UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral al folio 209 número 249 del libro correspondiente.
Sevilla 16/01/96
El Jefe del Negociado de Tesis,

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

ESTUDIO IN VITRO DE LA AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS

Tesis presentada para optar al

GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

por la Licenciada

M. Dolores Rodriguez Lopez

MIGUEL ANGEL MUNIAIN EZCURRA, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA:

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: "ESTUDIO IN VITRO DE LA AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS", ha sido realizado en este Departamento bajo mi dirección.

Firmo la presente en Sevilla a uno de Septiembre de mil novecientos noventa.

Fdo. Prof. Dr. M.A. Muniain Ezcurra

R.25037

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DIRECCION

AVDA. DR. FEDRIANI S/N
SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

RAMON PEREZ CANO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA:

AUTORIZA: a Dª Mª Dolores Rodríguez López, Licenciada en Medicina y Cirugía a presentar el trabajo titulado: "ESTUDIO IN VITRO DE LA AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS", para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla a doce de Septiembre de mil novecientos noventa.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Departamento de Medicina
DIRECCION
Prof. Dr. R. Pérez Cano

Fdo.: R. Pérez Cano
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de esta Tesis.

Al Prof. Garrido, por su constante ejemplo durante todos estos años.

Al Prof. Perez Cano, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Prof. Muniain Ezcurra, director de esta Tesis. Sólo el sabe cuanto uso ha tenido que hacer de su capacidad de estímulo, ayuda permanente e infinita paciencia para la conclusión de este trabajo. Mi admiración, respeto e inmenso cariño.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación, por su colaboración y contribución al presente trabajo, compartiendo muchas horas en la realización del mismo.

Al Dr. Luis Castilla y a Isabel de Haro por dedicarme su tiempo.

A todos los donantes, sanos y enfermos, que se prestaron voluntariamente, sin los cuales no hubiera sido posible la ejecución de este proyecto.

I N D I C E

INTRODUCCION 1

NEUTROFILOS 2

A. ORIGEN Y DISTRIBUCION DE LOS NEUTROFILOS 4

B. REGULACION DE LA MIGRACION DE LOS NEUTROFILOS . . 6

C. ANORMALIDADES DE LA FUNCION DE LOS NEUTROFILOS EN DIVERSAS ENFERMEDADES 8

D. DEFICIENCIAS DE GLICOPROTEINAS IMPLICADAS EN LA ADHERENCIA 11

CALCIO 12

A. MECANISMO DE ACCION DE LOS BLOQUEANTES DE LOS CANALES DEL CALCIO 14

METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO 17

A. EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE LAS PROSTAGLANDINAS . 18

B. DOLOR Y EDEMA 19

C. DAÑO TISULAR 19

D. PROSTAGLANDINAS COMO INHIBIDORAS DE LA FUNCION DE LOS NEUTROFILOS 20

E. LEUCOTRIENOS COMO MEDIADORES DE LA INFLAMACION . . 20

ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS 22

A. MODO DE ACCION 22

B. CLASIFICACION 24

C. EL PROCESO INFLAMATORIO EN REUMATOLOGIA Y EFECTO DE LOS AINE 25

SULFASALAZINA 27

ESTIMULOS QUIMIOTACTICOS 29

A. FACTORES QUIMIOTACTICOS EN ENFERMEDADES REUMATICAS . 30

B. EFECTOS CELULARES DE LOS FACTORES QUIMIOTACTICOS . . 31

RITMOS CIRCADIANOS 33

FACTOR QUIMIOTACTICO INDUCIDO POR CRISTALES 36

SUSTANCIA P 39

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 52

MATERIAL Y METODOS 56

MATERIAL 57

A. REACTIVOS 57

B. OBTENCION DE C.C.F. 60

C. APARATAJE 60

METODOS 61

A. SEPARACION CELULAR Y CONTAJE 61

B. AGREGACION 63

C. EXPERIMENTOS DE DESACTIVACION CRUZADA 64

D. RITMO CIRCADIANO 65

E. ESTUDIO ESTADISTICO 66

RESULTADOS 67

TABLAS DE RESULTADOS 77

DISCUSION 97

CONCLUSIONES *117*

BIBLIOGRAFIA *120*

INTRODUCCION

INTRODUCCION

NEUTROFILOS

Los neutrófilos humanos constituyen un eficaz mecanismo defensivo contra las infecciones producidas por hongos y bacterias (1), pero además estan directamente implicados en la patogénesis del daño tisular en numerosas enfermedades de origen no infeccioso (2).

