotáctica y en el pozo interno una sustancia control.

5.2.3.3. Preparación de las sustancias con actividad quimiotáctica: En nuestro estudio se han empleado los siguientes factores quimiotácticos:

a) Suero autólogo (S). Es decir, el obtenido del propio donante una vez la sangre ha coagulado en un tubo de vidrio y ha sido centrifugada a 3500 rpm durante 20 minutos.

b) Sobrenadante de cultivo puro de Klebsiella (K). Proporcionado por el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona.

c) Suero autólogo activado con el sobrenadante del cultivo de Klebsiella (S + K). Tal activación se consigue incubando el suero con el sobrenadante a una concentración 20% de suero, durante 45 minutos en baño maría a 37°C con agitación horizontal.

d) Suero autólogo activado con zimosán (S + Z). Se disuelven 400 mg. de zimosán en 40 ml. de suero salino fisiológico y se deposita la mezcla en baño maría a temperatura de ebullición durante una hora. Al cabo de este tiempo se decanta el sobrenadante y se resuspende con 10 ml. de tampón Veronal,

con lo que la concentración de zimosán es de 4 mg/0,1 ml. La activación del suero se consigue mezclando este con zimosán a una concentración del 10% de suero, en baño maría a 37°C con agitación horizontal durante 45 minutos.

La incubación se realiza durante tres horas en estufa bajo las condiciones anteriormente citadas. La lectura se realiza con el microscopio óptico previa fijación de la muestra con ácido acético al 10% y con ocular micrométrico. La agarosa puede desprenderse en bloque para proceder a la tinción de los GN con May-Grunwald-Giemsa o realizar su examen ultraestructural.

La quimiotaxis (A) viene cuantificada por la distancia que recorren los GN desde el borde externo del pozo central hasta el punto más alejado en dirección al factor quimiotáctico y la movilidad al azar (B) por la distancia que alcanzan desde el borde interno del pozo central hasta el punto más alejado del mismo (Fig. 23, 24 y 25).

5.2.3 Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico.- Se ha realizado según técnica de WINDHORST y cols. (180).

En un tubo de plástico se disponen 350 μ l de suero autólogo, 100 μ l de NAT (6 mg/3 ml. de suero fisiológico al 0.9%) y 15 μ l de látex dializado. Este sistema se preincuba durante 5 minutos al baño maría a 37°C.

Inicio de la reacción.- Se añaden 100 μ l de la suspensión de GN a una concentración alrededor de 10.000 μ l en tampón Krebs-Henseleit. Se incuba en agitación horizontal en las condiciones antes citadas durante 15 minutos.

