



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Patología y Clínica Médicas.

PAPEL DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO
PLASMÁTICO EN LA AGREGACIÓN DE
POLIMORFONUCLEARES. IMPLICACIONES
TERAPEÚTICAS.

Autor: Antonio Romero Tabares

Directores: Miguel Garrido Peralta

Miguel Ángel Muniain Ezcurra

7 de Septiembre de 1977

R. 14 869

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 189 número 21 del libro
correspondiente.

T.D.
R/67



Sevilla, 7 SET. 1987

El jefe del Negociado de Tesis,

Isabel González

D. MIGUEL GARRIDO PERALTA, TITULAR DE LA 1ª CÁTEDRA
DE PATOLOGÍA Y CLÍNICA MÉDICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE
LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA

Que D. Antonio Romero Tabares ha realizado la Tesis
Doctoral sobre "Papel del Sistema del Complemento Plasmático
en la Agregación de Polimorfonucleares. Implicaciones
Terapéuticas" en esta Cátedra, bajo mi dirección y la
codirección del Dr. Muniain Ezcurra, considerándola apta
para su lectura.

Sevilla, a

El Director

Prof. Garrido Peralta

Facultad de Medicina de Sevilla
Hospital Universitario
1ª Cátedra de Patología Médica
Departamento de Medicina Interna
Prof. Miguel Garrido Peralta

El Codirector

Dr. Muniain Ezcurra

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla de

de 19

EL DIRECTOR DE

[Handwritten signature]

PAPEL DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO PLASMÁTICO
EN LA AGREGACIÓN DE POLIMORFONUCLEARES,
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

INTRODUCCIÓN

Aunque originalmente el sistema del Complemento (C) plasmático se concibiera como un conjunto de factores de actividad principalmente lítica sobre bacterias recubiertas previamente por anticuerpos (Ac), actualmente es visto como un complejo con funciones amplias entre las que se encuentran, además de la lisis de bacterias, la opsonización y la modulación de algunos aspectos de las reacciones inflamatorias⁽¹⁾.

La capacidad del C para provocar, directa o indirectamente, cambios en la membrana celular que determinen su ruptura es la base de la implicación del C en la patogenia de varias entidades de origen inmunológico. Las bases biológicas que producen la lisis de la membrana bacteriana son las mismas que determinan la de hematíes y otras células por el suero de animales o humanos inmunizados. De hecho, la lisis de eritrocitos recubiertos de Ac es más fácil que la de las bacterias, por lo que este método es el que ha sido habitualmente utilizado para el estudio clínico del sistema del C.

Los primeros trabajos sobre la forma de actuación del C⁽²⁻⁴⁾ sugerían la idea del C como un factor inespecífico cuya actividad estaba precedida necesariamente por la unión del Ac con el antígeno (Ag) de la superficie celular. Básicamente, este concepto es cierto, pero ha existido un desarrollo del mismo. Si bien el sistema del C puede ser activado por cualquier unión específica Ag-Ac, y no muestra ninguna especificidad antigénica, la desaparición, natural o inducida, de alguna de las proteínas de su sistema conduce a la incapacidad para destruir la membrana.

No es objeto de este trabajo realizar una prolija descripción de los componentes del sistema del C, baste decir que es un complejo compuesto de glicoproteínas y de

TABLA I
COMPONENTES DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO,
PESOS MOLECULARES Y CONCENTRACIÓN SÉRICA

Componente	Número de cadenas	Peso Molecular	Concentración en suero (µg/ml)
<i>Via clásica</i>			
C1q*	18	400 000	200
C1r	2	168 000	100
C1s	1	79 000	100
C2	1	117 000	30
C4	3	240 000	400
C3	2	180 000	1 200
C5	2	185 000	75
C6	1	125 000	60
C7	1	120 000	60
C8	3	150 000	80
C9	1	79 000	150
<i>Via alterna</i>			
Properdina	4	190 000	20
Factor B de properdina	1	100 000	200
Factor D de properdina	1	25 000	3
<i>Inhibidores</i>			
C1	1	90 000	180
C3	2	100 000	25
BIH	1	100 000	133
C6	?	?	?

* El C1 circula como una molécula compuesta por una de cada una de las tres fracciones q, r, s, que se mantienen unidas mediante enlaces dependientes de Ca²⁺.

TABLA II
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE LAS VÍAS CLÁSICA Y
ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO

Vía	Composición	Sustrato natural
<i>Vía clásica</i>		
C1 esterasa	<u>C1s</u>	C4 y C2
C3 convertasa	<u>C4b2a</u>	C3
C5 convertasa	<u>C4b2a3b</u>	C5
<i>Vía alterna</i>		
Factor D	<u>D</u>	Factor B
Convertasa de C3 dependiente de C3	<u>BbC3</u>	C3
Convertasa de C3 dependiente de C3b*	<u>C3bBb</u>	C3
C5 convertasa lábil	<u>C3bBbC3b</u>	C5
estable	<u>C3bBbC3bP</u>	C5

*Enzima reguladora análoga a C4b2a.

Las letras minúsculas indican fracciones de los componentes, las mayúsculas, componentes de la vía alterna, y el superayado, fragmentos o componentes completos enzimáticamente activos.

* * *

La activación de la vía clásica del C comienza con la interacción de una superficie cubierta por Ac, IgG o IgM⁽⁶⁾, con el primer componente del C, el C1. El lugar de unión de la Ig con el C1, por su fracción q, se localiza en el fragmento Fc de aquella⁽⁷⁾. En el caso de la IgG se necesitan habitualmente dos moléculas de IgG adyacentes para unir el C1⁽⁸⁾. Esta característica parece ser decisiva para la activación del sistema, y puede explicar situaciones clínicas en las que, existiendo una reacción Ag-Ac sobre una membrana celular, no se produce activación del C, supuestamente por la dispersión de las moléculas de IgG sobre la superficie⁽⁹⁾. Como hemos visto, también es posible la interacción del C con Ig libres, pero ésta es sensiblemente menor⁽¹⁾.

La estructura del C1q, la fracción del C1 que se une a la Ig, es similar a la del colágeno, y es degradado por la colagenasa bacteriana⁽¹⁰⁾. Su unión al complejo Ag-Ac se sigue del desarrollo de la actividad enzimática del C1⁽¹¹⁾, llamándose C1 esterasa (o C1E). La C1 esterasa posee ahora la capacidad de escindir las moléculas de C4 y C2⁽¹²⁾ en dos fragmentos. Ambos compuestos son escindidos en sendos fragmentos de desigual tamaño. Los fragmentos menores (C4a y C2b) son liberados al medio, y los mayores (C4b y C2a) son los responsables de la continuación de la activación del resto de la "cascada". Si la activación tiene lugar sobre la membrana de una célula, la fracción C4b se adhiere a la superficie celular. Una sola molécula de C1 esterasa puede escindir muchas de C4, que van adhiriéndose a su vez a la membrana. El proceso enzimático es inhibido por el inhibidor de la C1 esterasa^(13,14). En presencia de C4b unido a la membrana, y mediante un proceso dependiente de Mg²⁺, la C1 esterasa es capaz de escindir el C2⁽¹⁴⁾. La fracción C2a se une al C4b, formando ambos un nuevo

compuesto con actividad enzimática, la C3 convertasa, capaz a su vez, de escindir el C3⁽¹⁵⁾ en C3a y C3b⁽¹⁶⁾. El fragmento menor, C3a, es liberado al medio, mientras que el mayor se asocia al conjunto C42 y a la membrana celular mediante una unión covalente de vida muy corta. El conjunto C423 sobre la membrana celular tiene la propiedad de escindir a su vez el C5 en C5a, pequeño fragmento que se libera, y C5b, que interactúa con la membrana en lugar distinto, aunque próximo, al C423. El lugar de unión del C5b tiene una vida bastante más larga que el del C3b, con lo que, ya que no es necesaria la unión a la membrana para la activación del C5, el C5b puede permanecer por largo tiempo en el medio, incluso en complejo con el C6, antes de unirse a la membrana^(17,18). El complejo C5b6 (el C6 y los restantes fragmentos de la cadena del C, C7-9, no son escindidos) es capaz de activar por sí solo el resto del sistema y de provocar así la lisis de la membrana, incluso en células no sensibilizadas por un Ac específico, fenómeno conocido como "lisis reactiva"⁽¹⁹⁾, y del que se desconoce su trascendencia clínica. Al C5b6 se une al C7, formando los tres un complejo estable que interactúa con el C8 y C9⁽²⁰⁾. Una vez situados todos los componentes sucede un proceso dependiente de temperatura⁽²¹⁾ durante el que se determina la aparición de una solución de continuidad en la membrana que provoca la lisis celular.

* * *

La vía alterna de la activación del C fue descubierta por Pillemer et al. en 1954⁽¹⁾, al comprobar la activación del C3 mediante la interacción de zymosán con una proteína plasmática que llamaron properdina, en ausencia de Ac y en presencia de otros factores, nombrados Factores A y B de la properdina, que diferían entre sí por su termolabilidad y su sensibilidad a amoníaco e

hidracina. Pronto se estableció que la properdina jugaba un papel importante en la inmunidad inespecífica contra muchos agentes infecciosos. Este concepto se negó posteriormente con el descubrimiento de la IgM, sugiriéndose que properdina e IgM eran una misma cosa, ya que, en apariencia, la IgM mimetizaba todas las acciones de aquella, y, además, fija sólo una pequeña cantidad de las fracciones 1, 4 y 2 del C y relativamente mayores del resto de las fracciones. El mismo grupo que describió la properdina diseñó el método para su purificación⁽²²⁾, con lo que se establecieron definitivamente las diferencias de ésta con la IgM.

Posteriormente a esta primera descripción, se comprobó que el fragmento (Fab)'₂ de la IgG de conejo era capaz de fijar el C, de la misma manera que se sabía lo hacía el fragmento Fc⁽²³⁾, aunque sin conducir a una completa pérdida de actividad plasmática del C. A esto se añadieron el descubrimiento de las propiedades de distintos tipos de Ac del cobaya para activar todas o sólo las últimas fracciones del C⁽²⁴⁾, la descripción de la capacidad de los lipopolisacáridos bacterianos de fijar sólo estas últimas fracciones⁽²⁵⁾, aun en caso de aganmaglobulinemia, de bloqueo inmunológico del C2⁽²⁶⁾, o de deficiencia selectiva del C4⁽²⁷⁾, y la identificación como factores D y B de la properdina a los mediadores de la activación del C3 por el veneno de cobra^(28,29).

Los mecanismos que conducen a la activación de la vía alterna del C no están del todo claros. En líneas generales, el C3 plasmático puede transformarse en C3b por el proceso que hemos visto en la vía clásica o mediante la interacción de un material estimulante (inmunocomplejos, zymosán, etc) con factor D, factor B, properdina y C3 en la fase fluida. En presencia del factor D, el factor B puede unirse al C3b previamente fijado a una superficie apropiada. El factor B es escindido por el factor D en dos fragmentos, el Bb, que

permanece unido al C3b, y el Ba, que se libera al medio. En un proceso dependiente de Mg^{2+} , el Bb modifica la estructura del C3, conformando ambos el $\overline{C3bBb}$, o convertasa de C3 dependiente de C3b, también llamada, más brevemente, "enzima de amplificación". El $\overline{C3bBb}$ puede entonces dividir más C3 que a su vez es capaz de reproducir el proceso o, si su situación física de proximidad lo permite, formar una estructura con el $\overline{C3bBb}$ capaz de fijar C5, llamada C5 convertasa, o $\overline{C3bBbC3b}$. Esta enzima es muy inestable, pero se transforma en estable con la adición de properdina, formando $\overline{C3bBbC3bP}$. La escisión del C5 conduce a la activación del resto de la vía⁽¹⁾. Probablemente, estos dos efectos del C3b, el comportamiento análogo al C4 de escindir más C3 y la propiedad de dividir el C5, dependan del lugar en que se localice el C3b, más que de una pluripotencialidad del compuesto⁽¹⁾.

* * *

El sistema del C, ambas vías, poseen mecanismos de autorregulación diversos. El C1 activado sufre la acción del inhibidor de la C1 esterasa⁽¹⁾, enzima capaz además de inhibir algunos factores de la coagulación y la calicreína, siendo una proteína marcadora de los pacientes con angioedema hereditario⁽¹⁾.

El inactivador del C3b es una enzima proteolítica que actúa junto con otra proteína, la $\beta 1H$, rompiendo la molécula de C3b para formar un C3c, que se libera, incapaz de unirse a sus receptores correspondientes en la membrana, y C3c, que queda firmemente unido a la superficie^(2,3,4). La $\beta 1H$ acelera la velocidad de degradación de la C5 convertasa mediante el establecimiento de una competición con el factor B por su lugar de unión con el C3b^(3,5).

En presencia de la una proteína capaz de unirse al C4, el inactivador del C3b es capaz de impedir que aquel pueda escindir C3 para formar C3b⁽³³⁾.

La acción del C5b6 puede ser inhibida, en el cobaya, por el inactivador del C6, que actúa sobre su lugar de fijación⁽³⁷⁾.

Tanto el C1q como el C3a poseen inactivadores de incierta función en humanos.

* * *

La mayoría de los componentes del sistema del C se sintetizan ya en el tejido fetal a las 12 semanas de gestación⁽³⁸⁾. En el momento del nacimiento los niveles de CH50 (cantidad de C que hay que añadir a una suspensión normalizada de eritrocitos para conseguir la lisis del 50% de las células) y de los distintos compuestos son menores que en el adulto, para igualarse a los 5 años.

Se ha demostrado que cultivos de macrófagos pueden producir C2-5 y factor B, pero parece que el parénquima hepático es el lugar más importante de producción de la mayoría de los componentes. El halotipo del C3 de un receptor de hígado cambia a las pocas horas, transformándose totalmente en el del donante⁽³⁹⁾. Por otra parte, los niveles de C caen en circunstancias que implican una reducción de la capacidad sintetizadora del hígado⁽¹⁾. No obstante existen pruebas de que síntesis de C por el intestino fetal de humanos y cobayas, por el colon humano normal y por células del adenocarcinoma de colon, indicando que podría ser producido por varios tipos de epitelios en cultivo⁽¹⁾. Al menos en el caso del C4, parece que es posible que un componente del C en particular pueda ser sintetizado como una proteína precursora grande que sufra una escisión posterior para convertirse en un elemento de la estructura conocida⁽⁴⁰⁾.

El recambio plasmático de C es bastante rápido, aproximadamente el 2% del total plasmático por hora, sin que la activación del sistema parezca justificarlo⁽¹⁾. En la enfermedades inflamatorias habitualmente se encuentran elevados los niveles de C, a expensas sobre todo de un aumento en la síntesis.

* * *

Como hemos visto antes, las acciones del C son más amplias que las que originalmente se le atribuyeron. El C1, al unirse al Ag-Ac estabiliza el complejo inmune⁽²⁾. En ausencia de Ac el C1 puede unirse directamente a la cápside de virus RNA oncógenos de primates, inactivándolos⁽⁴¹⁾. Esta capacidad antivírica es exhibida también por el C4b⁽⁴²⁾, el cual impide la adsorción del virus a la membrana del huésped.

El C3a se comporta como una anafilotoxina, induciendo, de forma no citotóxica, la liberación de histamina por los mastocitos y basófilos⁽⁴³⁾. Aunque no se ha relacionado nunca con procesos alérgicos comunes, el C3a si podría jugar un papel, con el C5a, en los que acompañan a las enfermedades autoinmunes. Por su parte, el C3b es la opsonina termolábil más importante del suero, pudiendo solubilizar e inactivar inmunocomplejos⁽¹⁾.

El C5a es un potente agente quimiotáctico para PMN y macrófagos, induciendo además aumento de la adhesividad de los primeros, como veremos detenidamente más adelante. El C5b facilita la acción opsonizadora del C3b.

De todo ello se deduce que el sistema del C actúa de forma coordinada en respuesta frente a la infección. ésta, aun en ausencia de Ac, provocaría la activación de la vía alterna. Una vez que los Ac se hubiesen producido, se activaría la vía clásica. La activación del sistema completo determinaría la opsonización del germen la

liberación de histamina y la quimiotaxis de leucocitos hacia el foco.

El C3 se une de forma covalente a la membrana mediante un enlace éster. Los restantes componentes lo hacen a través de los lípidos de membrana. El complejo posee actividad lítica cuando se fija el C8, pero el C9 acelera esta actividad. La lisis se basa al parecer en la propiedad del complejo final de introducir una estructura hidrófoba con núcleo hidrófilo entre las dos capas lipídicas de la membrana, permitiendo el paso de agua y solutos desde el interior al exterior de la célula⁽⁴⁴⁾.

* * *

El C posee una función en la síntesis de Ac. Los animales pertenecientes a cepas con déficit de C4 responden con bajos títulos de Ac ante la inyección IV de Ag, y no guardan memoria inmunológica^(45, 46). Este defecto es corregido al administrarles sueros de animales normales. Esto se cumple tanto para los Ag T-dependientes como para los T-independientes. Los animales deficientes en C5 no muestran esta característica, lo que revela la importancia de los primeros componentes de la vía clásica del sistema. El mecanismo que determina este hecho no es conocido, pero debe implicar a defectos dependientes del C en el proceso de cooperación celular. También hay que resaltar que los genes que determinan la síntesis de varios de los componentes del C se encuentran en la proximidad de los que controlan la respuesta inmune y que, por otra parte, los productos de la activación del C inducen la liberación de linfoquinas por los linfocitos B, que juegan un papel en la transformación de los linfocitos y en la migración de los macrófagos⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

* * *

Las técnicas de laboratorio clínico que se utilizan para investigar el sistema del C son de dos tipos: la inmunoprecipitación y el ensayo de la actividad de los distintos componentes. La primera ofrece ventajas de realización y es bastante sensible, pero es un análisis puramente cuantitativo que, además, no distingue entre proteínas completas y fragmentos de ellas. La segunda es una técnica complicada pero más precisa. El estudio habitual es el del CH50, que hemos definido más arriba. Es el más utilizado para investigar los errores de los componentes de la vía clásica, aunque existen ensayos funcionales para cada uno de los componentes del sistema.

Las determinaciones de C* se usan como ayuda al diagnóstico y al seguimiento de glomerulonefritis, enfermedades autoinmunes y en otras patologías determinadas. Estas cifras son a menudo difíciles de valorar, porque, en líneas generales, existe un exceso de cada componente en relación con la cantidad necesaria para producir su efecto, por lo que la activación del sistema con la suficiente intensidad como para producir daño celular puede no disminuir las cifras de C por debajo de las normales. Por otra parte, el C no difunde bien a través de las barreras fisiológicas, por lo que es frecuente hallar, en ciertas patologías, un gradiente entre un compartimento, p.e. sinovial, y suero.

La activación de la vía clásica, como sucede cuando existen complejos inmunes circulantes (p.e. en el lupus eritematoso diseminado, LED), conduce a la disminución de todos los componentes del sistema mientras que se mantienen las cifras de los factores B, D, y properdina.

