



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**LOS NEUTROFILOS COMO
MECANISMO DE DEFENSA**

TRABAJO MONOGRAFICO

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO · BIOLOGO

P r e s e n t a :

JORGE ALBERTO MATUS MEXIA

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

I .- Introducción

II.- Generalidades de los leucocitos polimorfonucleares

2.1 Origen

2.2 Características

2.3 Funciones

III- Neutrófilos, su papel fagocítico

3.1 Enzimas que intervienen

3.2 Degranulación

3.3 Mecanismo

IV.- Discusión

V .- Conclusiones

CAPITULO I

INTRODUCCION

El cuerpo humano está en contacto con agentes infecciosos y sus defensas inmunológicas que están compuestas por elementos específicos como los anticuerpos (Ac) y linfocitos sensibilizados, e inespecíficos como el complemento y las células fagocíticas, lo protegen de estos agentes.

La fagocitosis juega un papel importante y decisivo en el delicado balance entre el huésped y los microorganismos patógenos.

La fagocitosis es la capacidad de los fagocitos para ingerir microorganismos (m.o.s.) y depende de las propiedades de la superficie de los microorganismos. La capacidad para realizar la fagocitosis existe en muchos protistas unicelulares, y las células fagocíticas se encuentran en los tejidos de todos los grupos animales.

La actividad fagocítica de ciertas células en los organismos pluricelulares y su papel para evitar la infección, fueron descubiertos por E. Metchnikoff en 1880.

La virulencia de algunos organismos es debida en parte a su capacidad de resistir su ingestión por fagocitos, mientras que la de otros está relacionada a su capacidad de resistir la destrucción intracelular, así como la ingestión.

Una fagocitosis efectiva en el curso de una infección bacteriana limita el desarrollo de ésta.

El proceso fagocítico está dividido en cuatro fases que se relacionan entre sí: 1.- QUIMIOTAXIS, 2.- OPSONIZACION? 3.- INGESTION, y 4.- DIGESTION.

A través de la quimiotaxis los fagocitos migran hacia la bacteria adheriéndola a su superficie por medio de moléculas quimiotácticamente activas. Estas moléculas son fragmentos generados a partir del quinto

componente del complemento (C_5). (11)

Durante la opsonización las bacterias se combinan con componentes del suero y así son más susceptibles a la fagocitosis.

Este mecanismo de opsonización es de gran importancia principalmente en bacterias encapsuladas, ya que estas producen graves infecciones debido a su gran virulencia. (61)

Durante la ingestión la bacteria se fija a la superficie celular o al interior del fagocito por la invaginación de la membrana celular y la formación de vacuolas fagocíticas. La destrucción intracelular del microorganismo es un complejo mecanismo que involucra la ruptura de gránulos lisosomales y la liberación de su contenido dentro de la vacuola fagocítica. El sistema del complemento juega un papel directo en la opsonización y en la quimiotaxis. La quimiotaxis de fagocitos se estimula por tres productos de la activación del complemento: C_{5a} , C_{3a} y el complejo trimolecular $C_{5a,6,7}$.

El C_{5a} es el más potente de estos fragmentos para la atracción de leucocitos a los tejidos, la opsonización generada por la ruta clásica y alterna del complemento, la liberación de enzimas lisosomales, la función de anafitoxina y la liberación de histamina de las células cebadas. (38)

Por lo tanto, es de gran importancia el fenómeno de opsonización como mecanismo de defensa del huésped hacia agentes infecciosos, principalmente en los lactantes, ya que no tienen completamente desarrollado su sistema inmunitario, también en niños desnutridos, los cuáles tienen un aumento en la susceptibilidad a infecciones debido a un desequilibrio entre inmunidad y su nutrición que ocasiona alteraciones en diferentes proteínas del suero, así como disminución de sus actividades. (8,9,25,39,48,56,68)

También se ha reportado, la disminución en la capacidad de opsonización en el Síndrome de Leiner, en algunas inmunodeficiencias y en infecciones de repetición, generalmente ocasionadas por microorganismos gram negativos.

Este defecto en la capacidad de opsonización se asocia a una disfunción del quinto componente del complemento, el que se comprueba "in vitro" al añadir suero de ratones funcionalmente eficientes respecto a C_5 , lo que aumenta la fagocitosis, mientras que en el suero de ratones deficientes en C_5 no lo hace. (16,28,36,43,44,47,48,51,55,68)

El objetivo de este estudio es el de establecer un panorama más amplio acerca de las principales vías bioquímicas, por medio de las cuales los leucocitos polimorfonucleares LPMNs) (neutrófilos) realizan la fagocitosis de bacterias, empleando para esto el uso de los diferentes sistemas utilizados; como son los sistemas dependientes de oxígeno, sistemas independientes de oxígeno, las degranulaciones dentro de los fagosomas, las liberaciones de enzimas específicas, produciendo con esto un mecanismo satisfactorio para actuar en contra de los microorganismos patógenos.

CAPITULO II

GENERALIDADES DE LOS LEUCOCITOS

Los leucocitos comprenden dos tipos principales: AGRANULOCITOS y GRANULOCITOS. Los leucocitos agranulocitos tienen citoplasma de aspecto homogéneo y núcleos que varían de la forma esférica a la reniforme.

Los leucocitos granulocitos contienen gránulos específicos abundantes en su citoplasma, e incluyen núcleos que muestran variación considerable de forma. Existen dos tipos de agranulocitos: LINFOCITOS, que son células pequeñas con poco citoplasma, y MONOCITOS, que son células un poco mayores y contienen un poco más de citoplasma.

Los leucocitos granulosos son de tres tipos: NEUTROFILOS, BASOFILOS y ACIDOFILOS (o EOSINOFILOS), que se distinguen por la afinidad de sus gránulos por los colorantes neutros, básicos y ácidos, respectivamente. (37,67,69)

LEUCOCITOS AGRANULOSOS.

LINFOCITOS.- En la sangre humana, los linfocitos son células esféricas que varían de 6 a 8 micras de diámetro, aunque algunas pueden ser mayores.

La mayor parte de ellas son un poco más grandes que los eritrocitos. Integran del 20 al 35% de los leucocitos de la sangre normal. El carácter más notable del linfocito pequeño es que tiene un núcleo bastante grande rodeado de un borde angosto de citoplasma. El núcleo tiene aspecto esférico y por lo regular muestra indentación pequeña en un lado, la cromatina densa del núcleo se colorea intensamente, y el nucleolo es invisible en los frotis secos coloreados.

El citoplasma capta los colorantes basófilos, y en microfotografía electrónica puede observarse que ello proviene de concentración de ribosomas en el mismo. Pueden observarse gránulos azurófilos, purpúreos o violáceos en el citoplasma, pero a diferencia de los gránulos específicos de los leucocitos granulosos, no tienen carácter constante. (27,37,46,67,69)

Algunos linfocitos de la sangre circulante normal pueden tener incluso de 10

a 12 micras. Su Tamaño mayor proviene principalmente de la gran cantidad de citoplasma, estas células se han denominado a veces LINFOCITOS DE TAMAÑO MEDIO, ninguna de estas células grandes conviene confundirlas con los LINFOCITOS GRANDES que se encuentran en los ganglios linfáticos que aparecen en la sangre solamente en estado patológico. (27,37)

Se identifican estos últimos por la presencia de núcleos vesiculares con nucleolos prominentes.

MONOCITOS.- Los monocitos son células grandes que comprenden solamente del 3 al 8% de los leucocitos de la sangre normal, miden de 9 a 12 micras de diámetro, pero en los frotis secos pueden aplanarse y llegar a un diámetro de 20 micras o más. El núcleo suele ser excéntrico en la célula, y es ovoide o reniforme, pudiendo mostrar una depresión profunda o tener aspecto reniforme o en "herradura" en las células más viejas. El material de cromatina en su interior está dispuesto en una trama delicada, y por ello el núcleo no se colorea tan densamente como el del linfocito. El citoplasma es bastante abundante y con el colorante de Wright revela que tiene color grisáceo azuloso pálido en los frotis secos. Contiene una población de gránulos azurófilos, generalmente más numerosos pero menores que los de los linfocitos.

Los gránulos son primariamente lisosomas y el citoplasma también contiene algo de retículo endoplásmico granuloso pero menos ribosomas que los que se encuentran en los linfocitos. (60,67,69)

LEUCOCITOS GRANULOSOS

En contraste con los linfocitos y los monocitos, los leucocitos granulosos contienen gránulos específicos caracterizándose por la presencia de un núcleo multilobular (polimorfo). Por esta causa se les ha designado leucocitos polimorfonucleares (LPMN). Hay tres tipos de leucocitos que poseen en común un núcleo de contorno irregular, teniendo citoplasma granular y se diferencian entre sí, de acuerdo con las propiedades de sus gránulos citoplasmáticos en: NEUTROFILOS (gránulos que se tiñen con una mezcla de colorantes ácidos y bá-

sicos), EOSINOFILOS (gránulos que se tiñen con el colorante ácido de eosina) y BASOFILOS (gránulos que se tiñen con el colorante básico azul de metileno). NEUTROFILOS.- Los leucocitos polimorfonucleares (LPMNs) neutrófilos tienen de 7 a 9 micras de diámetro en estado fresco y 10 a 12 micras en los frotis secos. De los leucocitos humanos son los más numerosos y comprenden del 65 al 75% del total. El núcleo muestra variedad de formas, suele incluir de 2 a 4 lóbulos ovales irregulares conectados por filamentos finos de cromatina, el número de lóbulos aumenta con la edad.

No se observan nucleolos, y en los frotis secos de sangre periférica de mujeres puede observarse un pequeño apéndice nuclear unido al resto del núcleo por un filamento fino de cromatina en aproximadamente 3% de los neutrófilos. Esta prolongación "en palillo de tambor", observada por primera vez por Davison y Smith, (27,37), quizá represente el cromosoma sexual, aparece en todas las células femeninas, pero está íntimamente unido a uno de los lóbulos del núcleo de muchas células y por ello no se aprecia fácilmente, el citoplasma abundante incluye finos gránulos neutrófilos. Dado que las células varían en sus reacciones de tinción en diferentes especies, a veces se les ha denominado leucocitos "heterófilos" y no neutrófilos. (7,14,27,37,69)

EOSINOFILOS.- El leucocito eosinófilo o acidófilo es un poco mayor que los neutrófilos, y en estado fresco tienen de 9 a 10 micras de diámetro, en frotis secos el tamaño de la célula aplanada varía de 12 a 14 micras.

Normalmente integran más o menos del 2 al 14% del total de leucocitos, el núcleo suele ser bilobular.

El citoplasma en forma característica incluye gránulos gruesos de tamaño uniforme con capacidad de refracción, que se tiñen intensamente con los colorantes ácidos, los gránulos específicos tienen un aspecto llamativo en las microfotografías electrónicas.

BASOFILOS.- Estas células son difíciles de precisar en la sangre humana, dado que constituyen solamente del 0.5 al 1% del número total de leucocitos.

Tienen aproximadamente el mismo tamaño que los neutrófilos, esto es, de 7 a 9 micras de diámetro en estado fresco, y 10 o un poco más en los frotis secos. El núcleo con frecuencia tiene contornos irregulares y en parte está estrechado para formar dos lóbulos. Los gránulos citoplasmáticos son redondos, gruesos y de tamaño variable. Algunos en forma característica, están unidos al núcleo y su contorno es borroso, los gránulos son solubles y, en consecuencia, disueltos parcialmente o faltan en las preparaciones corrientes.

Son basófilos y metacromáticos y contienen histamina, heparina y serotonina; A diferencia de los gránulos de otros tipos de leucocitos granulados, no se considera que sean lisosomas, puesto que en los neutrófilos y eosinófilos granulosos son un tipo especial de lisosomas que contienen principalmente hidrolasas y peroxidasas respectivamente. (5,6,15)

Todos los leucocitos granulares son capaces de realizar la fagocitosis, pero solo en los neutrófilos es suficientemente activa como para ser un factor importante en la defensa del huésped. Los basófilos y eosinófilos, por el contrario, juegan especiales papeles en la respuesta inflamatoria, los linfocitos son responsables de la formación de anticuerpos (Ac); los monocitos son fagocitos activos.