QUIMIOTAXIS en placas de agarosa

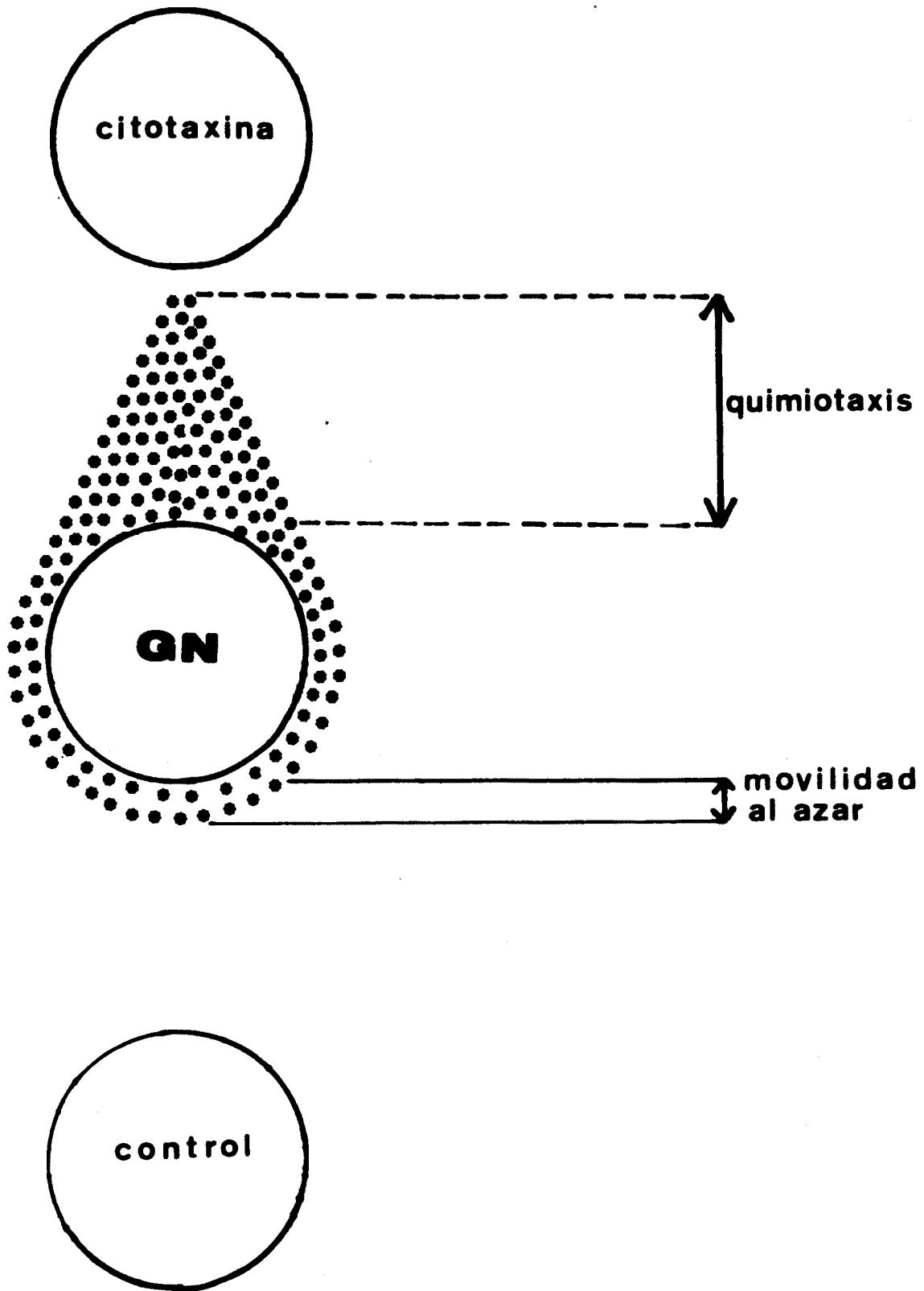


Fig. 23.- Quimiotaxis en placas de agarosa

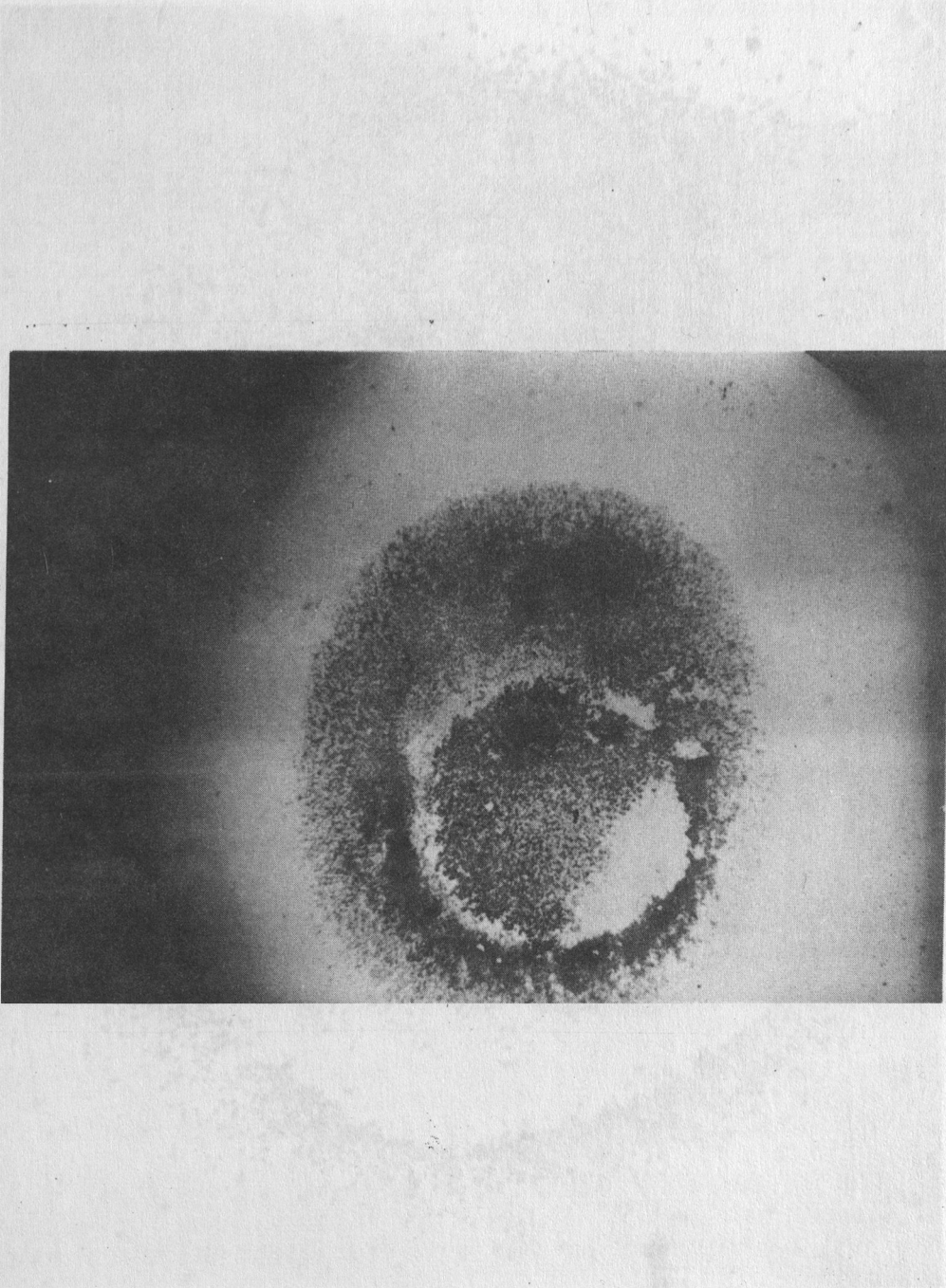


Fig. 24.- Aspecto al microscopio óptico de una quimiotaxis (40x)

Fig. 25.- Aspecto al microscopio óptico de una quimiotaxis (100x)