En el caso de una activación principal de la vía alterna, se encontrarán disminuidos los componentes C3-9 y los factores B, D, y la properdina; como ocurre en las

* Hay que tener en cuenta que el nivel de C plasmático es la suma de la tasa de síntesis, de degradación y de utilización.

glomerulonefritis membranoproliferativas y postestreptocócicas. Por todo ello, es importante para el diagnóstico de su causa, investigar el "patrón" de una hipocomplementemia. Las disminuciones aisladas de uno de los componentes deben hacer pensar en deficiencias hereditarias.

Como hemos dicho anteriormente, no es el objeto de este trabajo realizar una descripción detallada del sistema del C ni de su patología en general, por lo que no entraremos en detalles de las enfermedades y estados que entrañan una activación del C o una disminución de alguno/s de los componentes. No obstante, nombraremos los más característicos.

Determinan activación del sistema del C enfermedades de estirpe inmunológica, como la enfermedad del suero, el LED, artritis reumatoide, vasculitis, anemias, neutropenias, trombocitopenias, y linfocitopenias inmunes, y pénfigo; patología infecciosa, como en el shock endotóxico, la neumonía neumocócica, malaria y dengue; hemoglobinuria paroxística nocturna; enfermedades dermatológicas, como penfigoide bulloso, dermatitis herpetiforme y vasculitis cutánea necrotizante; nefropatías, glomerulonefritis membranosa y postestreptocócica, nefropatía del LED y de la púrpura de Schönlein-Henoch; pancreatitis; procedimientos terapéuticos que impliquen la utilización de materiales plásticos, (celofán, nylon) de estructura polisacárida que deban mantener un contacto extenso con la sangre, como en la hemodiálisis, leucoforesis y circulación extracorpórea.

Se han descrito deficiencias hereditarias de todos los componentes del C. Estas deficiencias se transmiten de forma autosómica, dominante o recesiva. Las familias heterocigóticas presentan niveles de C del 50% de los normales. Los genes responsables de la deficiencia de C2 y C4 en los humanos se encuentran dentro del complejo mayor de histocompatibilidad. Los del C3, C6 y C8 también están localizados dentro del cromosoma 6.

La deficiencia de los primeros componentes del C se asocia a enfermedades del tejido conectivo, como el LED; la del C3, a infecciones y, las de los últimos componentes, a una mayor susceptibilidad a infecciones por gonococos y meningococos. El déficit más común de la vía clásica es el de C2, en su forma homocigótica (frecuencia genética del 1%). El 40% de estos casos son normales y el 40% sufren SLE. Estos individuos no sufren infecciones graves.

En algunos pacientes con hipogammaglobulinemia IgG se ha apreciado una deficiencia concomitante de C1q. Al parecer la alteración radica en un aumento de la velocidad de aclaramiento del C1q⁽⁵⁰⁾. Posiblemente, los bajos niveles de IgG impiden una interacción entre el C1q y la IgG, difundiendo el primero rápidamente hacia el espacio extravascular donde se degrada. De hecho, el defecto se corrige con la administración IV de IgG altamente purificada⁽⁵¹⁾.

La disfunción del C5 es una enfermedad infantil y recibe el nombre de síndrome de Leiner⁽¹⁾ (dermatitis seborreica, diarrea, infecciones, y retraso del crecimiento). El C5 de estos pacientes presenta ciertas anomalías funcionales. Al parecer, la causa estriba en un compuesto presente en la leche humana que muestra cierta semejanza con el C5⁽⁵²⁾.

Se han descrito además deficiencias de inhibidores del sistema. El más frecuente es el que sucede en el angioedema hereditario, causado por el déficit de C1inh⁽⁵³⁾. Se transmite de forma autosómica dominante y, en el 85% de los casos, se aprecia una proteína funcionalmente normal pero en muy baja cantidad. En el resto, el C1inh no es funcionante. Las crisis de edema parecen mediadas por la activación del C, lo que reduce aún más las, por otra parte, reducidas cifras de C2 y C4 observadas en estos pacientes.

Se han identificado casos de deficiencia de carboxipeptidasa B (inactivadora del C5a y C3a) y del inactivador del C3.

* * *

La capacidad de agregación es una propiedad que, de forma similar a las plaquetas, poseen los leucocitos, en particular los PMN. Su significado biológico no está del todo aclarado pero, ya que sólo se muestra cuando los PMN son convenientemente estimulados, se le supone un efecto beneficioso en la fagocitosis y en la destrucción de elementos extraños que eventualmente penetren en el organismo. En las últimas dos décadas ha tomado cierta importancia el estudio de esta propiedad de los PMN al observarse que estas células se agregan intravascularmente durante el curso de patologías en las que se produce una masiva generación de compuestos conocidos como agentes quimiotácticos con capacidad activadora de ciertas funciones de los PMN, surgiendo una fuerte sospecha de que dicha agregación posee un papel patogénico en el desarrollo de las alteraciones fisiopatológicas de estas enfermedades. En líneas generales, esta hipótesis, que desarrollaremos más detenidamente en esta misma sección, viene a consistir en lo siguiente: en ciertos estados patológicos existe una generación importante de compuestos biológicos, distintos en principio a los conocidos factores de la coagulación y a los que median la agregación plaquetaria, que son capaces de inducir una mayor adhesividad de los PMN; como consecuencia de su acción éstos se agregan entre sí, formando conglomerados que quedan secuestrados en los lechos capilares vasculares y que, una vez allí, tendrían dos efectos: uno local, derivado de la producción de radicales oxigenados y de la liberación de sustancias tóxicas, y otro "aguas abajo", producido por el

taponamiento del lecho capilar que ocupan los agregados. Este puede ser el mecanismo subyacente en circunstancias clínicas de etiologías dispares en las que se ha demostrado leucoembolización y generación concomitante de factores proagregantes; tales como el shock séptico por gramnegativos, la disfunción pulmonar que sucede algunas veces tras la hemodiálisis, la circulación extracorpórea y la leucoforesis, el síndrome de Purtscher, el infarto de miocardio y, sobre todo, el SDRA (Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto).

Desde 1968 se conoce la leucopenia que sucede en los primeros instantes del tratamiento por hemodiálisis⁽⁵⁴⁾, siendo también admitido que en todos los pacientes sometidos a este procedimiento se desarrolla un cuadro de disfunción pulmonar consistente en disminución de la PaO_2 y aumento de la presión arterial pulmonar de severidad variable⁽⁵⁵⁾. En un principio se creyó que la leucopenia se originaba por un secuestro transitorio de los leucocitos en el serpentín de celofán, pero estudios posteriores demostraron que se debía a un factor generado por el plasma del paciente al ponerse en contacto con el mismo celofán, ya que el plasma de animales de experimentación, incubado con este material y reinfundido de forma autóloga determinó una leucopenia similar, que estaba determinada por la agregación de los PMN y su posterior secuestro en el árbol capilar pulmonar⁽⁵⁶⁾. Otros trabajos dejaron claro que este factor que provocaba la agregación de los PMN era la fracción 5a del Complemento y que estas células eran las causantes de la disfunción pulmonar que se aprecia durante el tratamiento^(55,57,58). Estos mismos autores desarrollaron la hipótesis de que era el C5a el causante de la agregación de los PMN y del cuadro pulmonar que aparecía en los pacientes hemodializados, pero además sería también la causa de los cuadros similares que surgen en individuos sometidos a leucoforesis⁽⁵⁹⁾ o a circulación

extracorpórea mediante oxigenador^(60,61). Al parecer, la estructura polisacárida del celofán, y del nylon del oxigenador y del filtro de leucoforesis, es la causante de la activación de la cascada del C por su vía alterna. De hecho, la modificación de esta estructura altera la capacidad generadora de C5a del material del dializador⁽⁶²⁾.

Existen otras patologías en las que se ha demostrado una generación masiva de C5a y neutropenia con formación de leucoémbolos en el pulmón y alteración cardiorrespiratoria. Una de las más características es la pancreatitis⁽⁶³⁾. En esta enfermedad efectivamente ocurre formación de C5a pero, además, está demostrada *in vitro* la capacidad que posee la tripsina para escindir el C y formar C5a^(64,65). Por todo ello, se piensa que las proteasas liberadas durante la pancreatitis pueden provocar la síntesis intravascular de C5a y la formación de agregados de PMN (efecto no impedido por inhibidores de las proteasas como la aprotinina⁽⁶⁶⁾). De hecho, en esta patología se desarrollan cuadros que pueden ser atribuidos al enclavamiento de estos agregados en lechos capilares. Por una parte, la pancreatitis es una causa habitual de SDRA, en el que nos detendremos más adelante. Por otra, en el marco de esta enfermedad aparece, infrecuentemente, un síndrome caracterizado por ceguera repentina y edema y hemorragia en la retina posterior, conocido como síndrome de Purtscher (descrito inicialmente en traumatizados graves) que se considera producto de microinfartos provocados por émbolos que comprometen la normal circulación retiniana^(67,68). El hecho de que este cuadro se presente en patologías en las que se ha demostrado generación de C5a y agregación de PMN *in vivo* o *in vitro*^(69,70) está de acuerdo con la hipótesis de que es el C5a el responsable de la agregación de los PMN.

El SDRA es un síndrome pulmonar de evolución muy grave que obedece a una amplia variedad etiológica⁽⁷¹⁾ entre las cuales las principales son: traumatismos severos, quemaduras extensas, sepsis por gramnegativos, reacciones adversas a fármacos, aspiración de ácido gástrico, inhalación de gases y pancreatitis. En la mayor parte de estas causas se ha demostrado como hemos visto la formación concomitante de C5a^(63,69,70,73-75), de tal forma que la investigación de los niveles séricos de este compuesto puede aportar datos que ayuden a dirimir el pronóstico⁽⁷⁵⁾. Por otra parte, en las primeras fases de esta entidad se ha comprobado el éstasis de PMN en los capilares pulmonares⁽⁷³⁾. En varios estudios experimentales se ha demostrado que la infusión de plasma autólogo rico en C5a, mediante incubación con Zymosán o celofán del usado en hemodiálisis, a un animal de experimentación, puede reproducir en éste la mayor parte de las constantes fisiopatológicas del síndrome: hipertensión pulmonar, hipoxemia y edema, además de agregación intravascular de los PMN y su ulterior secuestro en el árbol vascular pulmonar, hechos que no se apreciaron cuando los animales fueron sometidos a neutropenia mediante antimitóticos⁽⁵⁵⁾. Similares resultados han sido comunicados por autores que usaron cepas de ratones deficientes en C5 en los que se indujo un shock séptico y que no mostraron alteraciones de gases en sangre propias del SDRA, mientras que si lo hicieron ratones de cepas normales⁽⁷⁴⁾. En estudios *in vitro* en los que se utilizaron técnicas de agregometría similares a las que se usan en el estudio de la agregación plaquetaria se ha demostrado que el plasma de individuos con deficiencia de la fracción 5 del C, incubado con Zymosán, es incapaz de inducir agregación de los PMN, cosa que si ocurre cuando el plasma proviene de individuos normales⁽⁶⁶⁾. El contacto con C5a induce en los PMN la formación de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la

adhesión a células endoteliales en cultivo⁽⁷⁶⁾, con la consiguiente destrucción de éstas, hecho importante en la fisiopatología del SDRA, pero que también explicaría la fibrosis y calcinosis pulmonares que se ven en paciente dializados durante largo tiempo⁽⁷⁷⁾.

Hay otro tipo de patología en las que se sospecha la implicación del sistema del C plasmático. Existen trabajos que demuestran que tanto el colesterol como el material lipídico proveniente de los ateromas pueden activar la formación de C5a⁽⁷⁸⁾. Por otra parte, se han descrito pacientes con aterosclerosis ulcerada grave en los que se apreció una intensa elevación plasmática del C5a⁽⁷⁹⁾. Es fácil pensar que esta activación local del C induciría a los PMN a agregarse en el territorio distal de la lesión. Este ha sido un mecanismo invocado como de importancia patogénica en el infarto de miocardio. De hecho, la utilización de fármacos capaces de disminuir la capacidad agregante de los PMN, metilprednisolona e ibuprofén, ha permitido la reducción de la zona afectada en infartos experimentales⁽⁸⁰⁾.

El efecto de los corticosteroides en el "pulmón de shock" o SDRA aporta pruebas adicionales a la hipótesis patogénica de la agregación de los PMN dependiente de C5a. Los corticosteroides se han utilizado desde un principio en esta patología de una forma empírica, pero su beneficio en las primeras fases del SDRA parece admitido⁽⁸¹⁾. No obstante, algunos trabajos aportan una base racional para su utilización. Cuando alguno de estos compuestos se halla diluido en el plasma, antes de que éste se incube con celofán, se impide la generación de C5a⁽⁸²⁾. De forma análoga, el tratamiento previo con corticosteroides de un animal de experimentación impide la agregación de los PMN dependiente del Factor de Veneno de Cobra (compuesto capaz de activar el C *in vivo*)⁽⁷²⁾. Por otra parte, algunos corticosteroides inhiben *in vivo* e *in vitro* la agregación de los PMN inducida por el C5a

aun cuando éste ya esté presente⁽³³⁾. Todas estas acciones se llevan a cabo con dosis muy altas de estos compuestos.

Todo lo anteriormente expuesto apunta hacia la idea de que el C5a es el responsable de la agregación intravascular de los PMN en las patologías en que ésta se ha comprobado, y que la agregación de éstas células es un factor importante en la patogenia de dichas enfermedades. No obstante, hay indicios que hacen pensar que existen uno o varios factores más, implicados en el desarrollo de la agregación.

En estudios experimentales en los que se infundieron neumococos no viables en perros se apreció activación del C, leucostasis intrapulmonar y alteraciones hemodinámicas (aumento de las resistencias vasculares pulmonares y sistémicas, disminución del gasto cardíaco) algunas de ellas comparables a las que se producen en el SDRA por shock endotóxico⁽³⁴⁾. En este mismo trabajo puede apreciarse que la utilización de animales deficientes en C3 o la infusión de plasmas tratados con EDTA, antes de ser incubados con los neumococos, para hacer imposible la generación de C5a, inhibía las alteraciones hemodinámicas, pero no la leucostasis, por lo que sus autores concluyen que el sistema del C es esencial para el desarrollo del cuadro cardiovascular tóxico provocado por los neumococos, pero no para desarrollar la agregación de los PMN, y que estos gérmenes inducían la generación de un factor, distinto del C, que determina esta agregación.

Existen varios compuestos biológicos, distintos del C, capaces de provocar la agregación de los PMN. Estos compuestos pertenecen principalmente al grupo de metabolitos de la cascada del ácido araquidónico, cuya activación está comprobada en la patogenia del SDRA⁽³⁵⁾. Un metabolito estrechamente relacionado con este sistema, y de relativamente reciente descripción, es el Factor Activador de las Plaquetas (FAP, 1-alkil, 2-acetil, sn, gli-

cero-3-fosfatidilcolina), que se forma, como el ácido araquidónico, por la acción de la enzima fosfolipasa A₂ sobre los fosfolípidos de la membrana celular y cuyo origen se describió inicialmente en los basófilos del conejo sensibilizados a la IgE⁽¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾.

Al parecer el FAP es un mediador potente de las reacciones de anafilaxia provocando aumento de la vasopermeabilidad⁽¹⁰²⁾, agregación y degranulación de las plaquetas⁽¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾, contracción del músculo liso bronquial⁽¹⁰⁵⁾ con aumento de las resistencias aéreas y disminución de la distensibilidad⁽¹⁰⁶⁾, vasoconstricción e hipertensión pulmonar⁽¹⁰⁷⁾, hipotensión sistémica con disminución del gasto cardíaco y del flujo renal⁽¹⁰⁸⁾, y agregación de PMN^(109,110). El FAP es un mediador importante en la agregación de los PMN dependiente de IC⁽¹¹¹⁾, generándose *in vivo* durante la administración de inmunoadregados a animales de experimentación^(112,113). Todo ello hace valorar al FAP como un factor implicado en las reacciones de anafilaxia. Además, por sus efectos sobre la agregación de PMN, unidos a la demostración de que este compuesto se produce concomitantemente durante la neutropenia provocada por el C5a⁽¹¹⁴⁾, y por el paralelismo que existe entre gran parte de las acciones del C5a y del FAP, se ha sugerido por algunos autores que este último es el efector común que determina la agregación de los PMN, dependiente tanto de IC como de C5a⁽¹¹⁵⁾.

Por otra parte, existen algunos hechos que apoyan indirectamente esta hipótesis. Nos referimos a la descripción hecha por Flower y Blackwell⁽¹¹⁶⁾, y comprobada por otros⁽¹¹⁷⁾, de un inhibidor de la fosfolipasa A₂, de naturaleza protéica y de peso molecular entre ≈55.000 y 15.000 (según la especie animal en la que se produzca), cuya síntesis es inducida por los corticoste-

roides*. Ésto, que podría explicar, si tomamos al FAP como factor intermediario, la acción antiagregante que ejercen los corticosteroides frente al C5a *in vivo* y a la que hemos hecho mención más arriba. Es decir, el C5a no es un agente que provoque la agregación de los PMN por sí mismo, sino que induce la formación de FAP, que sí lo hace. Tomando estos hechos en consideración, podríamos aventurar que los corticosteroides impedirían la agregación a través de la síntesis de un inhibidor de la formación del FAP. En contra de ésto debemos decir que estaría la acción demostrada de los corticosteroides de impedir la activación del C a la que nos hemos referido ya.

Todo lo anteriormente expuesto nos ha llevado a investigar la existencia de fuertes relaciones entre el sistema del complemento plasmático y el del ácido araquidónico-FAP.

* La existencia de este inhibidor ha sido comprobada, al igual que sus acciones teratógenas sobre el ratón. Al parecer, los corticosteroides median su propia actividad teratógena a través de esta sustancia, pudiendo ser revertida mediante ácido araquidónico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De los datos expuestos en la sección precedente podemos extraer el concepto general de que existen algunas entidades patológicas en las que un factor patogénico importante es la agregación de los leucocitos PMN. Esta agregación puede tener efectos diferentes dependiendo del territorio vascular en el que principalmente queden enclavados los conglomerados de estos leucocitos. En el cuadro conocido como SDRA, generalmente producido durante el shock endotóxico, los aglomerados de PMN ocupan el lecho capilar pulmonar, provocando signos y síntomas respiratorios de pronóstico muy grave. En otras entidades los efectos producidos por el enclavamiento de los agregados de PMN son locales, como sucede en el infarto agudo de miocardio y el síndrome de Purtscher.

Al parecer, en estas patologías y en otras circunstancias en las que la sangre entra en contacto con materiales de naturaleza polisacárida, como en la hemodiálisis o la circulación extracorpórea, se produce la generación de un factor plasmático responsable de la agregación de los PMN. El fraccionamiento del plasma y estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* han permitido identificar este factor como el C, concretamente su fracción 5a.