La importancia de los leucocitos en la defensa del huésped viene indicada por el hecho de que abandonan el sistema circulatorio y se congregan en cualquier tejido que haya sido invadido o dañado. De las células de los mamíferos pueden extraerse muchas sustancias, una de estas es, la fagocitina, una globulina que se encuentra en los leucocitos fagocíticos y que es activa principalmente frente a las bacterias gram negativas, así como también las leukinas (que son proteínas básicas), que se encuentran en los leucocitos, que son substancias antimicrobianas activas frente a bacterias gram positivas.

Es notable que estas células altamente fagocíticas contengan sustancias activas, tanto frente a bacterias gram positivas como a gram negativas. (37,46, 55,60)

2.1 ORIGEN

Los elementos figurados de la sangre tienen vida corta y continuamente son destruidos. El número de elementos figurados en la sangre se conserva a nivel constante por formación de células nuevas; La formación de células nuevas se denomina HEMATOPOYESIS; y la hematopoyesis es uno de los tópicos de mayor controversia, debido a que existe un desacuerdo en las teorías que dan origen a las células originales de las líneas de diferenciación.

La teoría UNITARIA o MONOFILETICA de la hematopoyesis, afirma que las células hemáticas, rojas y blancas, provienen de una célula original común, el "HEMOCITOBLASTO".

La teoría DUALISTICA o DIFILETICA hace provenir a los linfocitos y los monocitos de una célula original (denominada linfoblasto) y los leucocitos granulosos y eritrocitos de una célula independiente (mieloblasto). Según una teoría ulterior (TRIALISTICA o POLIFILETICA), tres células originales distintas dan origen a: 1)Linfocitos, 2)Monocitos, y 3)Eritrocitos y leucocitos granulosos. En la actualidad, la mayoría de los hematólogos aceptan la teoría unitaria.

A continuación se presenta un diagrama de acuerdo a la teoría unitaria a partir de la célula madre (stem cell), ver diagrama 2.1.1. (17,21,37,67,69)

SERIE MIELOIDE O GRANULOCITICA .

Los granulocitos maduros son células con gránulos citoplasmáticos que dan con los colorantes de Romanowsky, una reacción neutrofilica, eosinoflica o basoflica; Estas células se conocen como leucocitos polimorfonucleares (LPMNs) debido a que poseen un núcleo polimórfico lobulado (segmentado). El mieloblasto es la primera célula reconocible de la serie granulocítica, del que surgen el "promielocito" y por progresión, las formas de mielocito, metamielocito, cayado y finalmente el granulocito maduro o segmentado.

Los gránulos específicos que determinarían la naturaleza de la célula neutrófila, eosinófila, o basófila, comienzan a manifestarse en el estado de promielocito y se encuentran totalmente diferenciadas en el mielocito.

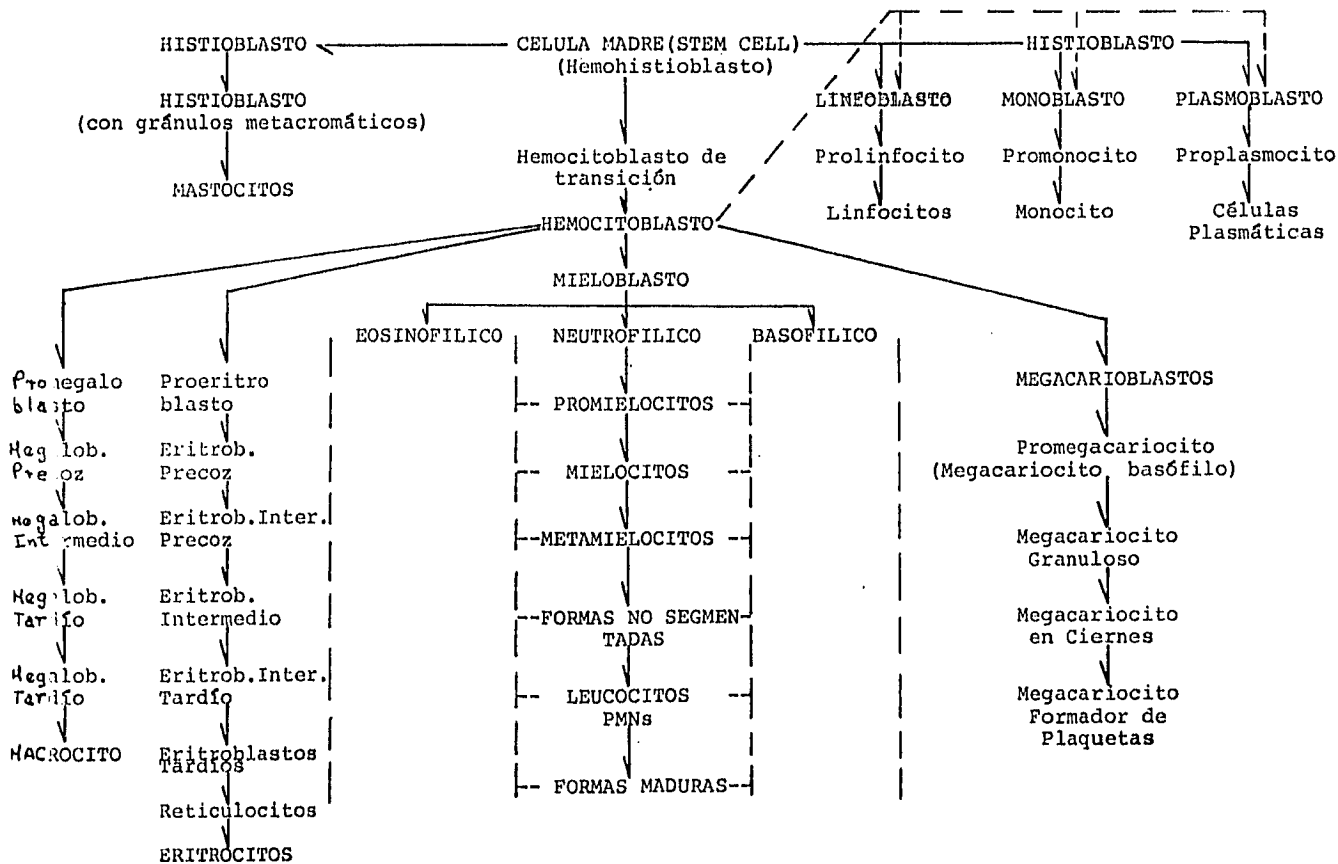


DIAGRAMA 2.1.1.

En el estadio de mielocito ocurre la última división mitótica, el metamielocito es incapáz de dividirse.

MIELOBLASTO.- La variación en el tamaño de esta célula oscila entre 15 o 20 micras, el citoplasma puede ser no granuloso o por el contrario mostrar escasos gránulos azurófilos, dependiendo del estado de desarrollo, la reacción tintorial es moderadamente de color azul oscuro que puede ser desigual, a menudo dando lugar a una región perinuclear algo más clara. El núcleo es redondo u oval y ocupa alrededor de las nueve décimas partes del total del área celular. La cromatina nuclear se dispone en finos filamentos que se colorean de rojo púrpura y le dan un aspecto reticular uniforme. Se pueden observar de uno a varios núcleos, lo habitual es que sean de 2 a 5, de tamaño medio y por lo común, se delimitan perfectamente con un halo cromatínico bien perfijado. (37,46,67,69)

PROMIELOCITO.- Esta célula cuyo diámetro es alrededor de 22 a 25 micras, recuerda al mieloblasto, salvo en que el citoplasma contiene gránulos (azurófilos) que se colorean de color azul púrpura rojizo.

La cromatina nuclear es algo más basta que en el mieloblasto y los nucleolos, aunque todavía son perceptibles, no aparecen tan bien definidos. (63,67,69)

MIELOCITO.- Las diferencias entre esta célula y el promielocito consisten en que los gránulos citoplasmáticos asumen en este momento su carácter neutrofílico y no es posible distinguir los nucleolos. El diámetro de la célula es de 18 a 20 micras, aunque, en una fase muy precoz, puede medir hasta 25 micras, en este estadio incipiente el citoplasma se tiñe de azul claro con un incremento de la relación nucleocitoplasmática. El citoplasma adquiere de manera progresiva un color rosáceo y en la forma madura es predominantemente o completamente rosa. El núcleo es redondo u oval, y la cromatina nuclear se encuentra en forma de gruesos filamentos que se colorean más intensamente que en el promielocito.

METAMIELOCITO.- En este estadio del desarrollo, el citoplasma tiene una coloración rosada y contiene gránulos neutrófilos finos, que semejan los del mielocito. El núcleo es más pequeño y ligeramente indentado (reniforme), pueden existir gran variación en cuanto al tamaño de este tipo de células, desde 14 a 20 micras. (27,37)

JUVENIL.- Esta célula normalmente es más pequeña que el metamielocito con un núcleo en forma de "U" gruesa y teñido intensamente, en el que la cromatina es basta y condensada. (27,37)

BANDA.- Son similares a los granulocitos neutrófilos maduros en que tienen el citoplasma rosado con gránulos finos azurófilos. El núcleo se encuentra elongado (en forma de herradura), y la cromatina nuclear está amontonada gruesamente. (27,37,69) Este estadio es el último de la maduración celular de la serie granulocítica, comprende del 3 al 5% de el conteo diferencial de leucocitos.

SEGMENTADO.- El diámetro de esta célula es de 12 a 14 micras y el citoplasma de color rosa, contiene numerosos gránulos neutrofilos finos o puntiformes que se distribuyen uniformemente, su núcleo es lobulado, con un número de lóbulos que se pueden yuxtaponer, son variables de 2 a 4, mostrando también diferencia en el tamaño y en la forma, y unidos entre sí por finos filamentos de cromatina, estando la cromatina nuclear dispuesta en grandes acúmulos. En el sexo femenino algunos neutrófilos tienen un apéndice nuclear con una cabeza bien definida en forma de palillo de tambor, adherida a un lóbulo nuclear por un delgado puente de cromatina, tales apéndices no existen en los neutrófilos del varón. (14,17,20)

GRANULOCITOS NEUTROFILOS.

La maduración de este tipo celular se caracteriza por el desarrollo de gránulos citoplasmáticos específicos y cambios en la reacción de coloración del citoplasma que pasa de basófilos a eosinófilos y en un estadio determinado los gránulos adquieren la coloración de ambos elementos tintoriales.

2.1.3

A medida que el núcleo madura se torna lobulado, desarrollándose la motilidad y la fagocitosis.

ORIGEN HEMATOPOYETICO DE LOS LEUCOCITOS. 2.1.2

Tomado de Bellanti (Inmunología) 2da. Edición Editorial Interamericana

CELULAS PRIMITIVAS HEMATOPOYETICAS	Médula Osea, Hígado, Saco-----	Sangre -----	Organos linfoides y Tejido conjuntivo
	Precursor de Células B -----	Linfocito B -----	Linfocito B o células plasmáticas
	Precursor de Células T -----	Linfocito T -----	Linfocito T
	Monoblasto		
	Promonocito		Macrófago libre
	Monocito -----	Monocito -----	Macrófago fijo
	Serie Granulocítica -----	Eosinófilo----- Neutrófilo----- Basófilo -----	Eosinófilos tisulares Neutrófilos tisulares Basófilos tisulares

2.2 CARACTERISTICAS

Los neutrófilos PMNs comprenden aproximadamente cerca del 60% de los leucocitos circulantes en la sangre humana. Principalmente el neutrófilo maduro es una célula fagocítica con 2 tipos distintos de gránulos primarios o azurófilos que contienen hidrolasas ácidas, mieloperoxidasas, lisozima y proteínas catiónicas, y los secundarios o específicos que contienen lactoferrina y algunas lisozimas. (20,29)

Aproximadamente estos neutrófilos maduros contienen el 80-90% de gránulos específicos y del 10 al 20% son azurófilos. Los granulocitos se producen en un promedio de 1.6×10^9 cel./Kg./dfa y los neutrófilos tienen una vida media de alrededor de 6 a 20 horas en sangre periférica. Los leucocitos PMNs pueden emigrar a través de las paredes de los capilares y tienen un movimiento zigzagueante, pueden ingerir bacterias y otros materiales, llamándosele a este fe

2.2.1

nómeno FAGOCITOSIS, siendo la función primordial de estos leucocitos PMNs (4,6,53) Podemos mencionar algunas de las sustancias que se encuentran relacionadas con los neutrófilos PMNs como son:

a) En los gránulos primarios: Mieloperoxidasas, proteínas catiónicas bactericidas, lisozima, proteasa neutral, ácido glicerofosfato, beta-glucoronidasa, alfa-manosidasa, etc. y en los b) gránulos secundarios específicos tenemos: Lactoferrina, fosfatasa alcalina, etc. (17,67,69)

2.3 FUNCIONES

Existen diversas funciones y propiedades que llevan a cabo los leucocitos PMNs y que son de mucha importancia para que se active el mecanismo del ser humano como huésped en contra de agentes extraños, así como la destrucción intracelular de los microorganismos, y podemos enumerarlas de la siguiente manera: 1.- QUIMIOTAXIS, 2.- FAGOCITOSIS, 3.- DEGRANULACION, 4.- DESTRUCCION, 5.- REACCION INFLAMATORIA, 6.- DIAPEDESIS, 7.- INGESTION y 8.- MOVIMIENTO AMIBOIDE.

