



11262
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 5

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO 29

EFECTO DEL OXIGENO SOBRE LA OXIREDUCCION
DE LOS MACROFAGOS PERITONEALES DE RATAS
Y ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA EN PMNs
PERIFERICOS DE PACIENTES CON PERITONITIS

TESIS

QUE PRESENTA:

FRANCISCO ESPINOSA LARRAÑAGA

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

MEXICO, D.F.

1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A LA MEMORIA DE MI PADRE
SR. FRANCISCO ESPINOSA LUNA
COMO UN HOMENAJE PÓSTUMO

EFFECTO DEL OXÍGENO SOBRE LA OXIREDUCCION
DE LOS MACROFAGOS PERITONEALES DE RATAS
Y ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA EN PHNs
PERIFÉRICOS DE PACIENTES CON PERITONITIS

Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Médicas
con aplicación al área de Medicina Interna

Presenta: Dr. Francisco Espinosa Larrañaga
Asesor académico: Dr. Ramón Paniagua Sierra

INDICE

1. Introducción	4
2. Planteamiento del problema	10
3. Objetivos	11
4. Material y métodos	12
5. Resultados	16
6. Discusión	18
7. Conclusiones	28
8. Figuras	30
9. Bibliografía	38
10. Anexo 1, Inducción de macrófagos peritoneales	45
11. Anexo 2, Cultivo de macrófagos peritoneales	46
12. Anexo 3, Ensayo Microbicida	48
13. Anexo 4, Ajuste de bacteria	49
14. Anexo 5, Obtención de leucocitos	50
15. Anexo 6, Preparación de tubos mezcla de reacción	52
16. Anexo 7, Obtención de polimorfonucleares	54
17. Anexo 8, Determinación de proteínas por el método de Lowry	56
18. Anexo 9, Determinación de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa por el método de la ortodiansidina	58
19. Anexo 10, Cuenta de leucocitos totales	60
20. Anexo 11, Cuenta diferencial de leucocitos	61

RESUMEN

Introducción. El Oxígeno (O₂) se ha usado con fines terapéuticos en enfermedades que cursan con hipoxemia. En el momento actual se conocen efectos tóxicos como consecuencia de hiperoxia en todas las formas de vida. El mecanismo de daño es por aumento en la concentración de radicales libres (RL) derivados del O₂.

Propósitos. Fueron medir el efecto en la capacidad de oxireducción hacia el nitroazul de tetrazolio (NBT) por macrófagos peritoneales (MP) de ratas que respiran O₂ a una concentración de 0.21 y 1.0. También se evaluó esta capacidad en MP cultivados en ambientes de O₂ al 0.10, 0.21 y 1.0. Por otro lado se valoró la capacidad de destrucción celular y actividad de mieloperoxidasa (MPO) de polimorfonucleares (PMNs) periféricos obtenidos de pacientes con hipoxemia y peritonitis crónica.

Resultados. La capacidad de oxireducir NBT se observó disminuida en forma significativa en ratas bajo ambiente al 1.0 con $p < 0.05$; también se observó disminuida en MP cultivados bajo ambiente de O₂ al 0.10 y al 1.0 con $p < 0.05$.

Se observó disminuida la capacidad de destruir bacterias por los PMNs periféricos de pacientes con peritonitis que presentaban hipoxemia ($P_{aO_2} < 45$ mmHg. La actividad de MPO también se observó disminuida y se descartó que este defecto fuera secundario a una deficiente producción de proteínas componente estructural básico de la enzima.

Los resultados sugieren que la función óptima de MP y PMN se produce bajo condiciones normales o ideales de un ambiente de O₂.

ABSTRACT

Introduction. Oxygen (O₂) has been used for therapeutic purposes in diseases with hypoxemia. At present, we know toxic effects by hyperoxia state for all kind of life cells. The mechanisms of damage is through increasing free radicals (FR) derived from O₂.

Purposes. Measure the effect of O₂ in the oxireduction capacity to nitrobluetetrazolium (NBT) by peritoneal macrophages (MP) of Sprague dolly rats breathing O₂ at concentration of 0.21 and 1.0. Also, was measure the myeloperoxidase (MPO) capacity on MP cultured in enviroment of 0.10, 0.21, and 1.0 of O₂ concentration. In other way, were measure the celular detruccion capacity and myeloperoxidasa activity by peroferical polymorphus nuclears (PMN) from patients with hypoxemia con chronic peritonitis.

Results. The activity for oxyreduction of NBT by MP was disminished in rats in 1.0 O₂ enviroment with $p < 0.05$. Also it was obserbed disminished in MP cultured at 0.10 and 1.0 O₂ enviroment with $p < 0.05$. The capacity to destroy bacterial cells by PMN was disminished in patients with hipoxemia (PaO₂ <45 mmHg) and peritonitis. The MPO activity, also was disminished and it was dismiss from consequences of a secondary defect of low protein production, a basic structural component of enzyme.

The results sugessted that the optimal function of MP and PMN is produce in normal or ideal O₂ enviroment.

EFFECTO DEL OXÍGENO SOBRE LA OXIREDUCCION
DE LOS MACROFAGOS PERITONEALES DE RATAS
Y ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA EN PMNs
PERIFÉRICOS EN PACIENTES CON PERITONITIS

Introducción

Desde su descubrimiento, el oxígeno (O₂) se ha utilizado con fines terapéuticos en enfermedades que cursan con hipoxemia, por ello, los reportes iniciales de toxicidad por O₂ sorprendieron a muchos. Actualmente, se conocen efectos tóxicos por O₂ a todos los órganos y sistemas. En 1873, Paul Bert realizó el primer estudio sobre la letalidad presentada como consecuencia del O₂ en condiciones de hiperoxia en todas las formas de vida, desde los mamíferos hasta los virus (1). Los cambios fisiológicos y síntomas asociados con hiperoxia en humanos han sido objeto de múltiples comunicaciones (2,3,4,5). Algunos han explorado la interacción entre O₂ activo y la elastasa del PMN, y sus resultados sugieren incremento en la gravedad del daño en pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda progresiva del adulto (SIRPA) (6). El mecanismo de daño es consecuencia de un aumento en la concentración de radicales libres (RL) derivados del O₂ (7,8,9). Los RL son sustancias que poseen un electrón impar y son considerados fragmentos de moléculas. Se pueden formar por 3 vías diferentes: 1) por ruptura homolítica de la unión covalente de una molécula, en la

que cada fragmento retiene uno de los electrones pares; 2) por la pérdida de un electrón; 3) por la adición de un electrón. La transferencia es el proceso más frecuente. La reducción del O₂ por transferencia de un electrón produce el RL, anión superóxido. El peróxido de hidrógeno se forma de la reducción de dos electrones del O₂ vía la producción de superóxido, y dos moléculas de superóxido pueden reaccionar y formar peróxido de hidrógeno y O₂, a este tipo de reacción se le conoce como dismutación. El peróxido de hidrógeno, no es en sí, un RT, pero se le considera una sustancia reactiva del O₂. El peróxido de hidrógeno es un compuesto importante en la bioquímica de los RTs porque puede fácilmente romperse en presencia de iones metálicos transitorios para producir otros radicales más reactivos y dañinos para la célula: el radical hidroxil (10,11,12).

Usando polimorfonucleares (PMNs) como una célula que genera RL, a través de la activación de NADPH oxidasa. En los años setentas se desarrollaron métodos citoquímicos para localizar los RLs (13). Los RL requieren O₂ molecular como sustrato. La ley de acción de masas predice que su formación se incrementa directamente con el aumento de la concentración de oxígeno molecular en el ambiente de los tejidos. Por otro lado, las células tienen mecanismos de defensa contra la formación de estos RL, por lo menos para limitar sus efectos dañinos, como son las enzimas que modifican peróxidos, proteínas que secuestran metales en transición y compuestos que los barren (14).

Los principales RL son derivados del O₂ y entre ellos tenemos al anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidróxilo, ácido hipocloroso, cloraminas, dióxido de nitrógeno y peróxidos lipídicos. El organismo posee sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, catalasas, el sistema de la enzima reductora del glutatión, el secuestro de iones metálicos, enzimas degradadoras de proteínas dañadas por los RL, metabolización de hidroxiperóxidos, reparación de DNA y vitaminas antioxidantes como lo son la E, C, P y el betacaroteno. Bajo condiciones normales se establece un equilibrio entre la producción de oxidantes y su neutralización por antioxidantes, también actúan sobre los lípidos de la membrana celular induciendo alteraciones genéticas y con ello modifican sus funciones (15).

Los fagocitos mononucleares fueron descubiertos por Eli Metchnikoff hace casi 100 años. Estas células, secretan además mediadores solubles, desde citocinas y factores del complemento hemolítico, hasta moléculas quimiotácticas y con actividad citotóxica. En el caso de antígenos particulados como los de origen bacteriano, en la respuesta primaria juega un papel relevante su capacidad de presentación antigénica (16). Otra función relevante lo constituye su capacidad para secretar citotoxinas como las interleucinas 1, 6, 8, 10 y 12, así como el factor de necrosis tumoral alfa. Finalmente cuenta con la función efectora para eliminar microorganismos intracelulares como bacterias, hongos, micobacterias y mycoplasma, amén de otros. Juega un papel relevante el efecto del interferón

gama y otros factores activadores de macrófagos (17). Bajo el efecto de las citocinas activadoras de macrófagos, estas células se transforman en macrófagos activados. El estado de activación le permite activar sus mecanismos citocidas intracelulares, entre los que se encuentran los RL del O₂ y óxido nítrico que permiten eliminar los agentes intracelulares que de otra manera, utilizan al macrófago como su medio de propagación. Por mencionado, se dice que el macrófago es el gran orquestador o que tiene múltiples funciones (18,19).

