



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TRABAJO ESCRITO DE EDUCACION CONTINUA:
"METODOS DE ESTUDIO DE LA FUNCION DE
LAS CELULAS FAGOCITICAS DE LA SANGRE"

Sustentado por:
RAFAEL ALFONSO CORREA RAMIREZ

TESIS CON
TITULO DE ORIGEN

Carrera:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
(Bioquímico Microbiológico)



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION.....	3
CAPITULO I. ANTECEDENTES.....	6
CAPITULO II. RELACION ENTRE LAS CELULAS FAGOCITICAS.....	11
CAPITULO III. LAS FUNCIONES DE LOS NEUTROFILOS.....	12
CAPITULO IV. LAS FUNCIONES DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES.....	28
CAPITULO V. METODOS DE ESTUDIO DE LA FUNCION DE LOS FAGOCITOS.....	33
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	46

INTRODUCCION

Hace cerca de tres billones de años que apareció la vida sobre nuestro planeta; al haber vida hubo muerte y, desde luego heridas y daño a la integridad de estos organismos primitivos, presumiblemente unicelulares, los cuales tuvieron necesidad de "aprender" a reparar dichas heridas o quemaduras provocadas por posibles fenómenos naturales. Conforme avanzó la evolución, estos organismos se hicieron multicelulares y fué necesaria la especialización de células, que con el tiempo formaron tejidos con funciones específicas siendo mayores y más complejas sus necesidades. Una de estas necesidades fué la especialización de células que constituyeron un sistema de defensa contra posibles agentes invasores (apareció el parasitismo) y, que a su vez realizaran funciones de limpieza de células dañadas o muertas de sus propios tejidos, inclusive algunas células mal formadas. Este tipo de células especializadas se observa tanto en invertebrados como en organismos superiores y sobretodo en mamíferos, en los cuales existe ya un sistema circulatorio con un grado mayor de complejidad funcional.

De esta manera los fagocitos presentes en la sangre, así como otras células que llegan a constituir tanto en el ser humano como en los demás mamíferos superiores, un sistema que, aún sin ser el único, si es crucial en la defensa del organismo huésped; ya que si un agente agresor vence las barreras naturales del organismo, entran en actividad estas células fagocíticas, las cuales se encuentran involucradas en el proceso de inflamación.

La inflamación es un mecanismo de defensa que ayuda a contener agresores y reparar daños que estos puedan causar. Gracias a este mecanismo-

se produce una vasodilatación local en el punto de la agresión, que asegura el arribo de factores plasmáticos que intervienen en la defensa del organismo, a la vez que facilita la llegada de mayor número de células fagocíticas. Una vez vencido el agresor, se encarga de reparar los daños ocasionados por el ataque (infección, trauma térmico, eléctrico o químico) y limpiar la zona de los residuos antigénicos y las células muertas durante el proceso.

Hay dos tipos de fagocitos "profesionales": los leucocitos polimorfonucleares, que son células circulantes que emigran a los sitios de inflamación y los fagocitos mononucleares que circulan en la sangre o se encuentran fijos en los tejidos y que también, se acumulan en los sitios de inflamación. - Ambos tipos de células son capaces de reconocer e ingerir partículas mediante sus receptores localizados en la superficie celular y de digerir tales sustancias por medio de sus lisosomas. No obstante, los fagocitos mononucleares muestran mucho mayor diversidad funcional y de respuesta. Esta diversidad de estructura y función es el resultado de la maduración progresiva de estas células a partir de sus precursores en la médula ósea.

En cuanto a los polimorfonucleares, su característica más sobresaliente es su gran movilidad y sobretodo la capacidad de fagocitar y digerir las partículas que los activaron, para ello tienen muy desarrollado el mecanismo de locomoción, que está formado de microtúbulos, microfibrillas y proteínas como la actina y la miosina. Su citoplasma es muy abundante en lisosomas, ricos en enzimas con las cuales va a ser posible digerir la partícula fagocitada. Son células que no se reproducen, su núcleo pierde importancia;

su actividad metabólica es mínima, sus mitocondrias y retículo endoplásmico están atrofiados. Es altamente especializada para un fin concreto: la fagocitosis.

Los monocitos son células que circulan en la sangre, donde podemos considerar que son células relativamente inmaduras ya que su característica más importante es su actividad fagocitaria, la que realizan fuera del torrente circulatorio, donde adquieren el equipo necesario para digerir el material fagocitado, conservando su capacidad de reproducción.

Si bien ambos tipos de células fagocíticas tienen una diversidad estructural que las capacita para la destrucción de agentes invasores del organismo, fisiológicamente tienen también una serie de funciones características que desarrollan para dicha finalidad como son: la quimiotaxis o capacidad de respuesta que conduce a la migración de células fagocíticas a través de los tejidos como prerrequisito para estar presentes en el sitio de la infección del agente o bacteria invasora; la degranulación o formación de fagosoma y finalmente la muerte de dicha bacteria.

Las funciones pueden estudiarse como fenómenos aislados tanto in vitro como in vivo, para lo cual existe un grupo de técnicas ya establecidas y que serán objeto de este estudio. Esta revisión no considerará trastornos de la producción periférica que tiene como consecuencia solamente un número insuficiente de granulocitos o de monocitos circulantes.

C A P Í T U L O I

ANTECEDENTES

El concepto de inflamación tiene una historia que está íntimamente relacionada con la infección, sin embargo la inflamación no es siempre debida a infección. La infección es causada por microorganismos que han invadido los tejidos del huésped.

De la vieja medicina egipcia se obtiene el documento más antiguo conocido, en el cual se usa varias veces un término que se puede interpretar como inflamación: el Papiro Smith, que data del año 1650 A.C. y es derivado de un original que es quizá mil años más antiguo. En este papiro los egipcios usan la supuesta palabra "shememet" en relación a heridas presumiblemente infectadas.

En la medicina griega, en la época de Hipócrates (460-380 A.C.) la inflamación era llamada "phlegmoné", que significa o da idea de inflamación. Tanto en la antigüedad como actualmente, un ejemplo clínico común de inflamación es una herida infectada; por razones obvias muchas heridas infectadas se hinchan solamente después de un periodo de supuración (formación de pus). Nuestros antecesores equivocaron su razonamiento al creer que la supuración era el paso previo a la inflamación y que ésta última debería evitarse provocando un abundante sangrado, es decir, hacer fluir a través de la herida tanta sangre como sea posible; durando por muchas generaciones esta pernicioso idea.

Es en la práctica médica romana, en el siglo primero A.C. cuando Cornelius Celsus da una definición clínica de la inflamación, tan precisa que no-

tenemos aún una mejor. Los signos más claros de la inflamación, dice Celsus, son cuatro: rubor, tumor, calor y dolor; ahora conocemos estas manifestaciones como "signos cardinales".

En 1793 el científico John Hunter escribió un gran tratado sobre sangre, inflamación y heridas de bala, en el cual sostiene que la inflamación no es una enfermedad como se creyó en la antigüedad, sino tal vez una reacción saludable.

Rudolph Virchow (1821-1902), el fundador de la Patología Celular Moderna, en su famosa Patología Celular, publicada en 1858 menciona los signos cardinales de Celsus, pero en realidad su contribución en la comprensión de la inflamación es muy pobre. Sin embargo, uno de sus discípulos, Julius Cohnheim en colaboración con Arnold en 1867 fué quien hizo las mejores aportaciones cuando aún no existían microtomos eficientes ni se trabajaba con fijación en parafina, así como tampoco se usaba la tinción simple de tejidos; él trabajó con tejidos vivos en los cuales indujo la inflamación y observó directamente al microscopio. Trabajando en el mesenterio de la lengua de una rana, él describió lo siguiente: primero una dilatación vascular acompañada de una aceleración del flujo sanguíneo y pocos minutos después una disminución vascular por abajo de lo normal, habiendo también una marginación de los leucocitos hacia la periferia del torrente sanguíneo, pero dentro de la zona plasmática, que al estar en contacto con la pared vascular se adhieren al endotelio, al cual se observa un aumento en su permeabilidad (exudación de fluido); habiendo además un deslizamiento a los espacios extravasculares -

(diapédesis) de estos leucocitos adheridos. Todos los cambios observados, - escribió Cohnheim pueden explicar los cuatro signos de Celsus; la vasodilatación puede relacionarse con el rubor; el incremento observado en el flujo con el calor, la exudación de flujo con el tumor observado en la inflamación y aun que la rana no puede hablar, expresa su dolor. Cohnheim escribió esto cincuenta años después de sus observaciones realizadas en tejidos vivos; pocos documentos en la historia de la Patología tienen la claridad y el impacto de su trabajo.