1.- QUIMIOTAXIS

Proceso por el cual las células fagocíticas son atraídas a la vecindad de microorganismos patógenos invasores. La quimiotaxis representa un cambio en la dirección de la movilidad del leucocito (polarización). La quimiotaxis se refleja por una atracción lineal de células fagocíticas o más precisamente un proceso por el cual se inhibe al azar la migración de los neutrófilos. (1,22,24)

2.- FAGOCITOSIS

Dos de los beneficios principales que se obtienen de la reacción inflamatoria en la mayor parte de las lesiones, son la fagocitosis de bacterias, de restos indeseables y la liberación de enzimas catalíticas potentes por los lisosomas de neutrófilos y macrófagos; fagocitar significa literalmente "comer células" .

Muchas células de la economía pueden fagocitar pero nos interesan en particular los leucocitos PMNs y los macrófagos. También los eosinófilos son fagocitarios, lo cual no se aplica a linfocitos ni células plasmáticas.

Se han estudiado los detalles finos de la fagocitosis valiéndose del microscopio electrónico. La primera etapa en la fagocitosis es la unión del leucocito a la partícula; la célula parece fluir parcialmente alrededor de la partícula para crear en realidad una bolsa profunda, el orificio de la bolsa por último se cierra para atrapar a la víctima en un saco limitado por una membrana que proviene de la membrana plasmática del fagocito. Después los lisosomas se unen a este saco y por fusión con el mismo hacen que las enzimas actúen directamente en la destrucción y la eliminación de la partícula atacante.

La energía utilizada en la fagocitosis proviene de vías glucolíticas. (49,50,52)
La actividad fagocitaria de los leucocitos es modificada por muchos factores, el más importante es la presencia de anticuerpos o fracciones de complemento que reciben el nombre genérico de opsoninas. (54,58)

Hay opsoninas en estado normal, en el suero, pero se presentan en mayor concentración en reacciones inmunitarias específicas. Las opsoninas revisten bacterias y las tornan más susceptibles a la fagocitosis. Tienen importancia particular en la fagocitosis de algunos microorganismos virulentos.

Las opsoninas pueden modificar la superficie de la bacteria, inactivar sustancias tóxicas o sencillamente servir como coloide que facilite la adherencia del fagocito y el cuerpo extraño. (54,58)

Después de la fagocitosis, los neutrófilos presentan gran aumento de la actividad metabólica, caracterizado por un incremento de la captación de oxígeno, mayor glucólisis y producción de ácido láctico con la consiguiente disminución del pH del medio. La acidéz facilita la activación de enzimas lisosómicas del neutrófilo, que incluyen lisozima (enzima que tiene la propiedad de degradar las paredes de las células bacterianas), que presenta en abundancia en los neutrófilos.

Metchnikoff dividió el sistema fagocitario en dos tipos de células, las células fagocíticas circulantes y las células fagocíticas fijas a la superficie de los vasos sanguíneos y sinusoides. (57)

El mecanismo por el cual las células fagocíticas reconocen a las partículas extrañas y bacterias es extremadamente sensible debido a que estos poseen una carga electropositiva y así son fácilmente atraídas y fagocitadas mientras que la mayor parte de las sustancias naturales del cuerpo tienen cargas de superficie electronegativas y en consecuencia son repelidas por los fagocitos.

La pinocitosis se refiere a la ingesta de moléculas o partículas muy pequeñas y la fagocitosis a la ingesta de partículas más grandes incluyendo bacterias. Tanto la pinocitosis como la fagocitosis involucran la invaginación de la membrana celular alrededor del material extraño, con la subsecuente fusión de la membrana y su reparación, creando así una vacuola fagocítica.

Hirsch (1962), utilizando técnicas de cinemicrofotografía para registrar la fagocitosis en intervalos de 1/10 de segundo, estableció varias observaciones clave a cerca de la secuencia de eventos durante la fagocitosis, primero el leucocito PMN rodea a la bacteria y la membrana celular comienza a invaginarse alrededor de ella, finalmente en un lapso de 30 segundos a 2 minutos, dependiendo de la actividad de las células y el tamaño de la bacteria, la incorpora completamente dentro del citoplasma del neutrófilo y lo rodea por una porción de la membrana celular externa.

3.- DEGRANULACION

Consiste en la liberación de enzimas granulares durante la fagocitosis bacteriana. Encontrándose pérdida de los gránulos, ricos en enzimas líticas que se vierten al medio, con la consiguiente lisis bacteriana.

4.- DESTRUCCION E (7.- INGESTION)

Recordando que la membrana plasmática está constituida por una doble capa de lípidos compuesta de moléculas de fosfolípidos con grupos hidrofóbicos orientados cabeza a cabeza y con extremidades hidrofóbicas dirigidas

hacia afuera intercalando en medio de las moléculas de fosfolípidos, una molécula de colesterol y flotando en la doble capa lipídica están las proteínas Y que algunas proteínas se encuentran en la superficie de la membrana y otras sobre la superficie citoplasmática. Y dado que la heterogeneidad en composición y movilidad son consistentes con una gran diversidad de estructuras. Existe so breposición de una partícula con la configuración de superficie de un fagocito en su movimiento, a modo que la partícula sea inmovilizada por el fagocito, después empieza a penetrar mediante ciertos eventos que se realizan en la membrana, como por ejemplo cambio en los grupos hidrofóbicos, para así realizar la ingestión y destrucción de los microorganismos.

El concepto de fagocitosis de superficie descrito por Wood y colaboradores, representa un ejemplo de una proporción fagocítica basal que es baja pero finita y es llevada a cabo por un contacto íntimo célula-partícula. Este efecto puede ser demostrado por medio del grado de ingestión por fagocitos suspendi dos con partículas de latex.

La función biológica de las opsoninas es la de aumentar el grado de ingestión de las partículas; Y una posibilidad para explicar la respuesta de los fagocitos a las opsoninas o a partículas limitadas con determinada configuración de superficie, es que se adhieren a los receptores existentes sobre la membrana celular y tales receptores reconocen a un efector y transmiten ese reconocimiento a otras moléculas que directa o indirectamente generan una respuesta celular en los fagocitos.

Los cationes juegan un papel interesante en la ingestión de una variedad de partículas por los leucocitos PMNs, algunos de los principales cationes son el magnesio (Mg^{++}) y el calcio (Ca^{++}) que junto con las opsoninas termolábiles, parecen acelerar la velocidad de ingestión, por la acción de un mecanismo contráctil, sin embargo se presenta un efecto inhibitorio a altas concentraciones de estos cationes divalentes. (35,42,62,65)

La adhesión se llevara a cabo si las potentes fuerzas repulsivas electrostáti

cas entre células/sustratos y células/partículas pueden vencerse y así permiten que las fuerzas electrostáticas débiles interactuen (Van der Waals e hidrofóbicas). Si el leucocito PMN encuentra una partícula que posteriormente ingerirá, se alarga un área del ectoplasma hialino para formar un pseudópodo el cual fluye alrededor de la partícula, la rodea y se funde a su polo distal. Hay gran similitud morfológica entre el esparcimiento del ectoplasma hialino periférico y el proceso de englobamiento, el ectoplasma es semejante a una sábana aplanada sobre el sustrato mientras que el pseudópodo rodea partículas, la superficie de la membrana se sobrepone a la partícula, empieza a aplanarse y la estructura del englobamiento del pseudópodo toma la apariencia de una taza. (55,56,65)

El ectoplasma hialino está compuesto de filamentos y túbulos, el pseudópodo (o lamelopodium) formado por el leucocito PMN consiste de filamentos de 4-6 nm. de diámetro y partículas de glucógeno. En los leucocitos PMNs existen otras estructuras llamadas microtúbulos y microfilamentos que penetran al ectoplasma hialino procedentes de la región centriolar y que son necesarios en el movimiento requerido para la ingestión de partículas.

Estos filamentos están constituidos por polímeros de actina con propiedades semejantes estructurales y funcionales a la actina del músculo y comprende una fracción de substancia del total de proteínas celulares. La presencia de actina y miosina permite el movimiento e ingestión de los fagocitos. (12,26,32)

5.- REACCION INFLAMATORIA

La conglomeración de leucocitos, principalmente neutrófilos y macrófagos, en el sitio de la lesión es el aspecto más importante de la reacción inflamatoria. Podemos considerar la sucesión con la cual los leucocitos se conglomeran y actúan en el foco inflamatorio de la siguiente manera: a) marginación y pavimentación, b) migración, c) quimiotaxis, d) conglomeración y e) fagocitosis. (70)

6.- DIAPEDESIS

6.- DIAPEDESIS

Los leucocitos PMNs pueden deslizarse a través de los poros sanguíneos por un proceso de diapédesis (paso de los leucocitos a través de las pa redes celulares). A pesar de que el poro es mucho menor que el volúmen de las células, una parte pequeña de esta se desliza a través del mismo y la porción que se desliza momentáneamente se reduce a las dimensiones del poro.

8.- MOVIMIENTO AMIBOIDE

Una vez que las células han alcanzado los espacios tisulares, los leucocitos PMNs, se desplazan hacia los tejidos con un movimiento de toda la célula en relación con el medio que la rodea, este movimiento comienza con un alargamiento de un pseudópodo desde un extremo de la célula. El pseudópodo se proyecta hacia afuera, separándose el cuerpo celular, luego el resto de la célula se mueve hacia el pseudópodo. (21,65,70)

CAPITULO III

LOS NEUTROFILOS, SU PAPEL FAGOCITICO.

3.1 ENZIMAS QUE INTERVIENEN.

Las enzimas que intervienen en la degranulación son muy importantes, ya que sin ellas no se podría llevar a cabo la destrucción de las bacterias patógenas. A continuación se dan dos cuadros en los cuales se anotan las enzimas que actúan en este proceso. (67,69)

TABLA DE ENZIMAS Y OTRAS PROTEINAS DE LOS GRANULOS DE LPMNs.