Las funciones del PMN se pueden dividir en cuatro principales como son: la quimiotaxis, la adherencia, la fagocitosis y la activación de eventos postfagocíticos encargados de la destrucción de material ingerido. La activación del factor quimiotáctico, favorece la actividad de fosfolipasa C que incrementa la producción de derivados de fosfoinositol. El trifosfato de inositol actúa liberando el calcio unido a la membrana, con lo que incrementa la concentración de calcio intracelular (20). Los macrófagos son células con múltiples funciones. Los macrófagos activados tienen una capacidad fagocítica aumentada, sin embargo, la acción microbicida no esta asociada directamente a una ingestión aumentada (21). La activación de los macrófagos y PMNs durante la fagocitosis está asociada a los siguientes hechos metabólicos (22):

- a) activación de la vía alterna hexosamonofosfato y del ciclo de la glutatión reductasa-glutatión peroxidasa;
- b) activación de una oxidasa del NADPH asociada a la membrana,

aumento del consumo de O₂ y generación del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno;

c) formación de radical hidróxilo, oxígeno atómico y otros metabolitos del oxígeno reactivo.

Los sistemas antimicrobianos de los macrófagos y los PMNs se dividen en relación al O₂ en dos grandes grupos:

A.- Dependientes del Oxígeno

a) Mediados por la mieloperoxidasa

1.- mieloperoxidasa

2.- H₂O₂

3.- Cofactor oxidable (por lo general un haluro)

4.- Acido a pH óptimo

b) Independientes de la mieloperoxidasa

1.- H₂O₂

2.- Anión superóxido

3.- Oxígeno en singlete

4.- Radical hidróxilo

B.- Independientes del oxígeno

a) proteínas catiónicas

b) lactoferrina

c) lisozima

d) Acido con pH bajo

e) Histonas del núcleo celular

f) Elastasa

Sí existe, un grupo de sistemas antimicrobianos (23) de los PMNs y los macrófagos que se reconoce como dependiente de O₂ y pueden ser mediados por mieloperoxidasa unos, y otros no, la actividad microbicida de estos sistemas al igual que su activación están relacionadas a la presencia de O₂ en el ambiente; y al mismo tiempo puede señalarse que de acuerdo a la ley de masas, bajo condiciones bajas de O₂ la activación de los PMNs y los macrófagos se encuentra deteriorada para los sistemas microbicidas dependientes de O₂ y por el contrario en ambiente rico de O₂ la activación de los PMNs y los macrófagos se incrementa hasta un límite en el cual los mismos PMNs y macrófagos sufren el efecto tóxico.

Planteamiento del problema

¿Cuál será el efecto en la capacidad de oxireducción hacia el nitroazul de tetrazolio (NBT) por macrófagos peritoneales de ratas que respiran a una concentración de 0.21 de O₂?

¿Cuál será el efecto en la capacidad de oxireducción hacia NBT por macrófagos peritoneales de ratas que respiran aire al 1.0 de O₂?

¿Cuál será el efecto en la oxireducción hacia el NBT por macrófagos peritoneales de ratas cultivados bajo ambiente de O₂ al 0.21?

¿Cuál será el efecto en la oxireducción hacia el NBT por macrófagos peritoneales de ratas cultivados bajo ambiente de O₂ al 1.0?

¿Cuál será el efecto en la oxireducción hacia el NBT por macrófagos peritoneales de ratas cultivados bajo ambiente de O₂ al 0.10?

¿Cuál será la diferencia en la capacidad de destrucción celular de PMNs en pacientes con hipoxemia y peritonitis crónica en comparación con un grupo control de personas sanas?

¿Cuál será la diferencia en la actividad de mieloperoxidasa de PMNs en pacientes con hipoxemia y peritonitis en comparación con un grupo control de personas sanas?

Objetivos

El primer objetivo fue observar la capacidad de oxireducción al NBT por macrófagos peritoneales de ratas respirando aire al 0.21 o enriquecido con O₂ al 1.0.

El segundo fue evaluar la capacidad de oxireducción al NBT por macrófagos peritoneales de ratas posterior a su cultivo en tres condiciones diferentes de O₂, 0.21; 1.0; y 0.10.

El tercer objetivo fue medir la capacidad de destrucción celular de los PMNs de enfermos con peritonitis e hipoxemia arterial.

El último objetivo fue cuantificar la actividad de mieloperoxidasa en PMNs de los mismos pacientes con peritonitis e hipoxemia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para los dos primeros objetivos se valoró la función fagocítica de macrófagos peritoneales en ratas Sprague Dawley de 8 a 12 semanas de edad, con peso mayor de 200 grs. La inducción de los macrófagos fue con la administración intraperitoneal de 20 ml. de aceite mineral. Un grupo de 20 ratas respiró O₂ al 0.21, (A); y otro de otras 20 respiró O₂ al 1.0, (E). 72 horas después, fueron extraídos los macrófagos peritoneales y se midió su capacidad de oxireducción del NBT como prueba de función fagocítica. Se tomó una muestra de macrófagos de cada una de las ratas. Se dividió en 3 partes iguales y previa cuenta de los mismos para su ajuste y estandarización se cultivaron bajo 3 condiciones diferentes de O₂ (0.21, al 1.0 y 0.10). Al término del período de cultivo (72 hrs), se evaluó la viabilidad de la células, y se midió la capacidad de oxireducción del NBT (24). Fig. 1 Se tuvo el cuidado de evitar condiciones hiperbáricas con una válvula que reguló la presión interna de la caja en donde se mantuvo a los animales. Se controló variables extrañas intervinieran como ciclos anormales de luz-oscuridad, espacio insuficiente para su movilización, e ingesta de líquidos y alimentos a libre demanda.

Para llevar a cabo el tercer objetivo se evaluó la capacidad de opsonización de bacterias como prueba preliminar de función fagocítica en 20 pacientes con PaO2 igual o menor de 45 mmHg que presentaban peritonitis. Fig. 2

Para cumplir el cuarto y último objetivo se valoró la actividad de la enzima MPO (mieloperoxidasa) en polimorfonucleares (PMNs) de los mismos 20 pacientes que cursaban su estado clínico de peritonitis y PaO2 igual o menor de 45 mmHg.

Las características de los pacientes admitidos fueron:

- 1.- Tener peritonitis comprobada mediante cirugía
- 2.- PaO2 igual o menor de 45 mmHg en el momento de la toma de la muestra y un período previo de 48 hrs o más en condición, independientemente de si se encontraba recibiendo O2.
- 3.- Edad entre 20 y 50 años
- 4.- No antecedente de defecto hereditario o adquirido de deficiencia en la fagocitosis, sistema de mieloperoxidasa o trastornos del complemento por interrogatorio
- 5.- No antecedente o presencia de cirrosis hepática, uremia crónica o diabetes mellitus por interrogatorio
- 6.- No antecedente de ingesta de fármacos que pudieran influir en la actividad de MPO o fagocitosis como clindamicina, corticoides y otros mediante la revisión de la prescripción médica en la semana anterior al estudio.

Se utilizó un grupo control, constituido también por 20 sujetos con las siguientes características:

- 1.- Ausencia de enfermedad en los últimos 30 días
- 2.- Edad de 20 a 50 años.
- 3.- No antecedente de alteración en la fagocitosis, actividad de MPO o en el sistema del complemento por interrogatorio.
- 4.- No antecedente de cirrosis hepática, uremia o diabetes mediante interrogatorio.
- 5.- No antecedente de fármacos que alteren la función fagocítica o la actividad de MPO en la semana anterior al estudio.

Posterior a la extracción de la muestra se realizó ensayo microbicida (24) y determinación de la actividad enzimática de MPO por el método de la ortodiansidina (25) que se basa en las siguientes reacciones:

peroxidasa de rábano + H₂O₂ -----> compuesto
compuesto + AH₂ (ortodiansidina) -----> peroxidasa + H₂O + A

La razón de descomposición del peróxido de hidrógeno por la peroxidasa de rábano con la ortodiansidina como donador de hidrógeno es determinada por la medición de color desarrollada a 460 nm. La relación entre el color oxidado y las moles de H₂O₂ descompuestos, fueron determinados por la medición de la absorbancia de la ortodiansidina oxidada por la variación de cantidades de H₂O₂ en presencia de enzima en exceso.

El análisis estadístico se realizó tanto por pruebas no paramétricas como la U de Mann-Whitney como paramétricas como análisis de varianza de 2 vías (26, 27, 28).

Resultados

Capacidad de oxireducción al nitroazul de tetrazolio (NBT).

El promedio de absorbancia obtenida para los macrófagos inducidos en ambiente de O₂ al 0.21 (normal) posterior a la oxireducción con NBT fue de 0.21+- 0.031 y para los macrófagos inducidos en O₂ al 1.0 (100%) fue de 0.14 +- 0.043 , con z= a 2.6 y p menor de 0.05 Fig. 3

El promedio de absorbancia medida en macrófagos inducidos en O₂ al 0.21 y posteriormente cultivados también en ambiente al 0.21 fue de 0.22 +- 0.072, posterior a la oxireducción con NBT para los inducidos 0.21, pero cultivados al 1.0 y 0.10 de O₂ mostraron los siguientes valores 0.13+- 0.065 y 0.07+- 0.03 Fig. 4

Por otro lado los macrófagos inducidos en ambiente de O₂ al 1.0 y posteriormente cultivados en ambientes al 0.21, 1.0 y 0.10 mostraron los siguientes valores en la reacción de oxireducción al NBT: 0.265+- 0.03 ; 0.13 +- 0.04; y 0.025 +- 0.02. Fig.5 y Fig.6

Capacidad de opsonización y actividad de mieloperoxidasa.