Ahora bien, Cohnheim solo describió la emigración de las células blancas de la sangre, pero no supo a ciencia cierta si emigraban directamente al sitio de la infección o bien, salían hacia afuera de los vasos por simple arrastre del derrame, sin embargo estos trabajos se complementaron cuando en - 1882, en Messina, el zoólogo ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) estudió el - papel de las células móviles de la larva transparente de una estrella de mar en la protección contra un intruso extraño. El introdujo una espina de rosa en el interior de estas larvas y observó que unas horas después la espina estaba rodeada por dichas células móviles. Este experimento puede considerarse el punto de partida de la Inmunología Celular. Ya había sido establecido por - Koch y Neisser que las bacterias pueden hallarse en el interior de los leucocitos, pero se pensó que esto era el resultado de la invasión bacteriana a - los leucocitos. Metchnikoff demostró que los leucocitos de hecho habían engullido a los microorganismos. En 1883 Metchnikoff observó que Daphnia, un - metazoario diminuto y transparente podía ser destruído por las esporas del -

hongo *Monospora bicuspidata* y que en algunos individuos estas esporas eran atacadas por las células sanguíneas y podían ser destruidas en el interior de estas células, protegiendo en esta forma al animal contra los invasores. En 1884, extendió dichas observaciones a los leucocitos de los conejos y del hombre empleando diversas bacterias. Él observó que la ingestión de los microorganismos por los leucocitos, que él denominó fagocitosis, se incrementaba en forma notoria en los animales que estaban recuperándose de alguna infección o después de la vacunación con una preparación de estos microorganismos. Por lo tanto, él concluyó que la fagocitosis era el principal mecanismo de defensa de los organismos superiores. Posteriormente demostró la existencia de dos tipos de leucocitos circulantes capaces de fagocitar: los polimorfonucleares y los macrófagos, así como la de ciertos leucocitos fijos y propuso el término general de fagocitos para todas estas células.

Las observaciones de Metchnikoff y Aschoff proporcionaron las bases para el concepto de formas de transición entre el monocito de la sangre y el macrófago hístico. En 1924 M.R. Lewis demuestra claramente, por primera vez, que en cultivo de tejidos los monocitos se transforman en macrófagos. Estudios anteriores habían descrito un fenómeno similar en sangre leucémica cultivada. Los de Lewis mostraron posteriormente que en todas las especies de vertebrados los grandes fagocitos mononucleares circulantes eran capaces de diferenciarse en "macrófagos" semejantes a los encontrados en el tejido conectivo, hígado, bazo y ganglios linfáticos, también en células epiteloides y gigantes exactamente iguales a las encontradas en lesiones tuberculosas.

Las subsiguientes observaciones de Maximow y otros biólogos celulares modernos confirmaron y ampliaron estas descripciones. La evidencia más convincente de la diferenciación del monocito sanguíneo en el animal se derivó del trabajo de Evert y Florey en 1909. Usando conejos en sus estudios, estos investigadores observaron que monocitos que contenían partículas de carbón fagocitadas o teñidas con colorante supravital, emigraban de los vasos sanguíneos hacia el tejido conectivo y se transformaban en células indistinguibles de los macrófagos hísticos (histiocitos). Con el tiempo, algunos de estos monocitos originaban células gigantes.

Un gran paso adelante en la evolución del estudio de estas células sanguíneas fué la introducción de las tinciones diferenciales de Paul Ehrlich que en 1879 publicó sus observaciones respecto a los gránulos específicos de los leucocitos, clasificándolos como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, distinguiendo todas las variedades de las células blancas de la sangre tal y como las entendemos actualmente.

C A P I T U L O I I

RELACION ENTRE LAS CELULAS FAGOCITICAS

Todavía se desconoce porqué surgió la necesidad de dos tipos de células fagocíticas, cuyas capacidades se diferencian y complementan en muchos aspectos. Los fagocitos mononucleares son las únicas células fagocíticas de los invertebrados que realizan una función digestiva cuando menos en algunos de ellos; en cambio los granulocitos se encuentran presentes en animales con sistemas circulatorios. En el humano se encuentran presentes ambos tipos de células fagocíticas.

Mientras los neutrófilos polimorfonucleares, en virtud de su núcleo peculiar segmentado, bien diseñado para atravesar espacios estrechos se relacionan principalmente con la destrucción de microorganismos que perecen al ser fagocitados; los fagocitos mononucleares se relacionan con microorganismos capaces de sobrevivir a la residencia intracelular y contra los cuales los neutrófilos resultan ineficaces. Es decir, las principales células efectoras son los macrófagos y los monocitos. Los monocitos pueden servir como un sistema de resguardo para los neutrófilos en las infecciones agudas, pero fagocitan con menor eficacia y carecen de muchos de los sistemas bactericidas del neutrófilo; los macrófagos son mucho más importantes en las infecciones crónicas. Estas características de unas y otras células nos motivan a estudiar sus funciones por separado.

C A P I T U L O I I I

LAS FUNCIONES DE LOS NEUTROFILOS

En el ser humano así como en otros organismos superiores, los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares son los responsables primarios del mantenimiento de las defensas normales contra organismos invasores, actividad que se manifiesta principalmente en la inflamación aguda; acumulándose en el sitio de la reacción, donde desarrollan sus funciones que conducen finalmente a la ingestión y destrucción de la mayoría de los invasores "extraños". Para esta finalidad requieren una secuencia de funciones características entre las cuales se encuentran involucradas la adherencia al endotelio vascular, la emigración extravascular (migración), la migración dirigida hacia las partículas que van a ser ingeridas (quimiotaxia), reconocimiento (y adherencia) de las partículas por las membranas, englobamiento de los cuerpos extraños (fagocitosis), fusión de lisosomas con las vacuolas fagocíticas (degranulación) con descarga de constituyentes lisosómicos en vacuolas y un estallido metabólico oxidativo (con la generación de radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno).

A continuación se revisará brevemente la producción y maduración de estas células con respecto a su función, la cual a su vez está innegablemente relacionada con su morfología; y después se hará una descripción detallada de cada una de estas funciones.

La serie mieloide la forman los granulocitos neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Se piensa que las tres líneas celulares siguen pa

trones similares de proliferación, diferenciación, maduración, almacenamiento en la médula ósea y de liberación a la sangre; sin embargo, los que mejor han sido estudiados en estos procesos son los neutrófilos, siendo menos para las otras dos líneas celulares. Se derivan de una célula pluripotencial de la médula ósea. Las tres primeras etapas morfológicas de su formación, el mieloblasto, el promielocito y el mielocito pueden reproducirse -- (proliferar), como ya se ha demostrado en experimentos con timidina marcada. Las etapas siguientes corresponden a la diferenciación y cambios de maduración. Los límites morfológicos de cada compartimiento celular se definieron hace muchos años y se basaron en pautas tales como tamaño celular, relación del tamaño del núcleo con respecto al citoplasma, delicadeza de la cromatina nuclear, forma nuclear, la presencia o ausencia de nucleolos, la presencia y tipo de gránulos citoplasmáticos y el color del citoplasma de las células teñidas; aunque estas definiciones morfológicas son necesariamente arbitrarias y no siempre se ajustan a cambios bioquímicos o fisiológicos significativos y a veces es difícil clasificar a una célula en una categoría u otra, ya que en realidad se trata de una transición entre ambas, sin embargo es útil separar las líneas celulares en estos límites morfológicos y definir límites normales de la distribución celular dentro de ellos.