No obstante, hay indicios que apuntan hacia la posibilidad de que no sea sólo el C5a el causante de la agregación de los PMN o, al menos, de que no sea el mediador directo de ella. En primer lugar, la infusión masiva de gérmenes grampositivos no viables provoca agregación de PMN no dependiente del C5a. En segundo, está demostrada la participación de los productos de la activación de la vía del ácido araquidónico en el síndrome de SDRA. Algunos de estos productos, como el leucotrieno B₄, son potentes agregantes de los PMN. Por

otra parte, compuestos relacionados con este último sistema, como es el FAP, se generan concomitantemente en circunstancias en las que ocurre una producción masiva de C5a, pudiendo, además, mimetizar gran parte de los efectos de este último, incluida la agregación de los PMN, hasta tal punto que algunos autores han postulado que es el FAP el factor intermedio que permite la agregación de PMN dependiente de C5a y de IC. En tercer lugar, hay una prueba indirecta que apoya esta última hipótesis, y que se basa en la acción de los corticosteroides. Estas drogas se han usado de forma empírica en el SDRA, pero la demostración de que alguna de ellas era capaz de impedir la agregación de los PMN tanto *in vivo* como *in vitro* mediante una acción anti-complemento aportó una base racional para su uso. Pero existe otro punto de vista que explica la acción de los corticosteroides. Ésta valora el hecho de que estas drogas inducen la síntesis de un inhibidor de la fosfolipasa A_2 , enzima necesaria para la síntesis de ácido araquidónico y de FAP.

Por todo ello, hay base para pensar que existe una estrecha relación entre la activación del C5a y la de algunos de los derivados del paso bioquímico catalizado por la fosfolipasa A_2 , concretamente, el FAP. Para evidenciar esta relación sería útil comprobar si la inhibición específica de la enzima con quinacrina y la administración de compuestos inhibidores del FAP, como el L-652.731, reducen, total o parcialmente, la agregación de los PMN dependiente del C5a. Es esto lo que nos hemos propuesto investigar en este trabajo. Por otra parte, hemos realizado una aproximación al conocimiento de la acción antiagregante de los corticosteroides para establecer si ésta se realiza exclusivamente a través de una actividad anti-C5a o anti-fosfolipasa A_2 , para lo cual hemos investigado la modificación que estos compuestos, en concreto, el succinato sódico de 6-metil-prednisolona,

provoca en la agregación de los PMN cuando se estimulan con C5a, IC, y FAP *in vivo* y con FMLP *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODO

PREPARACIÓN DE LOS PLASMAS

Mediante punción de la arteria central de la oreja se obtuvieron 10 ml de sangre de conejos albinos de Nueva Zelanda utilizando como anticoagulante 1 U/ml de heparina sin preservativo. La sangre se centrifugó a 4 grados C, y el plasma que se obtuvo se diluyó al 20% con solución salina fisiológica estéril.

El sistema del Complemento plasmático de los plasmas diluidos se activó por incubación con 0,5 mg/ml de Zymosan, un derivado de la pared del *S. serevisiae* con capacidad activadora del Complemento plasmático a través de la vía alternativa, durante 30 minutos a 37 grados C. Tras esto, los plasmas fueron centrifugados a 4 grados C. El plasma activado con Zymosán (PAZ) así obtenido se mantuvo a -20 grados C hasta su utilización durante un periodo no superior a 24 horas. La dilución del 20% demostró provocar los mismos efectos neutropénicos que el plasma sin diluir; diluciones mayores determinaron una menor neutropenia.

Para estudiar los efectos de los corticosteroides sobre la generación de factores agregantes se incubaron dos grupos de muestras de plasmas diluidos con 6 y 12 mg/ml respectivamente de Succinato sódico de 6-metil-prednisolona, antes de la activación con el Zymosan, durante 30 minutos a 37 grados C (PCZ). Otro grupo de plasmas fueron incubados con 12 mg/ml del mismo compuesto después de ser activados con el Zymosán (PAZ+C).

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS (IC)

Se obtuvieron IC de anticuerpos anti-albúmina humana (HSA) de conejo y HSA (fracción V).

Durante 5 semanas se sometió al conejo al siguiente protocolo de inmunización:

1ª semana: inyección subcutánea de 1 ml de solución de HSA al 2% en SSF + 1 ml de CCF.

2ª a 4ª semanas: inyección subcutánea de 1 ml de HSA al 1% + 1 ml de CCF.

5ª semana: inyección subcutánea de 3 ml de HSA al 0,3 %.

Tras esperar una semana se sangra y se obtiene suero que posteriormente se trata como sigue:

A 750 µl de suero de conejo inmunizado se añaden 300 µl de HSA al 0,1% en Buffer Fosfato Salino (PBS) a pH 8 y 6,450 ml de PBS (pH 8).

Se incuba la mezcla a 37 grados C durante 1 hora y, posteriormente, a 4 grados C durante 24 horas.

Se centrifuga y se lava dos veces el precipitado con PBS pH 8.

Se obtiene así una suspensión de IC que contiene 40 µg/ml de HSA y 165 µg/ml de IgG.

La suspensión se mantuvo a -20 grados C dividida en alícuotas hasta su utilización.

ESTUDIOS DE AGREGACIÓN DE PMN *IN VIVO*

Perfusión de PAZ, PCZ, y PAZ+C

Los estudios de agregación de PMN con PAZ, PCZ y PAZ+C se realizaron administrando a ejemplares adultos jóvenes, entre 2,5 y 3 kg de peso, de conejos albinos de Nueva Zelanda de plasmas autólogos tratados de la forma arriba indicada. Los animales fueron anestesiados mediante la inyección IV de 0,5 ml/kg de una solución que contenía 2,5 mg/ml de droperidol y 0,05 mg/ml de citrato de fentanilo. Los plasmas fueron perfundidos a través de la vena safena a una velocidad de 1 ml/min durante 10 minutos. En el transcurso de la perfusión se obtuvieron muestras de sangre, por punción de la vena marginal de la

oreja, a tiempos determinados. Se obtuvieron muestras adicionales de sangre a los 5 y a los 15 minutos de terminar la inyección de los plasmas. Las muestras (20 μ l) se trataron en fresco con 100 μ l de líquido de Türk y se tificaron con 80 μ l de Azul de Toluidina al 1%. Las muestras así tratadas sirvieron para determinar en ellas las cifras de PMN y leucocitos totales mediante recuento microscópico en una cámara de Thoma.

En este apartado se hicieron tres grupos de cinco animales cada uno a los que se administró respectivamente PAZ, PCZ y PAZ+C.

La cifra de PMN se expresó como un porcentaje de la cifra basal antes de realizar la perfusión.

Perfusión de FAP

A un grupo de 5 conejos de las mismas características se les administró una dosis de 75 ng/kg de FAP sintético (β -acetil- γ -O-hexadecil, L- α -fosfatidilcolina) diluidos en 1 ml de solución salina fisiológica estéril con un 0,25% de albumina bovina.

La perfusión del FAP se realizó por vía intraaórtica mediante un catéter (Cavafix® MT 134) introducido a través de la arteria femoral. La inyección se hizo en forma de bolo durante 15 seg y la sangre (1 ml) se obtuvo a tiempos determinados tras ella mediante el mismo catéter, usando citrato sódico al 3,2% como anticoagulante. Veinte μ l de cada muestra se trataron de la misma forma arriba descrita.

La dosis fde FAP utilizada por nosotros fue la mínima dosis que producía una agregación máxima. Dosis levemente menores provocaron una reducción sensible de la agregación de los PMN.

Perfusión de IC

A un grupo de conejos similar en número y características se les administraron a través de la vena safena

10 ml de una suspensión de IC que contenía 8 $\mu\text{g/ml}$ de HSA y 33 $\mu\text{g/ml}$ de IgG en PBS pH 8, a una velocidad de 1 ml/min. A tiempos determinados durante y después de la infusión se obtuvieron muestras de 20 μl de sangre que se trataron de la forma descrita con anterioridad.

Con esta dosis se obtuvo una curva de agregación próxima a la máxima posible con suspensiones de contenido más alto de IC. Concentraciones menores de IC produjeron curvas de agregación de morfología menos constante y que reflejaban agregación de menor intensidad.

Tratamiento previo con corticosteroides

Cinco conejos fueron tratados con Succinato sódico de 6-metilprednisolona (SSMP) en dosis de 100 ó 250 mg/kg en forma de bolo IV 5 minutos antes de comenzar la infusión de PAZ o IC, y 30 segundos antes de la administración del FAP.

Tratamiento previo con colchicina

Grupos de 5 conejos fueron tratados 10 minutos antes del PAZ con dosis IV de colchicina de 60, 90 ó 120 $\mu\text{g/kg}$.

Tratamiento previo con quinacrina

Un grupo de 5 conejos fue tratado con dosis IV de quinacrina de 1,25 mg/kg una hora antes de la administración del PAZ o IC.

Tratamiento previo con inhibidor del FAP

Otro grupo de conejos perfundidos con PAZ, FAP o IC fueron tratados 15 minutos antes con el compuesto L-652.731, inhibidor experimental del FAP, a dosis de 160 μl por kg de peso de una solución 100 mM en DMSO- H_2O .

ESTUDIOS DE AGREGACIÓN DE PMN *IN VITRO*

Obtención y recuento de las células

Se extrajeron 10 ml de sangre mediante punción de la arteria central de la oreja del conejo, anticoagulándola con 10 U/ml de heparina sin preservativo. Se colocó la sangre en un tubo de 50 ml de polipropileno con 10 ml de PBS 0,15 M pH 7,2 y 3,3 ml de dextrano (Pm 500.00) al 6% en PBS. La mezcla se removió suavemente hasta la completa homogenización y se dejó sedimentar a 37 grados C durante 45 minutos. Una vez sedimentados los hemeties se recogió el sobrenadante y se añadió, evitando que se mezclara, a 10 ml de una solución de Ficoll/metrizoato de sodio (d = 1.075) en tubo cónico de polipropileno de 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 460 x g a 4 grados C durante 20 minutos, obteniéndose un "pellet" de PMN y hematies. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el "pellet" en 30 ml de PBS, centrifugándose en las mismas condiciones durante 10 minutos. Se despreció el sobrenadante y se sometió el "pellet" a choque hemolítico con 15 ml de NH₄Cl al 0,85% e incubación a 37 grados C durante 10 minutos, al cabo de los cuales se completó el volumen de 50 ml con PBS y se centrifugó a 460 x g durante 15 minutos. El "pellet" se resuspendió en PBS y se centrifugó a 833 x g. El sedimento restante estaba compuesto casi exclusivamente por PMN y se suspendió en 1 ml de medio de Hanks pH 7,4 con BSA 0,1%. Se realizaron controles periódicos de viabilidad celular mediante Azul Tripán, comprobándose que entre el 90 y el 95% de las células eran viables con este método de separación.

Veinte µl de la suspensión de células se mezclaron con 180 µl de líquido de Türk, contándose los PMN en microscopio óptico con cámara de Thoma.

Ensayo de agregación *in vitro*

Este ensayo se realiza en base a un método nefelométrico similar al que se utiliza para estudiar la agregación plaquetaria. En resumen, un haz de luz se hace pasar a través de una suspensión celular homogénea que la

absorberá en relación inversa con el tamaño de los corpúsculos que se forman, dejando así pasar más luz al aproximarse las células. Un inscriptor dibujará una curva que se corresponderá con la cantidad de luz que pasa a través de la suspensión en un tiempo determinado.

Hemos utilizado un lumiagregómetro de un canal con termostato Payton 1010. El aparato se calibró con un tubo control que contenía 500 μ l de medio de Hanks con 8×10^6 PMN/ml, a pH 7,4 y 37 grados C, con agitación continua a 900 rpm. En el tubo que contenía la suspensión celular a ensayar había PMN (10×10^6 PMN/ml), 50 μ l de Citocalasina B 10 mM (10 μ M c.f.) (1000) y 50 μ l de FMLP como estímulo (1 - 0,1 μ M) con un volumen final de 500 μ l. Las células se dejaron incubar con la Citocalasina B durante 5 minutos antes de añadir el FMLP. En 4 tubos con similar contenido se añadió SSMP a 12,5, 25, 50, y 65 μ g/ml.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En los estudios *in vivo* el número de PMN en las muestras obtenidas a los tiempos determinados en cada experimento es expresó como porcentaje de la cifra basal de PMN.

En los estudios *in vitro* de agregación se utilizaron como variables las áreas de las curvas trazadas por el inscriptor en un tiempo de 3 minutos. Las áreas de las curvas obtenidas en los ensayos con SSMP se expresaron como porcentajes del área de la curva obtenida sin corticosteroides. Con estos datos se realizó un simple análisis de regresión lineal mediante un programa de ordenador.

PROCEDENCIA DE LOS REACTIVOS USADOS

El Zymosan A, el FAP, el FMLP, la Quinacrina, el Ficoll™, la Citocalasina B, HSA fracción V, CCF, Dextrano y la BSA son de Sigma Chemical Co., St. Louis MO (E.U.A.).

La colchicina en solución IV es comercializada en E.U.A. por Lilly (Colchicine Injection, USP, ampollas de 2 ml con 0,5 mg/ml)

El SSMP es comercializado en España por Upjohn como Solu-Moderin™.

La mezcla anestésica de droperidol/fentanilo es comercializada en España por Latino como Thalamonal™.

El metrizoato de sodio fue en forma de contraste radiológico comercial (Nitigraf™).

El inhibidor del FAP L-652.731 nos fue proporcionado por el Dr. Chabala (de laboratorios Merck, Sharp & Dome, Department of Membrane and Arthritis Research, M.S. & D. Research Laboratories, Rahway, New Jersey, E.U.A.) y por el Dr. Sánchez-Crespo, del Servicio de Nefrología de la Clínica de la Concepción, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

COMPOSICIÓN DE LOS TAMPONES

PBS: NaCl 130 mM, KCl 2,65 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,4 mM.

Medio de Hanks: NaCl 130 mM, KCl 5,3 mM, CaCl_2 1,2 mM, MgSO_4 0,8 mM, NaH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 4 mM.

RESULTADOS

ENSAYOS IN VIVO

La infusión continua de PAZ, 10 ml (1 ml/min), en los conejos provocó una rápida desaparición de los PMN de la circulación periférica (fig. 1,2,). La neutropenia se desarrolló sobre todo durante los dos primeros minutos de la perfusión y se mantuvo mientras duró esta. La finalización de la perfusión se siguió de una recuperación de las cifras de PMN hasta superar la inicial en un 40%.

El tratamiento de los animales 5 minutos antes con dosis de 250 mg/kg de SSMP impidió por completo la neutropenia producida por el PAZ. Dosis de 100 mg/kg retrasaron la neutropenia pero no la inhibieron (fig 1a).

El tratamiento previo de los plasmas antes de ser incubados con el Zymosan impidió de forma dosis-dependiente la neutropenia. Seis mg/ml de SSMP la redujeron en un 60%, mientras que 12 mg/ml la impidieron en su totalidad y determinaron una intensa neutrofilia al finalizar la perfusión. Por el contrario, el tratamiento del plasma con posterioridad a su incubación con el Zymosan no tuvo efecto alguno sobre la neutropenia (fig. 1b).

El tratamiento de los animales con dosis máximas de quinacrina, 1,25 mg/kg, una hora antes de la perfusión del PAZ determinó una reducción aproximadamente del 30% en la neutropenia (fig 2a), reducción que fue similar a la producida por el tratamiento previo, 15 minutos antes, con el inhibidor del FAP L-652.731 (fig 2b).

El tratamiento con colchicina no impidió la neutropenia inducida por el PAZ a ninguna de las dosis probadas. En la fig. 2c se muestra el efecto de la dosis máxima utilizada por nosotros, 120 µg/kg.

La perfusión al conejo de una suspensión de IC HSA-antiHSA conteniendo 8 $\mu\text{g/ml}$ de HSA y 33 $\mu\text{g/ml}$ de IgG determinó una neutropenia de casi el 90 % de desarrollo gradual durante todo el tiempo de perfusión de los 10 ml (fig 3).

El tratamiento previo de los animales con dosis de SSMP de 100 y 250 mg/kg produjo una reducción dosis-dependiente de la neutropenia durante la perfusión de los IC (20 y 50% respectivamente) (fig 3a).

El tratamiento con quinacrina, 1,25 mg/kg, redujo la neutropenia en más de un 30%, mientras que el inhibidor del FAP L-652.731 sólo logró una reducción del 15% aproximadamente (fig 3b).

La inyección intraarterial de un bolo de FAP, 75 ng/kg, provocó una neutropenia de más del 90% en 30 segundos, de muy lenta recuperación, ya que se mantuvo por debajo del 50% al menos durante 2 minutos (fig 4).

El tratamiento con SSMP, 100 mg/kg, redujo la neutropenia levemente, pero la cifra de PMN volvió a la normalidad en los 2 minutos posteriores a la inyección. El SSMP a 250 mg/kg impidió por completo la neutropenia (fig. 4a), lo que también logró el L-652.731.

Como control interno de los ensayos *in vivo* algunos animales se perfundieron con las soluciones solventes de los principios activos administrados y con SSMP. La especificidad de los resultados aportados se comprobó tras observar que la administración de SSF mas BSA 0,25%, PBS a pH 8, DMSO, plasma autólogo y SSMP (250 mg/kg), en las condiciones correspondientes a los ensayos respectivos no produjeron variaciones apreciables de las cifras de PMN (datos no mostrados).

ENSAYOS IN VITRO

En la fig. 5a se muestran las curvas de agregación producidas por el agregómetro al ensayar suspensiones de

PMN, con y sin SSMP a diversas dosis, frente a FMLP. El FMLP provocó una rápida agregación bimodal. Puede apreciarse una evidente reducción de la capacidad agregante del FMLP cuando los PMN se han incubado previamente con el corticosteroide.

El análisis estadístico e los resultados mostró una clara respuesta dependiente de la dosis de SSMP (fig 5b).