Fueron 11 hombres y 9 mujeres. La edad promedio fue de 33.78 +- 10.19 y 30.38 +- 8.91 respectivamente. El grupo control estuvo también constituido por 11 hombres y 9 mujeres con edad promedio

32.43 +- 12.2 y 30.80 +- 9.18 respectivamente. Tiempo promedio de evolución de la peritonitis de los pacientes problema fue de 32.86 +-19.3 días.

En el ensayo de opsonización que utilizó plasma heterólogo AB Rh negativo se observó una mortalidad celular menor del 50% constante en diluciones del plasma entre 1:4 y 1:6. Fig. 7

La cuenta diferencial de PMNs en el grupo problema fue de 78% +- 5.5 de un promedio total de 14 250 leucocitos +- 3758; mientras que para el grupo control fue un promedio de 6770 leucocitos totales +- 1490 con cuenta diferencial de PMNs promedio de 46% +- 12

La actividad enzimática de MPO en PMNs en el grupo problema fue de 0.37+- 0.022 U.E. y para el grupo control de 0.46+- 0.018 Fig. 8

El contenido de proteínas en PMNs por el método de Lowry fue de 82 mcg de proteína x 1×10^6 PMNs+-16 para el grupo problema y de 65 +-12 para el grupo control.

Discusión

Kinnula y cols. en 1992 informaron disminución de la liberación de peróxido de hidrógeno poco significativo como efecto de la hiperoxia (1-14 días, FiO_2 .85) sobre los macrófagos alveolares tipo II y macrófagos en ratas, en las primeras 24 hrs. e incremento significativo después del tercer día de exposición (29), lo que es sugestivo de disminución de la función fagocítica en las primeras 24 hrs y una exaservación posterior. En nuestro trabajo tanto durante la fase de inducción de macrófagos peritoneales como el cultivo de los mismos a FiO_2 de 1.0 fueron de 72 hrs para la primera y 72 hrs.de exposición durante el cultivo. La capacidad de oxireducción del NBT se observó disminuida en ambos casos, lo cual concuerda con lo referido por Kinnula y cols. Podría esperarse que por ser consecutivas ambas condiciones los macrófagos inducidos por 72 hrs. e inmediatamente después de su cosecha cultivados al final de esta etapa tendría 6 días de exposición al O_2 , sin embargo el comportamiento de los macrófagos no se observó así, sino como dos eventos independientes, que pudieran estar influidos por el tiempo de preparación (aproximadamente 3-4 hrs.) del cultivo durante el cual varió la FiO_2 , o porque la recuperación funcional de las células no fue completa. Una posibilidad que explique este resultado es que en el peritoneo desconocemos la concentración de O_2 a la cual estuvieron expuestos los macrófagos, así mismo, otro hecho fue que el tiempo de exposición de los macrofagos en el

peritoneo fue diferente, ya que unos migraron en las primeras 24 hrs. y otros a lo largo de las 72 hrs.

En nuestro estudio, la finalidad de administrar aceite mineral fue la de atraer macrófagos a la cavidad peritoneal. No se puede descartar el efecto que el aceite mineral pudiera tener sobre la activación de macrófagos y la producción de RL. El aceite mineral es un material inerte, sin embargo, en las laminillas al valorar viabilidad celular, se pudo observar la presencia de partículas de aceite incluidas (fagocitadas) por el macrófago en menos del 10% de las células, luego entonces, sí hubo fagocitosis, hubo activación. A mayor cantidad de aceite intraperitoneal fue mayor la cosecha de macrófagos, y también a mayor permanencia dentro del peritoneo, es más alto el número de células obtenidas. Este hallazgo concuerda con lo expresado en la literatura y con el procedimiento de laboratorio estandarizado. No se mostró diferencia significativa entre los animales bajo O₂ al 0.21 y los que se colocaron al 1.0 en relación a la cosecha de células, es probable que a mayor tiempo de exposición (más de 72 hrs.) sí hubiera podido observar diferencias como consecuencia de toxicidad.

La reacción de oxireducción del NTB medida a través de absorbancia fue mayor en los macrófagos inducidos en O₂ al 0.21 que cuando lo fue en O₂ al 1.0, lo que es sugestivo de toxicidad.

Las células que inicialmente se refieren dañadas en el pulmón en la

revisión de la literatura son los pneumocitos alveolares tipo I y las células capilares del endotelio pulmonar. Los efectos tempranos son el edema del endotelio y la ruptura de las uniones intercelulares. En etapas tardías se ha descrito hiperplasia de pneumocitos tipo II e intraalveolar, así mismo fibrosis intersticial. Las características de daño pulmonar producido por la hiperoxia se considera muy semejante al que se presenta en el SIRPA (30), de ahí la importancia de evaluar sus efectos en pacientes que respiran F_{iO_2} mayores a 0.60. Dentro de los objetivos de nuestro trabajo no tuvimos el valorar los cambios histológicos en los pulmones de los animales de experimentación.

El uso de superóxido dismutasa y catalasas, así como otros sistemas antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E, N acetilcisteína, alopurinol, oxipurinol y otros, no han sido aún evaluadas con suficiente satisfacción (31, 32). El estado actual de nuestro conocimiento, señala la extrema complejidad de estos sistemas y nos sugiere precaución en el uso de sustancias antioxidantes con fines terapéuticos (33). Se ha usado el análogo de prostaciclina para prevenir el daño pulmonar por O_2 , lo cual ha mostrado resultados parciales, ya que ha observado un efecto estabilizador de membranas y otro inhibitorio para la migración de neutrófilos, su activación, producción de RLS y de enzimas proteolíticas (34).

Durante la hiperoxia se ha observado un incremento en la producción de sustancias reactivas del O_2 a nivel intrapulmonar de superóxido

y peróxido de hidrógeno (35), así como un incremento en la biosíntesis de prostanoídes (36). En nuestro estudio la condición de hiperoxia no concuerda con incremento en la capacidad de oxireducción del NBT y por ello con mayor producción de sustancias reactivas del O₂, como habría de esperarse de acuerdo a la ley de masas. Estos hallazgos sugieren daño tóxico a los PMNs y macrófagos como consecuencia de concentraciones altas de O₂, las cuales son reversibles parcialmente ya que al reubicarlas en un ambiente de O₂ normal, mejora la capacidad de oxireducción a NBT, sin llegar a ser igual a la capacidad que presentaban cuando se encontraban en FiO₂ 0.21 y esto puede deberse a que el tiempo transcurrido no hubiese sido el suficiente como para dañar de manera irreversible a los PMNs y macrófagos, pero si, por lo menos funcionalmente. Otra posibilidad es que los macrófagos obtenidos del peritoneo presentaran una reactividad diferente al O₂ como consecuencia del efecto del aceite mineral y posible activación de los macrófagos.

El daño por reperusión involucra la adhesión y activación de PMNs tanto en los órganos afectados como en sistemas distantes. Durante este proceso se presenta a nivel local de tejidos hipoxia y posteriormente reoxigenación (37). Este fenómeno es un sitio interesante para estudiar la hipoxia y los PMNs a nivel de microcirculación.

Cuando los macrófagos inducidos al 0.21 fueron cultivados en 3

condiciones diferentes de O₂, se observó nuevamente que la reacción de oxireducción del NTB fue mayor, al final de la etapa de cultivo en las células bajo condiciones de O₂ al 0.21 y se observó menor absorbancia en las células cultivadas al 1.0 y 0.12 de O₂ lo que sugiere y confirma el hallazgo antes descrito de que biológicamente se obtiene la mejor función celular bajo condiciones denominadas de presión parcial óptima de O₂ por Gilbert en 1981 (38).

Estudios recientes con cultivo de células, apoyan la noción de que la hipoxia puede actuar de una manera primaria, independientemente de sus efectos sobre el metabolismo energético para alterar la diferenciación celular LLC-PK1, utilizando como mediador proteína quinasa C (39).

Dentro de las alteraciones observadas a nivel de metabolismo energético en mitocondrias se ha observado que la administración de hormona tiroidea está asociado con un flujo mayor de electrones a nivel microsomal, mitocondrial y en los sistemas de transporte peroxisomal, lo cual está acorde con lo observado en hipertiroidismo donde se induce un incremento de la activación de los PMNs tanto en ratas como en humanos (40). El acúmulo y activación de PMNs incrementa el metabolismo de prostaglandinas, y la hipoxia tisular favorece concentraciones altas de RL y otros metabolitos en el choque séptico. En sincronía se observa también, niveles altos de óxido nítrico. A los RL se les atribuye el daño tisular irreversible que conduce a la falla orgánica múltiple

durante la sepsis, sin embargo, en relación al tratamiento con los barredores de RLs existen interrogantes básicas que no se han podido resolver completamente, como ejemplos tenemos: ¿Qué inhibidor dar?, ¿Cuánto? y ¿Cuándo?, para mejorar el pronóstico de la sepsis y del choque séptico (41) y que están en relación a la activación de los macrófagos y la producción de RL.