EL MIELOBLASTO. El término mieloblasto describe una célula inmadura que se encuentra normalmente en la médula ósea y no en la sangre. Es la célula grande (14 a 20 micras de diámetro) se divide y forma promielocitos. Posee un núcleo relativamente grande, redondo o ligeramente oval y -

una pequeña cantidad de citoplasma. En preparados teñidos con colorante de Wright, la membrana nuclear es lisa y la cromatina presenta una distribución uniforme y fina. Por lo general hay de dos a cinco nucléolos de color celeste pálido; el citoplasma es basófilo y a veces reticulado con un aparente aparato de golgi. No hay gránulos citoplasmáticos.

EL PROMIELOCITO. El promielocito es una célula un poco más grande que el mieloblasto. Tanto con el microscopio electrónico como el microscopio óptico, se observa que posee un núcleo redondo u oval en el cual la cromatina nuclear se distribuye difusamente como en el mieloblasto. Se encuentran nucléolos presentes pero conforme la célula madura se tornan menos notables; con un retículo endoplásmico más prominente. Aparecen los gránulos primarios, azurófilos y se acumulan en número creciente durante esta etapa, pero aún no se encuentran presentes los denominados gránulos secundarios o específicos. Es importante observar que los gránulos primarios no se transforman en gránulos secundarios al madurar la célula, sino persisten durante la maduración y se les observa durante todas las etapas subsecuentes incluyendo las formas polimorfonucleares. Es inmóvil al igual que el mieloblasto.

EL MIELOCITO. El mielocito neutrófilo presenta un núcleo usualmente excéntrico, redondo u oval, y un lado puede aparecer algo aplanado. La cromatina nuclear es un poco gruesa y los nucléolos pequeños frecuentemente invisibles, aunque se les vé claramente en el microscopio electrónico. Los gránulos primarios persisten, pero su producción se detiene brúscamen

te y cada división subsecuente conduce a una disminución de su número en la población hija. Aparecen los gránulos secundarios que son más pequeños en la población hija que en la anterior y forman un número creciente sobre la superficie convexa y bordes laterales del ya menos prominente aparato de golgi. El retículo endoplásmico granular y la basofilia citoplásmica disminuyen. Las mitocondrias permanecen pequeñas y relativamente escasas.

EL METAMIELOCITO. Durante este estado el desarrollo de las características citoplasmáticas proporcionará las de los granulocitos maduros. El núcleo toma una forma arrañada de manera que anuncia estados de segmentación nuclear, ha perdido la capacidad de división celular, el citoplasma se hace uniformemente rosado y con la presencia de gránulos primarios y secundarios, pero predominando los secundarios.

EN BANDA. Los cayados o bandas son similares a los granulocitos neutrófilos maduros, poseen el citoplasma rosado con finos gránulos azurófilos. El núcleo aparece alargado como una salchicha o encorvado sobre sí mismo y la cromatina nuclear menos madura que se encuentre en sangre periférica.

LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES. Este estado corresponde al granulocito completamente maduro, con un contenido de gránulos en donde predominan los secundarios (80 al 90%), pero retienen algunos azurófilos (10 al 20%). En los preparados teñidos con colorante de Wright, se observa que el núcleo adquiere un color púrpureo muy intenso y contiene cromatina. El citoplasma es rosa claro y contiene gránulos específicos finos, que

a veces pueden dar solo un aspecto de vidrio esmerilado. En extensiones húmedas presentan actividad amebnide a temperatura fisiológica, con movimientos erráticos, a una velocidad que ha sido estimada a 19 micras por minuto y con una vida media de 6 a 7 horas, antes de perder su capacidad funcional, - abandonando el cuerpo de manera aleatoria no relacionada con la edad. Aproximadamente 10^{11} neutrófilos entran y salen del organismo cada día.

La reserva total de neutrófilos que salen de la médula y entran a la sangre periférica está compuesta de dos grupos rápidamente intercambiables. Una es la "reserva circulante" que está presente en el torrente sanguíneo y - representa aproximadamente la mitad del total de neutrófilos sanguíneos en el ser humano, que se calcula con facilidad mediante las cuentas leucocitaria y diferencial en una biometría hemática. La "Reserva Marginal" la constituyen el resto de los neutrófilos sanguíneos totales que se concentran lentamente y a lo largo de la superficie del endotelio vascular, lugar donde algunas veces se adhieren .

GRANULOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

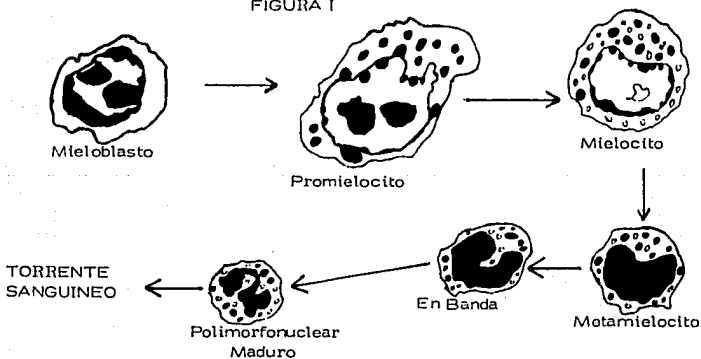
Los gránulos primarios de los neutrófilos humanos son lisosomas que contienen varias enzimas y otras sustancias tales como fosfatasa ácida, peroxidasa, estearasa, beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, aril-sulfatasa, 5'nucleosidasa, N-acetil-beta-glucosa-minidasa, alfa-manosidasa, mucosus-tancia sulfatada, lisosima y otras proteínas básicas. La peroxidasa ha sido asociada con los gránulos primarios por métodos histoquímicos, citoquími-

cos y bioquímicos. La mucosustancia sulfatada es presumiblemente la causa de la coloración azurófila de estos gránulos primarios. La fosfatasa alcalina al parecer, está ausente en estos gránulos.

Los gránulos secundarios de los neutrófilos se caracterizan por su contenido de fosfatasa alcalina y su carencia de fosfatasa ácida, de peroxidasa y de mucopolisacárido sulfatado, conteniendo además aminopeptidasa, lisozi-ma, colagenasa y proteínas básicas. La aminopeptidasa aparece relativamente tarde en la maduración del mielocito.

Se ha descrito una tercera forma o gránulo terciario en neutrófilos humanos, pero algunos investigadores la consideran simplemente como la va-riación morfológica de los gránulos primarios y secundarios. No se sabe si estos gránulos se originan más allá de la etapa de mielocito, pero este hecho se ha considerado como probable.

FIGURA I



La figura 1 es una representación diagramática de la aparición de gránulos durante la maduración neutrófila. Los mieloblastos son células relativamente indiferenciadas con un gran núcleo oval, grandes nucléolos y citoplasma carente de gránulos. Se origina a partir de un pool precursor de células-madres. Subsecuentemente hay dos etapas secretoras, el promielocito y el mielocito, cada una de las cuales produce un tipo diferente de gránulo secretor. Los gránulos azurófilos (oscuros) se producen solamente durante la etapa de promielocito; los gránulos específicos (gránulos claros) se producen durante la etapa de mielocito. El metamielocito y las formas en banda son etapas no proliferativas, no secretoras que se desarrollan hacia el polimorfonuclear maduro, caracterizado por un núcleo multilobulado y un citoplasma que contiene principalmente glucógeno y gránulos. Tanto los gránulos azurófilos no específicos como los gránulos específicos persisten durante todas las etapas posteriores.