ENZIMAS:	Azurófilos(primarios)	Específicos(secundarios)
Peroxidasa	+	-
Hidrolasas ácidas	+	-
Lisozima	+	+
Colagenasa	-	+
Fosfatasa alcalina	-	+
OTRAS PROTEINAS:		
Mucosubstancia ácida	+	-
Proteínas catiónicas antibacterianas	+	-
Fagocitina	+	-

TABLA DE ENZIMAS Y SUBSTANCIAS QUE HAN SIDO DETECTADAS EN LOS LISOSOMAS

ENZIMAS QUE ACTUAN SOBRE PROTEINAS Y PEPTIDOS:	ENZIMAS QUE ACTUAN SOBRE CARBOHIDRATOS :
Catepsina D	Lisozima
Catepsina E	Neuraminidasa
Histonasa	alfa-Glucosidasas
Proteinasa Neutral	beta-Glucosidasas
Catepsina A	alfa-Galactosidasas
Catepsina B y B ⁺	beta-Galactosidasas
Catepsina C	alfa-Manosidasas
Arilamidasa	alfa-acetil glucominidasa
Dipeptidasa (tirosil glicina)	alfa-acetil galactosamida
Colagenasa	beta-acetil galactosamida
Elastasa	beta-Glucuronidasa
Activador kininógeno	alfa-L-Fucosidasas
Activador plasminógeno	beta-D-Fucosidasas
Renina	Sucrasa
Factor quimiotáctico generando proteasa	Hialuronidasa
beta-Aspartil glucosilamina amido hidrolasa	Ribonucleasa ácida
O-seril-N acetil galactosaminida glucosidasas	Ribonucleasa
Lipasa ácida	Deoxiribonucleasa ácida
Fosfolipasa A ₁ , A ₂	Aril sulfatasa
Coolesterol estereasa	Fosfatasa ácida y alcalina

3.2 DEGRANULACION

Los granulocitos neutrófilos PMN (o PMG) contienen varios gránulos o lisosomas con diferentes contenidos enzimáticos. (2,3,6,16,20)

La degranulación es el fenómeno morfológico más característico asociado con la fagocitosis; los diferentes lisosomas muestran diferentes porcentajes de liberación enzimática respondiendo a diferentes estímulos. (10,11,12,13,20)

La degranulación ocurre una vez que los microorganismos han sido fagocitados ya que se produce la fusión de los gránulos citoplasmáticos con la membrana de la vacuola fagocítica y el contenido es vertido al interior de la vacuola. La degranulación puede ocurrir por endocitosis después de la fusión de las membranas de lisosoma-fagosoma y va acompañada de liberación de enzimas lisosomales (mieloperoxidasas, beta-glucuronidasas, lisozima) y citoplasmáticas (lactato deshidrogenasa-LDH), de granulocitos neutrófilos PMN (o PMG) durante la fagocitosis de partículas en latex inerte o bacterias. (9,10,13,30,31)

La degranulación es mucho más rápida y pronunciada por fagocitosis de bacterias que de partículas inertes. Con frecuencia existe fusión lisosoma-lisosoma, así como también la fusión lisosoma-fagosoma para la liberación del material granular que ha sido transportado por una fusión lisosoma-lisosoma-fagosoma, (60) y enzimas ricas de material granular salidas de los fagosomas han sido demostradas morfológicamente (14,18,26) y bioquímicamente. (1,20)

Durante la fagocitosis bacteriana hay evidencia de material granular liberado dentro del citoplasma causando desintegración enzimática, y durante el curso de esta, ocurre lisis celular sobre cerca del 5% de las células bacterianas al cabo de 60 minutos. En este mismo tiempo la liberación enzimática debida a la fagocitosis bacteriana es de un 20-30% del contenido total enzimático en los gránulos de los leucocitos PMNs.

Existe una liberación no específica de LDH (lactato deshidrogenasa) durante la fagocitosis de partículas inertes probablemente debido a una eritrofagocitosis.

La degranulación también puede ocurrir por exocitosis y sugerimos el siguiente

te mecanismo:

- 1) Regurgitación durante la alimentación o la pérdida de enzimas de los fagosomas inmóviles conectados a la membrana celular. (10)
- 2) Endocitosis inversa (opuesta o contraria) o también llamada fagocitosis frustada, debido a la fusión de lisosomas a las membranas celulares, (9,18,21) particularmente dentro de respuesta para complejos inmunes. (10,13)

La lisis celular causando liberación de enzimas, ha sido observada para monocitos (7), pero no para leucocitos PMN (o PMG). (25)

El material granular de los lisosomas puede ser transportado de una parte distante de la célula hacia los fagosomas, (aunque no hay evidencia cierta de que así ocurra) (5,20); Con esto sin embargo sugerimos que el sistema microtubular está envuelto dentro del transporte. (11,27) (ver esquema 3.2)

LIBERACION ENZIMATICA DURANTE LA FAGOCITOSIS. (30,31)

Se llevó a cabo un estudio para medir la liberación enzimática que existe en la fagocitosis. La fagocitosis empleada fue sobre las bacterias de *Estafilococo aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) llegándose a los siguientes resultados: la lisozima, la beta-Glucuronidasa y LDH (lactato deshidrogenasa), se encontraban presentes en el medio antes de empezar la fagocitosis, mientras la mieloperoxidasa (MPO) estuvo solamente dentro de las células. Existe liberación ligeramente alta de lisozima y LDH que de MPO y beta-Glucuronidasa dentro de este experimento (con *S. aureus* y *E. coli*) no específica. El contenido enzimático decrece de el fondo de la capa y se incrementa dentro de el fluido sobrenadante y la liberación enzimática por la fagocitosis de partículas de latex de poliestireno no fueron diferentes de estas dentro de los ensayos con *S. aureus* y *E. coli* (usados como controles), existiendo una liberación ligeramente alta de LDH que de otras enzimas durante la fagocitosis bacteriana.. Sin tomar en cuenta el tipo de fagocitosis, existe una correlación significativa entre las enzimas LDH citoplasmática y MPO ($r=0.85$, $p < 0.001$), beta-Glucuronidasa ($r=0.40$, $p < 0.05$) y lisozima ($r=0.67$,

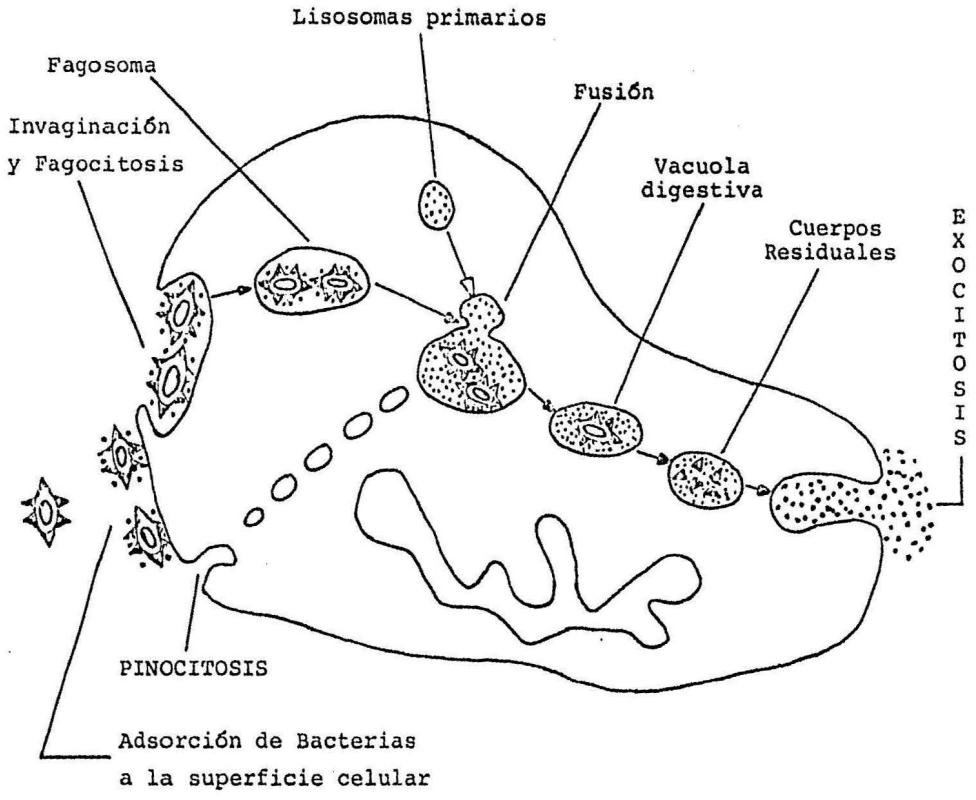
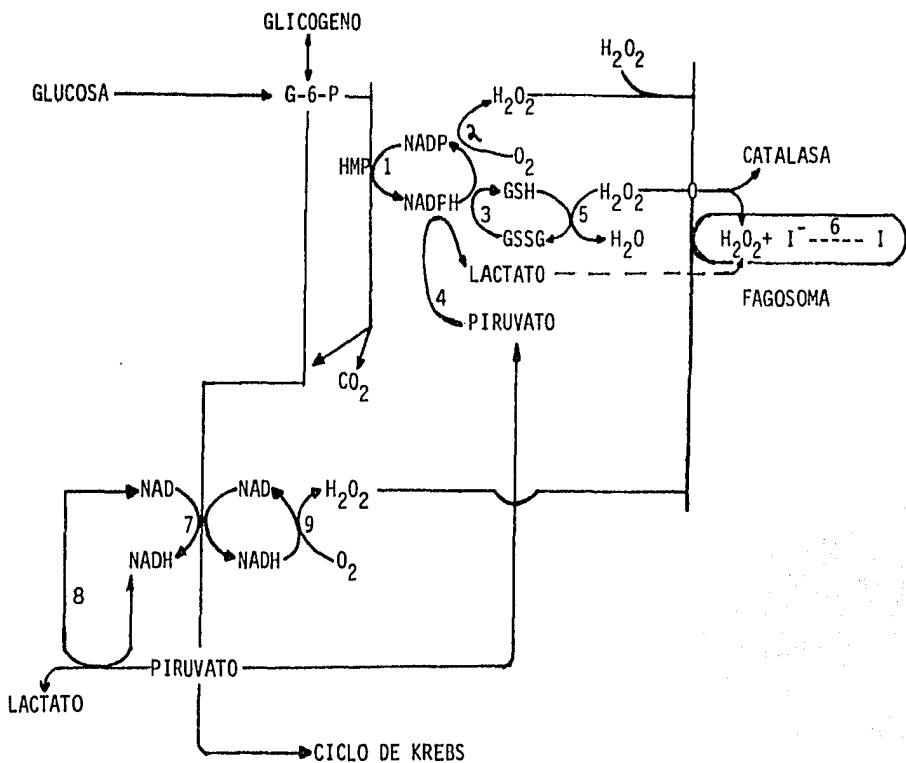


DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA ENDOCITOSIS MOSTRANDO LA FAGOCITOSIS Y LA PINOCITOSIS DE BACTERIAS



METABOLISMO LEUCOCITARIO

- 1.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa
- 2.- NADPH oxidasa; 3.- Glutati3n reductasa; 4.- NADPH-enlazado a deshidrogenasa l3ctica; 5.- Glutati3n peroxidasa; 6.- Mieloperoxidasa (MPO);
- 7.- Fosfogliceraldehido deshidrogenasa; 8.- NADH-enlazado a deshidrogenasa l3ctica; 9.- NADH oxidasa.

DIAGRAMA 3.2

p 0.001) (N=25). (60)

Se observó la fusión lisosoma-lisosoma, fusión lisosoma-fagosoma y el material granular dentro de los fagosoma. Existe además la fusión lisosoma-lisosoma-fagosoma, que es un importante mecanismo para el transporte de enzimas durante la degranulación de el lisosoma para el fagosoma; Existe marcada desintegración de citoplasma sugiriendo autodigestión enzimática y a uno u otra liberación de enzimas directamente de lisosomas o debido a una dispersión de fagosomas; Evidencia de pérdida parcial de membranas fagosomales, vacuolización de lisosomas y posible material granular dentro de el citoplasma sosteniendo esto, existe entonces una dispersión enzimática dentro de el citoplasma, encontrándose una pequeña discrepancia entre la liberación enzimática y la frecuencia de lisis celular, aún cuando las células destruidas completamente pueden no haber sido observadas. (30,32,41)

Se demostró la liberación de fagosomas intactos de células lisadas, sin embargo no había acumulación de enzimas del acúmulo sobrenadante. La igual o mayor liberación de enzimas citoplasmáticas o lisosomales durante la fagocitosis bacteriana es debida a lisis celular como punto inicial del mecanismo de la liberación enzimática.

Después de la fagocitosis bacteriana, las células degranuladas mantenían su integridad, mientras enzimas ricas, se perdían, las cuales in vivo pueden ser removidas de la circulación por células reticuloendoteliales. (60)

3.3.MECANISMOS BACTERICIDAS

Después de que se ha vertido el contenido granular al interior de la célula, inmediatamente se activan los mecanismos bactericidas, los cuales en la siguiente tabla se muestran.