En el ensayo fagocítico tradicional el plasma de los pacientes presentó inhibición importante para el crecimiento de E coli probablemente por la presencia de antimicrobianos circulantes, anticuerpos inespecíficos y específicos. El plasma descomplementado mediante calor mostró una gran variabilidad de respuesta atribuido a la carencia de complemento y a la presencia de sustancias termolábiles que puede incluir, antimicrobianos circulantes en los pacientes problema. El plasma normal adicionado de PMNs mostró una inhibición importante y consistente, y poco variable para el crecimiento de E coli. En el ensayo fagocítico tradicional con plasma heterólogo " O " Rh positivo se observó efecto opsonizante adecuado a diluciones entre 1:4 y 1:7. Así mismo, el efecto inhibitorio para el crecimiento de E. coli fue inconsistente y se atribuyó a la presencia de anticuerpos inespecíficos y no a antimicrobianos circulantes. En el ensayo fagocítico tradicional con plasma AB Rh negativo se observó buen efecto opsonizante a la dilución entre 1:4 y 1:6, motivo por el cual se decidió utilizar este tipo de plasma en el procedimiento estandarizado y como prueba de referencia de opsonización. Así mismo, mejoró la capacidad

fagocítica en el grupo problema en relación al grupo control y al efecto del plasma AB Rh negativo donante.

Golberg y cols, evaluaron el efecto de la tensión de O₂ sobre la capacidad destructiva de E. coli P4 por PMNs. Con tensión de O₂ normal y un ambiente micro-aerofílico, el número de bacterias declinó durante la primera hora después de la adición de PMNs. La tensión de O₂ declinó rápido con los PMNs, lo cual es sugestivo de que la fagocitosis es un proceso aeróbico en general. Cuando todo el O₂ fue depletado, disminuyó la capacidad fagocítica y se incrementó el número de bacterias (42).

Los macrófagos peritoneales inducidos con O₂ al 1.0 mostraron menor capacidad para oxireducir el NBT que los inducidos al 0.21 de O₂. Existen modelos establecidos de estrés oxidativo pulmonar con envenenamiento con paraquato o exposición hiperbárica de O₂ que muestran incremento en quimiluminiscencia después de la migración de PMNs hacia el pulmón. Posterior a ello decrece la sobrevivencia de los animales de experimentación (43).

Los macrófagos peritoneales inducidos en O₂ al 0.21 y cultivados al 1.0 y 0.12 de O₂ mostraron menor capacidad para oxireducir el NBT que los cultivados a 0.21. Lo cual sugiere influencia de la concentración baja de O₂ en la capacidad de oxireducción del NBT. En otros trabajos, también se ha observado fenómenos semejantes. Knowles y cols. (1995) exploraron el efecto de la hipoxemia sobre

la fagocitosis de PMNs. Estos autores concluyeron que bajo condiciones bajas de O₂ se incrementa el estímulo de IL-8 a los PMNs durante la fagocitosis a través de la expresión de CD32w y CD35. Bajo condiciones normales de O₂ IL-8 disminuye los niveles de RNA mensajero tanto para CD32w como CD35. La hipoxemia regula directamente el control de IL-8 de PMNs incrementado la fagocitosis, la expresión de receptores y el RNA mensajero (44). También se ha involucrado a las citoquinas como reguladoras de la función de PMNs (45).

Se ha observado que posterior al inicio del efecto inhibitorio, la óxido nítrico sintetasa provee una señal activadora que incrementa el metabolismo de la L-arginina, actividad de arginasa, contenido protéico en la óxido nítrico sintetasa y favorece la liberación de TNF-alpha e IL-6 (46).

Los macrófagos peritoneales inducidos al 1.0 y cultivados al 0.21 de O₂ recuperaron su capacidad de oxireducción para el NBT.

Los macrófagos peritoneales inducidos en O₂ al 1.0 y cultivados al 0.12 y 1.0 mostraron menor capacidad de oxireducción para el NBT.

Simms (1994) evaluó la fagocitosis en PMNs después de períodos de hipoxemia o hipoxia- reoxigenación con lo cual describió que bajo condiciones de hipoxia, se presenta un incremento en el porcentaje de PMNs activados. Este fenómeno requiere de movilización de Ca²⁺ intracelular por un aumento significativo de CD16, CD32w y CD35; La reoxigenación disminuyó los PMNs activados y la expresión de CD32w

y CD16 concluyendo que la hipoxemia y la hipoxia-reoxigenación reclutan y suprimen distintas poblaciones de PMNs para la fagocitosis (47). Se ha observado en animales de experimentación, daño pulmonar secundario a O₂ por incremento de RNA mensajero de fibronectina que estimula fibroproliferación como respuesta y consecutivamente fibrosis en el parénquima pulmonar (48), todo ello mediado por RL.

Los pacientes con peritonitis con PaO₂ menor de 45 mmHg presentaron mayor cantidad de PMNs que el grupo control. D'Angio y cols en 1995, mostraron que en el daño pulmonar con O₂ en conejos, se incrementó el número de PMNs y macrófagos, y así mismo, el RNAm para IL-8 y la proteína-1 quimioattractante de los macrófagos. Enfatiza la importancia de las células efectoras en la respuesta pulmonar a la exposición de O₂ (49).

Los PMNs de los pacientes problema mostraron mayor contenido de proteínas que el grupo control. Lo que sugiere que la disminución de la actividad de la MPO no es por bloqueo en la síntesis de proteínas, sino un probable efecto en la capacidad de oxireducción de NBT, y de actividad de MPO.

Estudios con resonancia paramagnética de electrones y su relación con la generación de RLs por PMNs activados sugieren estabilización de f-actina y la ruptura de microtubulos, lo cual atenua la activación oxidativa en PMNs, mientras que la ruptura de f-actina

y la estabilización de microtubulos incrementa la producción de RL, ambos hechos sugieren que el esqueleto microtubular principal tiene una contribución específica a la actividad oxidativa de los PMNs (50). Consideramos que sería interesante evaluar el citoesqueleto de los PMNs bajo condiciones diferentes de O₂.

La actividad enzimática de MPO en PMNs fue menor en los pacientes con peritonitis (que se encontraban respirando O₂ a una fracción inspirada igual o mayor de 0.60) que en el grupo control. Shekarritz y cols han utilizado la positividad a la tinción de MPO (prueba de Endts) como un indicador de formación excesiva de RL derivados del O₂, y la determinación baja de la misma en el grupo problema, en comparación con el grupo control, pudiera ser interpretado como una escasa producción de los mismos como consecuencia de hipoxemia y no de daño tóxico por O₂, ya que la muestra de sangre tomada fue periférica y en este sitio la concentración de O₂ fue menor de 45 mmhg. (51).

Conclusiones

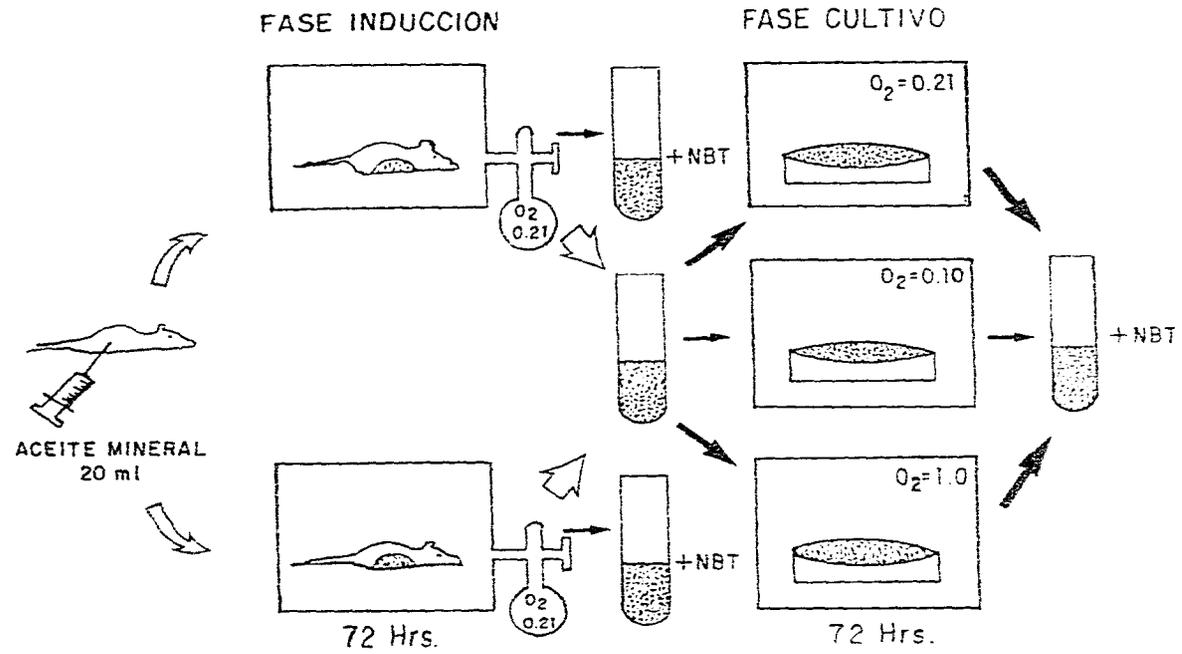
La capacidad para oxireducir el NBT se observó disminuida en forma significativa en macrófagos peritoneales inducidos con aceite mineral en animales que se encontraban respirando O₂ al 1.0 en relación a los que fueron inducidos en animales respirando aire ambiente.

La capacidad para oxireducir el NBT se observó disminuida en forma significativa en macrófagos peritoneales inducidos con aceite mineral en animales que se encontraban respirando O₂ al 0.21 y 1.0 y posteriormente fueron cultivados en ambiente de O₂ al 1.0 y al 0.10 en relación a los cultivados en ambiente de O₂ al normal (0.21).