ADHERENCIA ENDOTELIAL

Al iniciar el proceso inflamatorio agudo, se presenta un incremento en la marginación de los neutrófilos circulantes; esta adherencia al endotelio vascular es un prerrequisito para la diapédesis subsiguiente; tan importante es que si la lesión es mínima, esta acumulación es el único signo de la inflamación.

Podríamos afirmar que la adherencia endotelial es una actividad innata del neutrófilo, sin embargo, se han encontrado sustancias capaces de incre-

mentar esta adherencia (como péptidos sintéticos y algunas fracciones derivadas del complemento que si se administran por vía intravenosa producen una rápida neutropenia a consecuencia del importante incremento de margina
ción.

QUIMIOTAXIS

Se define a la quimiotaxis como la capacidad de respuesta de las células móviles (monocito-macrófago y polimorfonuclear) a ciertas sustancias endógenas o exógenas para las cuales existen receptores celulares específicos. - El desplazamiento celular es unidireccional hacia la zona de mayor concen
tración del estímulo quimiotáctico, de manera que los receptores y la concen
tración del factor quimiotáctico son los mecanismos que influyen en la acumu
lación de células inflamatorias en la zona del conflicto.

Al existir un gradiente de estímulo quimiotáctico a nivel tisular, los po
limorfonucleares se encuentran conformando la "reserva marginal", la cual está adherida al endotelio vascular fácilmente emigran a los tejidos inflamados, la fuente de esos estímulos es muy variada, como son algunos péptidos de origen bacteriano de los cuales el más estudiado es la N-formilmetionina, que es importante en la génesis de proteínas bacterianas, aunque se han sintetizado otros péptidos de utilidad en los estudios de la quimiotaxis como los péptidos de formilo-metionilo. Otras sustancias son los factores quimiotácticos inducidos por cristales (FCC) como urato monosódico y pirofosfato cálcico, sin embargo los más importantes son los producidos por mediación del -

sistema del complemento. Después de la activación del complemento, ya sea por la vía clásica o por la alterna, C_3 y C_5 se rompen en los fragmentos a y b respectivamente. C_{3a} y C_{5a} funcionan como anafilatoxinas provocando la liberación de histamina de las células cebadas y basófilos, sustancia cuya función es la de contraer el músculo liso y aumenta la permeabilidad de los capilares. Además que el C_{3a} y el C_{5a} se consideran como los factores quimiotácticos más importantes derivados del sistema de complemento, que a concentraciones tan bajas como 5 a 10 nanogramos inducen la quimiotaxis, e incrementan la adhesividad. Los leucocitos liberan factores que son directa o indirectamente quimiotácticos. Se han identificado varios lípidos quimiotácticos como las prostaglandinas; así como productos de la coagulación o de la fibrinólisis.

Cuando un factor quimiotáctico se adhiere a los receptores leucocitarios se activa el ciclo hexosa-monofosfato que finalmente produce Na , K y Ca alternando la polaridad de la membrana, provocando un movimiento celular dirigido, lo cual implica alteración morfológica por la formación de un pseudópodo, libre de gránulos; el borde conductor (urópodo) muestra delgadas fibrillas de retracción que se adhieren al sustrato. El borde conductor del pseudópodo se llena de microfilamentos de actina y se extienden como una fina capa submembranosa alrededor de la célula y luego reaparecen con haces densos en el urópodo. Estos microfilamentos proporcionan sosten estructural, y junto con las moléculas de miosina y otras proteínas reguladoras son capaces de contraerse proporcionando así las fuerzas dinámicas necesas-

rias para el movimiento celular. También hay microtúbulos en la célula que no intervienen en la movilidad, sino que sirven como esqueleto dando mayor rigidez y forma a la célula. Estas microfibrillas también parecen ser las estructuras causantes de la persistencia del movimiento en una dirección específica a la falta de un gradiente quimiotáctico.

Algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para evitar la quimiotaxia como los gonococos que producen infecciones diseminadas activando el complemento con una rapidez menor que con la que ellos infectan las mucosas.

RECONOCIMIENTO Y ADHERENCIA DE PARTICULAS FAGOCITABLES

Esta es una función de los receptores de superficie de los neutrófilos y de algunos constituyentes del suero capaces de actuar sobre algunas bacterias, hongos y otras partículas para aumentar su "avidez de ingestión" llamada opsonización.

Van Oss postuló que las bacterias no virulentas poseen superficies relativamente hidrófobas que favorecen la fagocitosis en tanto que especies virulentas se caracterizan por tener factores hidrófilos de superficie que retardan la fagocitosis. Siguiendo este punto de vista, el fin de la opsonización es aumentar la hidrofobicidad al reducir las cargas existentes entre microorganismos y neutrófilos, pues ambos están cargados negativamente.

Aunque ningún esquema simple puede resumir los requerimientos opsonicos de cualquier género o especie de microorganismos, se conocen cuando menos tres mecanismos:

Primero, un anticuerpo específico por sí solo (subclase IgG_1 e IgG_3) puede actuar como opsonina. Se fija la fracción Fab, que se combina con su antígeno respectivo de la superficie bacteriana; la porción Fc se libera para adherirse a los sitios receptores Fc que se encuentran en la superficie del fagocito completándose así un puente entre bacterias y fagocito. Se ha calculado que 75 a 90% de los neutrófilos humanos en la sangre periférica tienen receptores en su superficie para las partículas cubiertas con IgG . Aunque no se han aislado ni identificado los receptores Fc sobre los neutrófilos.

Segundo, cuando un anticuerpo específico de IgM o IgG al parecer en cantidad insuficiente para opsonizar por sí mismo, puede reaccionar con bacterias y activar en sucesión progresiva la vía hemolítica del complemento. En la superficie del neutrófilo se han identificado plenamente receptores estructuralmente específicos para C_{3b} y se han demostrado en más del 90% de los neutrófilos de sangre periférica. El C_3 activado en la superficie bacteriana sirve como puente entre la bacteria y el fagocito, pero para que ocurra la fagocitosis deben participar un gran número de receptores C_3 (en macrófagos) una linfocina activa a estos, permitiendo que emigren y se distribuyan en la membrana celular.

Tercero, opsonización inespecífica a través de la vía alterna del complemento. Esta vía no es activada por complejos antígeno-anticuerpo, sino directamente por polisacáridos bacterianos o micóticos que resultan de la fijación de C_3 , el factor opsonico crucial a la superficie del microorganismo. En este caso la fagocitosis estará mediada por el receptor celular para C_3 activado.

FAGOCITOSIS

Cuando se ha establecido el contacto entre un neutrófilo y una partícula adecuada, la partícula es ingerida por la célula en un proceso denominado fagocitosis, función que puede ser llevada a cabo en el interior anaeróbico de un absceso con energía obtenida por glicólisis anaerobia; requiere el movimiento de pseudópodos alrededor de los microorganismos para lo cual una interacción en cadena de todos los ligandos opsónicos distribuidos homogéneamente tanto en el fagocito como en la partícula que va a ser ingerida, que de esta forma queda envuelta con una "cremallera" en el fagosoma formado. Al fusionarse los pseudópodos, este fagosoma se desplaza hacia el centro de la célula, aparentemente con mediación de microtúbulos.

Los neutrófilos son capaces de ingerir ciertas partículas en ausencia total de complemento o de inmunoglobulina debido probablemente a similitud química en las superficies de tales partículas, que permite la adherencia por un comportamiento como "inmunoglobulinas sustitutas". Esto permite al polimorfonuclear la ingestión directa de tales partículas, hecho que ya ha sido demostrado.

La ingestión de partículas por macrófagos y por neutrófilos se acompaña por un estallido respiratorio observado como un incremento espectacular en el consumo de oxígeno y la activación de una oxidasa asociada a la membrana que depende del fosfato de nicotinadeninucleótido reducido (NADP). Esta enzima reduce el oxígeno molecular hasta anión superóxido, que a su vez se transforma en peróxido de hidrógeno.