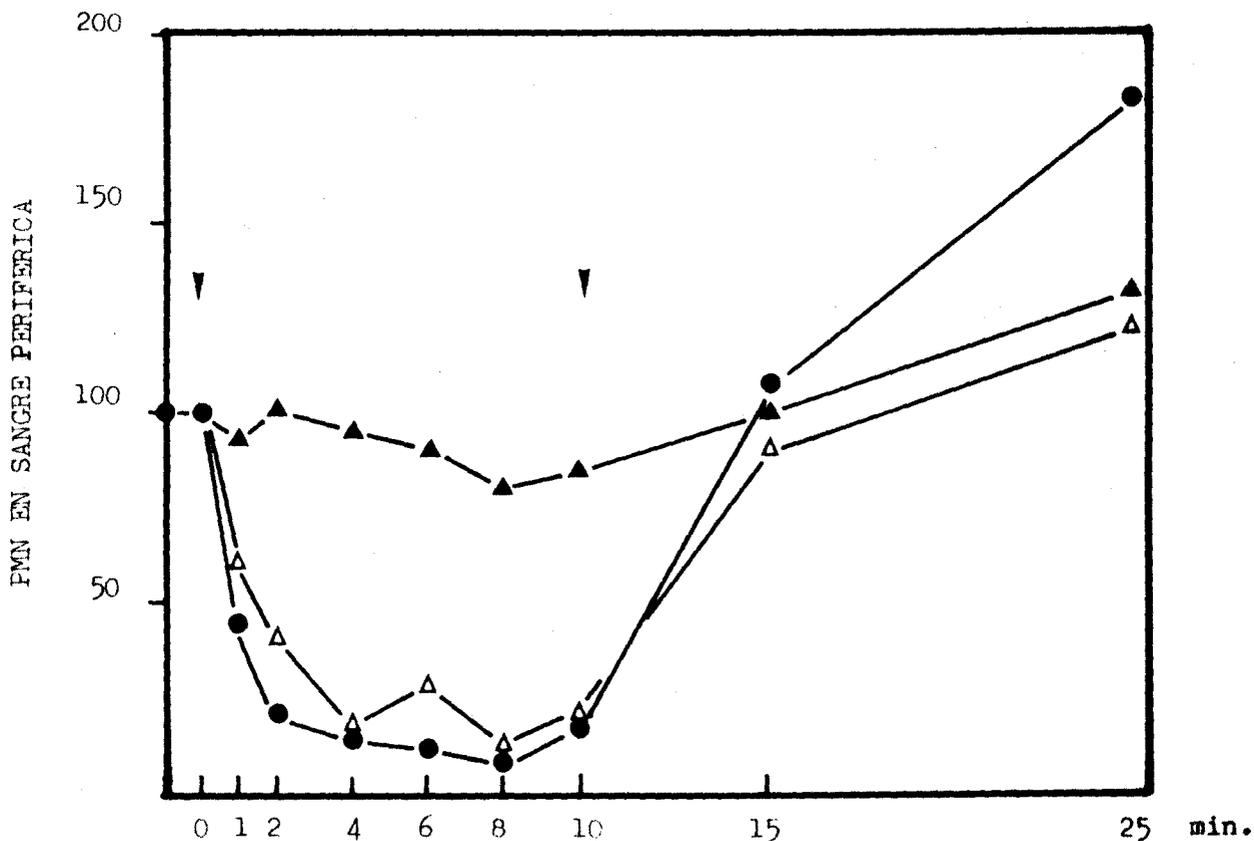


FIGURA 1a

Efecto del tratamiento previo del conejo con dos dosis de SSMP sobre la neutropenia inducida por PAZ. Las gráficas representan los valores medios de 5 experimentos. Las flechas indican el comienzo (izquierda) y el final (derecha) de la perfusión de 10 ml de PAZ a una velocidad de 1 ml/min. Los valores se han calculado como porcentaje de la cifra inicial de PMN. Sin tratamiento previo (●—●); 100 mg/kg de SSMP (Δ—Δ); 250 mg/kg de SSMP (▲—▲).

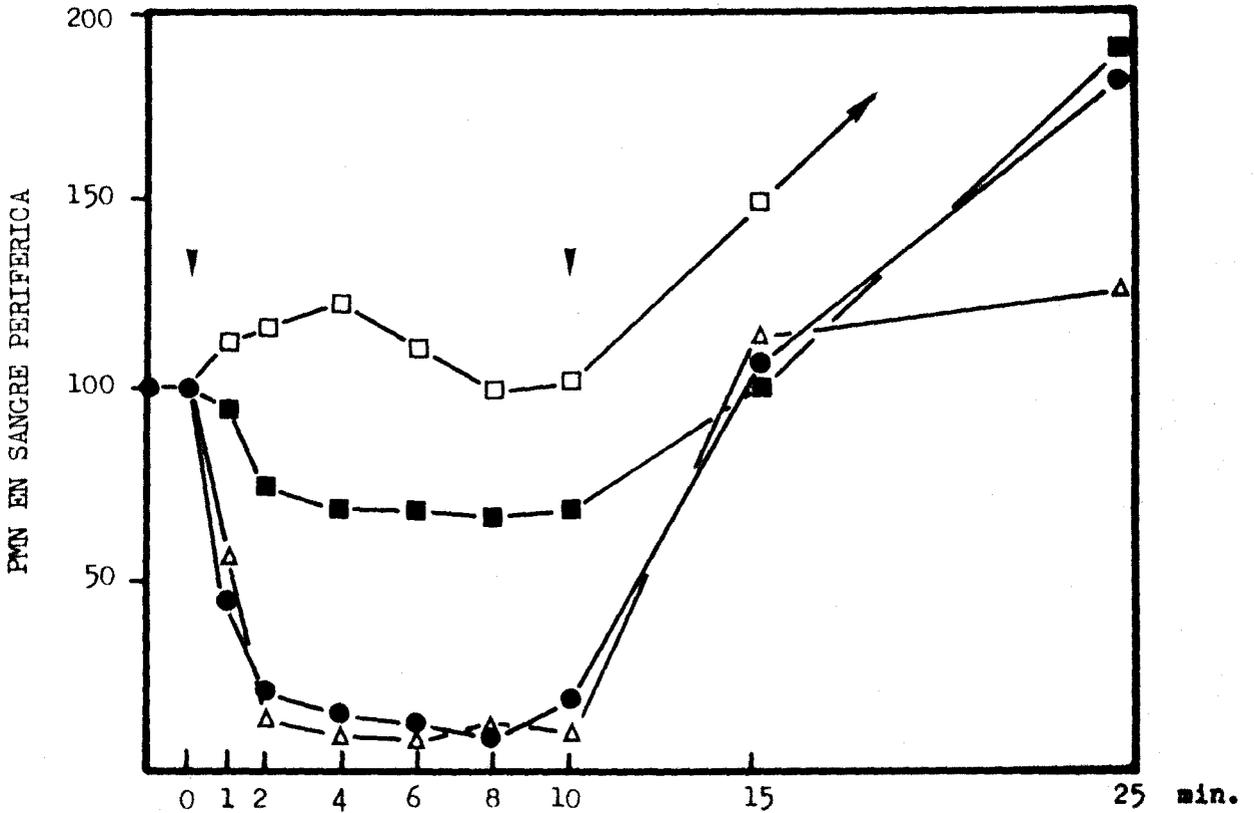


FIGURA 1b

Efecto de la incubación de los plasmas con SSMP, antes y después de la activación con Zymosán, sobre la neutropenia dependiente de PAZ. Las gráficas representan los valores medios de 5 experimentos. Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de los plasmas a una velocidad de 10 ml/min. PAZ (●—●); PCZ (plasma con adición de SSMP, 6 mg/ml (■—■) y 12 mg/ml (□—□), antes de ser incubado con zymosán); PAZ-C (plasma activado con zymosán al que posteriormente se incubó con SSMP 12 mg/ml (Δ—Δ)). Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN.

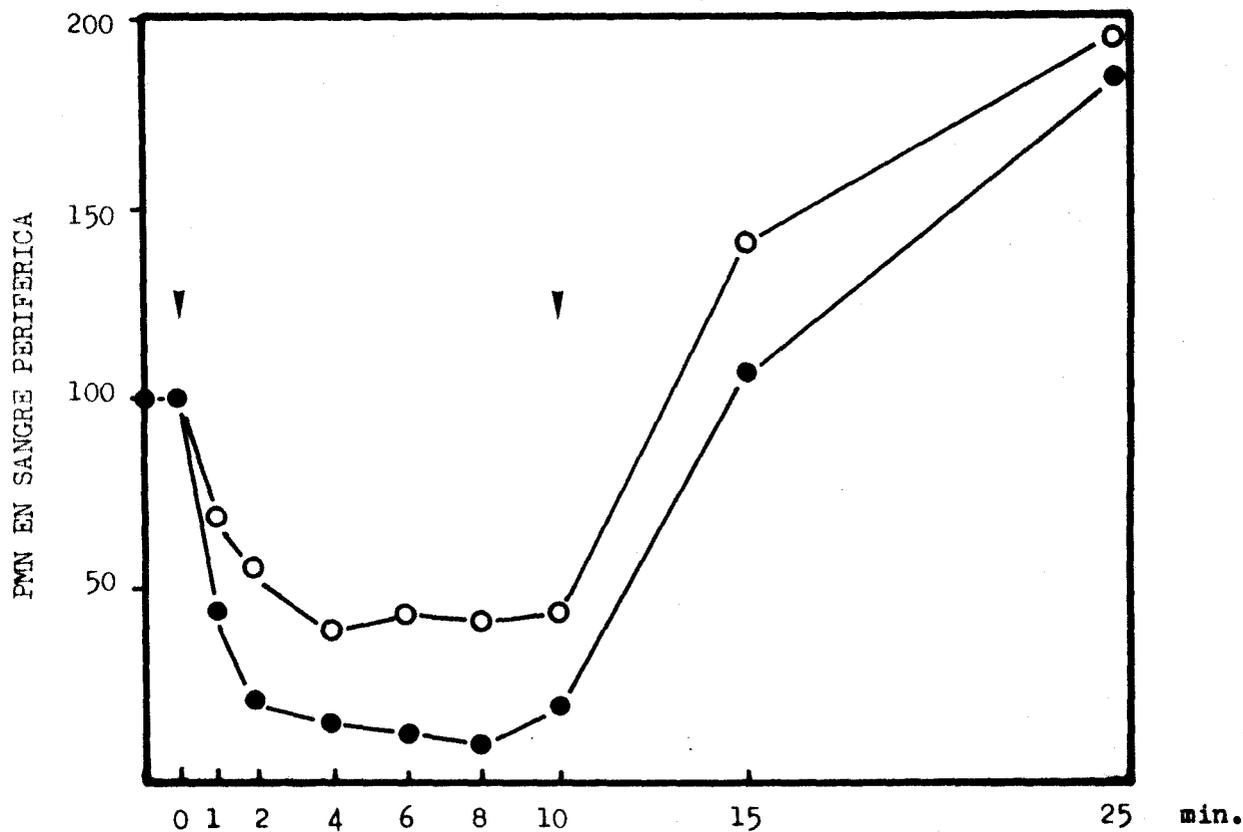


FIGURA 2a

Efecto del tratamiento con quinacrina sobre la neutropenia inducida por PAZ. Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de PAZ, 10 ml a 1 ml/min. Control (●—●); quinacrina 1,25 mg/kg (○—○). Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. Los resultados del tratamiento con quinacrina son los de un experimento representativo.

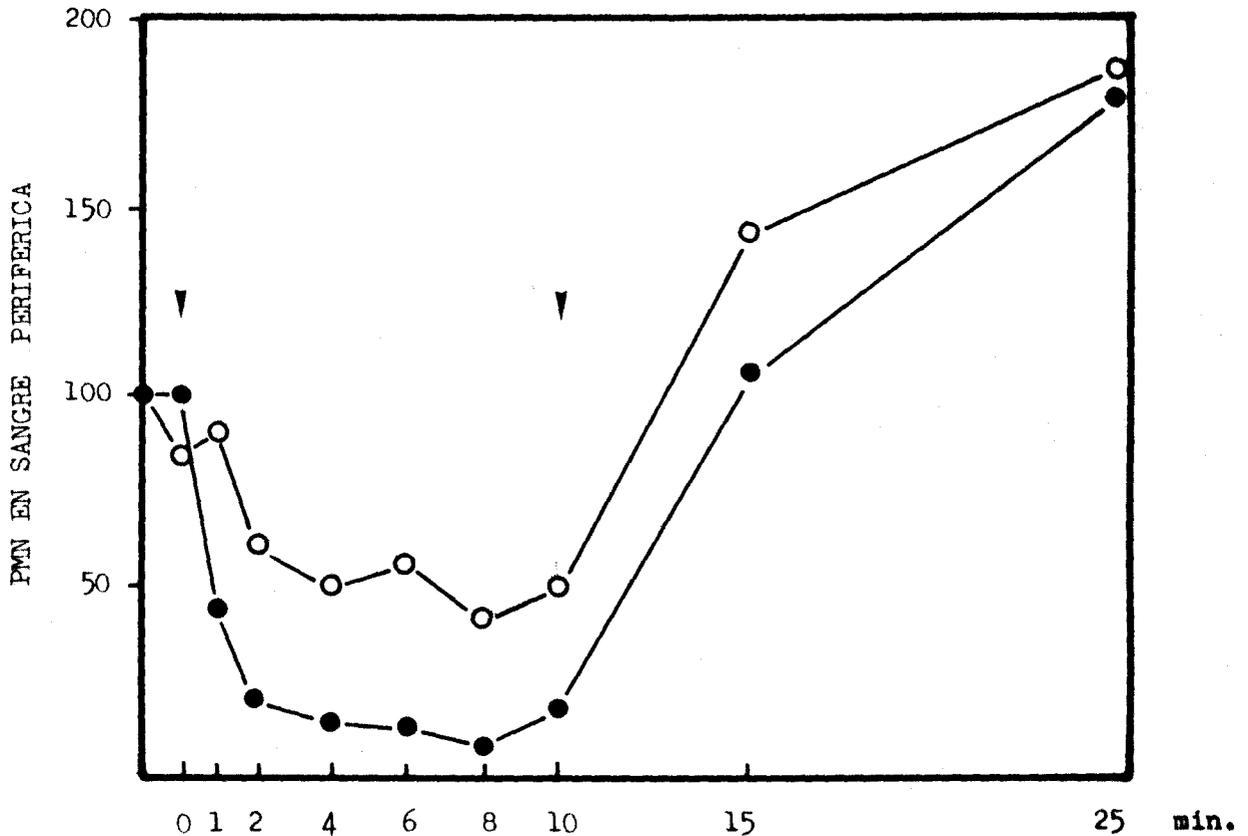


FIGURA 2b

Efecto del tratamiento del conejo con el inhibidor del FAP L-652.731 sobre la neutropenia inducida por el PAZ. Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de 10 ml de PAZ a 1 ml/min. Control sin tratamiento (●—●); L-652.731, 160 μ l/kg de una solución 100 mM, (○—○). Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. La gráfica de L-652.731 muestra los resultados de un experimento significativo.

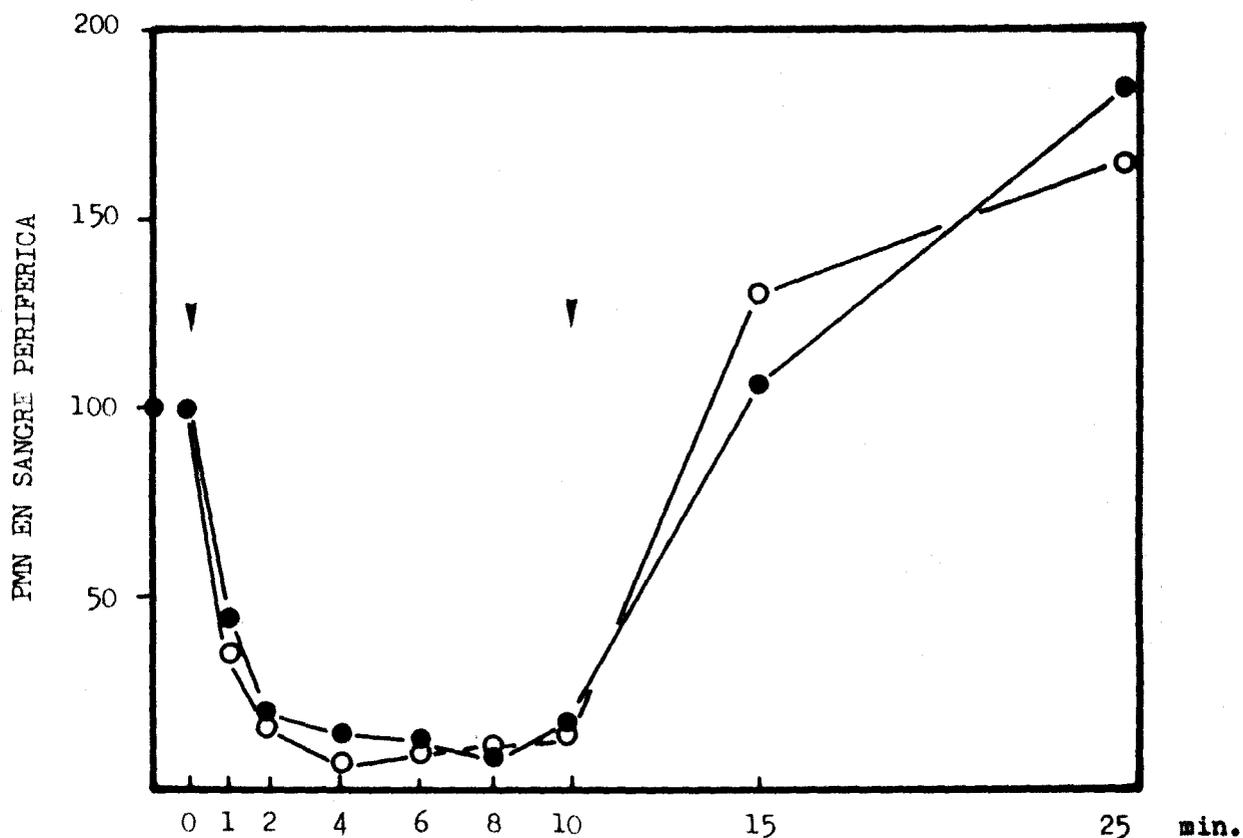


FIGURA 2c

Efecto del tratamiento previo del conejo con colchicina sobre la neutropenia inducida por el PAZ. Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de 10 ml de PAZ a 1 ml/min. Control sin tratamiento (●—●); quinacrina 120 µg/kg (○—○). Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. Las gráficas muestran los valores medios de 5 experimentos.

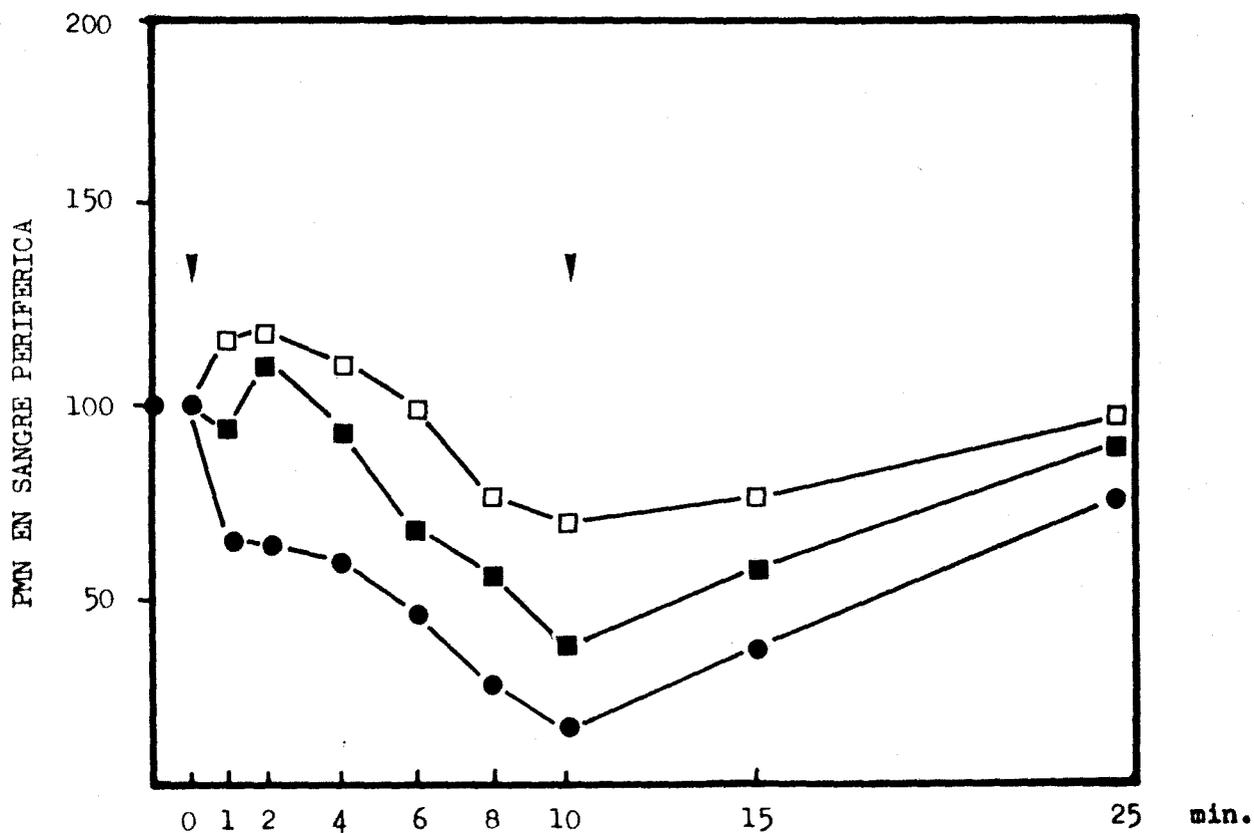


FIGURA 3a

Efecto del tratamiento previo del conejo con dos dosis de SSMP sobre la neutropenia inducida por IC. Las gráficas representan los valores medios de 5 experimentos. Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de la suspensión de IC. Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. Sin tratamiento previo (●—●); 100 mg/kg de SSMP (■—■); 250 mg/kg de SSMP (□—□).