Previa evaluación de la opsonización se observó disminución de la capacidad para destruir bacterias en PMNs de sangre periférica de pacientes con peritonitis que presentaban PaO₂ menor de 45 mmHg y que por este motivo se encontraban inspirando fracciones de O₂, igual, o mayores al 60%. No es posible discriminar si este fenómeno se debe a la hipoxemia arterial o consecuencia de la peritonitis. En este mismo grupo se observó disminución de la actividad de MPO los mismos PMNs de sangre periférica en comparación con el grupo control y se constató que este defecto no fuera secundario a una deficiente producción de proteínas componente estructural básico de la enzima.

Los resultados son sugestivos de que la condición de hiperoxia es capaz de producir efecto tóxico sobre macrófagos y disminuir su capacidad de oxireducir el NBT y la capacidad de destrucción de bacterias. Esta alteración es funcional porque revierte al regresar a condiciones normales de O₂.

INDUCCION Y CULTIVO EN MACROFAGOS PERITONEALES



30 Fig. 1

ENSAYO MICROBICIDA

INHIBICION DEL DESARROLLO DE COLONIAS DE BACTERIAS POR FMNs DE PACIENTES CON PERITONITIS

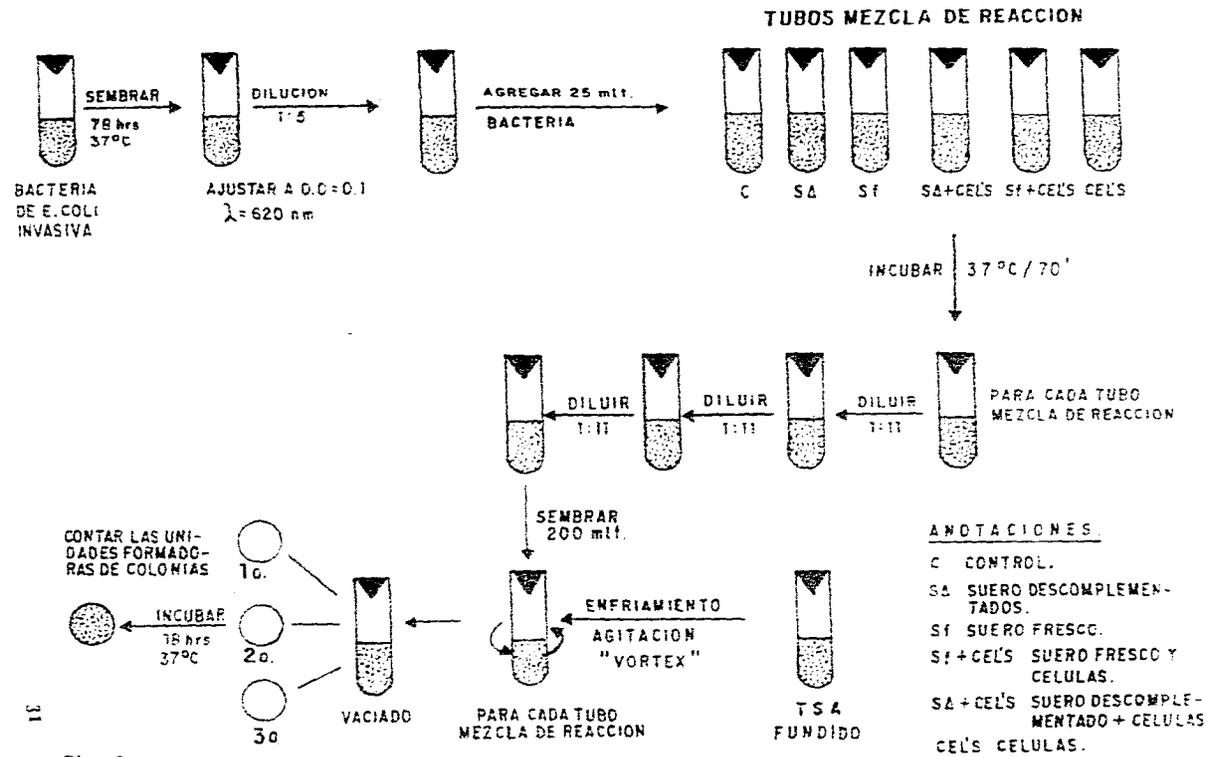


Fig. 2

OXIREDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR MACROFAGOS
PERITONEALES DE RATA RESPIRANDO DOS DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE OXIGENO

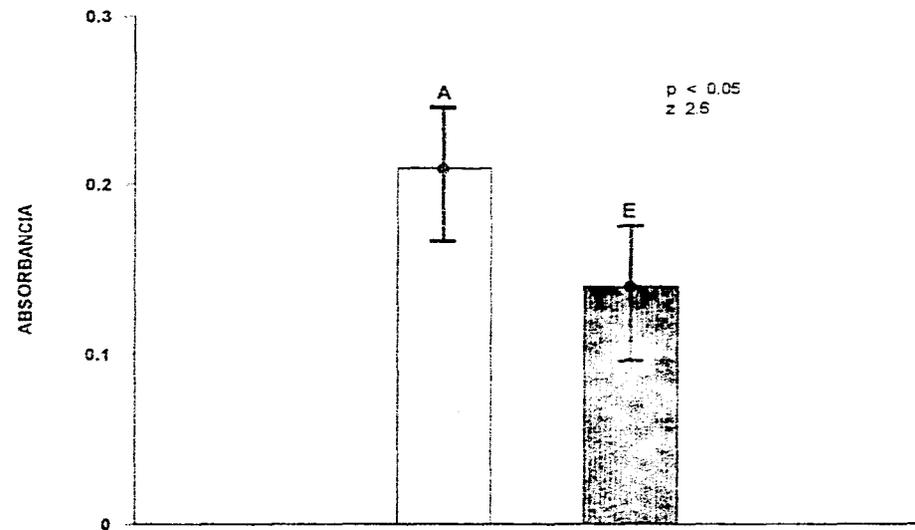


Fig. 3 Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de oxireducción por el nitroazul de tetrazolio en macrófagos peritoneales de ratón inducidos con 20 ml. de aceite mineral intraperitoneal y respirando dos concentraciones diferentes de oxígeno, A al 0.21 y E al 1.0

OXIREDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR MACROFAGOS PERITONEALES DE RATA INDUCIDOS A AIRE AMBIENTE Y CULTIVADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXIGENO

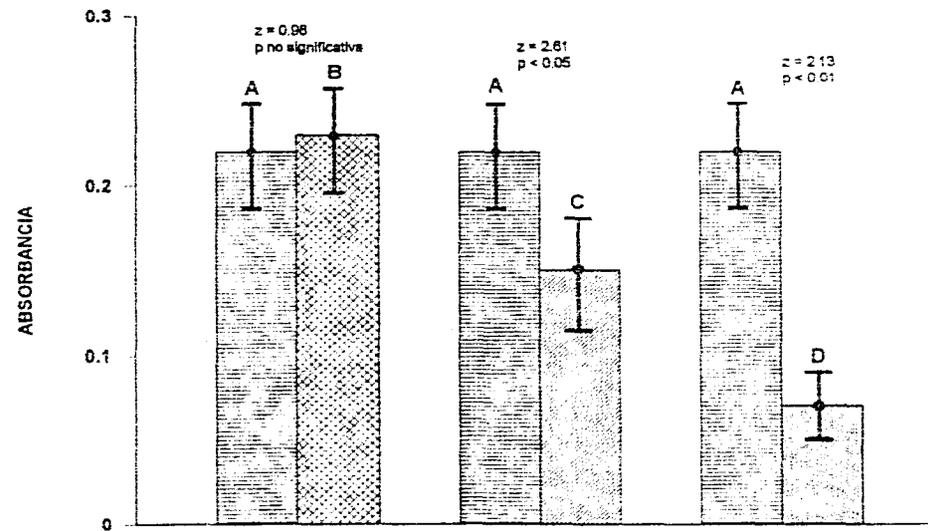


Fig. 4 Valores $\bar{x} \pm EE$ de absorbancia obtenidos en la prueba de oxireducción por el nitroazul de tetrazolio en macrófagos peritoneales inducidos en ratones respirando oxígeno al medio ambiente y posteriormente cultivados a tres concentraciones de oxígeno. A = macrófagos peritoneales inducidos con aceite mineral respirando al 0.21; B, C y D macrófagos obtenidos de la muestra A y posteriormente cultivados en concentraciones de oxígeno de 0.21, 1.0 y 0.10 respectivamente

OXIREDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR MACROFAGOS PERITONEALES DE RATA INDUCIDOS EN AMBIENTE DE AL 1.0 Y CULTIVADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXIGENO

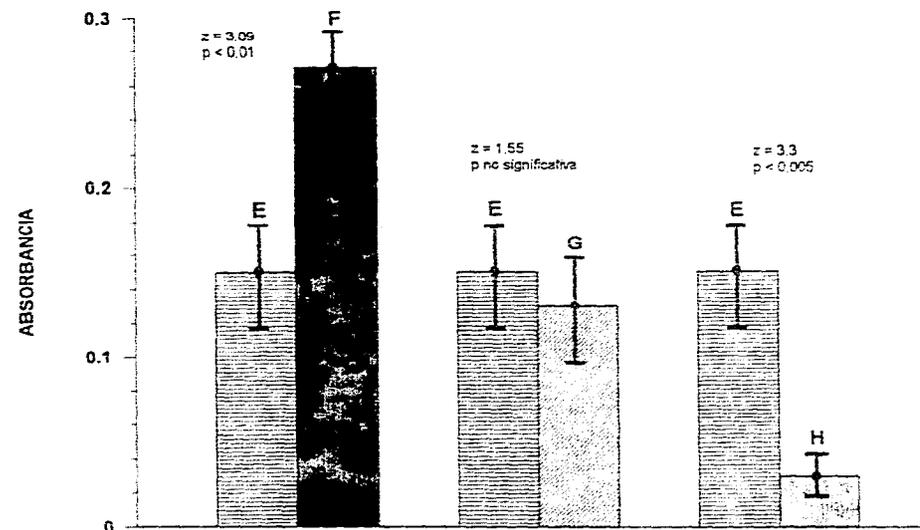


Fig. 5 Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de oxireducción por el nitroazul de tetrazolio en macrófagos peritoneales inducidos en ratón respirando oxígeno al 1.0 y posteriormente cultivados a tres concentraciones de oxígeno. E = macrófagos peritoneales inducidos con aceite mineral respirando al 1.0; F, G y H macrófagos obtenidos de la muestra E y posteriormente cultivados en concentraciones de oxígeno de 0.21, 1.0 y 0.1 respectivamente

OXIREDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR
MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON

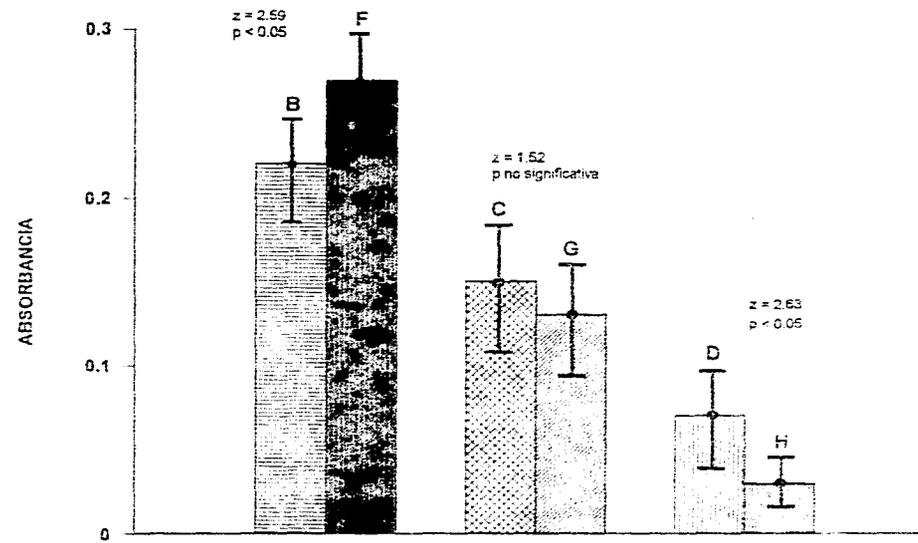


Fig. 6 Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de oxireducción por el nitroazul de tetrazolio en macrófagos peritoneales inducidos en ratón respirando oxígeno al medio ambiente y posteriormente cultivados a tres concentraciones de oxígeno B al 0.21 ; C al 1.0 ; D al 0.10 ; comparados con macrófagos peritoneales inducidos en ratón respirando oxígeno al 1.0 y posteriormente cultivados a tres concentraciones de oxígeno F al 0.21 ; G al 1.0 ; H al 0.10

**ENSAYO FAGOCITICO CON PMNs DE PACIENTES
CON PERITONITIS**

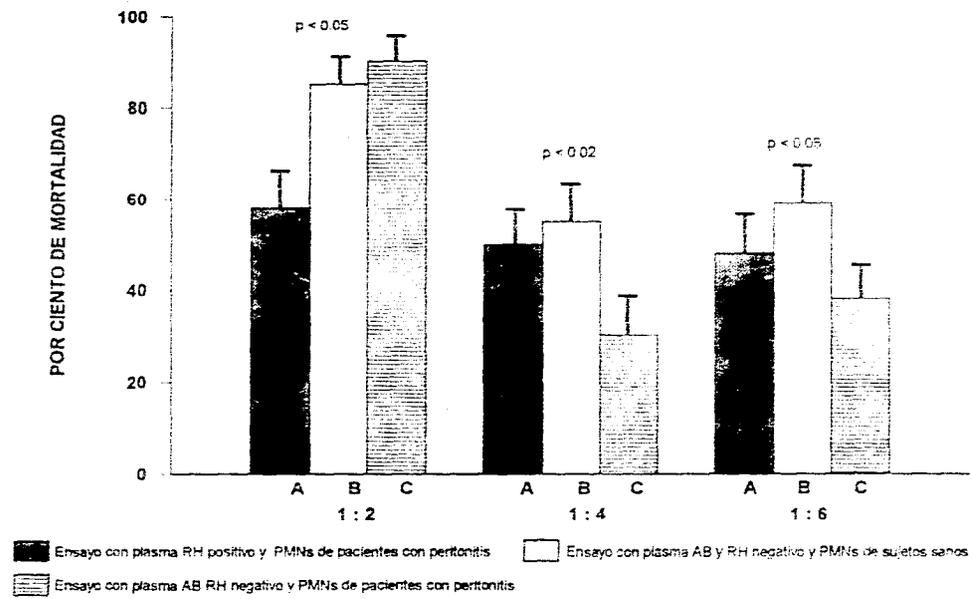


Fig. 7 Valores $\bar{x} \pm EE$ de cinéticas de pacientes con peritonitis y con PaO_2 menor de 45 mmHg. Utilizando plasma heterólogo AB RH negativo, así como en igual número de sujetos control sano.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MIELOPEROXIDASA (MPO) EN PMNs DE
PACIENTES CON PERITONITIS Y CON PaO₂ MENOR DE 45 mmHg

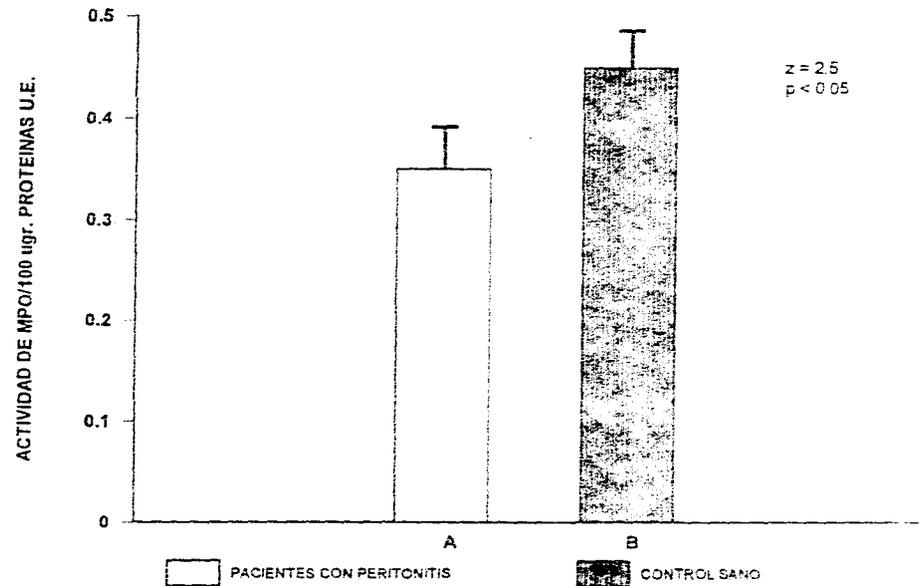


Fig. 8 Actividad enzimática de MPO por método enzimático en 20 pacientes con peritonitis y con PaO₂ menor de 45 mmHg. El grupo control estuvo constituido por igual número de sujetos. Las mediciones que se muestran son $\bar{x} \pm EE$

BIBLIOGRAFÍA:

1. Balentine JD ; Pathology of Oxygen Toxicity. New York, Academic Press, 1982.
2. Bryan CL, Jenkinson SG ; Oxygen toxicity. Clin Chest Med 1988; 9 : 141-152
3. Duane P; Pulmonary insults due to transfusions, radiation, and hyperoxia. Semin Res Infec 1988; 3 : 240-246
4. Fisher AB; Oxygen therapy. Side effects and toxicity. Am Rev Respir Dis 1980; 122: 61-69
5. Jackson RM; Pulmonary oxygen toxicity. Chest 1985; 88: 900-905
6. Nakae H; Endo S; Takakuwa T; Inada K; Yoshida M. Relationship between alpha-tocopherol and polymorphonuclear leukocyte elastase in septic adult respiratory distress syndrome. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1995; 89: 93-100
7. Freeman BA, Crapo JD: Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. J Biol Chem 1981; 256: 986-992
8. Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47: 412-426
9. Cheeseman KH; Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Brit Med Bull 1993; 49: 481-493

10. Leirisalo Repo M. The present knowledge of the inflammatory process and the inflammatory mediators.
Pharmacol Toxicol 1994; 75 Suppl 2: 1-3
11. Halliwell B; Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 1984; 219: 1-14
12. Halliwell B; Gutteridge JMC; Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?
J Lab Clin Med 1992; 119: 598-620
13. Karnovsky MJ. Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective. Histochemistry 1994; 102: 15-27
14. Urban T; Hurbain I; Urban M; Clement A; Housset B. Oxidants and antioxidants, Biological effects and Therapeutic Perspectives. Ann Chir 1995; 49: 427-34
15. Gutteridge JMC: Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin: a study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. Biochim Biophys Acta 1986; 869: 119-27
16. Solbach W, Moll H, Röllinghoff M: Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune.
Immunol Today 1991; 12: 4-6
17. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation.
Annu Rev Immunol 1993; 11: 403-450

18. Moreno J. Papel de los factores solubles en la comunicación celular en el sistema inmune. Parte I. De la observación funcional a la caracterización molecular.
Rev Mex Reumatol 1987; 2: 53-64
19. Moreno J. Papel de los factores solubles en la comunicación celular en el sistema inmune. Parte II Interferón y otras citocinas. Rev Mex Reumatol 1987; 2: 72-83
20. Adams DO, Hamilton TA: The cell biology of macrophage activation. Ann Rev Immunol 1984; 2:283-318
21. Johnston RB: Monocytes and macrophages.
N Engl J Med 1988; 318: 747-752
22. Karnovsky ML, Lazdins JK : Biochemical criteria for activated macrophages. J immunol 1978; 121: 809
23. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation.
Acta Physiol Scand 1986; Suppl 548: 9-37
24. Handbook of Experimental Immunology. 1979.Blackwell Scientific Pub. Edit. D.M. Weir.Third Edition, vol 2 p 31.4 y p. 31.7
25. Worthington Enzyme Manual. 1972. Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, p.43.
26. Siegel S. Estadística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta. Edit Trillas. México, 3a ed 1990 (reimp 1991)
27. Downie NM; Heath RW. Métodos estadísticos aplicados. Edit. Harla. México, 5a. ed. 1986.
28. Shao SP. Estadísticas para economistas y administradores de empresas. Edit Herrero. México 14a. ed. 1978.