DEGRANULACION

La destrucción de microorganismos susceptibles dentro de los neutrófilos está íntimamente asociada al proceso de degranulación, o sea la liberación del contenido de los gránulos al interior del fagosoma. Además, hay datos firmes de que se realiza cierta degranulación hacia el exterior de la célula.

A medida que se forma el fagosoma durante el englobamiento microbiano, los gránulos del neutrófilo adquieren movimientos violentos en la proximidad del fagosoma, se fusionan con la vacuola fagocítica y desaparecen del citoplasma (degranulación). En algún momento entre estas etapas de adherencia y digestión, las membranas de los gránulos específicos comienzan a fusionarse con los fagosomas nacientes. El resultado es que la lactoferrina y lisosima pasan al espacio extracelular. Poco después los gránulos azurófilos se fusionan con los fagosomas, el contenido de estos gránulos tiende a permanecer en el fagosoma. Como sucede en la quimiotaxia y en la ingestión, los microfilamentos y los microtúbulos pueden ser importantes en la fusión de los fagosomas y los gránulos.

Es importante revisar el contenido de los gránulos ya que en ellos se encuentran presentes los múltiples sistemas microbicidas que en el ser humano pueden dividirse en dos amplias categorías: dependientes del oxígeno e independientes del mismo.

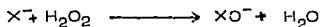
Los sistemas dependientes del oxígeno se pueden dividir a su vez en los que están mediados por la mieloperoxidasa y los que no lo están.

La mieloperoxidasa se encuentra en los gránulos primarios y representan el 5% del peso seco del neutrófilo. Junto con el peróxido de hidrógeno, factores haluros oxidables y un pH ácido, se integra un potente sistema antimicrobiano en el fagolisosoma que tiene propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales y antimicoplásmicas, se ha propuesto una proteína muy básica, sirve para unir el peróxido de hidrógeno y el haloide a la superficie blanco microbiana, poniendo así en contacto estrecho los componentes del sistema peroxidasa con la envoltura celular.

El peróxido de hidrógeno surge del estallido respiratorio; si hay producción deficiente, algunos microorganismos lo producen cuando no tienen catalasa, paradójicamente median su propia destrucción como los neumococos y los estreptococos.

En el interior del neutrófilo hay cloruros por arriba de lo requerido para la destrucción mediada por la mieloperoxidasa y pueden penetrar al interior de la vacuola fagocítica. Otro haluro podría ser el yoduro del suero obtenido por la desiodación de hormonas tiroideas.

El sistema mediado por la mieloperoxidasa tienen un pH ácido óptimo, condición que se reúne en la vacuola fagocítica. La mieloperoxidasa cataliza la oxidación de iones (X^-) haluro a iones hipohalitos por el peróxido de hidrógeno:



Hay varios mecanismos de "haluro activado" que podrían dañar a los microorganismos, incluyendo la halogenación de la pared bacteriana, la des

carboxilación de aminoácidos con liberación de aldehídos tóxicos y la producción de oxígeno único, aunque todo es supuesto, ya que en vivo no se han obtenido datos.

Se requiere actividad de la mieloperoxidasa para una función óptima de los polimorfonucleares, sin embargo se han identificado numerosas personas con ausencia de mieloperoxidasa en sus células fagocíticas, pero aún sin la presencia de la enzima se llega a la ingestión y destrucción, aunque incompleta de bacterias, lo que implica la existencia de otros mecanismos bactericidas que no involucran a la mieloperoxidasa, como son los siguientes:

a concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno hay actividad microbiana directa y puede actuar en combinación con el ácido ascórbico y otros iones metálicos para matar los microorganismos ingeridos.

el anión superóxido tiene un efecto sobre los microorganismos, aunque algunos contienen la superóxido-mutasa que los hace resistir en la vacuola fagocítica.

el radical hidroxilo formado por la interacción del peróxido de hidrógeno y el ión superóxido, que reacciona casi instantáneamente con la mayor parte de las moléculas orgánicas.

Existen también sistemas de actividad microbicida independientes del estallido respiratorio como son: las proteínas catiónicas, lactoferrina, lisozima, histonas nucleares, elastasa, y el ácido de la vacuola fagocítica.

Las proteínas catiónicas de los gránulos azurófilos fueron las prime-

ras sustancias antimicrobianas identificadas en los neutrófilos; su mayor actividad se realiza a pH neutro, no destruyen al microorganismo, pero afectan rápidamente su capacidad para desarrollarse. La susceptibilidad de los microorganismos gram negativos para ser lisados por los neutrófilos se basa en la cantidad de polisacáridos que hay en su envoltura.

La lactoferrina proviene de los gránulos específicos y puede ejercer función antimicrobiana fijando y reteniendo el hierro requerido de las bacterias ingeridas y puede además ejercer una parte sustancial fuera del fagocito.

La lisozima se encuentra en los gránulos primarios y también en los gránulos secundarios, ataca mucopéptidos de la pared celular de diversas bacterias, pero sirve más al fagocito por su capacidad digestiva y no tanto como microbicida.

Durante la fagocitosis, el pH del fagosoma disminuye; se desconoce el mecanismo de la acidificación, pero estudios recientes sugieren que esta en proporción 1 : 1 con el consumo celular de oxígeno.

Los granulocitos contienen además diversas proteasas que son activas a pH neutro (por ejemplo: catepsina G, serina, esterasas, etc.); más importantes en la digestión microbiana que en la destrucción.

Finalmente las histonas nucleares son liberadas en los tejidos circunvecinos por la muerte y autólisis de las células. Tienen actividad directa antimicrobiana.

Todos estos mecanismos microbicidas mencionados son de importancia obvia ya que se llevan a cabo en condiciones anaerobias.

C A P I T U L O I V

LAS FUNCIONES DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES

Los fagocitos mononucleares se originan en la médula osea a partir de una célula precursora pluripotencial común a todas las células hemopoyéticas, incluyendo eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y fagocitos mononucleares. Conforme la célula precursora va diferenciándose a través de divisiones sucesivas, las series de fagocitos mononucleares y de granulocitos continúan compartiendo una célula precursora común, de la cual se van a diferenciar. En los cultivos, estas células de proveniencia medular dan origen a colonias mixtas de granulocitos y macrófagos, bajo ciertas condiciones y colonias monocíticas bajo condiciones diferentes. La primera célula precursora indetectable como parte del sistema fagocítico mononuclear es el monoblasto, que es una célula esférica de 10 a 12 micras de diámetro con escasas granulaciones. Los monoblastos son capaces de realizar fagocitosis y se adhieren a el vidrio; presentan receptores Fc y estearasa citoquímica típica de la progenté más madura y distintos de los mieloblastos, los cuales son precursores de las series granulocíticas. En el ratón cada monoblasto se divide una vez, dando así origen a los promonocitos en un ciclo de doce horas aproximadamente.

Los promonocitos tienen diámetro aproximado de 15 micras, con un núcleo dentado que ocupa la mitad de la célula más o menos. Comparten con el monoblasto las características típicas de los fagocitos mononucleares, incluyendo el gran almacenamiento de gránulos, que en los frotis muestran ser azurófilos, algunos de los cuales son además positivos a la mieloperoxidasa.

dasa. Los gránulos almacenados son sintetizados únicamente en esta etapa de maduración.