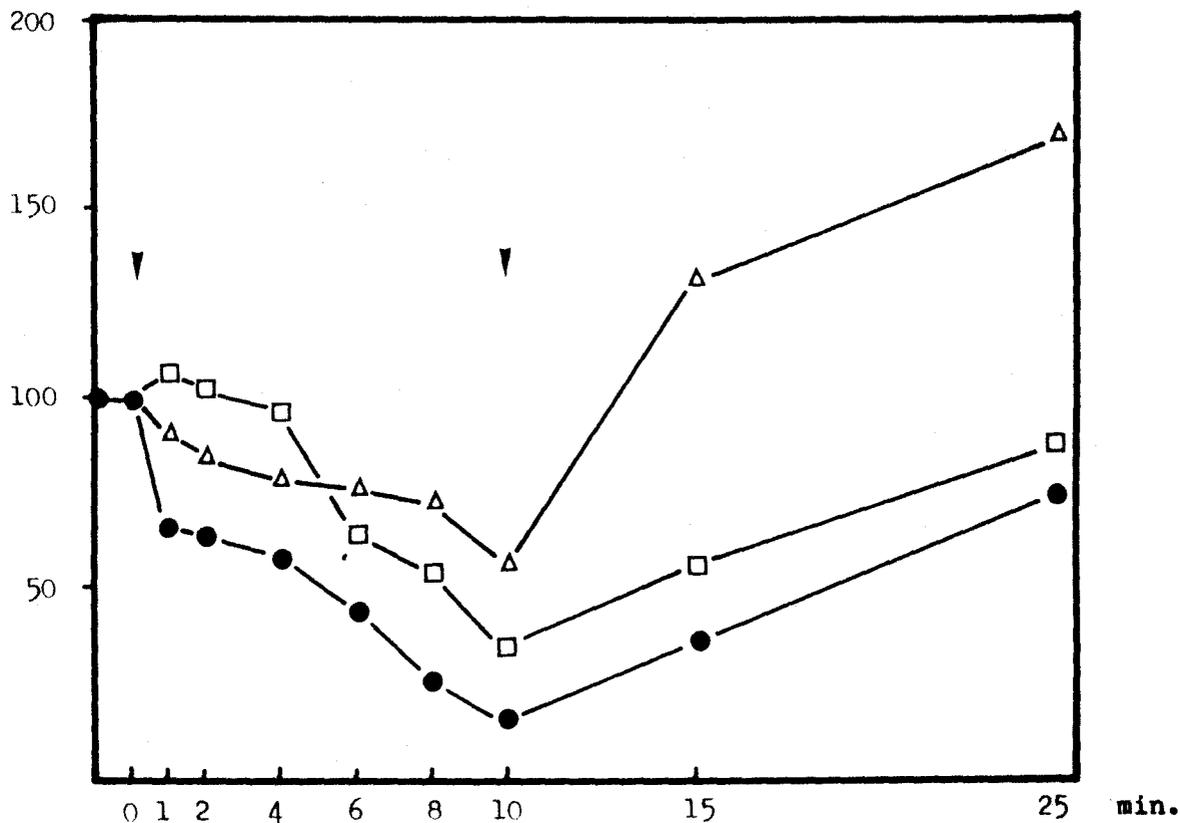


FIGURA 3b

Efecto del tratamiento previo del conejo con quinacrina e inhibidor del FAP L-652.731 sobre la neutropenia inducida por IC. Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. Las gráficas representan los valores medios de 5 experimentos. Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de la suspensión de IC. Sin tratamiento (●—●); quinacrina 1,25 mg/kg (Δ—Δ); L-652.731, 160 μ l/kg de una solución 100 mM. □—□

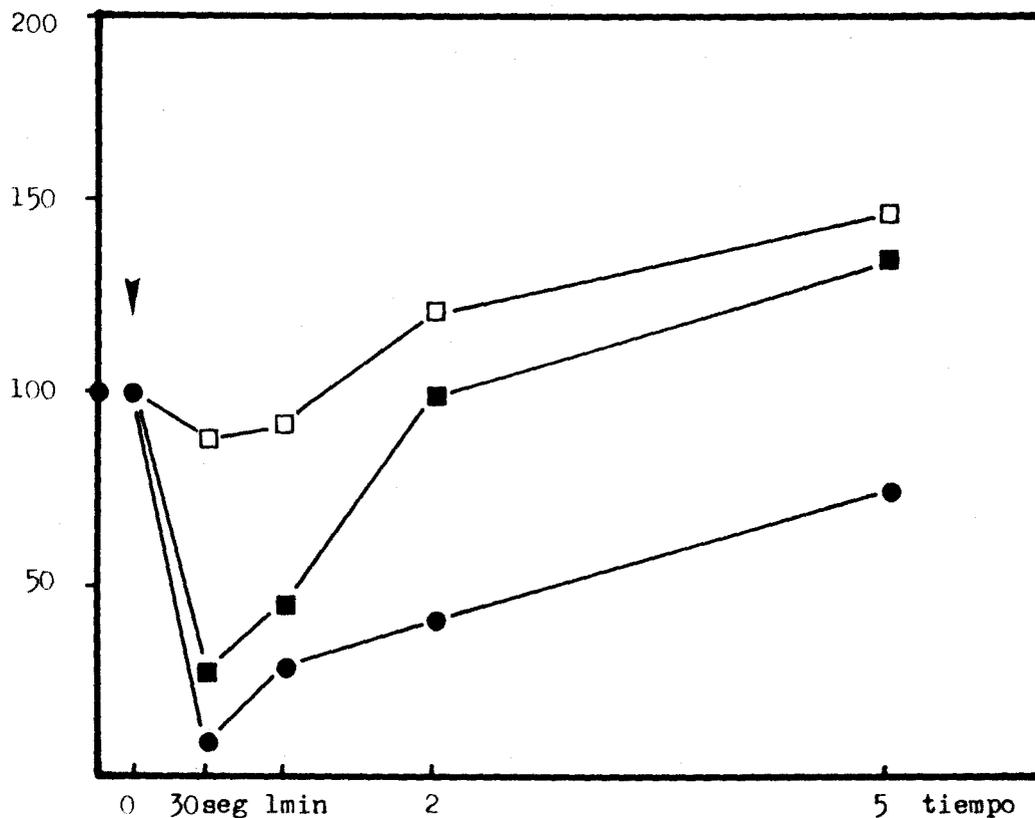


FIGURA 4a

Efecto del tratamiento previo del conejo con dos dosis de SSMP sobre la neutropenia inducida por el FAP. Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. Las gráficas representan los valores medios de 5 experimentos. La flecha indica el momento de la inyección de 75 ng/kg de FAP. Sin tratamiento previo (●—●); SSMP 100 mg/kg (■—■); SSMP 250 mg/kg (□—□).

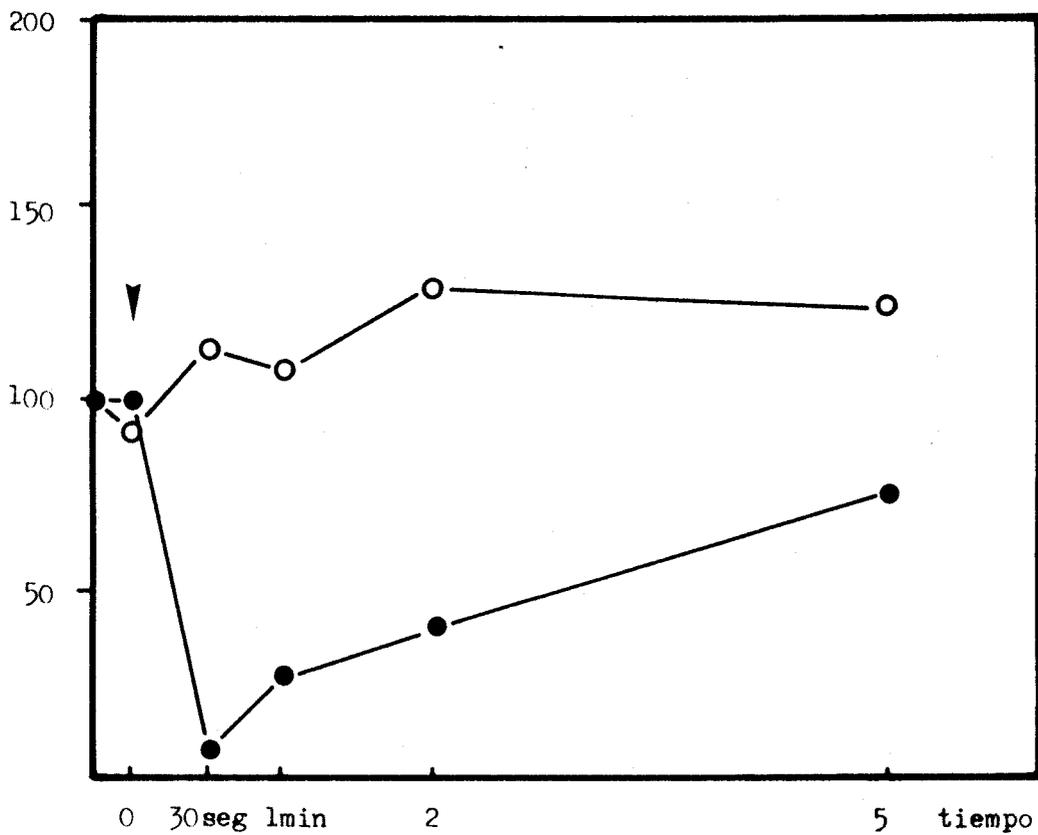


FIGURA 4b

Efecto del tratamiento previo del conejo con el inhibidor del FAP L-652.731 sobre la neutropenia inducida por el FAP. La flecha indica el momento de la inyección de 75 ng/kg de FAP. Los valores se han calculado como porcentajes de la cifra inicial de PMN. Las gráficas representan los valores medios de 5 experimentos. Sin tratamiento previo (●—●); L-652.731, 160 µl/kg de una solución 100 mM (○—○).

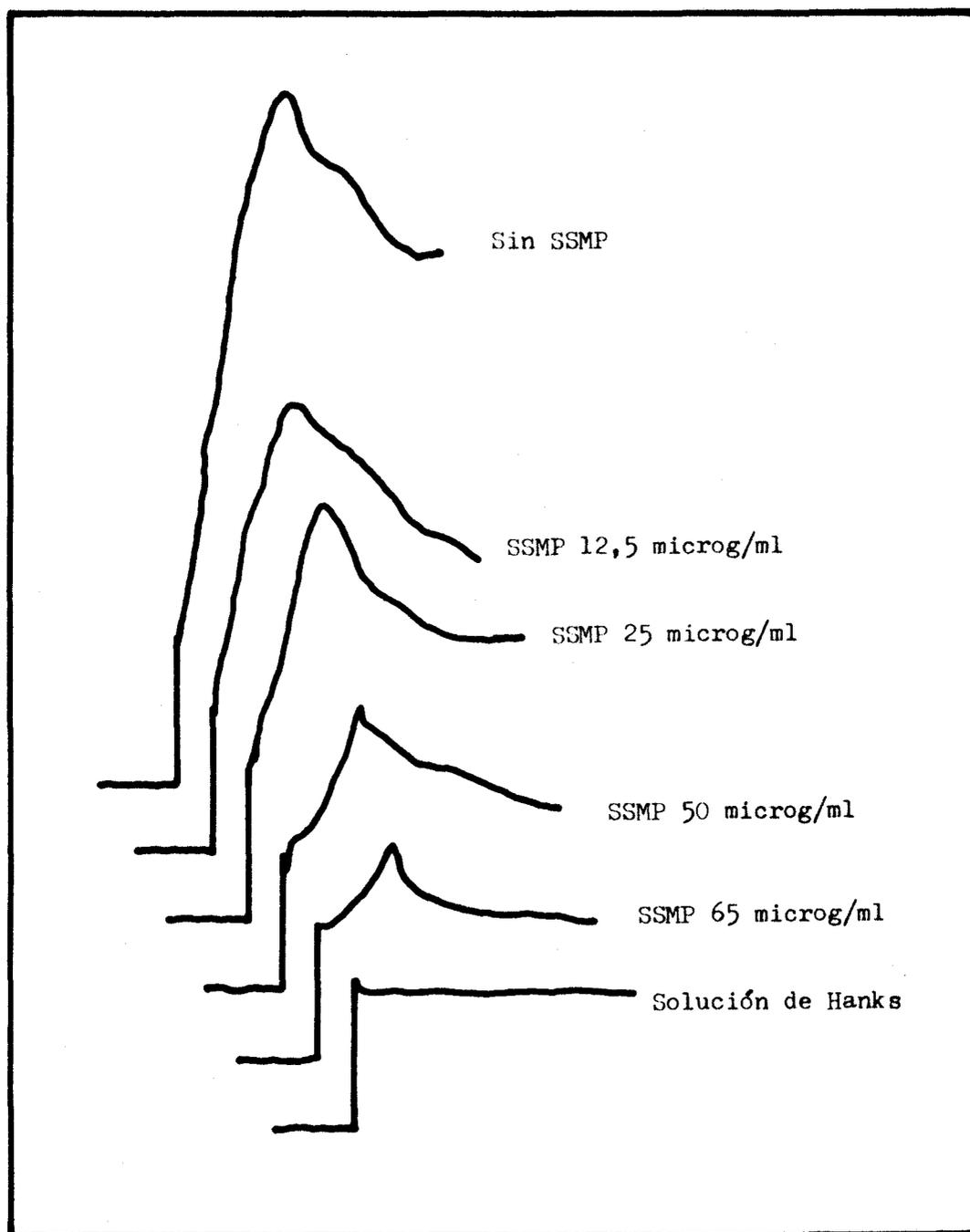


FIGURA 5a

Efecto del SSMP sobre la agregación *in vitro* de PMN inducida por FMLP: dependencia de dosis. Las líneas son recreaciones de trazados auténticos realizados por el registrador del agregómetro. La figura muestra los resultados de una serie de ensayos consecutivos en los que se utilizaron los PMN de un solo animal de experimentación. El tiempo total de registro fue de 3 minutos. El estímulo utilizado fue FMLP 1 μ M.

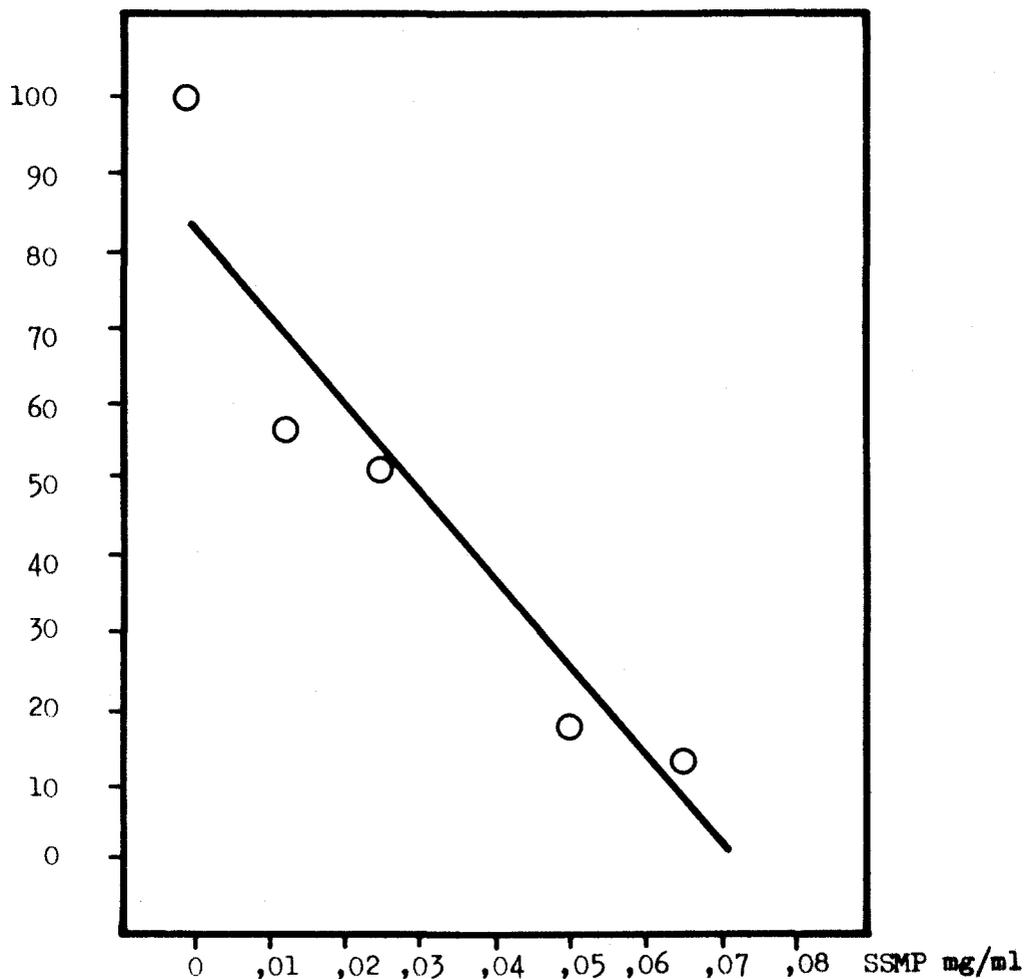


FIGURA 5b

Regresión lineal de los resultados obtenidos en los ensayos de dosis-respuesta de agregación de PMN inducida *in vitro* por FMLP; efecto de distintas dosis de SSMP. Cada punto representa el valor medio de 3 experimentos, y se ha calculado como porcentaje de la curva trazada por el inscriptor del agregómetro en ausencia de SSMP en cada uno de los 3 ensayos. En estas series se utilizó FMLP a concentración 1 μ M.