29. Kinnula VL; Chang LY; Ho YS; Crapo JD. Hydrogen peroxide release from alveolar macrophages and alveolar type II cells during adaptation to hyperoxia in vivo.
Exp Lung Res 1992; 18: 655-73
30. Baldwin SR; Simon RH; Grum CM; Ketai LH; Boxer LA; Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. Lancet 1986; 1: 11-4
31. Cross CE; Halliwell B; Borish ET; Pryor WA; Ames BN; Saul RL; McCord JM; Harman D. Davis Conference. Oxygen radicals and human disease. Ann Int Med 1987; 107: 526-245
32. Martin D; Korthuis RJ; Perry M; Townsley MI; Taylor AE. Oxygen radical-mediated lung damage associated with alfa-naphthylthiourea. Acta Physiol Scand 1986; Suppl 548: 119-125
33. Rangan U; Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. Brit Med Bull 1993; 49: 700-718
34. Holtzman RB; Adler L; Hageman JR. Evaluation of prostacyclin analog in prevention of pulmonary oxygen toxicity.
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1992; 46: 307-10
35. Castranova V. Generation of oxygen radicals and mechanisms of injury prevention.
Environ Health Perspect 1994; 102 Suppl 10:65-8
36. Winrow VR; Wynyard PG; Morris CJ; Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. Brit Med Bull 1993; 49: 506-22

37. Clark ET; Desai TR; Hynes KL; Gewertz BL. Endothelial cell response to hypoxia-reoxygenation is mediated by IL-1.
J Sur Res 1995; 58: 675-81
38. Gilbert DL : Oxygen: An Overall Biological view. In Oxygen and Living Processes. New York, Springer-Verlag, 1981,pp 376-392
39. Lartigau E; Guichard M. Does tirapazamine (SR-4233) have any cytotoxic or sensitizing effect on three human tumour cell lines at clinically relevant partial oxygen pressure?.
Int J Radiat Biol 1995; 67: 211-6
40. Videla LA; Fernández V: Thyroid calorigenesis and oxidative stress: modification of the respiratory burst activity in polymorphonuclear leukocytes.
Braz J Med Biol Res 1994; 27: 2331-42
41. Schoenberg MH; Nussler AK; Begler HG.
Oxygen radicals and nitrogen monoxide in sepsis.
Chirurg 1995; 66: 18-26
42. Golberg JJ; Pankey JW; Politis I; Zavizion B; Bramley AJ.
Effect of oxygen tension on killing of Escherichia coli by bovine polymorphonuclear neutrophil leucocytes in vitro.
J Dairy Res 1995; 62: 331-8
43. Giulivi C; Lavagno CC; Lucesoli F; Bermudez- MJ; Boveris A.
Lung damage in paraquat poisoning and hyperbaric oxygen exposure: superoxide-mediated inhibition of phospholipase A2.
Free Radic Biol Med 1995; 18: 203-13

44. Knowles R; Keeping H; Nguyen K; Garner C; D'Amico R; Simms RH.
Hypoxemia up-regulates interleukin-8 stimulated phagocytosis
of polymorphonuclear leukocytes by differential regulation of
CD32w and CD35 messenger RNA expression.
Surgery 1995; 118: 177-84
45. Albina JE; Henry WL Jr; Mastrofrancesco B; Martin BA; Reichner
JS. Macrophage activation by culture in an anoxic environment.
J Immunol 1995; 155: 4391-6
46. Sahai A; Xu G; Sandler RS; Tannen RL. Hypoxia mediated
impaired differentiation by LLC-PK1 cells: evidence based on
the protein kinase C profile. Kidney Int 1992; 42: 1145-52
47. Simms RH; D'Amico R. Regulation of whole blood
polymorphonuclear leukocyte phagocytosis following hypoxemia
and hypoxemia/reoxygenation. Shock 1994; 1: 10-8
48. Sinkin RA; LoMonaco MB; Finkelstein JN; Watkins RH; Cox
C; Horowitz S. Increased fibronectin mRNA in alveolar
macrophages following in vivo hyperoxia.
Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7: 548-55
49. D'Angio CT; Sinkin RA; LoMonaco MB; Finkelstein JN.
Interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 mRNAs in
oxygen injured rabbit lung.
Am J Physiol 1995; 268 (5 Pt 1): L826-31
50. Wiles ME; Dykens JA; Wright CD. The Human neutrophil (PMN)
oxygen radical production and the cytoskeleton.
Life Sci 1995; 57: 1533-46

51. Shekarriz M; Sharma RK; Thomas AJ Jr; Agarwal A. Positive myeloperoxidase staining (Endts test) as a indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen.
J Assit Reprod Genet 1995; 12: 70-4

ANEXO 1

Inducción de Macrófagos peritoneales

- a) Determinación de la cantidad ideal de aceite mineral inyectado intraperitonealmente para obtener una cosecha suficiente de macrófagos y del tiempo de migración.
1. Se aplicó a grupos de 5 ratas intraperitonealmente cantidades diferentes de aceite mineral " Lugol " 3 ml , 5 ml 10 ml, 15 ml y 20 ml
 2. Se permitió por 48 y 72 hrs. la migración de los macrófagos hacia el peritoneo respirando una concentración normal de oxígeno (0.21)
 3. Se sacrificaron los animales por medio de dislocación brusca del cuello
 4. Se abrió piel y músculo a través de disección
 5. Por medio de punción gentil se extrajo el exudado peritoneal
 6. Se realizó cuenta de macrófagos
 7. Se elaboró una curva que relacionó cantidad inyectada de aceite mineral con cantidad de macrófagos presentes en peritoneo, relacionado a su vez con el tiempo de incubación
 8. A todos los animales que ingresaron a la fase experimental A se les aplicó 20 ml. de aceite mineral intraperitoneal para inducir la presencia de macrófagos en exudado peritoneal y el tiempo de incubación fue de 72 hrs.
 9. Ratas que presentaron infección peritoneal fueron descartadas

ANEXO 2

Cultivo de macrófagos peritoneales

1. Se esterilizó material de vidrio a utilizar, previo lavado con detergente, a 160° C por 60 minutos previo uso de ácido nítrico al 2% por 48 hrs y lavado con agua destilada
2. Se utilizó medio 199 con suplemento de lactoalbumina para su cultivo
3. Se sacrificaron las ratas de 8 a 12 semanas de vida mediante dislocación brusca del cuello
4. Mediante técnica estéril y previa disección de piel y músculos, se realizó punción directa para extracción de exudado peritoneal previa inyección de 5 ml. de medio 199 y conteniendo 5 Us de heparina/ ml en la cavidad peritoneal, en la línea media del abdomen
5. El exudado peritoneal se obtuvo mediante aspiración lenta y cuidadosa para evitar daño a las células y obstrucción con la grasa peritoneal
6. El líquido aspirado fue transferido a un tubo de ensayo estéril
7. Se tomó una muestra con una pipeta Pasteur y se realizó conteo de células dentro de las cuales 60 a 90 % eran macrófagos
8. Se adicionó de medio suplementario para lograr una concentración del 10%

9. En tubos para cultivo con medio 199 se colocaron 5×10 células con técnica estéril y bajo campana de flujo laminar
10. Se mezclaron gentilmente las células y fueron puestas a incubar en estufa para cultivos a 37 grados C por 72 hrs
11. Cada 24 hrs. fueron revisados los tubos de cultivo siendo desechados los que presentaron contaminación
12. A las 72 hrs. se realizó cosecha de células
13. Se valoró viabilidad y se realizó conteo
14. Se tomó muestra para realizar reacción de oxireducción del Nitroazul de tetrazolio

ANEXO 3

Ensayo Microbicida

a) Preparación de la bacteria.

1. De una cepa bacteriana pura de *Escherichia coli* invasiva 9001 (serotipo 01.K1:H7), se tomó una asada que fue sembrada en 15 ml de caldo de soya, tripticaseína e incubada a 37° C por 24 hrs.
2. Se preparó medio glicerol-caldo soya tripticaseína en proporción 5/ 50 ml. Se tomó una proporción de este medio en un tubo de rosca estéril y se efectuó prueba de esterilidad, incubándolo a 37° C por 24 hrs.
3. El sembrado, al medio glicerol-caldo soya tripticaseína, se repartió en tubos Eppendorf de 1 ml, que se rotularon y se congelaron a -70 grados C hasta su uso.