Los promonocitos al madurar se convierten en monocitos, los cuales poseen un número menor de gránulos positivos a la peroxidasa y presentan un aumento en la proporción citoplasma/núcleo. En comparación con los neutrófilos, la reserva medular de los monocitos preformados es pequeña. En los seres humanos, son liberados a la sangre dos y medio días después de su formación, donde circulan con una vida media aproximada de un día, emigrando al azar del torrente sanguíneo hacia el medio extravascular. En general, los monocitos no penetran en el fondo común circulatorio. Durante la inflamación; la producción de monocitos aumenta por expansión del depósito de promonocitos, la disminución del tiempo del ciclo celular y su liberación más rápida a la circulación son llevadas a cabo. Los macrófagos tisulares surgen por la proliferación de macrófagos inmaduros contenidos en la población macrófágica que retienen su capacidad para responder a los mitógenos como el factor estimulante de colonias. La mayor parte de los resultados de los estudios favorecen el predominio de la vía hemopoética. Es posible que la duración de vida de un macrófago sea de meses.

Los macrófagos aparecen tempranamente en el desarrollo del sistema linfoide y se sabe que intervienen en la resorción tisular asociada con el proceso embrionario. Al igual que la maduración del sistema linfoide de los fagocitos mononucleares van aumentando su desarrollo durante la vida fetal y neonatal, y cierto número de funciones le son relativamente inmaduras al nacimiento. La multiplicación de los macrófagos tisulares y sus precur-

sores parece estar bajo el control de factores de crecimiento específicos conocidos como factores estimulantes de colonias que son producción de fibroblastos y linfocitos. El factor estimulante de colonias mejor conocido es una glicoproteína con un peso molecular de 60 000 que es reconocida por sus receptores específicos de la superficie de los monocitos.

A diferencia de los neutrófilos, los monocitos no mueren cuando abandonan la circulación, sino que maduran convirtiéndose en macrófagos (histiocitos) en los tejidos: macrófagos alveolares (pulmón), células de Kupffer (hígado) y macrófagos de los sinusoides del bazo, ganglios linfáticos, peritoneo y otras zonas. Hay cierta evidencia de que los macrófagos en el pulmón y en el hígado pueden proliferar localmente. La maduración de los macrófagos va acompañada por un aumento en el tamaño celular y en el número de los organelos citoplásmicos, incluyendo las mitocondrias y los lisosomas (que contienen las enzimas hidrolíticas), al igual que otros cambios morfológicos, - bioquímicos y funcionales.

QUIMIOTAXIS

Los mediadores humorales de la quimiotaxis de los fagocitos mononucleares se entienden menos que los de los neutrófilos. Sin embargo, la quimiotaxis de los monocitos se produce en respuesta a los oligopéptidos N-formilados sintéticos y el C_{5a} del suero proporciona actividad quimiotáctica. - El reclutamiento de los fagocitos mononucleares es afectado en un mayor grado por los materiales quimiotácticos liberados a partir de los linfocitos, co-

mo el factor inhibitorio de la migración, estimulando la acumulación de fagocitos atraídos por quimiotactismo en los focos de inflamación por factores necrotáticos, restos celulares, células desvitalizadas, etc.

OPSONIZACION

Las membranas de los monocitos humanos y de los macrófagos contienen receptores para las IgG (subclases IgG₁ e IgG₃) y C₃. Por lo tanto, presumiblemente el proceso de opsonización sea semejante al que ocurre en los neutrófilos. Las especies de Mycoplasma tienen la capacidad interesante (in vitro) de adherirse a los macrófagos en ausencia de anticuerpos o de complemento. Cuando se adhieren, retardan los movimientos ameboides del fagocito. Al agregar el anticuerpo específico, los micoplasmas son fagocitados y destruidos. Tales observaciones experimentales permiten la disección de las fases de adherencia y de ingestión de la función de los fagocitos mononucleares, pero su importancia es incierta.

INGESTION

Los monocitos ingieren bacterias con más lentitud que los neutrófilos, destruyéndolas con menos eficacia, y utilizan en forma predominante las vías metabólicas dependientes del oxígeno (fosforilación oxidativa) para realizar la fagocitosis. No obstante, un estallido respiratorio acompaña claramente el encuentro monocito-bacteria, con formación de H₂O₂, O₂⁻ y OH⁻, y además quimioluminiscencia.

MUERTE

Los monocitos poseen dos poblaciones de lisosomas. La primera aparece desde el principio de la maduración de los monocitos y contiene mieloperoxidasa, arilsulfatasa y fosfatasa ácida. El contenido de la segunda población de lisosomas, que aparece posteriormente, es desconocido. Los monocitos no poseen las proteínas catiónicas bactericidas de los neutrófilos; no tienen lactoferrina. Sin embargo, el sistema Haluro-MPO-H₂O₂ opera al parecer, y los monocitos de los enfermos con padecimiento granulomatoso crónico tienen actividad microbicida alterada. Los lisosomas primarios, pueden fusionarse con las vacuolas fagocíticas o vesículas pinocíticas para producir lisosomas secundarios. Hay una relación definida entre la actividad endocítica y la formación de lisosomas; a medida que los macrófagos maduran hay elevación progresiva en los lisosomas y en su contenido de enzimas hidrolíticas.

C A P I T U L O V

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS FAGOCITOS

Después de haber revisado y comprendido los mecanismos funcionales normales por los que los leucocitos son atraídos a la zona de inflamación y cómo actúan al llegar allí, veremos ahora que hay algunos casos que el mecanismo de defensa resulta defectuoso por el acortamiento de la vida-media de los leucocitos y en otros casos, que son los que nos interesan, resultan funcionalmente anormales e incapaces de participar en la defensa del huésped; en estas situaciones estamos ya hablando de alteraciones y obviamente de enfermedad.

No es el objeto de este trabajo el ver los trastornos cuantitativos en cuanto al número de fagocitos, sino cualitativos en cuanto a función. En los trastornos cualitativos de los neutrófilos en que naturalmente se considera que el número total de leucocitos polimorfonucleares es normal o algunas veces elevado, el daño puede estar en cualquiera de sus funciones: movilidad, reconocimiento, ingestión, degranulación y destrucción intracelular; dando lugar a una serie de padecimientos y por lo tanto a diferentes métodos de estudio de estas funciones.

Las pruebas de laboratorio empleadas en la práctica clínica son disponibles para sujetos con diversas enfermedades que se pueden estudiar en términos de las cinco funciones mencionadas.

Movilidad. Los neutrófilos tienen que abandonar la sangre y entrar en-

el espacio perivascular para cumplir su papel en el mecanismo de defensa. La migración a través del espacio endotelial y de la membrana es una característica no separada completamente de la quimiotaxis.

Todos los estudios de la migración de los granulocitos in vivo se basan en el trabajo precursor de Rebeck y sus colaboradores (Rebeck y Crowley, - 1955), que emplearon la técnica de la ventana cutánea con un cubreobjetos, - consiste en hacer una pequeña herida en la piel y se cubre con la laminilla - que se cambia cada dos horas, durante 24 horas. El examen microscópico - permite estudiar la cantidad y tipo de células que acuden a la "defensa". Normalmente se presenta un cúmulo de polimorfonucleares en las primeras horas, que es sustituido por uno de linfocitos, pasadas las primeras 6 horas. Un perfeccionamiento de esta técnica, es el método de la cámara cutánea - plástica, (Senn y Jungi, 1975), o la cámara de caucho utilizada por Helium y Solberg (1977). La técnica de la ventana cutánea plástica, tiene una respuesta celular predominantemente de neutrófilos. Se ha sugerido que la técnica de Rebeck, es un modelo de reacción a cuerpo extraño, mientras que - los estudios de la ventana cutánea plástica reflejan mejor la migración neutrófila en respuesta a la inflamación.

Se han descubierto tres tipos de respuesta en las personas normales: respuesta en "pico", donde la respuesta máxima se produce entre las 6 y - 12 horas, descendiendo luego; respuesta en "cuesta arriba", que es más lenta pero mantenida; y respuesta en "meseta elevada", caracterizada por el rápido aumento, mantenido en un índice alto. Estas respuestas son caracterís

ticas y reproducibles en los diferentes individuos; pueden representar la forma de respuesta individual a la infección.