DISCUSIÓN

El método que hemos empleado para valorar cuantitativamente la agregación es el de la desaparición de los PMN de la circulación periférica. Es evidente que este método no mide directamente la agregación de los PMN, pero puede asumirse que es un indicador fiable de la agregación de estas células. Como hemos visto, el C5a (producido por nosotros por incubación del plasma con Zymosán) induce una agregación intravascular de los PMN que forman así cuerpos de mayor volumen que quedan atrapados en los lechos capilares, principalmente en el pulmón. Creemos que nuestro método reproduce esta situación concreta, existiendo un cuerpo de investigación suficiente que permite omitir el estudio anatomopatológico de confirmación (55, 57, 66, 70, 74, 79, 84, 104). El nuestro es de todas formas una adaptación de métodos previamente descritos (55), habiéndose diseñado otros más sofisticados para la valoración clínica experimental de la leucostasis en el shock mediante la reinfusión de leucocitos marcados con ^{111}In , pero basados también en la desaparición de los PMN de la circulación periférica (70). El único sistema de valoración directa *in vivo* de la agregación que se ha puesto en práctica es un complicado método de microscopía de fluorescencia intravital con iluminación láser (83) que, si bien hace posible ver los agregados celulares, permite mucha subjetividad en la cuantificación de la agregación. Por otra parte, el lugar de atrapamiento de los agregados de PMN no es importante aquí. Pensamos que en circunstancias que impliquen la activación *in vivo* de la cadena del C (infusión de veneno de cobra, pancreatitis, traumatismo, etc) no es exclusivamente el lecho capilar pulmonar el lugar de formación de los leucoémbolos, pero este territorio vascular es el primer obstáculo que encuentran

los PMN activados por un factor proagregante que es infundido en la circulación venosa.

El establecimiento en experimentos *in vivo* de la dosis útil del compuesto a ensayar es un problema de difícil solución que necesita la medición de algún producto de la vía metabólica sobre la que incide el compuesto activo que ensayamos. Esto no ha sido posible en nuestro caso, teniendo que realizar aproximaciones más simples. En el caso de la colchicina y de la quinacrina hemos utilizado como dosis máxima aquella que permitió la supervivencia del 90% de la población total de animales tratados con estas drogas, dosis que hemos calificado de "subletales", a sabiendas que, en algunos casos, letalidad y eficacia biológica no se corresponden. Esto es particularmente cierto en el caso de la colchicina cuya dosis necesaria para reducir en un 70% la reacción inflamatoria dependiente de cristales de urato en el ratón produce una mortalidad de la población de los animales de experimentación de un 60% (105). Nuestros resultados con este compuesto deben valorarse teniendo en cuenta este factor. En el caso del inhibidor experimental del FAP L-652.731 la situación es aún más difícil ya que no existen pautas experimentales previas publicadas. Hemos utilizado la dosis de 160 $\mu\text{l}/\text{kg}$ de una solución 100 mM por haber comprobado que esta dosis impidió completamente la agregación provocada por la dosis de FAP sintético utilizada previamente, presumiendo que la cantidad de FAP endógeno posiblemente generado durante la perfusión del ZAP y de la solución de IC no fuese superior. Hay que tener en cuenta en este caso que los compuestos sintéticos de FAP son algo menos activos que sus análogos naturales a igualdad de dosis.

La infusión de PAZ produjo en nuestros animales de experimentación una desaparición brusca de los PMN de la circulación periférica. La neutropenia se mantuvo durante todo el tiempo que duró la perfusión, siguiéndose de

neutrofilia al finalizar ésta. La morfología de la curva de neutropenia obtenida por nosotros así como el desarrollo cronológico de la misma es similar a la obtenida por otros autores (55, 62, 104, 106) que han usado tanto PAZ como plasma activado con el celofán de los dializadores. No existe una explicación clara para la neutrofilia final post-perfusión. Podría aducirse la razón de que una vez cesado el estímulo proagregante del C5a revirtiera la agregación, con lo que aumentaría de nuevo el número de PMN pero, además, al hacerse éstos menos adherentes, se desprenderían del endotelio capilar volviendo a la circulación, fenómeno conocido como "demarginación". Recordemos que cuando un PMN se hace más adherente se vuelve más adherente para cualquier superficie, incluyendo otros leucocitos (107), lo que nos lleva a la conclusión de que la neutropenia no es sólo debida a la agregación sino también a la marginación de estas células.

El tratamiento previo de los conejos con quinacrina, inhibidor de la fosfolipasa A₂, a dosis suficiente para inhibir la vasopermeabilidad dependiente de FAP en el ratón (89), y con el compuesto anti-FAP L-652.731 a dosis que impidieron por completo la agregación de los PMN inducida por el FAP redujeron en un 30% la agregación de PMN dependiente de PAZ. Consideramos que estos resultados sugieren la existencia de una generación concomitante de FAP, y de otros metabolitos derivados del ácido araquidónico. Esto está de acuerdo con lo publicado por otros autores (108) los cuales comprobaron efectivamente que la perfusión de C5a provoca en el animal de experimentación un aumento de las cifras de FAP, y apoya la hipótesis de que el FAP es un mediador común de la neutropenia inducida por C5a e IC (99, 100), aunque no completamente. Efectivamente, lo incompleto de la inhibición producida por la quinacrina y el L-652.731 indicaría una participación de éstas vías metabólicas, pero no que sus

productos sean los mediadores exclusivos de la agregación de PMN dependiente de C5a. Debemos advertir que el compuesto inhibidor del FAP que nosotros hemos usado es un producto en fase experimental, aún no comercializado, que nos ha sido cedido por el Dr. Chabala de MS & D. Existen otras sustancias anti-FAP actualmente en periodo de prueba. La forma de actuación de la mayoría de ellas permanece todavía sin dilucidar por completo. El L-652.731 no es un análogo del FAP en su estructura*, y su actuación es debida al parecer a una competición por el receptor celular. La actividad del compuesto no está normalizada, debiendo establecerse la de cada lote por separado. Ignoramos la intensidad de la acción de las otras sustancias.

No encontramos argumentación clara para explicar la igualdad de acción de la quinacrina y el L-652.731. Teóricamente, la completa inhibición de la fosfolipasa A_2 impediría no sólo la formación de liso-FAP (67), precursor inactivo del FAP, a partir de los fosfolípidos esterificados de la membrana plasmática, sino también la formación de ácido araquidónico, para lo que es necesaria la misma enzima. En el PMN el ácido araquidónico es metabolizado por la vía de la lipooxigenasa hasta leucotrieno A_4 y, por medio de una hidrolasa, hasta leucotrieno B_4 (88, 100). Siendo a su vez estimulada la síntesis de este último compuesto por el mismo FAP (110, 111). El leucotrieno B_4 se sintetiza además en los macrófagos y posee una potente capacidad quimiotáctica y proadherente de PMN (112). Si efectivamente existe una activación de la fosfolipasa A_2 dependiente de C5a sería lógico pensar que

* El L-652.731 tiene por fórmula (dl)-2,5-bis(3,4,5-trimetoxifenil) tetrahidrofurano ($C_{22}H_{26}O_7$), de Pm 404,46. Muy poco soluble en agua (0,007 mg/ml) pero si muy soluble en DMSO.

no sólo aumentaría la síntesis de FAP, sino también la de los derivados del ácido araquidónico -al menos, esto es cierto para la vía de la ciclooxigenasa⁽¹¹³⁾-, con lo que existiría una sinergia de los efectos agregantes de ambos compuestos. El efecto antiagregante de la inhibición completa de la fosfolipasa A₂ sería mayor que el obtenido por el bloqueo del FAP. Esto no es así, a juzgar por nuestros resultados, apreciándose la similitud de ambos efectos. Debemos referir aquí que nuestros intentos de reducir la agregación *in vivo* inducida por el PAZ por medio del inhibidor de los leucotrienos dietilcarbamazina han resultado hasta el momento infructuosos (datos no mostrados).

El inhibidor del FAP L-652.731 a la dosis utilizada por nosotros es capaz de bloquear por completo la agregación provocada por la dosis mínima de FAP capaz de inducir una agregación igual a la que producirían dosis mayores de este compuesto. Es de suponer que la generación endógena de FAP dependiente de C5a en las condiciones de nuestro experimento no supera cuantitativamente la dosis del compuesto sintético administrado por nosotros, por lo que presumimos que 160 µl/kg de L-652.731 100 mM es capaz de bloquear todo el FAP generado durante la perfusión del PAZ en estas condiciones, a pesar de ello sólo, se logra una moderada reducción de la neutropenia. No obstante, pensamos que el efecto más importante del bloqueo del FAP por el L-652.731 no es tanto esta reducción en sí como el retraso de la aparición de la neutropenia máxima, que sólo se logró, en todos los ensayos realizados con este compuesto, a los 8 minutos de la perfusión de PAZ, cuando el desarrollo de la neutropenia dependiente de éste se completa casi a los 2 minutos de la perfusión. Unos resultados similares, aunque menos evidentes, se obtuvieron con la quinacrina. Con esta droga, la neutropenia máxima se logró a los 4 minutos.

Estos resultados indicarían, como hemos dicho, la participación de otros factores agregantes generados por el C5a, sobre todo del FAP pero, a la vez, confirman la capacidad agregante que posee el C5a por sí mismo.

La configuración de la curva de agregación de PMN inducida por los IC es diferente a la que se obtiene con el PAZ. La neutropenia se desarrolla casi homogéneamente durante todo el tiempo de la perfusión. Está demostrada la generación de C5a⁽¹¹³⁾ y de FAP^(33,33,114) por la acción de los IC. Al parecer, la producción del primero se realiza por medio de la activación de tanto la vía alterna como de la clásica⁽¹¹⁵⁾, mientras que poco se sabe del proceso de formación del segundo. Según trabajos publicados anteriormente y realizados con IC, la liberación de FAP puede ocurrir *in vivo* cuando algunas células del sistema mononuclear fagocítico se estimulan adecuadamente con sustancias fagocitables. Por otra parte, el FAP parece ser un mediador de la vasopermeabilidad que provoca la administración de IC a ratones⁽³³⁾ y de la agregación de PMN IC-dependiente ^(33,33). Nuestros resultados están hasta cierto punto de acuerdo con estas afirmaciones. El tratamiento con el inhibidor del FAP L-652.731 determinó una reducción de la neutropenia dependiente de IC de un 25% de su valor máximo a los 10 minutos pero, además, la neutropenia no se desarrolló desde el comienzo de la inyección, sino sólo a partir de los 4 minutos. Por el contrario, la quinacrina redujo la neutropenia en un 50%, aunque no se apreció retraso alguno en su desarrollo.

Según estos datos, parece ser que, ante el estímulo de los IC *in vivo*, existe una producción endógena de FAP, y que éste es un mediador de la agregación de los PMN inducida por los IC, pero no debe ser el único, ya que es posible también la participación de otros metabolitos de la vía del araquidónico cuya generación se impediría por medio de la quinacrina. No obstante,

tampoco son estos compuestos provenientes de los fosfolípidos de membrana los mediadores exclusivos de la agregación de PMN, al contrario de lo que sucede con el incremento en el ratón de la vasopermeabilidad dependiente de IC. Pensamos que alguno de estos otros factores que intervienen en la agregación de PMN IC-dependiente pudieran provenir de la activación de la cadena del C, y que, por lo tanto, no pueden ser inhibidos completamente por quinacrina ni por L-652.731, lo que concordaría con los resultados obtenidos por nosotros con PAZ y estas drogas.

El efecto antiagregante de los corticosteroides se encuentra bien documentado^(33,32,33). El mecanismo de su actuación es oscuro, ya que su efecto inhibitorio se lleva a cabo frente a diversos estímulos, como el FMLP, el C5a, y el FAP con lo que difícilmente puede admitirse una interacción con un receptor específico. Por otra parte, los corticosteroides no impiden los cambios morfológicos del aspecto de los PMN cuando éstos se enfrentan al C5a⁽³⁴⁾.

El tratamiento de los animales de experimentación con dosis de 100 y 250 mg de SSMP 5 minutos antes de la perfusión con PAZ provocó una inhibición de la neutropenia dependiente de la dosis. Estos resultados concuerdan con los publicados anteriormente^(33,32,33). Además, el plasma tratado con SSMP (6 y 12 mg/ml) antes de la activación con zymosán no indujo neutropenia. Este efecto es también recogido por los autores citados, y puede descartarse una acción similar a la que provoca el tratamiento previo del animal de experimentación, ya que la dosis total de SSMP administrada sería de 60 y 120 mg respectivamente, cuando el mínimo efecto antiagregante del tratamiento previo del animal de experimentación sólo es notable con 100 mg/kg. Por otra parte, la adición al PAZ de 12 mg/ml de SSMP no modifica la neutropenia. Queda así demostrada la capacidad antagonista del SSMP frente a

la generación de los factores agregantes derivados del C y el efecto antiagregante cuando se administra, a dosis elevadas, antes de la perfusión de plasma rico en C5a.

Cuando el SSMP se administró a las mismas dosis antes de la infusión de una suspensión de IC se produjo una inhibición dosis-dependiente de la neutropenia. Al contrario de lo que ocurre con el PAZ, la inhibición no logró ser completa con 250 mg/kg. Sin embargo, esta dosis de SSMP fue capaz de revertir totalmente la neutropenia producida por el FAP.

Estos resultados no están a favor de nuestra hipótesis inicial que trataba de explicar la inhibición de la agregación de los PMN dependiente del C5a por los corticosteroides por la inhibición de la fosfolipasa A₂. Si esto fuera cierto, la agregación inducida por el FAP no debería verse impedida, ya que este compuesto supone un paso posterior a esta enzima. Esto sugiere más bien un efecto de los corticosteroides sobre los mecanismos celulares de la agregación. Por otra parte, el hecho de que el SSMP haya sido incapaz de impedir por completo la agregación inducida por los IC indica que éstos pueden determinar la generación de otros factores proagregantes distintos del C5a y del FAP o que la agregación de los PMN no es un hecho que se produzca mediante un mismo mecanismo sea cual sea el activador, o grupo de activadores, que incida sobre la célula.

Existe una cierta implicación clínica en estos resultados. Algunos autores⁽¹¹⁾ han razonado que la inhibición de la liberación de araquidónico es la base de los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides. Es evidente que inflamación no es igual a agregación, no obstante, el aumento de adhesividad de los PMN es un hecho común a los fenómenos inflamatorios. La agregación de los PMN tiene otros efectos aparte de los físicos derivados del enclavamiento en los lechos capilares, siendo los más importantes la liberación de radicales de

O_2^- ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) altamente tóxicos cuya generación *in vivo* parece independiente de los productos del ácido araquidónico⁽¹¹²⁾ y cuyos efectos *in vitro* pueden ser anulados mediante la adición de superóxido dismutasa y catalasa o hidrocortisona^(76,117). Por todo ello, es arriesgado pensar que los corticosteroides basen su efecto antiinflamatorio principalmente en la inhibición de los productos del araquidónico.

La dosis máxima de colchicina probada por nosotros (120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fue ineficaz para alterar la agregación de los PMN inducida por el PAZ.

La colchicina tiene un importante efecto antagonista de la agregación de los microtúbulos por su unión con la tubulina⁽¹⁰⁵⁾. Ya que el sistema de microtúbulos está implicado en la motilidad celular, se ha querido explicar a través de este efecto la acción de la droga en la artritis gotosa aunque, desde hace tiempo, este concepto se halla en discusión. Algunos autores han comprobado que la colchicina disminuye la capacidad de adhesión de los PMN a superficies extrañas, tales como fibras de nilón^(117,118). Nuestros resultados no confirman que la colchicina tenga capacidad antiagregante de los PMN *in vivo*, estando de acuerdo en cambio con lo publicado por otros⁽⁵⁷⁾, quienes comprobaron que concentraciones de esta droga entre 0,1 y 10 μM no afectaban la agregación de los PMN dependiente de C5a en un modelo de experimentación *in vitro*. Asumiendo un volumen sanguíneo de 350 ml en el animal de experimentación tipo, hemos logrado una concentración de colchicina de 0,9 μM , que está dentro del rango de las utilizadas en el trabajo citado y con la que, en éste, no se apreció efecto alguno, a pesar de ser una concentración a la que puede obtenerse un 90% de inhibición de la agregación de los microtúbulos⁽¹²⁰⁾. Por todo ello, parece dudoso el papel del sistema microtubular en el mecanismo de agregación de los PMN.

Para estudiar la capacidad antiagregante de los corticosteroides sobre los PMN estimulados por un factor no natural utilizamos un método nefelométrico similar al que se usa para valorar la agregación plaquetaria, y que ya ha sido descrito con anterioridad^(10,11). Puede apreciarse el efecto de dosis crecientes de SSMP sobre la agregación inducida por FMLP. Es evidente la inhibición dosis-dependiente que ejerce el corticosteroide.

El efecto agregante del FMLP ya ha sido comprobado y depende, como su efecto quimiotáctico, de la interacción del péptido con un receptor específico de membrana^(10,11). Pensamos que los resultados obtenidos por nosotros están a favor de la hipótesis de que los corticosteroides no ejercen su acción mediante competición con el agente agregante por el receptor ni por alteración de éste, sino por la intervención sobre el mecanismo celular que determina la agregación misma, ya que son capaces de inhibir los efectos de factores que poseen receptores distintos.

Nuestra hipótesis inicial al comenzar el presente trabajo suponía la existencia de un mediador entre el compuesto activo C5a y el efecto de agregación de los PMN, y que este mediador era el FAP. Los resultados de este estudio apoyan hasta cierto punto esta suposición pero, a su vez, no permiten aventurar que tal mediador sea un factor esencial entre la fracción 5a del complemento y su efecto agregante. La utilización de inhibidores de la fosfolipasa A₂ y del FAP en animales perfundidos con plasma rico en C5a nos ha permitido comprobar que efectivamente el FAP puede ser este factor intermedio, pero que su inhibición no impide por completo la agregación de PMN dependiente del C5a, lo que confirma la actividad agregante "per se" de éste.

Pensamos que las condiciones experimentales de nuestros ensayos reproducen con cierta fidelidad las de

un organismo que padece una patología que propicia la generación masiva intravascular de C5a. En estas condiciones, el FAP generado concomitantemente procede de distintas fuentes: PMN, macrófagos, plaquetas, basófilos, e incluso células del SRE⁽¹²²⁾. Todos estos tipos y sistemas celulares están implicados en la patogenia de entidades tales como el SDRA, por lo que pensamos que, en condiciones naturales, existe una producción de FAP dependiente de C5a que potencia la capacidad agregante de éste y al que presumimos le corresponde una parte importante en la responsabilidad de los acontecimientos fisiopatológicos posteriores. Los resultados del presente estudio concuerdan con este punto de vista.