ANEXO 4

b) Ajuste de bacteria

1. Fue depositado el contenido del vial en 3 ml. de caldo de soya tripticaseina en un tubo de rosca estéril, y se incubó a 37° C por 24 hrs.
2. Del tubo anterior se depositó una alícuota en caldo soya tripticaseina y se ajustó a una Densidad Optica (D.O.) de 0.1 a 620 nm de longitud de onda.
3. Se realizó dilución 1:5 del ajuste anterior con caldo de soya tripticaseina y se mantuvo en refrigeración hasta su uso en la preparación de los tubos mezcla de la reacción.

ANEXO 5

c) Obtención de leucocitos

1. Se obtuvieron 15 ml. de sangre venosa con una jeringa de 20 ml, conteniendo 5 ml. de dextrán al 6% en solución de Alsever a cada sujeto problema y control
2. se mezcló perfectamente
3. Se colocó una porción de 0.5 ml en un tubo de ensayo que se empleó para la cuenta de leucocitos totales
4. La jeringa con sangre fue encubada en posición vertical durante 30 minutos a 37° C
5. Se separó el plasma rico en leucocitos y se recibió en un tubo de rosca estéril
6. Se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante
7. Se resuspendió el botón celular en 1 ml de solución de Alsever usando una pipeta Pasteur y se llevó a 15 ml. con esta solución
8. Se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 1 ml. de Alsever y se llevó a 15 ml con esta misma solución
9. Se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante
10. Se resuspendió el botón celular en 1 ml de agua bidestilada estéril con una pipeta Pasteur se homogeneizó durante 45 segundos. Se aforó hasta 15 ml con un Medio Mínimo Esencial (MEM) y se volvió a homogeneizar

11. Se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante
12. Cuando quedaban eritrocitos en el botón celular se repetían los pasos 10 y 11
13. Se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de MEM y se homogeneizó con una pipeta Pasteur, aforando hasta 15 ml con MEM
14. Se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C y se descartó el sobrenadante
15. Se resuspendió el botón celular en 2 ml de solución salina estéril y se determinó el número de leucocitos totales en suspensión, se empleó una pipeta de Thoma para cuenta de glóbulos blancos, se usó azul de tripano como diluyente (1:20) y se contó en la cámara de Neubauer
16. Se aforó la suspensión anterior hasta 15 ml. con el MEM, se homogeneizó y se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C, se descartó el sobrenadante
17. Se resuspendió el sedimento celular en 2 ml. de MEM
18. Se efectuaron los cálculos para tomar el volumen de suspensión celular que corresponden a 2×10^6 a la 6×10^6 células en 2 ml.

ANEXO 6

e) Preparación de tubos mezcla de reacción.

1. Se preparó una serie de tubos 13 X 100 mm estériles por duplicado que contenían lo siguiente:

TUBOS	CONTENIDO
1 y 2	control
3 y 4	suero inactivado (0.2 ml)
5 y 6	suero (0.2 ml)
7 y 8	suero inactivado (0.2 ml)+ 2 X 10 células
9 y 10	suero (0.2 ml)+ 2 X 10 células
11 y 12	2 X 10 células

Se añadió a cada tubo de mezcla de reacción 0.050 ml de bacteria ya ajustada y diluida y se aforó a un volumen de 2 ml con MEM

2. Se incubó a 37° C por 70 minutos
3. Se efectuaron cuatro diluciones 1 : 11 de cada tubo mezcla de reacción con agua bidestilada estéril
4. De la última dilución se vertió 0.2 ml en un tubo de agar soya tripticaseína, previamente fundido y posteriormente mantenido a 37° C. Se realizó esta operación por triplicado para cada tubo mezcla de reacción

5. Se vació la mezcla anterior en cajas de Petri estériles y se incubó a 37° C por 24 hrs.
6. Se efectuó la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias de *Escherichia coli* invasiva, y se evaluó el efecto inhibidor de crecimiento bacteriostático y/ o bactericida
Cada serie de tubos se realizó para muestras de pacientes y de controles normales por triplicado

ANEXO 7

Determinación Enzimática

a) Obtención de polimorfonucleares

1. Las células restantes del ensayo microbicida se trataron con solución de Ficoll-Hypaque de densidad 1.077 g/ml
- 2.- Se centrifugó a 500 x g por 30 minutos a 4° C
- 3.- Se eliminó la banda de mononucleares con una pipeta Pasteur y se lavaron los polimorfonucleares en dos ocasiones con solución salina 0.85%
4. Se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4° C. Se resuspendió el botón celular del último lavado en 2 ml de solución salina 0.85%
5. Se realizó la cuenta viable con la pipeta de Thoma para glóbulos blancos y se usó azul tripano como diluyente (1:20). Se contó en la cámara de Neubauer
6. Se depositó el volumen correspondiente de la suspensión en tubos de ensayo 13 X 100 mm de 1 X 10 polimorfonucleares (PMNs) para la determinación de proteínas, así como 0.1 X 10 PMNs para el ensayo de ortodiansidina. Todo esto se hizo por duplicado

7. Se realizó frecuentemente frotis de las suspensiones celulares, que se tiñeron por el método de May-Grünwald para hacer la cuenta de PMNs. Se verificó que los PMNs se presentaran en más del 85% en relación a los mononucleares
8. Se almacenaron las preparaciones celulares a -20° C para hacer posteriormente la determinación de proteínas y la actividad enzimática .

ANEXO B

b) Determinación de proteínas por el método de Lowry

1. Se realizó la curva de calibración de proteínas de la siguiente manera: se preparó un patrón de ovoalbúmina a una concentración de 1 mg/ml en solución salina 0.85%. Se emplearon diferentes alícuotas por triplicado (0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.16, 0.20, y 0.25 ml) en tubos 13 x 100 mm
2. Se descongelaron los tubos almacenados con 1×10^6 PMNs y se ajustó el volumen de cada tubo a 1 ml con solución salina 0.85%
3. Se agregó a cada tubo 3 ml de una solución que contenía 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2 %, 1 ml de sulfato de cobre pentahidratado al 1 %, carbonato de sodio al 2% en 100 ml de hidróxido de sodio al 0.1 N
4. En dos tubos de 13 x 100 mm se colocaron los reactivos anteriores y se trabajó simultáneamente como blanco de reactivos
5. Se agitó y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente
6. Se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu (0.1 ml) y se leyó contra el blanco a una longitud de onda de 600 nm después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente

7. Con los datos obtenidos de las diferentes alícuotas, fue construida la curva tipo colocando en las abscisas la concentración de proteína en microg/ml de la solución patrón de ovoalbúmina y en las ordenadas los valores de la densidad óptica (D.O.)
8. En cuanto a las muestras problema, cada serie de determinaciones se hizo en correlación con las alícuotas de 0.08 y 0.10 ml de solución patrón.

ANEXO 9

c) Determinación de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa por el método de la ortodianisidina

1. Se descongelaron los tubos almacenados que contenían 0.1 x 10 PMNs de cada muestra
2. Se llevaron a un volumen final de 2.5 ml con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0
3. Se agregó a cada tubo 0.1 ml de bromuro de acetil trimetil amonio (CTAB) al 0.6%, 0.05 ml de solución de ortodianisidina 0.02 M y 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 0.03 m
4. En dos tubos 13 x 100 mm se colocaron todos los reactivos anteriores, excepto la muestra (blanco de reactivos) que se trabajaron simultáneamente. Se incubó a 37° C durante 20 minutos
5. Se agregó a cada tubo 0.5 ml de ácido tricloroacético al 40%
6. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1400 X g durante 30 minutos y con una pipeta Pasteur se descartó el sobrenadante
7. Se agregaron 3 ml de dióxano y se agitó
8. Se centrifugó a 1 400 x g por 15 minutos

9. El sobrenadante se leyó con respecto al blanco a una longitud de onda de 460 nm; la cuantificación de mieloperoxidasa se calculó de acuerdo a la proteína existente en las células. Como para el método de Lowry se colocaron 1×10^6 PMNs se realizó el cálculo para 0.1×10^6 PMNs. El resultado obtenido se relacionó con la D.O. de cada muestra en la determinación de mieloperoxidasa para conocer las Unidades Específicas de actividad enzimática.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 10

Cuenta de leucocitos totales

1. Se tomó el tubo de ensayo con 0.5 ml. de sangre venosa y se llenó con sangre una pipeta de Thoma para glóbulos blancos hasta la marca de 0.5
2. Se limpió la sangre adherida en el exterior de la pipeta con una gasa
3. Se completó hasta la marca de 1.01 con líquido de Turk
4. Se homogeneizó y se agitó vigorosamente 2 minutos
5. Se colocó el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer por uno de sus bordes y se depositó la muestra
6. Se dejó reposar de 2 a 4 minutos
7. Se observó al microscopio y se contaron los leucocitos en los 4 cuadrantes de las esquinas de la cámara

ANEXO 11

Cuenta Diferencial de Leucocitos

1. Se realizó un frotis de sangre periférica en un portaobjetos limpio y desengrasado
2. El frotis se secó al aire y se fijo durante 3 minutos en metanol
3. Se tiñó con el colorante May-Grünwald durante 5 minutos
4. Se lavó con agua de la llave
5. Se tiñó con el colorante de Giemsa durante 15 minutos
6. Se lavó con agua de la llave
7. Se secó al aire en posición vertical
8. Por último se observó y fueron contadas las células al microscopio empleando el objetivo de inmersión