Se observan anomalías de la migración neutrófila a partir de los 40 años de edad, descenso de la movilización en el alcoholismo agudo, disminución en la leucemia aguda (granulocítica y linfocítica), descenso de la leucemia mielóide crónica, migración normal en la enfermedad de Hodgking, disminución en el mieloma múltiple y en la cirrosis hepática; en la mayoría de estas situaciones está aumentada la susceptibilidad a las infecciones.

La movilidad aleatoria se prueba por el método del tubo capilar. Los neutrófilos purificados en solución de albúmina humana al 0.1%, a la concentración de 5×10^6 /ml son colocados en un tubo siliconizado de microhematocrito, el tubo está cerrado en la cámara especialmente construida de portaobjetos para microscopio e incluido en arcilla adhesiva. Después de llenar la cámara con aceite de inmersión, toda la cámara es colocada sobre la platina de un microscopio. La movilidad es evaluada por observación del frente de la columna de leucocitos en el microscopio a intervalos de una hora. La medición se expresa en milímetros de movimiento a partir de la frontera inicial de la capa de leucocitos empaquetados.

TABLA I. ANOMALIAS MENSURABLES EN ALGUNOS TRASTORNOS DE LA MOVILIDAD GRANULOCITICA.

Trastorno	Recuento Absoluto de neutrófilos	Respuesta a la prueba Reubuck	Quimiotaxis	Movilidad Aleatoria
Chediak-Higashi	Bajo	Disminuido	Disminuido	Normal
Recien nacido	Normal	Mod. Dismin.	Disminuido	Mod. Dis.
Síndrome del Leucocito peresoso	Bajo	Disminuido	Disminuido	Disminuido
DIABETES	Normal	Mod. Dismin.	Disminuido	Normal
Defecto Quimiotáctico familiar	Normal	Normal	Disminuido	Normal
Quimiotaxis e Inmunitad Celular Defectuosa	Normal	Mod. Dismin.	Disminuido	Normal
Enfermedad de Crohn	Normal	Disminuido	Normal	Normal

Quimiotaxis. Para poder evaluar la movilidad dirigida de los neutrófilos como respuesta a estímulos quimiotácticos se emplea el sistema introducido por Sephen Boyden en Australia en 1962. Este sistema consiste esencialmente de una cámara con dos compartimientos separados por un filtro de membrana horizontal. Los leucocitos colocados en el compartimiento superior, deslizándose a través de los poros del filtro de membrana cuando una solución quimiotáctica del fluido en el compartimiento inferior es evaluada por conteo del número de células en la pared baja del filtro (ó la penetración de las células a través del filtro) al final de un cierto periodo de tiempo.

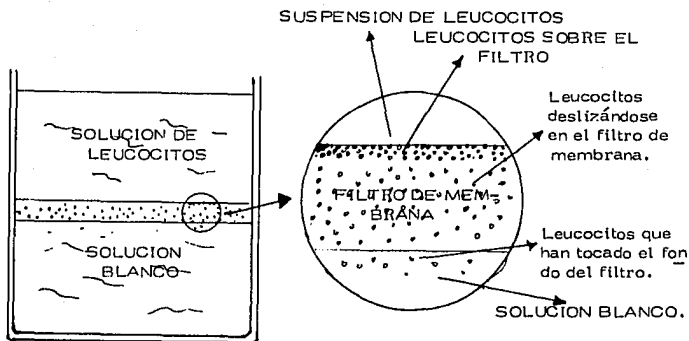


FIGURA 2. EL SISTEMA QUIMIOTACTICO DE BOYDEN

Los leucocitos son colocados en la parte superior de la cámara y se deslizan por los poros del filtro hacia la solución blanco, que se encuentra en el compartimiento del fondo. Las células son contadas sobre el borde inferior del filtro o en la solución misma que se encuentra en el fondo.

Aunque este método es simple en teoría, presenta numerosas dificultades técnicas. Estas incluyen la no disponibilidad de los filtros de tamaño estandar del poro, el perjuicio del observador para estimar cuantitativamente los neutrófilos que han emigrado en el microscopio, la pérdida de células que se desprenden o atraviesan por completo el filtro, y el fracaso de muchos investigadores para estandarizar los números de células y los suplementos del suero.

Históricamente esta prueba ha demostrado como lo hizo John Hurley - con sus investigaciones, que fracciones de tejido llegan a ser productos quimiotácticos; o como los experimentos de James Hirsch y Sally Zigmond que demostraron que determinadas soluciones de bajas concentraciones inducen la quimiotaxis, pero inhiben esta a altas concentraciones.

Más recientemente se ha elaborado otro método para la medición de la quimiotaxis y la movilidad al azar. Esta técnica comprende la emigración radial de agarosa en una caja de petri. En muchos aspectos, el método es similar a la difusión radial simple. Por lo general se cortan tres pozos en la agarosa. La población celular problema es colocada en el pozo central. En uno de los pozos laterales se coloca un agente químico de atracción y en el pozo que contenía originalmente células en migración. De este modo, puede cuantificarse el movimiento dirigido y la movilidad al azar. Este método ha logrado una extensa aplicación y en muchos laboratorios ha subsistido a la aplicación de la cámara de Boyden.

Para hablar de alteraciones o quimiotaxis defectuosa debemos considerar que las alteraciones no necesariamente se encuentran ligadas al ejecutor de la función, que en este caso el fagocito, sino que también pueden deberse a otros factores también de considerable importancia, que involucran otros sistemas del organismo como pueden ser las deficiencias en el sistema del complemento que involucra padecimientos como la anemia drepanocítica o lupus eritematoso diseminado y cirrosis hepática; o bien anomalías en la inhibición o factores quimiotácticos que aunque el suero normal los contiene, en -

situaciones de títulos elevados de estos como la enfermedad de Hodgkin y en la alergia cutánea aguda.

Existen otros padecimientos asociados a la quimiotaxis defectuosa como la hipogammaglobulinemia, diabetes mellitus y artritis reumatoide.

Reconocimiento. A medida que el neutrófilo se aproxima a su blanco, - ya sea por movilidad aleatoria o dirigida, reconoce los microorganismos por la presencia de anticuerpos y del complemento fijados a la superficie del microorganismo. La intensificación de la fagocitosis (opsonización) ocurre en esta circunstancia.

Las pruebas para localizar la presencia del complemento y los receptores Fc de los anticuerpos sobre los neutrófilos son instrumentos de investigación y no tienen aplicación clínica directa. La necesidad de recubrir los microorganismos con anticuerpos o complemento (opsoninas) para fagocitosis se puede determinar empleando sueros deprovistos de uno o de ambos - factores, siguiendo por un ensayo de ingestión y destrucción intracelular subsiguiente. Además, los receptores para IgG y el complemento sobre los neutrófilos al igual que los fagocitos mononucleares pueden descubrirse con facilidad por la formación de rosetas con eritrocitos recubiertos con complemento o de IgG. Tales ensayos, no han sido ampliamente usados en la clínica para el estudio de la insuficiencia de las defensas del huésped contra la infección pero poseen valor promisorio considerable para dilucidar los defectos en la fase de reconocimiento de la fagocitosis.

Aunque el término ingestión aquí sea diferente del de degranulación, en general ambos términos se asocian, de manera que las expresiones como índice fagocitario que se refieren al número promedio de partículas ingeridas, deberían ser consideradas en realidad, como mediciones de la ingestión y no de la fagocitosis. Después de la ingestión de partículas o de microorganismos, el elemento ingerido es fijado por la membrana invaginada de la superficie celular en un organelo llamado fagosoma. Poco después los lisosomas se fusionan con el fagosoma para formar la estructura llamada fagolisosoma. La degranulación es el proceso de fusión de los lisosomas y de los fagosomas con la descarga subsiguiente del contenido intralisosómico en el interior del fagolisosoma. La etapa final de la fagocitosis depende de la terminación afortunada de las etapas precedentes: movilidad, reconocimiento, ingestión y degranulación. Una diversidad de sistemas intraleucocitarios integran el arsenal de los neutrófilos. Obviamente, algún defecto en la destrucción intracelular, podría ser el resultado de cualquiera o de una combinación de estas funciones. Sin embargo, en la práctica clínica solo dos ensayos se han usado ampliamente a saber; la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (NBT) y la prueba de la muerte intraleucocitaria. Se espera que los ensayos metabólicos y antimicrobianos específicos para otros eventos intraleucocitarios se vuelvan accesibles para un futuro no muy lejano.