El método por nosotros utilizado se ha revelado como un medio simple de comprobar los efectos agregantes que sobre los PMN poseen ciertos compuestos y el antagonismo que sobre éstos ejercen otros. Los resultados revelan un alto grado de reproducibilidad y el método ha permitido confirmar las dos formas de actuación de los corticosteroides sobre la agregación de los PMN inducida por el C5a: el efecto antagonista de la activación del complemento y la presumible actuación sobre el efector celular. Pensamos que este último efecto de los corticosteroides es un hecho real y que no depende de una interacción sobre el receptor, ya que estas drogas pueden impedir la agregación inducida por compuestos muy distintos que no comparten un mismo receptor: C5a, FAP, FMLP e IC.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo hemos empleado fracción 5a del complemento, inmunocomplejos y Factor Activador de las plaquetas para inducir *in vivo* agregación intravascular de los leucocitos polimorfonucleares del conejo. Tanto cuantitativamente como desde el punto de vista del desarrollo de la agregación, nuestro método, valoración de la desaparición de los polimorfonucleares de sangre periférica, ha aportado resultados comparables a los publicados por otros autores.

2. Según nuestros resultados, la agregación inducida por la fracción 5a del Complemento es impedida por el SSMP de dos formas distintas: en primer lugar, la incubación de los plasmas con SSMP antes de ser activados con Zymosán determina que la perfusión posterior del plasma al animal de experimentación no provoque agregación. En segundo lugar, el tratamiento del conejo con dosis masivas de SSMP impide la agregación que, en animales sin tratar, provoca el plasma activado con Zymosán. Los resultados obtenidos por nosotros, 100% de inhibición de la neutropenia, indican una anulación total del sistema.

3. La agregación provocada por el fracción 5a del Complemento es impedida de forma parcial por el inhibidor de la enzima fosfolipasa A₂ quinacrina a dosis subletales y por el inhibidor experimental del Factor Activador de las plaquetas L-652731. Cuantitativamente, ambos compuestos aportaron una reducción similar de la agregación ($\approx 30\%$ del valor máximo de neutropenia).

4. El SSMP, a altas dosis, es capaz de impedir *in vivo* la agregación producida por los inmunocomplejos. Esta inhibición es dosis-dependiente y no llega a ser

total incluso utilizando dosis que son capaces de impedir totalmente la agregación provocada por el Factor Activador de las plaquetas y la fracción 5a del Complemento.

5. La quinacrina y el L-652731 impiden la agregación provocada por los inmunocomplejos. Esta inhibición es sólo parcial y es más marcada con la quinacrina que con el inhibidor del Factor Activador de las plaquetas.

6. El SSMP, a altas dosis, impide de forma dosis-dependiente la agregación producida por el Factor Activador de las plaquetas. La inhibición total de la neutropenia se obtiene a las mismas dosis que las utilizadas con la fracción 5a.

7. *In vitro*, el SSMP impide de forma dosis-dependiente la agregación que es inducida por el FMLP.

8. De los datos aquí aportados se deduce que los productos de la activación de vías paralelas a la del ácido araquidónico participan en la agregación de los polimorfonucleares inducida por el fracción 5a del Complemento, como lo demuestra el hecho de que tal agregación se vea reducida por inhibidores del Factor Activador de las plaquetas y de la fosfolipasa A₂. Ambos compuestos inhiben la agregación de forma cuantitativamente similar. El hecho de que la inhibición sea sólo parcial indica que el Factor Activador de las plaquetas participa, pero no es un mediador esencial, en la agregación dependiente del fracción 5a del Complemento.

9. La agregación de polimorfonucleares puede ser un resultado común a varias vías biológicas distintas, aunque interactivas, como parece extraerse del hecho de que los corticosteroides inhiban sólo parcialmente la

agregación producida por los inmunocomplejos, aun utilizando dosis capaces de impedir totalmente la agregación dependiente de fracción 5a del Complemento y de Factor Activador de las plaquetas. Los datos de este estudio son de todas formas insuficientes para asegurar tal cosa ya que pudiera ser que los inmunocomplejos indujeran la formación de otros factores proagregantes, distintos al fracción 5a del Complemento y al Factor Activador de las plaquetas, cuyos efectos no pudieran ser anulados por los corticosteroides.

10. Los resultados del presente trabajo no confirman nuestra hipótesis de partida de que los corticosteroides impidan la agregación de los polimorfonucleares por medio exclusivamente del estímulo de inhibidores de la fosfolipasa A_2 , ya que también anulan la agregación dependiente del Factor Activador de las plaquetas, compuesto posterior a la activación de esta enzima.

11. Es probable que la acción de los corticosteroides se deba, además de a impedir la generación de factores agregantes de la vía del Complemento sérico, a su interacción con el efector celular. A favor de esto estaría el hecho de que también impidan la agregación de los polimorfonucleares en un sistema in vitro, exento de factores plasmáticos biológicos, y cuyo activador es el péptido sintético FMLP.

12. La agregación no parece poder explicarse por la acción de una vía determinada, sea la del fracción 5a del Complemento o la del Factor Activador de las plaquetas. De hecho, la inhibición del Factor Activador de las plaquetas y de la fosfolipasa A_2 mediante el L-652731 y la quinacrina respectivamente, en un sistema in vivo cuyo activador son los inmunocomplejos, no impide por completo

la agregación inducida por éstos. Era de esperar este hecho, ya que tales compuestos no anularían los efectos del fracción 5a del Complemento generado, tanto por la vía clásica como por la alternativa, durante la perfusión de los inmunocomplejos.

13. No ha sido objeto de nuestro estudio el dilucidar los mecanismos celulares de la agregación, pero la serie de ensayos *in vivo* con colchicina I.V. a altas dosis parecen sugerir que el sistema de microtúbulos no es el responsable, o al menos no es el único ni el más importante, de la agregación de polimorfonucleares.

14. Es clásica la utilización de los corticosteroides en situaciones patológicas que provoquen SDRA, en cuya patogenia está directamente implicada la agregación de polimorfonucleares. Esta práctica encuentra justificación escasa en los datos de este trabajo, ya que las dosis que nosotros hemos debido utilizar son enormes en comparación con las que se administran en humanos. De todas formas, hay que tener en cuenta la gran tolerancia natural a la mayoría de las drogas comunes que tiene el modelo animal que hemos empleado nosotros.

Por otra parte, es interesante valorar la posibilidad de incidir terapéuticamente sobre otro factor participante en la patogenia de la agregación de los polimorfonucleares, hecho capital en la producción de SDRA, y cuya existencia demostramos en este trabajo, como es la generación de Factor Activador de las plaquetas durante la activación *in vivo* de los polimorfonucleares por el fracción 5a del Complemento.

RESUMEN

Hay suficientes indicios para afirmar que la agregación de los PMN puede ser un hecho importante en la patogenia de entidades tales como el SDRA, el síndrome de Purtscher, el síndrome "de salida de bomba" que sucede tras la circulación extracorpórea o la disfunción pulmonar en la hemodiálisis. En estas patologías los agregados de PMN ocupan los lechos capilares, sobre todo pulmonares, determinando alteraciones locales y sistémicas.

Al parecer, en todos estos cuadros patológicos existe una generación masiva del componente 5a del C, un potente activador de los PMN. Estudios fraccionando el plasma de estos pacientes y trabajos experimentales con plasmas ricos en C5a han permitido comprobar que es éste el responsable de la agregación de los PMN y que ésta es a su vez la determinante de la aparición de los signos patológicos de estas enfermedades, ya que no acontecen en sujetos y animales de experimentación con deficiencias en algunos componentes del C o neutropénicos. A pesar de ello, es posible que el C5a no sea el único responsable de la agregación de los PMN o, al menos, que no sea el responsable directo. En este sentido, se ha comprobado la similitud que existe entre los efectos del C5a y los de un derivado fosfolipídico biológico: el FAP. El FAP se produce de forma natural en muchas circunstancias, algunas de las cuales provocan también la generación de C5a, lo que ha llevado a varios autores a suponer que es el factor intermedio existente entre el C5a y el desarrollo de agregación de los PMN. Como prueba indirecta se añade que los corticosteroides, de comprobada actividad antiagregante de los PMN y anticomplemento, hechos que pueden justificar su utilización en el SDRA, inducen la síntesis de un compuesto, de naturaleza aún no determinada, inhibidor de la fosfolipasa A₂, enzima

necesaria para la síntesis de FAP. Esta actividad justifica su eficacia terapéutica en las patologías en que se produce agregación de los PMN.

En este trabajo hemos tratado de establecer si existe una relación entre la generación de C5a y del FAP con respecto a la agregación de los PMN. Para ello hemos perfundido conejos con plasmas ricos en C5a, con suspensiones de IC y con FAP, con y sin tratamiento previo con metilprednisolona, el inhibidor de la fosfolipasa A₂ y el inhibidor del FAP L-652.731.

Los resultados de este trabajo demuestran que, efectivamente, el plasma activado con Zymosán, PAZ, provoca agregación de los PMN, por su contenido en C5a. La incubación del plasma con SSMP antes de añadir el Zymosán impide, de forma dosis-dependiente, la agregación de los PMN, lo que revela su acción antigeneradora de C5a, que se demuestra al permitir la agregación cuando la droga se añade al plasma después de la incubación con Zymosán. De la misma forma, el tratamiento con SSMP de un conejo al que se perfunde PAZ impide la agregación de los PMN. Este mismo efecto se aprecia cuando se utilizan IC o FAP. La acción antiagregante de los corticosteroides se hace evidente cuando se utilizan dosis muy altas de estas drogas (100-250 mg/kg).

El tratamiento del conejo con quinacrina impide sólo parcialmente la agregación de PMN inducida por el PAZ, al igual que hace el L-652.731, a dosis capaces de impedir totalmente la agregación dependiente de FAP. Los resultados son similares cuando se utiliza una suspensión de IC en vez de PAZ.

El SSMP impide también, de forma dosis-dependiente, la agregación de los PMN *in vitro* dependiente del péptido sintético FMLP.

De los datos aportados por nosotros puede deducirse que, como suponíamos, existe una generación de FAP cuando en un organismo se perfunde un plasma rico en C5a, y que

la agregación de los PMN que se produce depende efectivamente, hasta cierto punto, del FAP producido. No obstante, este compuesto no es el mediador exclusivo entre el C5a y la agregación de los PMN, dependiendo probablemente ésta de la acción directa de ambos compuestos. Comprobamos además que el FAP es un mediador importante en la agregación de PMN inducida por IC.

Por otra parte, constatamos que los corticosteroides tienen un efecto anticomplemento, pero posee además una actividad antiagregante directa, ya que impide la agregación inducida por factores muy distintos (C5a, FMLP y FAP). Su acción frente el FAP hace sospechar que la actividad antiagregante no se realiza mediante la inhibición de la fosfolipasa A₂, ya que el FAP supone un paso metabólico posterior a esta enzima.

BIBLIOGRAFIA

1. ATKINSON, J. P. y FRANK, M. M.: Complement, pp 219-271 en: Parker, Ch. W. ed. Clinical Immunology. Philadelphia, W. B. Saunders Co. 1980.

2. RAPP, H. J. y BORSOS, T.: Molecular basis of complement action. New York, Appleton-Century-Croft, 1970.

3. HUMPHREY, J. H. y WHITE, R. G.: Immunology for students of medicine. 3ª edición. Philadelphia, F. A. Davis Co., 1970.

4. MAYER M. M.: Complement and complement fixation, pp 133-240 en: Kabat, E. A. ed. Experimental Immunochemistry. Springfield, Charles C. Thomas Pub., 1961.

5. AGNELLO, V.; Complement deficiency states. Medicine 57: 1-23, 1978.

6. BORSOS, T.: Immunoglobulin classes and complement fixing, pp. 841-848 en: Progress in Immunology. New York, Academic Press Inc., 1971.

7. DORRINGTON, K. J. y PAINTER, R. H.: Functional domains of immunoglobulin G, pp. 74-96 en: Progress in Immunology. New York, American Elsevier Publishing Co. Inc., 1974.

8. ROSSE, W. F.; Fixation of the first component of complement by human antibodies. J. Clin. Invest. 47: 2430-2445, 1968.

9. REID, K.B.M., LOWE, D.M. y PORTER, R.R.; Isolation and characterization of C1q, a subcomponent of the first component of complement from human and rabbit sera.

Biochem. J. 130: 749-763, 1972.

10. BECKER, E.L.; Concerning the mechanism of complement action. II. The nature of the first component of guinea pig complement.

J. Immunol. 77: 469-478, 1956.

11. BUDZKO, D.B. y MULLER-EBERHARD, H.J.; Cleavage of the first component of human complement by C1 esterase: isolation and characterization of low molecular weight product.

Immunochem. 7: 227-236, 1970.

12. LEVY, L.R. y LEPOW, I.H.; Assay and properties of a serum inhibitor of C1 esterase.

J. Biol. Chem. 236: 1674-1679, 1961.

13. DONALDSON, V.H., y EVANS, R.R.; A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C'1 esterase.

Am. J. Med. 35: 37-44, 1963.

14. GIGLI, I. y AUSTEN, K.F.; Fluid phase destruction of C2^{EST} by C1^{EST}. I. Its enhancement and inhibition by homologous and heterologous C4.

J. Exp. Med. 129: 679-696, 1969.

15. POLLEY, M.J. y MULLER-EBERHARD, H.J.; The second component of human complement: its isolation, fragmentation by C'1 esterase, and incorporation into C'3 convertase.

J. Exp. Med. 128: 533-551, 1968.

16. MULLER-EBERHARD, H. J., DALMASSO, A. P. y CALCOTT, M. A.; The reaction mechanism of β_{1c} -globulin (C'3) in immune hemolysis.

J. Exp. Med. 123: 33-54, 1966.

17. COOPER, N. R. y MULLER-EBERHARD, H. J.; The reaction mechanism of human C5 in immune hemolysis.

J. Exp. Med. 132: 775-793, 1970.

18. SHIN, H. S., PICKERING, R. J. y MAYER, M. M.; The fifth component of the guinea pig complement system. II. Mechanism of SAC14235b formation and C5 consumption by EAC 1423.

J. Immunol. 106: 473-479, 1971

19. SHIN, H. S., PICKERING, R. J. y MAYER, M. M.; The fifth component of the guinea pig complement system. III. Dissociation and transfer of C5b, and the probable site of C5b fixation.

J. Immunol. 106: 480-493, 1971.

20. KOLB, W. P., HAXBY, J. A., ARROYAVE, C. M. y MULLER-EBERHARD, H. J.; Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement.

J. Exp. Med. 135: 549-566, 1972.

21. FRANK, M. M., RAPP, H. J. y BORSOS, T.; Studies of the terminal steps of immune hemolysis. II. Resolution of the E* transformation reaction into multiple steps.

J. Immunol. 94: 295-300, 1965.

22. PENSKY, J., HINZ, C. F., TODD, E. W., WEDGEWOOD, R. J., BOYER, J. T. y LEPOW, I. H.; Properties of highly purified human properdin.

J. Immunol. 100: 142-158, 1968.

23. SCHUR, P. H. y BECKER, E. L.; Pepsin digestion of rabbit and sheep antibodies. The effect on complement fixation .

J. Exp. Med. 118: 891-904, 1963.

24. SANDBERG, A. L. y OSLER, A. G.; Dual pathways of complement interaction with guinea pig immunoglobulins.

J. Immunol. 107: 1268-1273, 1971.

25. SNYDERMAN, R., GEWURZ, H., MERGENHAGEN, S. y JENSEN, J.; Effects of C4 depletion on the utilization of the terminal components of guinea pig complement by endotoxin.

Nature 231: 152-154, 1971.

26. MARCUS, R. L., SHIN, H. S. y MAYER, M. M.; An alternate complement pathway: C3 claving activity, not due to C4, 2a on endotoxic lipopolysaccharide after treatment with guinea pig serum; relation to properdin.

Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 1351-1354, 1971.

27. FRANK, M. M., MAY, J. E., GAITHER, T. y HELLMAN, L.; In vitro studies of complement function in sera of C4 deficient guinea pig.

J. Exp. Med. 134: 176-187, 1971.

28. ALPER, C. A., GOODOFISKY, I. y LEPOW, I. H.; The relationship of glycine rich B glycoprotein to factor B in the properdin system and to the cobra factor-binding protein of human serum.

J. Exp. Med. 137: 424-437, 1972.

29. FEARON, D. T., AUSTEN, K. F. y RUDDY, S.; Properdin factor D: characterization of its active site and isolation of the precursor form.

J. Exp. Med. 139: 355-366, 1974.

30. WHALEY, K. y RUDDY, S.; Modulation of C3b hemolytic activity by plasma protein distinct from C3b inactivator. Science 193: 1011-1013, 1976.

31. WHALEY, K. y RUDDY, S.; Modulation of the alternative complement pathway by β 1H globulin. J. Exp. Med. 144: 1147-1163, 1976.

32. WEILER, J. M., DAHA, M. D., AUSTEN, K. F. y FEARON, D. T.; Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β 1H. Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 3268-3272, 1976.

33. PANGBURN, M. K., SCHREIBER, R. D. y MULLER-HEBERHARD, H. J.; Human complement C3 inactivator: isolation characterization, and demonstration of an absolute cleavage of C3 and C4 in solution. J. Exp. Med. 146: 257-270, 1977.

34. PANGBURN, M. K. y MULLER-HEBERHARD, H. J.; Complement C3 convertase: cell surface restriction of β 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 2416-2420, 1978.

35. FEARON, D. T. y AUSTEN, K.; The alternative pathway of complement. A system for host resistance to microbial infection. N. Eng. J. Med. 303: 259-263, 1980.

36. FUJITA, T., GIGLI, I. y NUSSENZWEIG, V.; Human C4-binding protein. II. Role of proteolysis of C4 by C3b-inactivator. J. Exp. Med. 148: 1044-1051, 1978.

37. TAMURA, N. y NELSON, R. A.; Three naturally occurring inhibitors of components of complement in guinea pig and rabbit serum.

J. Immunol. 99: 582-589, 1967.

38. FIREMAN, P., ZUCHOWSKI, D. A. y TAYLOR, P. M.; Development of human complement system.

J. Immunol. 103: 25-31, 1969.

39. ALPER, C. A., JOHNSON, A. M., BIRTCH, A. G. y MOORE, F. D.; Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis.

Science 163: 286-288, 1969.

40. HALL, R. E. y COLTEN, H. R.; Cell free synthesis of the four component of guinea pig complement (C4): identification of a precursor of serum C4 (Pro-C4).

Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1707-1710, 1977.

41. COOPER, N. R., JENSEN, F. C., WELSCH, R. M. y OLDSTONE, M. B. A.; Lysis of RNA tumor virus by human serum: direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway.

J. Exp. Med. 144: 970-984, 1976.

42. DANIELS, C. A.; Neutralization of sensitized virus by the fourth component of complement.

Science 165: 508-509, 1969.

43. BOKISH, V. A., DIETRICH, M. P. y MULLER-EBERHARD, H. J.; Third component of complement (C3). Structural properties in relation to function.

Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 1989-1993, 1975.

44. MAYER, M. M.; Mechanism of cytotoxicity by complement.

Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2954-2958, 1972.

45. DUKOR, P. y HARTMANN, K. U.; Bound C3 as the second signal for B-cell activation.
Cell Immunol. 7: 349-356, 1973.

46. OCHS, H. D., JACKSON, C. G., HELLER, S. R. y WEDGEWOOD, R. J.; Defective response to a T-dependent antigen in C4 deficient guinea pig and its correction by addition of C4.
Fed. Proc. 37: 1477A, 1978.