MECANISMOS BACTERICIDAS DE LOS NEUTROFILOS PMN. (34,35)

I.- Dependientes de OXIGENO

A.- Mediados por Mieloperoxidasa (MPO)

- a) Mieloperoxidasa
- b) Peróxido de Hidrógeno
- c) pH ácido
- d) Cofactor Oxidable (generalmente haluros)

B.- Independientes de Mieloperoxidasa (MPO)

- a) Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)
- b) Anión Superóxido (O_2^-)
- c) Oxígeno singlet (singulete) (1O_2)
- d) Radicales Hidroxilo (OH^*)

II.- Independientes de OXIGENO

- A.- Proteínas catiónicas
- B.- Lactoferrina
- C.- Lisozima
- D.- pH ácido
- E.- Histonas Nucleares
- F.- Elastasa

Los factores microbicidas de los neutrófilos podemos representarlos de la siguiente manera:

- a.- El pH ácido de las vacuolas fagocíticas es bactericida.
- b.- La degranulación permite la llegada de agentes microbicidas.
- c.- La lisozima ataca al mucopéptido de la pared de células bacterianas.
- d.- Complemento hemolítico.
- e.- Acido ascórbico y peróxido de hidrógeno.
- f.- Lactoferrina que inhibe el crecimiento de microorganismos.
- g.- Enzimas hidrolíticas.
- h.- Sistema peróxido-mieloperoxidasa-haluro, aunque también se ha observado la importancia que tienen los nucleótidos principalmente el ATP (adenosín tri fosfato) como fuente de energía y como posible cofactor en reacciones de poli merización. (34)

La energía del metabolismo es indudablemente importante en el englobamiento ya que los leucocitos humanos aumentan su grado de consumo de glucosa (o en ausencia de esta de glucogenolisis) y producción de lactato durante la inges tión de partículas sugiriendo esto un aumento en el grado glucolítico llevado

a cabo por el trabajo de englobamiento. (65)

SISTEMAS MEDIADOS POR MPO (mieloperoxidasa). (1,15,17,35,61)

a.- MIELOPEROXIDASA (MPO).

Se encuentra en los gránulos primarios (azurófilos), es una enzima con un grupo hemo que cataliza la acción de un número de sustancias por peróxido. Se encuentra en vacuolas lisosomales, de los leucocitos PMNs y en combinación con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un haluro (I^- , Cl^- , Br^- , F^-), forman un sistema antimicrobiano potente, aún en un medio libre de células.

b.- PEROXIDO DE HIDROGENO (H_2O_2).

Sabemos que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en este sistema proviene de el metabolismo en el neutrófilo. El H_2O_2 es una de las más importantes sustancias bactericidas, su síntesis en LPMNs, monocitos, y algunos macrófagos no se inhiben con el cianuro, lo que nos indica que hay una oxidasa involucrada, la cuál actúa oxidando nucleótidos pirimídicos reducidos, los neutrófilos que no poseen glucosa-6-fosfato (G-6-P) están incapacitados para formar el peróxido. La formación del peróxido es la siguiente: Reducción del O_2 hasta anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), este anión es reducido por la enzima hasta H_2O_2 . La producción del peróxido se inicia casi inmediatamente después del reconocimiento de la partícula; La formación del peróxido llega a la peroxidación de la membrana del fagosoma, y además este compuesto es de fácil difusión a través de las membranas lipídicas. Para evitar daño celular los neutrófilos y macrófagos poseen dos sistemas de detoxificación del peróxido, la catalasa y las reacciones enzimáticas, involucrando glutatión reducido.

Con deficiente producción de H_2O_2 (enfermedad granulomatosa crónica), ciertos microorganismos proporcionan el H_2O_2 , el cual regula su destrucción, entre estos tenemos a los neumococos y estreptococos.

Las oxidaciones terminales de microorganismos clasificados como lactobacilos son catalizadas por flavoproteínas las cuales reducen el oxígeno a H_2O_2 porque carecen de catalasas, y el H_2O_2 acumulado puede ser utilizado en el sistema

de la mieloperoxidasa (MPO).

Esto explica por que los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica no muestran particular predisposición a infecciones estreptocócicas. (69)

El oxígeno es reducido para superóxido (O_2^-) por una oxidasa, se piensa que este NADH regenerado a partir de NADPH por una transhidrogenasa o por otro mecanismo es el donador de hidrógeno, por esta oxidasa u otros favorables reductores de oxígeno por NADPH. El NADPH es regenerado a partir de NADP por la vía hexosa. El superóxido es después reducido a H_2O_2 el cual reacciona con el superóxido para formar radicales oxidrilos (OH^{\cdot}) o genera aldehídos bactericidas por oxidación bacteriana, constituidos en presencia de iones haluro y mieloperoxidasa (MPO) liberado por el fagosoma por degranulación. Los radicales hidroxilo sobresaturan de peróxido los ácidos grasos de la membrana fagosomal y ayudan al potencial de los aldehídos bactericidas.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) saliendo del fagosoma es destruido por catalasas o reducido a glutatión (GSH) sobre citosol. El glutatión reducido es regenerado por reacciones acopladas, esto estimula el flujo de G-6-P en la vía de las hexosas. (ver diagramas 3.3.1 y 3.3.2) (1,6,15,17,19,30,34,35,40,41, 45,67)

c.- pH ACIDO

El sistema mediador de mieloperoxidasa (MPO) tiene un pH ácido óptimo de 4.5 a 5.0 y el pH en la vacuola fagocítica es también ácido.(59) Todas las siguientes reacciones se efectúan a un pH ácido, reacción del H_2O_2 con el hierro de los grupos prostéticos del hemo de la MPO para producir un complejo enzima-sustrato con capacidad oxidativa.

Cuando interactúa el haluro I^- , la acción microbicida se lleva a cabo a través de la iodación directa de proteínas microbianas, oxidación de grupos sulfhidrilo, de enzimas o peroxidación de lípidos.

En el caso del cloruro (Cl^-), la oxidación por el complejo MPO- H_2O_2 produce un intermediario OCl^- o Cl_2 . A pH ácido actúa en forma semejante al ácido hi

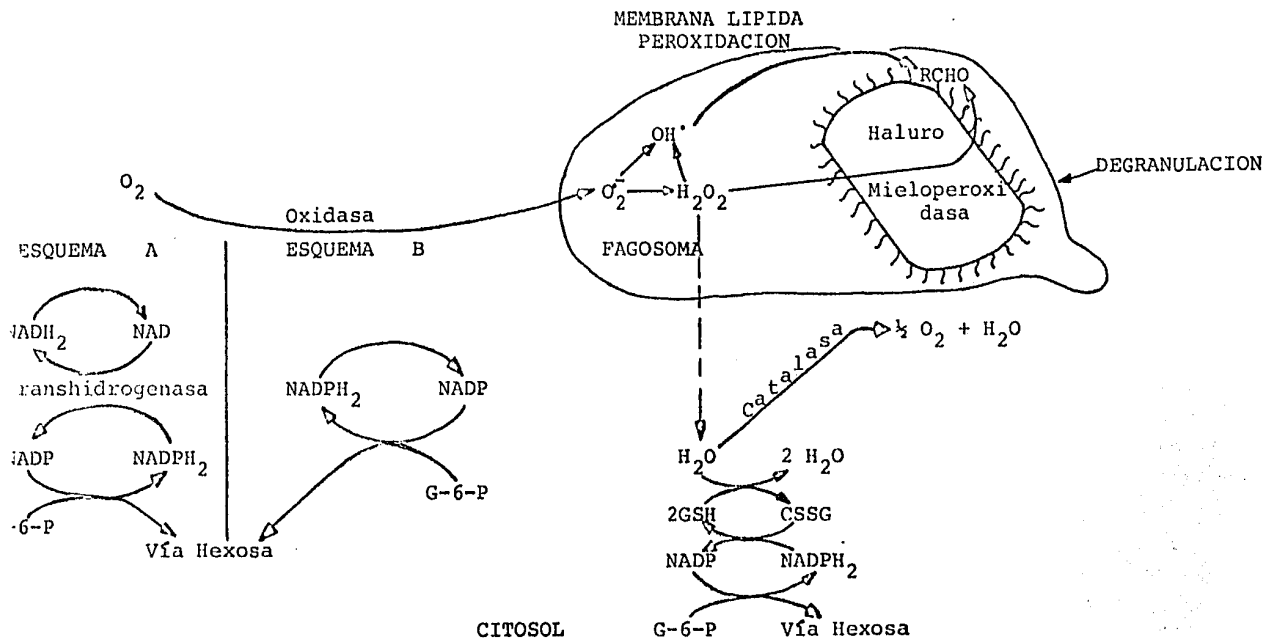
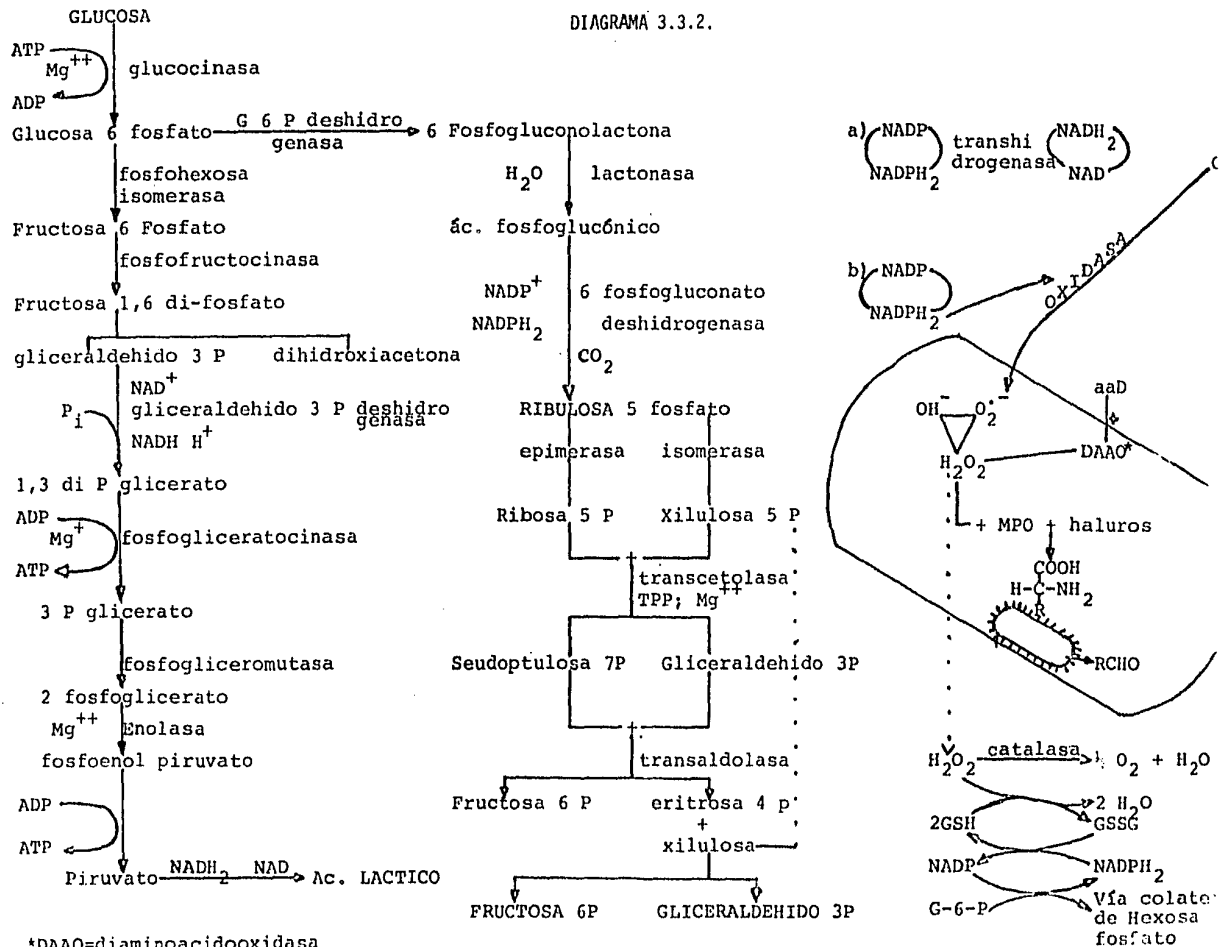


DIAGRAMA 3.1.1.

ESQUEMA QUE MUESTRA LAS DIFERENTES VIAS UTILIZADAS (HEXOSAS) EN LA PRODUCCION DE LOS MECANISMOS BACTERICIDAS.