Cuando se incuba con neutrófilos, el nitroazul de tetrazolio, se reduce y produce un precipitado azul oscuro de formazán. La proporción de neutrófilos que reduce el colorante puede cuantificarse por recuento celular en un

portaobjetos o por espectrofotometría. Aunque no está claro el mecanismo exacto de esta reducción del colorante, este proceso parece estar asociado con la actividad derivada de la vía hexosa monofosfato durante la fagocitosis.

En un portaobjetos cóncavo con silicón se colocan aproximadamente 0.1 mililitros de sangre heparinizada y se mezcla con un volumen igual de solución salina amortiguadora de fosfato 0.15 M, pH de 7.2; se coloca en cámara húmeda 15 min a 37°C y 15 min a temperatura ambiente, se hacen frotis, se seca al aire y se contrastan con colorante de Wright.

Se cuentan 100 neutrófilos en inmersión, y se consideran positivos al NBT aquellos que presentan un único y gran depósito azul oscuro o múltiples depósitos similares más pequeños (todavía mayores que los gránulos neutrófilos). Se ignoran los monocitos o plaquetas que pueden contener depósitos de formazán. El resultado se registra como el porcentaje de neutrófilos positivos al NBT.

Los individuos normales tienen menos de un 10% de neutrófilos positivos al NBT, como ocurre en los pacientes con leucocitosis de origen no bacteriano (por ejemplo: artritis reumatoidea, lupus eritematoso, etc.), enfermedades postquirúrgicas e infecciones víricas. En individuos con infecciones localizadas, la prueba de NBT es también normal. Un porcentaje de neutrófilos positivos al NBT elevado (11% o más) es característico de las infecciones bacterianas sistémicas y está presente también en la tuberculosis diseminada, infecciones micóticas sistémicas, malaria, también en recién nacidos. Esta prueba, por consiguiente puede ser valiosa para ayudar a diag

tinguir entre las infecciones bacterianas sistémicas y las no bacterianas o procesos en pacientes febriles antes de disponer de cultivos bacterianos definitivos.

La prueba NBT también es útil en la detección de defectos congénitos de la función neutrófila, como la enfermedad granulomatosa crónica. En este trastorno se hallan ausentes o casi ausentes los neutrófilos positivos, al NBT.

C A P I T U L O V I

CONCLUSIONES

El estudio de las células fagocíticas de la sangre fué enriquecido por el estudio de dos eventos de suma importancia en medicina: la inflamación y la leucemia. El estudio de estos eventos y principalmente el de la inflamación se remontan a la medicina egipcia y la medicina romana, donde se hace la mejor y más antigua definición de la inflamación, y de ahí hasta - que Cohnheim y Metchnikoff sientan las bases del estudio de la función fagocítica, enriquecida por estudios posteriores que en la actualidad cuentan con adelantos tan importantes como el microscopio electrónico.

Las características innatas de las células fagocíticas en la defensa del organismo es una consecuencia del perfeccionamiento de la especialización de los tejidos por el proceso de evolución, características que se expresan fisiológicamente como eventos con actividades fisiológicas diferentes, que en conjunto representan uno de los sistemas de defensa más importantes del organismo animal: la inmunidad celular.

Aunque estas actividades se expresan en términos generales como fagocitosis: este mecanismo involucra cuatro funciones básicas: locomoción (adherencia y marginación), fagocitosis, degranulación y muerte.

Estas funciones muestran su importancia cuando la ausencia de una de ellas da como consecuencia alteraciones que se manifiestan como enfermedad. Surge de aquí la necesidad de evaluar estas enfermedades; y puesto que cumple con estas finalidades fundamentales de la clínica médica, se -

constituyen como análisis clínicos; análisis que si bien en el momento actual no son un método de laboratorio usual, no cabe duda que en un futuro se emplearán plénamente.

Los métodos de estudio mencionados en este trabajo, al igual que las funciones también revisadas, al estudiarse en conjunto nos dan un panorama que nos conduce al diagnóstico clínico y es por lo tanto importante mencionar que uno de los métodos de estudio de la función leucocitaria nos puede a ayudar a evaluar una o más funciones, y a su vez, una función puede ser evaluada por uno o más métodos.

Así tenemos que la prueba de Rebeck nos permite no solo comparar la migración de leucocitos, sino también nos ayuda a estudiar los efectos de varios agentes quimiotácticos sobre los fagocitos.

Con respecto a la quimiotaxis, mencionamos que lo más probable es que la migración extravascular de neutrófilos sea causada por gradiente de sustancias quimiotácticas ya definidas, y que una prueba que nos ayuda a identificar tales sustancias, nos pone además de manifiesto si las células fagocíticas de un organismo (humano) no se desplaza a la velocidad requerida por el mecanismo o simplemente no se desplazan.

La administración de sustancias quimiotácticas por vía intravenosa a animales de experimentación produce una rápida neutropenia, es decir, que el incremento de la marginación se lleva a cabo por sustancias quimiotácticas, y si esto sucede con sustancias preparadas in vitro, in vivo las sustancias quimiotácticas naturales regulan fisiológicamente la cantidad de fago-

citos que se tienen marginados en el organismo en condiciones normales.

Con respecto a la prueba de nitroazul de tetrazolio, se debe reservar para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica, para el estudio de los factores involucrados en la fagocitosis y para la identificación de enfermos con defectos en la destrucción intraleucocitaria.

Se ha desarrollado mucha información en los últimos años respecto a los trastornos funcionales de los leucocitos, sin embargo en la mayoría de los casos no se ha definido la naturaleza específica de los defectos. Con respecto a los métodos de estudio, estos aún se encuentran en desarrollo de nuevas pruebas, y se requiere que se superen las limitaciones de las pruebas ya establecidas, que aún se encuentran mal definidos los parámetros de comparación sin considerar las alteraciones sufridas por los leucocitos durante su obtención y aislamiento en las pruebas in vitro.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Graeme B. Ryan, INFLAMATION. Published By The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan 1978.
- 2) Lehrer R.I., Ganz, Selsted, Babior, Curnutte. NEUTROPHILS AND HOST DEFENSE. Ann Intern Med. 1988; 109: 127-142.
- 3) Gallin JI, Fetcher MP, Seligmann BE, Hoffstein S, Cehrs K, Mounessa N. HUMANN NEUTROPHIL-SPECIFIC GRANULE DEFICIENCY; A model to assess the evolution of the inflammatory response. Blood. 1982; 59:1317-29
- 4) Stiles Daniel P. INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA, QUINTA EDICION. 1985. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. Capítulos 1, 2, 9, 14, y 19.
- 5) Rojas M. William. INMUNOLOGIA. Sexta Edición. 1985. Editado por el Fondo Interamericano Educativo, S.A. de C.V. Capítulos 3, 4, 13 y 14.
- 6) William J. William. HEMATOLOGIA. Vol. 1, 1a. Edición en Español. 1975. Salvat Editores, S.A. Cap.: Parte 3.
- 7) Miale, John B. HEMATOLOGIA. Medicina de Laboratorio. Sexta Edición. 1985. Editorial Reverté, S.A.
- 8) CLINICAS MEDICAS DE NORTEAMERICA. Trastornos Hematológicos. 4-1980. NUEVA EDITORIAL INTERAMERICANA S.A. Pág. 693-58.