47. KOOPMAN, W. J., SANDBERG, A. L., WAHL, S. M. y MERGENHAGEN, S. E.; Interaction of soluble C3 fragments with guinea pig lymphocytes. Comparison of effects of C3a, C3b, C3c and C3d on lymphokine production and lymphocyte proliferation.
J. Immunol. 117: 331-336, 1976.

48. HARTMANN, K. U. y BOKISH, V. A.; Stimulation of murine B lymphocytes by isolated C3b.
J. Exp. Med. 142: 600-610, 1975.

49. GOTZE, O., BIANCO, C. y COHN, Z. A.; The induction of macrophage spreading by factor B of the properdin system.
J. Immunol. 120: 1776A, 1977.

50. KOHLER, P. F. y MULLER-EBERHARD, H. J.; Metabolism of human C1q: studies in hypogammaglobulinemia, myeloma and systemic lupus erythematosus.
J. Clin. Invest. 51: 868-875, 1972.

51. ATKINSON, J. P., FISCHER, R. I., REINHARDT, R. y FRANK, M. M.; Reduced concentration of the first component of complement in hypogammaglobulinemia: correction by infusion of γ -globulin.
Clin. Immunol. Immunopathol. 9: 350-355, 1978.

52. MILLER, M. E. y GRANGER, R. G.; Serum complement-like opsonic activities in human, animal, vegetable, and proprietary milks.

Science 196: 1115-1117, 1977.

53. FRANK, M. M., GAITHER, T., ADKINSON, F., TERRY, W. D. y MAY, J. E.; Activation of the alternate complement pathway by human immunoglobulins.

J. Immunol. 116: 1733A, 1976.

54. KAPLOW, L. S., GOFFINET, J. A.; Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis.

JAMA 203: 1135-1137, 1968.

55. CRADDOCK, P. R., FEHR, J., BRIGHAM, K. L., KRONENBERG, R. S., JACOB, H. S.; Complement and leukocyte-mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis.

N. Engl. J. Med. 296: 769-774, 1977.

56. JENSEN, D. P., BRUBAKER, L. H., NOLPH, K. D., JOHNSON, C. A., NOTHUM, R. J.; Hemodialysis coil-induced transient neutropenia and overshoot neutrophilia in normal man.

Blood (1973); 41: 399-408.

57. CRADDOCK, P. R., HAMMERSCHMIDT, D. E.; MOLDOW, Ch. F., YAMADA, O., JACOB, H. S.; Granulocyte aggregation as a manifestation of membrane interactions with Complement: possible role in leukocyte margination, microvascular occlusion, and endothelial damage.

Sem. Hematol. 16: 140-147, 1979.

58. HAKIM, R. M., BREILLANT, J., LAZARUS, J. M., PORT, F. K.; Complement activation and hypersensitivity reactions to dialysis membranes.

N. Engl. J. Med. 311: 878-882, 1984.

59. HAMMERSCHMIDT, D. E., CRADDOCK, P. R., McCULLOGH, J., KRONENBERG, R. S., DALMASSO, A. P., JACOB, H. S.; Complement activation and pulmonary leukostasis during nylon fiber filtration leukaferesis. Blood 51: 721-730, 1978.

60. CHENOWETH, D. E., COOPER, S. W., HUGLI, T. E., STEWART, R. W., BLAKSTONE, E. H., KIRKLIN, J. W.; Complement activation during cardiopulmonary by-pass. N. Engl. J. Med. 497-502, 1981.

61. HAMMERSCHMIDT, D. E., STRONCEK, D. F., BOWERS, T. K.; Complement activation and neutropenia occurring during cardiopulmonary bypass. A possible mechanism for the protective effect of corticosteroids against 'post-perfusion lung'. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 81: 370-377, 1981.

62. GÓMEZ-FERNÁNDEZ, P., GUAJARDO, A. S., VICENTE, J. C., et alii; Cinética leucocitaria en la hemodiálisis: aumento de la agregación leucocitaria y de la actividad quimiotáctica del suero como factores etiológicos de la leucopenia intradialítica. Med. Clín. 82: 705-708, 1984.

63. GOLDSTEIN, J. M., CALA, D., RADIN, A., KAPLAN, H. B., HORN, J., RANSON, J.; Evidence of complement catabolism in acute pancreatitis. Am. J. Med. Sci. 275: 257-264, 1978.

64. CRADDOCK, P. R., HAMMERSCHMIDT, D. E.; WHITE, J. C., DALMASSO, A. P., JACOB, H. S.; Complement (C5a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. J. Clin. Invest. 60: 260-264, 1977.

65. WARD, P. A., NEWMAN, L. J.; A neutrophil chemotactic factor from human C'5.
J. Immunol. 102: 93-99, 1969.

66. JACOB, H. S., CRADDOCK, P. R., HAMMERSCHMIDT, D. E., MOLDOW, Ch. F.; Complement-induced granulocyte aggregation. An unsuspected mechanism of disease.
N. Engl. J. Med. 302: 789-794m, 1980.

67. GLITTER, K. A., YANNUZZI, L. A., SCHATZ, H.: Trauma, págs. 331-338 en Yannuzzi, L. A., Glitter, K. A. & Schatz, H. eds., The macula, a comprehensive text and atlas. Baltimore, Williams & Wilkins, 1979.

68. INKELES, D. M., WALSH, J. B.; Retinal fat emboli as a sequels to acute pancreatitis.
Am. J. Ophthalmol. 80: 935-938, 1975.

69. JACOB, H. S., GOLDSTEIN, I. M., SHAPIRO, I., WEISSMANN, G.; Sudden blindness in acute pancreatitis: a manifestation of complement (C)-induced retinal leukostasis?
Clin. Res. 26: 498 (abstract), 1978.

70. REDL, H., SCHLAG, G., HAMMERSCHMIDT, D. E.; Quantitative assessment of leukostasis in experimental hypovolemic-traumatic shock.
Acta Chir. Scand. 150: 113-117, 1984.

71. BALK, R., BONE, R.; El síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto
Clin. Med. N. Am. (ed. esp.) 3: 681-722, 1983.

72. WOLACH, B., COATES, T. D., HUGLI, T. E., BAEHNER, R. I., BOXER, L. A.; Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation via Complement in burn patients.

J. Lab. Clin. Med. 103: 284-293, 1984.

73. FEARON, D. T., RUDDY, S., SCHUR, P. H.; Activation of the properdin pathway of complement in patients with gram-negative bacteriemia.

N. Engl. J. Med. 292: 937-940, 1975.

74. OLSON, L. M., MOSS, G. S., BAUKUS, O., GUPTA, T. K. D.; The role of C5 in septic lung injury.

Ann. Surg. 202: 771-776, 1985.

75. HAMMERSCHMIDT, D. E.; WEAVER, L. J., HUDSON, L. D., CRADDOCK, P. R., JACOB, H. S.; Association of complement activation and elevated plasma C5a with adult respiratory distress syndrome: pathophysiological relevance and possible prognostic value.

Lancet 1: 947-949, 1986.

76. SACKS, T., MOLDOU, C. F., CRADDOCK, P. R., BOWERS, T. K., JACOB, H. S.; Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes: an in vivo model of immune vascular damage.

J. Clin. Invest. 61: 1161-1167, 1978.

77. CONGER, J. D., HAMMOND, W. S., ALFREY, A. C., CONTIGUGLIA, S. R., SATNAFORD, R. E., HUFFER, W. E.; Pulmonary calcification in chronic dialysis patients: Clinical and pathologic studies.

Ann. Intern. Med. 83: 330-336, 1975.

78. HAMMERSCHMIDT, D. E., GREENBERG, C. S., YAMADA, O., CRADDOCK, P. R., JACOB, H. S.; Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states.

J. Lab. Clin. Med. 98: 68-77, 1981.

79. JACOB, H. S.; Complement-mediated leucoembolization: A mechanism of tissue damage during extracorporeal perfusions, myocardial infarction and in shock. A review. Quart. J. Med. New Series LII: 289-296, 1983.

80. HAMMERSCHMIDT, D. E., FLYNN, P. J., COPPO, P. A., SKUBITZ, K. M., JACOB, H. S.; Synergy among agents inhibiting granulocyte aggregation. Inflammation 6: 169-176, 1982.

81. NICHOLSON, D. P.; Corticosteroides en el tratamiento del choque séptico y del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto. Clin. Med. N. Am. (ed. esp) 3: 715-722, 1983.

82. O'FLAHERTY, J. T., CRADDOCK, P. R., JACOB, H. S.; Mechanism of anti-complementary activity of corticosteroids in vivo: possible relevance in endotoxin shock. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154: 206-209, 1977.

83. HAMMERSCHMIDT, D. E.; WHITE, J. C., CRADDOCK, P. R., JACOB, H. S.; Corticosteroids inhibit Complement-induced granulocyte aggregation. A possible mechanism for their efficacy in shock states. J. Clin. Invest. 63: 798-803, 1979.

84. CHICK, T. W., GOLDBLUM, S. E., SMITH, N. D., et alii; Pneumococcal-induced pulmonary leukostasis and hemodynamic changes: role of complement and granulocytes. J. Lab. Clin. Med. 103: 180-192, 1984.

85. ROGERS JACOB, E., BONE, R. C.; Mediadores de la lesión en la sepsis pulmonar. Clin. Med. N. Am. (ed. esp.) 3: 699-714, 1983.

86. BENVENISTE, C. G., HENSON, P. M., COCHRANE, C. G.;
Leucocyte-dependent histamine release from rabbits
platelets. The role of IgE basophils and a platelet
activating factor.

J. Exp. Med. 136: 1359-1377, 1972.

87. SNYDER, F.; Chemical and biochemical aspects of
platelet activating factor: a novel class of acetylated
ether-linked choline-phospholipids.

Med. Res. Rev. 5: 107-140, 1985.

88. SANCHEZ-CRESPO, M., ALONSO, F., INARREA, P.,
CAMBRONERO, J. G.; ¿Qué es el factor activador de las
plaquetas?

Immunol. 3: 65-71, 1984.

89. INARREA, P., ALONSO, F., SANCHEZ-CRESPO, M.;
Platelet activating factor: an effector substance of the
vasopermeability changes induced by the infusion of immune
aggregates in the mouse.

Immunophar. 6: 7-14, 1983.

90. McMANUS, L. M., MORLEY, C. A., LEVINE, S. P., PINCKARD,
R. N.; Platelet activating factor (PAF) induced release of
platelet factor 4 (PF4) in vitro during IgE anaphylaxis in
the rabbit.

J. Immunol. 123: 2835-2841, 1979.

91. McMANUS, L. M., SAW, S. O., PINCKARD, R. N.;
Thromboxane B₂ (TXB₂) release during IgE anaphylaxis in the
rabbit.

J. Immunol. 125: 1950-1954, 1980.

92. STIMLER, N. GERRARD, C., O'FLAHERTY, J. F.;
Contraction of human lung tissue by platelet activating
factor.

J. Pharmacol. 14: 22 (abstract), 1983.

93. MORLEY, J., PAGE, C. P., SANJAR, S.; Pulmonary responses to platelet activating factor
Prog. Resp. Res. 19: 117-123, 1985.

94. HEFFNER, J. E., SCHOEMAKER, S. A., CANHAM, E. M., et alii; Acetylglyceryl ether phosphorylcholine-stimulated humane platelets cause pulmonary hypertension and edema in isolated rabbit lung.
J. Clin. Invest. 71: 351-357, 1983.

95. VEMULAPALLI, S., CHU, P. J. S., BARNETT, A.; Cardiovascular and renal action of platelet activating factor in anesthetized dogs.
Hypertension 6: 489-493, 1984.

96. McMANUS, L. M., HANAHAN, D. J., DEMOPOULOS, C. A., PINCKARD, R. N.; Pathobiology of the intravenous infusion of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC), a synthetic platelet-activatin factor (PAF), in the rabbit.
J. Immunol. 124: 2919-2924, 1980.

97. McMANUS, L. M., PINCKARD, R. N., FITZPATRICK, F. A., O'ROURKE, R. A., CRAWFORD, M. H., HANAHAN, D. J.; Acetyl-glyceryl-ether-phosphorylcholine. Intravascular alterations following intravenous infusion into the baboon
Lab. Invest. 45: 303-307, 1981.

98. CAMUSSI, G. C., TETTA, F., BUSSOLINO, F., CALIGARIS-CAPPIO, F., MASERA, F.; Mediators of immune-complex induced aggregation of polymorphonuclears neutrophils. II. Platelet activating factor as the effector substance of immune-induced aggregation .
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 64: 25-36, 1981.

99. CAMUSSI, G., BUSSOLINO, F., TETTA, C. et alii;
Effect of (PGI₂) on immune-complex-induced neutropenia.
Immunol. 48: 625-633, 1983.

100. FLOWER, R. J., BLACKWELL, G. J.; Anti-inflammatory
steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor
which prevents prostaglandin generation.
Nature 78: 456-459, 1979.

101. GUPTA, C., KATSUMATA, M., GOLDMAN, A. S., HEROLD, R.,
PIDDINGTON, R.; Glucocorticoid-induced phospholipase A₂-
inhibitory proteins mediate glucocorticoid teratogenicity in
vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1140-1143, 1984.

102. CRADDOCK, P. R., WHITE, J. C., JACOB, H. S.;
Potentiation of Complement (C5a)-induced granulocyte
aggregation by cytochalasin B.
J. Lab. Clin. Med. 91: 491-499, 1978.

103. WALLACE, S. L.: Colchicine, págs. 878-884 en
Kelley, W. N., Harvis, E. D., Ruddy, S., Sledge, C. D. eds.
Textbook of Rheumatology. Philadelphia, W. B. Saunders Co.,
1981.

104. O'FLAHERTY, J. T., KREUTZER, D. L., WARD, P. A.;
Neutrophil aggregation and swelling induced by chemotactic
agents.
J. Immunol. 119: 232-239, 1977.

105. HAMMERSCHMIDT, D. E., HARRIS, P. D., WAYLAND, H.,
CRADDOCK, P. R., JACOB, H. S.; Complement-induced granulocyte
aggregation in vivo.
Am. J. Pathol. 102: 146-150, 1981.

106. WILKINSON, P.C.: Chemotaxis and Inflammation. Edinburgh. Churchill Livingstone 1982.

107. CAMUSSI, G., TETTA, C., BUSSOLINO, F., et alii; Mediators of immune-complex induced aggregation of polymorphonuclear neutrophils. Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 64: 25-30, 1981.

108. MACLOUF, J., BORGEAT, P., GRANGE, M. J., WAUTIER, J. L., CAEN, J. P.; Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Función en las enfermedades cardiovasculares en las reacciones alérgicas y en la inflamación. Presse Méd. (ed. esp.) 3: 200-205, 1984.

109. LEE, T. C., MALONE, B., SNYDER, F.; Stimulation of calcium uptake by 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor) in rabbit platelets: possible involvement of the lipoxygenase pathway. Arch. Biochem. Biophys. 223: 33-39, 1983.

110. SHAW, J. O., PRINTZ, M. P., HIRABAYSHI, K., HENSON, P. M.; Role of prostaglandin synthesis in rabbit platelet activation by basophil-derived platelet activating factor. J. Immunol. 121: 1939-1945, 1978.

111. SMITH, M. J. H.; Biological activities of leukotriene B₄ (Isomer III), págs. 283-292 en Samuelsson, B. & Paoletti, R. ed. Leukotrienes and other lipoxygenase products. New York, Raven Press 1982.

112. GEE, M. H., PERKOWSKI, S. Z., TAHAMONT, M. V., FLYNN, J. T.; Arachidonate cyclooxygenase metabolites as mediators of Complement-initiated lung injury. Fed. Proc. 44: 46-52, 1985.

113. CLERICI, N., LEYVA-COBIAN, F.; Generación de factores quimiotácticos por activación de las vías clásica y alternativa del complemento.

Inmunología 2: 25-46, 1983.

114. CAMUSSI, G., TETTA, C., DEREGIBUS, M. CH., BUSSOLINO, F., SEGOLONI, G., VERCELLONE, A.; Platelet-activating factor (PAF) in experimentally-induced rabbit acute serum sickness: role of basophil-derived PAF in immune complex deposition.

J. Immunol. 1: 86-94, 1981.

115. GEWURZ, H., LINT, T. F.; Alternatives modes and pathways of complement activation, pp 17-45 en Day, N. K. & Good, R. A. ed. Biological amplification systems in immunology. New York, Plenum Publishing Co. 1977.

116. HONG, S. L., LEVINE, L.; Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids

Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 1730-1734, 1976.

117. YAMADA, Y., MOLDOW, C. F., SACKS, T., CRADDOCK, P. R., BOOGAERTS, M. A., JACOB, H. S.; Deleterious effects of endotoxin on cultured endothelial cell: an in vitro model of vascular injury.

Inflammation 5: 115-126, 1981.

118. FORDHAM, J. N., KIRWAN, J., CASON, J., CURREY, H. L. F.; Prolonged reduction in polymorphonuclear adhesion following oral colchicine.

An. Rheum. Dis. 40: 605-608, 1981.

119. WRIGHT, D. G., UNGERLEIDER, R. S., GALLIN, J. I., DEISSEROTH, A. B.; Pretreatment of filtration leukapheresis donors with colchicine

Blood 52: 783-792, 1978.

120. HOFFSTEIN, S., GOLDSTEIN, J. M., WEISSMANN, G.; Role of microtubule assembly in lysosomal enzyme secretion from human polymorphonuclear leukocytes. A reevaluation. J. Cell Biol. 73: 242-250, 1977.

121. SERHAN, Ch. N., BROEKMAN, M. J., KORCHAK, H. M., SMOLEN, J. E., MARCUS, A. J., WEISSMANN, G.; Changes in phosphatidylinositol and phosphatidic acid in stimulated human neutrophils. Relationship to calcium mobilization, aggregation, and superoxide radical generation. BBA 762: 420-428, 1983.

122. CAMUSSI, G., AGLIETTA, M., MALAVASI, F., TETTA, C., PIACIBELLO, W., SANAVIO, F., BUSSOLINO, F. The release of platelet activating factor from human endothelial cells in culture. J. Immunol. 131: 2397-2403, 1983.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Prof. Dr. D. Miguel A. Muniain Ezcurra la responsable y juiciosa dirección de esta Tesis.

Agradezco al Dr. D. Rafael Fernández su asesoramiento en el manejo de los animales de experimentación y en el diseño de los ensayos *in vivo*. De igual forma, reconozco como impagable la ayuda prestada por mis compañeros, los doctores Dña. Rosario Mata, D. José Pérez Venegas, Dña. Francisca Pozuelo, Dña. Carmen Martínez Hornillo y Dña. Dolores Rodríguez López, inasequibles al desaliento.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Antonio Ramos Vázquez
titulada Repel au Siteme et complément
Normes a l'égard de l'union foncière
juridictionnelles
acordó otorgarle la calificación de Apt. cum laude p.
summa cum laude

Sevilla, de 19

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

Ramos Vázquez

[Signature]

[Signature]