METABOLISMO DE UN LEUCOCITO POLIMORFONUCLEAR

DIAGRAMA 3.3.2.



*DAAO=diaminoacidooxidasa

pocloroso que es formado en forma subsecuentemente y constituye un germicida efectivo. (15,16,21,23,34,45,49,69)

d.- COFACTOR OXIDABLE (generalmente haluros)

Estos pueden ser flúor, cloro, bromo o iodo, y podemos encontrar al ión cloro en los neutrófilos a un nivel considerablemente superior al requerido para la participación en la destrucción mediada por MPO (mieloperoxidasa). El ión cloro puede entrar en la vacuola fagocítica junto con la partícula fagocitada o puede ser transferido por medio de la membrana del fagolisosoma. La concentración in vivo del ión cloro es mejor y el más fuerte haluro oxidable a partir del correspondiente ácido hipocloroso libre y modelo del sistema H_2O_2 -MPO- Cl^- . (15,16,17)

Existe un número de mecanismos por medio de los cuales el cloruro (Cl^-) activándose daña a los microorganismos y son:

- a.- Oxidación de grupos sulfhidrílos,
- b.- Oxidación del haluro I^- a iodo,
- c.- Producción de oxígeno
- d.- Formación de cloramina

La concentración del ión iodo en el suero es de 100 mcg./dl, las hormonas tetrayodotiroxina (T_4) y la triyodotironina (T_3), pueden reemplazarlo como cofactor en el sistema mediador de la MPO, las hormonas tiroideas se unen a los leucocitos intactos por medio de sitios sobre las membranas plasmáticas, la T_3 y T_4 son degradadas liberando yodo como ión inorgánico. (35,45,67,69)

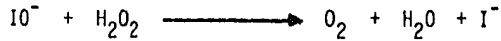
Las siguientes son reacciones en las cuales se encuentra el yodo o yoduro relacionado en su actividad catalítica dependiente de yoduro con varias funciones peroxidativas de enzimas como son:

- 1.- La peroxidasa tiroidea y lactoperoxidasa exhiben marcada actividad catalítica en presencia del yoduro.
- 2.- El pseudohalógeno, tiocianato (SCN^-), no puede reemplazar al I^- como promotor de la actividad catalítica, aún cuando el SCN^- es rápidamente oxidado

do por el H_2O_2 + peroxidasa tiroidea o lactoperoxidasa.

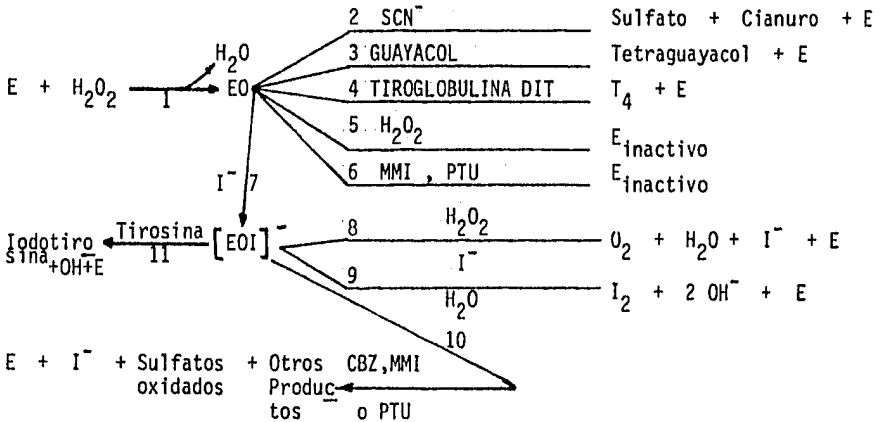
3.- Se encuentra que a concentraciones altas de I^- se inhibe la actividad catalítica de la peroxidasa tiroidea y lactoperoxidasa.

Existe un especial interés en las condiciones con la siguiente reacción reportada por Liebhasfsky (42) :



Esta reacción proporciona una base química para la evolución del O_2 , que es el elemento esencial de la actividad catalítica.

En el siguiente esquema se procura explicar la actividad catalítica dependiente de ioduro de la peroxidasa tiroidea y lactoperoxidasa y la relación de estas reacciones con las varias funciones peroxidativas de estas enzimas. (41,42, 45)



a) La reacción #1 muestra la formación del compuesto I representado en el esquema como (EO). La exacta naturaleza del compuesto I de enzimas peroxidadas, no ha sido elucidado totalmente. Dolphin (*1) tiene evidencias de que el compuesto I es mejor presentado o representado como una especie Fe(IV)-porfirin II-radical catiónico. Hager y col. (*2) han aceptado esta formulación y además reportan que este compuesto I de cloroperoxidasa contiene solamente un átomo

de oxígeno singlete (singlet) derivado de un substrato peróxido. Morrison y Schonbaum (*3) han usado la representación EO para diferenciar al compuesto 1 de otras peroxidasa.

b) Las reacciones 2 y 3 son independientes de I^- y muestra que el EO reacciona directamente con donadores tales como SCN^- y guayacol así catalizando la oxidación de estos compuestos por H_2O_2 .

c) La reacción 4 muestra a este EO pudiendo envolver en catalización la unión de dos moléculas de diiodotirosina (DIT) contenida con la proteína tiroglobulina, para formar la hormona tiroidea, y tiroxina (T_4).

d) Las reacciones 5 y 6 son también independientes de I^- y muestran esto como una forma oxidada de la enzima, pudiendo ser inactivado por 6-propil-2-tiouracil (PTU) y metimazola (MMI) o por H_2O_2 .

e) La reacción 7 muestra la oxidación del I^- por EO para formar un intermediario, el cual se representa como $(EOI)^-$.

f) La reacción 8 es la base para la actividad catalítica dependiente de iodo. Se propone que el compuesto intermediario $(EOI)^-$ puede reaccionar con una segunda molécula de H_2O_2 en una reacción con catalasa, con liberación de O_2 .

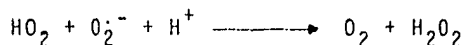
g) Reacciones 9, 10 y 11 representan bien la acción peroxidativa descrita de peroxidasa tiroidea y lactoperoxidasa.

El ioduro sirve como mecanismo de transporte en la actividad de la peroxidasa tiroidea y lactoperoxidasa, pero es necesario el ATP producido en la fosforilación oxidativa para que esto ocurra. (40, 42)

SISTEMAS INDEPENDIENTES DE MIELOPEROXIDASA (MPO)

1.- PEROXIDO DE HIDROGENO (H_2O_2)

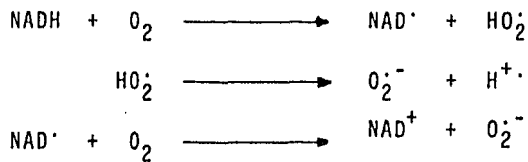
El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tiene una actividad antimicrobiana directa, algunos microorganismos son más susceptibles a H_2O_2 que otros, dependiendo de su capacidad de producir catalasa o peroxidasa. Se forma el peróxido de hidrógeno a partir de una reacción de dismutación como sigue:



2.- ANION SUPEROXIDO ($O_2^{\cdot-}$)

Es una molécula intermediaria altamente reactiva tiene efecto directo sobre los microorganismos, sin embargo existen algunos microorganismos que tienen superóxido dismutasa y resisten la acción de este radical en la vacuola fagocítica. El anión superóxido puede actuar como reductor o un oxidante; Cuando actúa como reductor, como por ejemplo en la reducción del ferrocitocromo C o -nitroazul tetrazolium (NBT), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pierde un electrón y se convierte hasta oxígeno, y cuando actúa como un oxidante, como por ejemplo en la oxidación de epinefrina, el $O_2^{\cdot-}$ gana un electrón y se convierte en H_2O_2 . Este anión predomina a un pH alcalino, y la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ es catalizado por superóxido dismutasa, particularmente a un pH neutro o alcalino, donde la dismutación espontánea es relativamente baja.

La formación de este anión superóxido es como sigue: (23,34,35)



3.- OXIGENO SINGULETE (SINGLET) (1O_2)

Los electrones generalmente vienen en pares estabilizados por los spines en dirección opuesta. El oxígeno moléculas es una extraordinaria molécula dentro de su estado basal, dos de los electrones de valencia son desapareados y tienen spines en la misma dirección, esto es así dentro del estado triple ($1\bar{0} - \bar{0}.1$).

El oxígeno moléculas singulete (singlet) es formado cuando ocurre un cambio dentro de la absorción de energía, de uno de estos electrones para un orbital de mayor energía con una inversión de spin, este estado electrónicamente excitado emite luz (quimioluminiscencia), cuando este regresa al nivel del estado triple. Existen dos formas de oxígeno molecular singulete(singlet) (1O_2) son el oxígeno singulete(singlet) delta ($\Delta ^1O_2$) dentro del cual nuevamente los electrones apareados ocupan el mismo orbital, donde ($\bar{0} - \bar{0}\uparrow\uparrow$), y el oxígeno singulete(singlet) sigma ($\Sigma ^1O_2$)

dentro del cual los electrones de spin opuesto, ocupan diferentes orbitales ($\downarrow\bar{0} - \bar{0}\uparrow$).

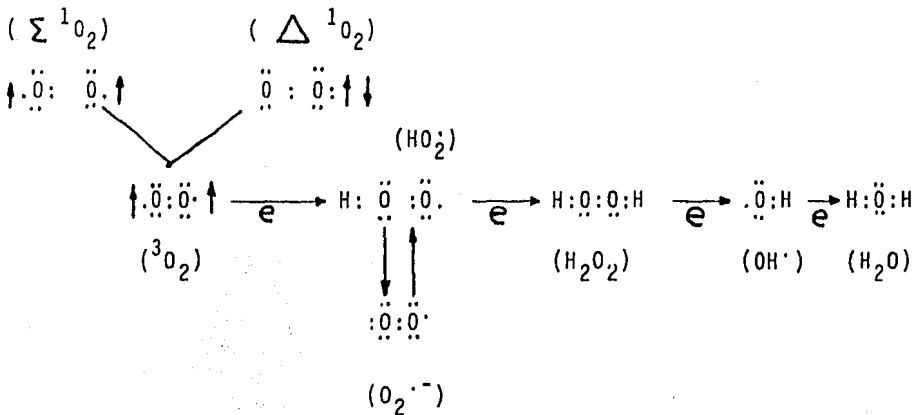
Cuando se incuban los leucocitos intactos con partículas, emiten luz indicando que se forma el oxígeno diatómico en la célula intacta. Esta quimioluminiscencia no se observa en ausencia de gago citosis o cuando se emplean leucocitos de pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica.

Cuando se añade hipoclorito a un exceso de H_2O_2 , el oxígeno es liberado en una cantidad equivalente a la cantidad de hipoclorito añadido.



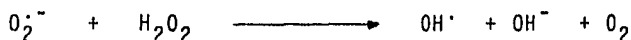
Una debil quimioluminiscencia roja acompañada esta reacción. La quimioluminiscencia resulta de la disminución de energía de grupos carboxilos excitados electrónicamente, generada por el O_2 durante la oxidación de los microorganismos ingeridos, esta oxidación trae como consecuencia la muerte de los microorganismos. La quimioluminiscencia está estrechamente relacionada con la oxidación de la glucosa por la vía colateral de hexosa monofosfato. (33, 34, 35,41,49,61).

A continuación ponemos el esquema de la excitación y reducción -- del oxígeno.



4.- RADICALES HIDROXILO (OH[·])

La reducción adicional de H₂O₂ resulta dentro de la formación de radicales hidroxilo; Estos radicales hidroxilo están formados por la interacción de H₂O₂ y el anión superóxido como lo muestra la reacción siguiente:



La producción de OH[·] por células fagocíticas también ha sido propuesto, basándose en la formación de etileno, el sistema de la Xantina-oxidasa, la que genera entre ambos O₂^{· -} y H₂O₂, forma etileno a partir de metional.

Esta reacción es inhibida por superóxido dismutasa, catalasa y OH[·] emigrante. La formación de OH[·] por célula fagocíticas.

Tampoco la mieloperoxidasa es requerida para una óptima formación de OH[·] formados por los leucocitos PMNs, o que ocurra formación de etileno por el mecanismo dependiente de mieloperoxidasa, lo cual no involucra radicales hidroxilos. (33, 40, 42,49).

SISTEMAS INDEPENDIENTES DE OXIGENO

Los sistemas o mecanismos de actividades microbicidas in dependientes de oxígeno incluyen:

a.- PROTEINAS CATIONICAS

Se encuentran en los gránulos primarios (azurófilos) y dañan la pared de los mucopolisacáridos, actúan a un nivel óptimo de pH alcalino. Los mucopolisacáridos dañan la pared celular, si alguna sustancia (antibióticos) interfieren en el ciclo normal -- del crecimiento, puesto que a diferencia de sus células huéspedes, las bacterias no son isotónicas con los líquidos corporales. Su contenido se encuentra bajo elevada presión osmótica y su viabilidad depende de que la integridad de la malla del mucopeptido de la pared celular, sea mantenida a través del ciclo de crecimiento. Cualquier compuesto que inhiba algún paso de la biosíntesis del -- mucopéptido, hace que la pared de la célula bacteriana en crecimiento se debilite y que la célula experimente lisis.

b.- LACTOFERRINA

Es una proteína unida al hierro la cuál tiene propiedad des microbiostática cuando no está completamente enlazada al fie-

rro Inhibe el crecimiento por enlazamiento del hierro requerido como un nutrimento esencial para los microorganismos. La lactoferrina está presente en los gránulos de los leucocitos PMNs y se libera dentro de la vacuola fagocítica.

c.- LISOZIMA

Ataca a los mucopéptidos de la pared celular de las bacterias. Las bacterias que son intrínsecamente insensibles a la lisozima, empiezan a sensibilizarse a ésta por la presencia de complemento hemolítico o ácido ascórbico y H_2O_2

d.- pH ACIDO

La acidéz (pH 3.5-4.0) puede resultar de la producción de ácido láctico en la glucólisis durante la fagocitosis o refleja la producción de ácido carbónico por la presencia de anhidrasa carbónica. Sin embargo los polisacáridos microbianos tienen un papel importante en el cambio de pH mediante intercambio iónico.

e.- HISTONAS NUCLEARES

Son liberadas en los alrededores de los tejidos muertos y tienen actividad antimicrobiana directa.

f.- ELASTASA

La elastasa de gránulos primarios, ataca a los mucopéptidos de ciertas paredes celulares y son más importantes en la digestión que en la destrucción. (49, 57, 67, 69)

CAPITULO IV

DISCUSION

La función primaria de las células fagocitarias en el organismo consiste en la localización, captación, y eliminación de - sustancias extrañas, partículas, microorganismos, etc.

Requieren varios pasos para cumplir con esta función. En primer lugar, las células deben llegar a donde se encuentra la sustancia extraña (quimiotactismo); a continuación atrapan dicha sustancia (fagocitosos), finalmente, después de una serie de acciones metabólicas, destruyen a la sustancia en cuestión o inhiben la multiplicación del microorganismo (muerte microbiana).

Los leucocitos PMNs, responden a tres estímulos quimiotácticos diferentes, originados por el sistema del complemento, por factores bacterianos y producidos por linfocitos.

La fagocitosis se puede dividir a su vez en dos etapas: Fase de Fijación y fase de ingestión.

En la fase de fijación, se establece un sólido contacto con la partícula, en ocasiones se consigue esta directamente por interacción del fagocito con la partícula, otras veces la fijación requiere la presencia sobre la membrana plasmática del fagocito de dos tipos - de receptores:

- 1) Un receptor para el fragmento fijación del complemento (Fc) de una molécula de inmunoglobulina y
- 2) Un receptor para el complemento C_3b del complemento.

En presencia de ciertas protefnas del suero, como el complemento y determinados anticuerpos (Acs.) (opsoninas), la fijación sobre los receptores de superficie de las bacterias es más fácil y la fagocitosis es más eficiente.

INGESTION

El fagocito forma una invaginación de la membrana plasmática, con lo cual la partícula queda incluida dentro del citoplasma en el interior de una vacuola (fagosoma) cuya pared está -- formada por la membrana invaginada.

Después de la aparición del fagosoma, la porción de membrana que - rodea la partícula va separándose progresivamente de la superficie quedando en el interior de la célula, lo que se llama una vacuola

fagocitaria. Los gránulos de los lisosomas del leucocito se aproxima al fagosoma, uniéndose las membranas que limitan ambos, hasta formarse un fagolisosoma.

Los gránulos se rompen y liberan dentro de la vacuola las enzimas que contienen, éstas enzimas entran en contacto con la partícula ingerida. Este fenómeno llamado degranulación, es el equilibrio vacuolítico morfológico de la transferencia de enzimas del gránulo lisosómico al fagosoma.

Al ocurrir lo anterior aumenta la acidéz intracelular a partir de las substancias liberadas por lo gránulos.

FENOMENOS METABOLICOS

Una vez formada la vacuola fagocítica, se inicia en la célula una serie de reacciones bioquímicas. Los ciclos metabólicos que intervienen de manera primaria corresponden a la vía glucolítica para interrumpir la vía de monofosfato de hexosa. En conjunto, la activación de estas vías recibe el nombre de interrupción respiratoria y comprende.

- 1) Aumento de la glucólisis
- 2) Aumento de la actividad de la interrupción del monofosfato de hexosa (HMP) y
- 3) Incremento del consumo de oxígeno y de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido láctico.

El aumento del ácido láctico explica en parte el descenso del pH dentro del fagosoma. La utilización preferencial de estas vías en ciertas células fagocitarias como los neutrófilos, facilita su función en áreas donde el oxígeno puede ser escaso.

Entre las enzimas que intervienen en el metabolismo de las células fagocitarias destaca la oxidasa de NADPH, esta enzima podría cumplir dos funciones:

- 1) Constituir una fuente de NADP, que puede ser el factor limitante en la regulación de la actividad de la interrupción del monofosfato de hexosa (HMP).
- 2) Intervenir en la producción de peróxido (H_2O_2), componente esencial de las reacciones microbicidas.

Además el NADP interviene en otras funciones metabólicas como la producción de glutatión, el metabolismo del RNA y de los lípidos y la formación de membranas, fenómenos esenciales para las funciones de la célula fagocitaria.

Simultáneamente con la interrupción respiratoria, aumenta la producción de H_2O_2 o de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Este anión sufre una dismutación en presencia de una enzima llamada dismutasa de superóxido, en consecuencia se produce más H_2O_2 . La producción de H_2O_2 es más notoria en los neutrófilos, que en los macrófagos tisulares o alveolares. Se encontraron defectos en la producción de H_2O_2 , acompañados de imposibilidad de iniciar la interrupción respiratoria, en los leucocitos de niños que sufrían diversos trastornos funcionales de los neutrófilos por ejemplo - enfermedad granulomatosa crónica.

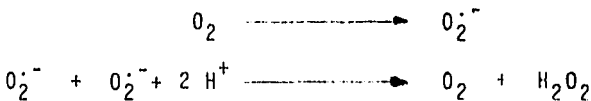
Existen mecanismos microbianos que dependen del oxígeno y otros - que no dependen del mismo.

El primer sistema formado por H_2O_2 -haluro-mieloperoxidasa ejerce una actividad microbicida muy potente, y contribuye a la acción - microbicida total de las células fagocitarias, fundamentalmente los neutrófilos. El mecanismo de acción para el complejo MPO-haluro- H_2O_2 , incluye la formación de aldehídos y de hipoclorito, con la halogenación de proteínas bacterianas, el resultado global sería la muerte del microorganismo.

Existen mecanismos distintos del sistema MPO-haluro- H_2O_2 , estos - sistemas, actúan por ejemplo en el caso de concentraciones bajas de H_2O_2 , en esos casos la mieloperoxidasa (MPO) es substituida -- por una catalasa.

Entre los sistemas que no dependen de la MPO, se encuentra el propio H_2O_2 que posee actividad antimicrobiana; el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que se produce durante la fagocitosis, debido a la reducción univalente del oxígeno molecular; es un radical sumamente tóxico, muy importante en cuanto a actividad bactericida.

La dismutación ulterior del $O_2^{\cdot-}$ por intervención de la dismutasa de superóxido (DSO) tiene como resultado la formación de H_2O_2 , - como se muestra en la reacción.



El radical superóxido, además de su propia actividad bactericida

puede producir por dismutación H_2O_2 microbicida. Esto nos indica que el O_2^- actúa como un cuerpo intermedio en la producción de H_2O_2 , contribuyendo indirectamente al funcionamiento del sistema dependiente de la MPO.

El oxígeno de singlete (singlet) (1O_2), es un oxígeno molecular - en estado de excitación electrónica que emite luz (quimioluminiscencia) cuando vuelve al estado basal de tripleto (O_2).

El origen de este oxígeno de singlete (1O_2) puede ser una reacción dependiente de la MPO en la cual se forma hipoclorito. Este oxígeno de singlete podría reaccionar también con algunos grupos químicos no saturados; por ejemplo los grupos etileno, formando dioxetanos a nivel de dobles enlaces inestables, y este fenómeno podría resultar tóxico para los microorganismos.



con lo cuál intervendría en la muerte bacteriana debido a sistemas dependientes de MPO.

El fagosoma contiene también lactoferrina, proteínas fijadoras de hierro que inhibe el desarrollo de los microorganismos.

El agente microbicida más potente en los granulocitos (neutrófilos) es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), puesto que en sí ataca bacterias hongos y virus. Actividad que aumenta considerablemente cuando se encuentra presente MPO, así como iones yoduro y cloruro.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Podemos concluir que algunos de los sistemas antimicrobianos independientes de mieloperoxidasa (MPO) de los leucocitos polimorfonucleares (LPMNs) neutrófilos (pH ácido, lisozima, lactoferrina y proteínas catiónicas), son efectivas bajo condiciones anaeróbicas. Otras sin embargo requieren oxígeno.

Las conclusiones evidentes para la presencia de oxígeno dependiente pero mieloperoxidasa (MPO) independiente en los sistemas antimicrobianos dentro de los leucocitos polimorfonucleares (LPMNs) neutrófilos que describen en los siguientes puntos:

- 1.- Leucocitos deficientes en el metabolismo oxidativo (enfermedad granulomatosa crónica) tienen un gran defecto microbicida.
- 2.- En contraste, en la enfermedad granulomatosa crónica se induce la fagocitosis incrementando el consumo de oxígeno, como en la oxidación de glucosa C-1, producción de O_2^- y generación de H_2O_2 ; estos no son abatidos aún con deficientes de MPO que de células normales.
- 3.- Los productos de reducción o oxidación de oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$ y 1O_2) tienen actividad antimicrobiana dentro de la ausencia de la mieloperoxidasa (MPO).
- 4.- La actividad antimicrobicida se puede inhibir por catalasa, pero no por superóxido dismutasa, implicando la formación de H_2O_2 como agente tóxico.
- 5.- De los sistemas antimicrobianos dependientes de oxígeno, aparece el sistema MPO-haluro- H_2O_2 , para predominar durante el período temprano post-fagocítico.
- 6.- Dentro de la ausencia de la mieloperoxidasa (MPO) y posiblemente también en su presencia, los productos de la reducción del oxígeno, se acumula para destruir al organismo ingerido, en combinación con los sistemas antimicrobianos independientes de oxígeno.
- 7.- La toxicidad de ambos sistemas (sistema MPO y sistema MPO- independiente, oxígeno-dependiente) pueden ser mediados en parte por la formación de oxígeno singlet (singlete).

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

- 1.- Aviran Irit, Elizabeth R; Simon and Babier Bernard M.
Reversible plackeade of the respiratory burst in human neutrophils by a cleavable cross-linking agent. *The Journal of Biological Chemistry* 259 (1): 306-311. 1984.
- 2.- Baener, R. L. Molecular basis for functional disorders of phagocytes. *J. Pediatr.* 84(3) :317. 1974.
- 3.- Barret, S. G. Use of Baker's years to detect complement receptor Blood 52: 569. 1978.
- 4.- Beckerel, M. and Stossel, T.P. Chemotaxis.
Fed. Proc. 39 (12): 2949. 1980.
- 5.- Bhagavan, N. V. Bioquímica.
L ed; Interamericana, México. 1978.
- 6.- Borregars Neil and Tauber Alfred I. Subcellular localization - of the human neutrophil NADPH oxidase. *The journal of Biological Chemistry.* 259 (1): 47-52. 1984
- 7.- Burdon, K.L. y Wlliams, R.P. Microbiologfa.
La ed. Publicaciones Culturales S. A. México, 1976.
- 8.- Candy, D.C.A., Larcher, V.F., Tripp, J.H., Harries, J.T., Harvey B.A.M. and Soothill, J. F. Yeast opsonitation in children with chronic diarrhoeal states. *Arch. Dis. Child.* 55: 189. 1980.
- 9.- Chandra, R. K. and Newbern, P.M. Nutrition, Immunity and Infection. 2nd. Ed. Plenum Press. New York. 1979.
- 10.- Colten, H. R. Biosynthesis of C₅ and C₆.
Adv. Immunol. 92. 1976.
- 11.- Craddock, P.R. Hammerschmidt, D., White, J.G., Dalmaso, A.P. and Jacob, H.S. Complement (C_{5a})-induce granulocyte aggregation in vitro *J. Clin. Invest.* 60: 260. 1977.
- 12.- Dallaverde, E., Fan, P.T., Chang, Y.H. Mechanism of action of - colchicine 5. Heutrophil adherence and phagocytosis in patients with acute gout treated with cochicine. *J. Pharm Exp. Therap-*, 223 (1): 197-202-. 1982.

- 13.- Dallegri, F., Patrone, F. Holm, G., Garnstan, G. Saccetti, C.
Neutrophil mediated antibody dependent cellular cyto toxicity
against erythrocytes mechanisms of target cell destruccion. -
Clin. Exp. Immunol. 52 (3): 613-619. 1983.
- 14.- Davis, B. D., Dulbecco, R. Eisen, H.N. Ginsberg, H.S., and Wood
W.B. Micorbiology. 2nd. Ed. Harper & Row, Pub. U.S.A. 1973.
- 15.- De Chatalet, L. R. Oxidative bactericidal mechanisms of poly-
morphonuclear leukocytes. J. Med. 18: 846. 1975.
- 16.- Elsbach, P. On the Interaction between phagocytes and microor_
nisms. N. Engl. J. Med. 18: 846. 1973.
- 17.- Estensen Richard D. An Approach to microbial virulence through
examination of neutrophil function.
- 18.- Evans, D.I., Holzel, A. and Macfarlane, H. Yeast opsonization -
defect and immunoglobulin deficiency in severe infantile derma
titis (Leiner's disease) Arch. Dis. Child. 52: 691. 1977.
- 19.- Ferguson, M.M., Alexander, W. D., Comwell, J.M.C. Peroxidase ac
tivity in relation to iodide, 17-B-oestradiol and thioureylene
drug uptake in human polymorphoneutrophils. Biochem. Pharm. 33
(5): 757-762. 1984.
- 20.- Forman, M.L. and Sthiehm, E.R. Impaired opsonic activity buy -
normal phagocytosis in low-birth weight infants. N. Engl. J. Med.
23: 926. 1969.
- 21.- Fudenberg, H.H., Stites, D.P. Caldwell, J.L. and Wells, J.V.
Basic & Clinical Immunology, 2nd. Lange Medical Pub. U.S.A. --
1978.
- 22.- Goldblum, S.E, Van, Epps, D.E. and Reed, W. Serum inhibitor of -
C₅ fragment mediated polymorphonuclear leukocyte chemostaxis
associated with chronic hemodialysis. J. Clin. Invest. 64: 255
1979.
- 23.- Goldstein, I.N. Complement and immunoglobulins stimulate super-
oxide production by human leukocytes independently og phagocy-
tosis. J. Clin. Invest. 56: 1155. 1975.
- 24.- Goldstein, I.N. Endogenous regulation og complemnt (C₅)-derived
chemotactic activity: fine tuning of inflammation. J. Lab Clin
Med. 93 (1): 13 1979.

- 25.- Grant.A.J., Settle Linda, Whornton, E. R, and Dupree,E. Complement-Mediated release of histamine from human basophils,J.Immunol. 117(2):450, 1976.
- 26.- Guyton,A.C. Tratado de Fisiología Médica. 4a.Ed. Interamericana México. 1975.
- 27.- Ham,A.W. Tratado de Histología. 7a.Ed. Interamericana.México. - 1975.
- 28.- Hayward, A.R. Deficiencia Inmunitaria. 1a. Ed. El Manual Moderno, México. 1978.
- 29.- Hof.D.G., Repina, J.E. Giebink,G.S. Production of opsonins that facilitate phagocytosis of Streptococcus pneumoniae by human alveolar macrophages or neutrophils after vaccination with pneumococcal poly saccharide. Am. Rev. Respir. Dis. 124 (2): 193. 1981.
- 30.- Holubarsch,C., Galle, J., Haferkarp,O. The mechanism of lysosomal enzyme release from neutrophilic granulocytes. Virchows Arch B cell Pathol. Ind. mol Patol. 30(1): 63. 1979,
- 31.- Johansen K. Staerh, Berger,E.M., and Repine,J.E. Effect of Temperature on polymorphonuclear leukocyte function, Acta Path, Microbiol. Immunol. Scans. Sección C. 91: 355-359. 1983.
- 32.- Johnston,R.B., Klempere,M.R., Alper,C.A. and Rosen,F.S. The enhancement of bacterial phagocytosis by serum J. Exp. Med. 129. - 1275. 1969.
- 33.- Kaplan,C.J. The molecular basis of immune cell function. 1a. Ed. Elsevier-North-Holland Biomedical Press. 1979.
- 34.- Klebanoff,S.J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Seminar. Hemat. 12(2):117. 1975.
- 35.- Klebanoff,S.J. Mechanisms of microbial virulence
- 36.- Landen B. and Manfred,D.P. Identity of C_3 and C_5 receptors on lymphoid cells. J. Immunol 122(3); 1015. 1979.
- 37.- Leeson C. Roland. Leeson Thomas S. Histología. 3a. Ed. Editorial Interamericana, México. 1981.
- 38.- Lehrer,R.L. and Cline,M.J. Interaction of Candida albicans -- with human leukocytes and serum. J. Bacteriol. 98 (3):996. 1969.

- 39.- Mc Cracken,G.H. and Eichenwald,A.F. Leukocyte function and the development of opsoninic and complement activity in the neonate. *Am. J. Dis. Child.* 121: 120. 1971.
- 40.- Magnusson Ronald P., Taurog Alvin, and Dorris Martha L. Mechanism of Iodide-dependent catalytic activity of thyroid peroxidase and lactoperoxidase. *The Journal of Biol. Chem* 259(1): 197-205. 1984.
- 41.- Öberg, G. Linsmark,G., Moberg,L. and Venge,P. The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy. *British Journal of Haematology.* 55: 701. 1983.
- 42.- Ochs Duane L., and Reed Peter W. Ca^{2+} -stimulated, Mg^{2+} -dependent ATPase activity in neutrophil plasma membrane vesicles. *The J. of Biological Chem.* 259(1): 102. 1984.
- 43.- Papadimitriou,J,M. Robertson,T.A., walters,N.I An analysis of the phagocytic potential of multinucleate foreign body giant cells. *Am. Jour, of Pathol.* 78(2); 75. 1978.
- 44.- Porter,R.R. and Reid,K.B.M. The biochemistry of complement. *Nature.* 275:699. 1978.
- 45.- Rajkovic,I.A. and Williams Roger. Enhancement of neutrophil response by SH-containing compounds; Modulation of superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochem. Pharmacol.* 33(8);1249 1984.
- 46.- Rapaport,T.S. *Introducción a la Hematología*, 1a. Ed. Salvat Editores, México. 1977.
- 47.- Rosenfeld,S.I., Baum,J., Steigibigel,R.T. and Leddy,J.P. Hereditary Deficiency of the fifth complement in man. II Biological properties of C_5 -deficient human serum, *J. Clin. Invest.* 57: 1635. 1976.
- 48.- Rosenfeld,S.I. and Karnovsky,M.L. Hereditary C_5 deficiency in man: genetic linkage studies. *J. Immunol* 119:(2):604. 1977.
- 49.- Sbarra, A. J. and Karnovsky,M.L. The biochemical basis of the phagocytosis I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem* 237(6): 1355. 1984.

- 50.- Short Communications. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 33(8): 1367. 1984.
- 51.- Snyderman, R., Phillips, J.K. and Mergenhagen, S. E. Biological activity of complement in vivo. Role of C₅ in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates. *J. - Exp. Med.* 134: 1131. 1971.
- 52.- Steerman, R.L., Snyderman, R. Leikin, S.L. and Colten, H.R. Intrinsic defect of the polymorphonuclear leukocytes resulting in impaired chemotaxis and phagocytosis. *Clin. Exp. Immunol.* 9: 939. 1971.
- 53.- Stossel, T.P. Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood.* 42(1): 121. 1979.
- 54.- Stossel T.P. Quantitative studies of phagocytosis. Synthetic - effects of cations and heat-labile opsonins. *J. Cell Biol.* 58: 346. 1973.
- 55.- Stossel, T.P. Phagocytosis (first, second and third of three - parts). *Med. Prog.* 290 (13, 14, 15,): 717-774-779-831. 1974.
- 56.- Stossel, T.P. Phagocytosis: recognition and ingestion, *Seminars Hematol* 12 (1): 83. 1975.
- 57.- Stossel, T.P. Biology of the polymorphonuclear leukocytes. A - review. New York, Raven Press. 1977.
- 58.- Stossel T.P. Field, R.J. Gitlin, J.D., Alper, C.A. and Rosen, F.S. The opsonic fragment of the third component of human complement (C₃) *J. Exp. Med.* 141: 1329. 1975.
- 59.- Suskind, R. M. Malnutrition and the immune response. 1a. Ed. - Raven Press. New York. 1977.
- 60.- Talstad, I., Dalen, H.M. and Lehman, V. Degranulation and enzyme release during phagocytosis of inert particles and of bacteria by polymorphonuclear neutrophil granulocytes. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section C.* 91: 403-411. 1983
- 61.- Test Samuel T, and Weiss Stephen J. Quantitative and temporal characterization of the extracellular H₂O₂ pool generated by - human neutrophils. *The J. of Biol. Chem.* 259(1): 399-405. 1984.

- 62.- Till, G. and Ward, P.A. Two distinct chemotactic factor inactivator in human serum. *J. Immunol.* 114(2):843. 1975.
- 63.- Todd-Sanford. *Diagnostico Clínico por el laboratorio*. 5a. Ed. Salvat Editores. España. 1976.
- 64.- Eard, P.E. and Newman, L.J. a neutrophil chemotactic factor from C_5 . *J. Immunol.* 102(1):93, 1979.
- 65.- Weir, D.M. *Handbook of cellular Immunology*, Blackwell Scientific Publications., U.S.A, 1979.
- 66.- Weston, W.L. Disorders of phagocytic function. *Arch. Derm.* 112: 1589. 1979.
- 67.- William J. Williams, Ernest Beutler, Allan J. Erslev. *Hematology*. 2nd. Ed. Mc Graw-Hill, Inc. 1977.
- 68.- Winkelstein, J.A. Opsonins: their fuction, identity and clinical significance. *Med. Prog.* 82(5):747, 1979.
- 69.- Wintrobe Maxwell M., Lee G. Richard, Boggs Done R. *Clinical -- Hematology Seventh Edition*. Ed. Lea & Fabiger Philadelphia. - 1974.
- 70.- Robins L. Stanley, Marcia Angel, *Patologfa básica*. 2a. Ed. Ed. Interamericana. 1979.
- *1 .- Dolphin d., Forman A., Borg D.C., Fajer J., and Felton R.H. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci.* , U.S.A. , 68, 614-618 .
- *2 .- Hager L.P., Hollenberg P.F., Rand-Meir T., Chiang R. and Uoubek D., (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 244, 80-93.
Hollenberg P.F. , Rand-Meir T, and Hager L.P. (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 5816-5825.
- *3 .- Morrison M., and Schonbaum G.R. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45,861-888.