Se han publicado desde alteraciones leves a más severas en la función del neutrófilo, tanto en enfermedades congénitas como adquiridas, no conociendose en la mayoría de los casos las bases de dichas alteraciones (3). En cambio, en un pequeño número de enfermedades congénitas de los neutrófilos, sí se ha encontrado un defecto bioquimico específico, lo que ha

permitido estudiar las diversas funciones de los componentes del neutrófilo y a su vez, delinear el papel de dichas funciones en la defensa del individuo (4).

El neutrófilo, por tanto, puede activarse ante estímulos infecciosos y no infecciosos (5). Uno de los elementos esenciales en la reacción inflamatoria, es la atracción de las células hacia el foco en el que se encuentra el agente causal (6). Esta atracción no es un fenómeno al azar, sino que está regida por un gradiente de concentración de una sustancia atrayente, y una dirección determinada (7). Es preciso, por tanto, la presencia de un elemento quimiotáctico.

Para que los neutrófilos circulantes lleguen a los tejidos, deben marginarse en el torrente circulatorio, adherirse a las células endoteliales y atravesar la pared vascular, manteniendo la integridad de la misma (8). Posteriormente, una vez la célula en el foco inflamatorio, se pondrá en marcha un complejo mecanismo de secreción que describiremos más adelante.(Fig. 1).

El influjo y la participación de los granulocitos es una característica constante de las inflamaciones agudas, subagudas y crónicas. Los granulocitos juegan un papel central en la defensa del organismo, pero si se acumulan en un número excesivo, o se activan de una manera incontrolada, los resultados pueden ser deletereos para el paciente. Los neutrófilos pueden ingerir partículas extrañas y bacterias, pero tambien pueden

participar activamente en la aparición de vasculitis necrotizantes. Del mismo modo, los eosinófilos pueden detener enfermedades parasitarias, pero una eosinofilia constante puede originar una fibrosis endocárdica.

La capacidad de los basófilos para liberar sustancias que al producir vasodilatación , permitan el paso de anticuerpos y Complemento a los tejidos es hipotética, por lo que todavía los basófilos son asociados exclusivamente con enfermedades alérgicas y algunos casos de hipersensibilidad retardada (9).

En el presente estudio vamos a estudiar algunas características fundamentales de los granulocitos.

A. Origen y distribución de los neutrófilos

En los adultos los neutrófilos se originan de la médula ósea de unas células pluripotenciales denominadas células stem o célula madre. Estas células tienen la capacidad de renovarse y diferenciarse en las células progenitoras de los neutrófilos.

Cada tipo de granulocito deriva de una subclase de célula progenitora que es estimulada a proliferar y diferenciarse por glicoproteinas denominadas conjuntamente factores estimuladores de colonias (CSF). En los humanos se han encontrado

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA BIBLIOTECA

cuatro CSF: neutrófilo (G) CSF, monocito (M) CSF, GM CSF y multi CSF o interleuquina 3 (10). Cada una de estas glicoproteinas actúa a través de receptores específicos y muchos de sus efectos se superponen.

Los estadíos terminales de proliferación y desarrollo de los neutrófilos en la médula ósea estan representados por una serie de divisiones celulares que conducen a la aparición de unas características peculiares en el nucleo y en los gránulos citoplasmáticos específicos para cada tipo celular que los diferenciará claramente cuando sean células adultas.

Todos los neutrófilos en sus últimos estadíos de diferenciación sintetizan proteinas, enzimas y otros constituyentes que son almacenados en gránulos secretores. Del mismo modo aparecen características específicas en la superficie celular. Así, los neutrófilos expresan en su superficie receptores para el fragmento F_c de las inmunoglobulinas, para el Complemento y para las lectinas. En cambio, desaparecen los antígenos Ia. Los neutrófilos además de los eosinófilos, adquieren la capacidad de fagocitar y responder a factores quimiotácticos.

Existen además, diversas subclases de neutrófilos. Estas subclases se diferencian por la cinética celular, distribución tisular y por su función.

Aunque nuestros conocimientos sobre los neutrófilos son

muy incompletos, varios estudios han revelado que existen diversos compartimentos: en la médula ósea, neutrófilos circulantes y marginados, y los neutrófilos tisulares. Los neutrófilos maduros permanecen en la médula ósea por un espacio de cinco dias aproximadamente. En la circulación estan unas diez a doce horas y posteriormente migran a los tejidos. En general, permanecen en los tejidos solamente si existe un cierto grado de irritación o infección (11). No se conoce cómo son eliminados de los tejidos, pero sólo en circunstancias muy excepcionales (si es que ocurre alguna vez), los neutrófilos vuelven a torrente sanguíneo.

B. Regulación de la migración de los Neutrófilos

El movimiento de los neutrófilos se origina cuando detectan la presencia de un gradiente en la concentración de un estímulo con capacidad quimiotáctica para ellos. Esto llevará a la acumulación de neutrófilos en lugares en los que existe inflamación o infección. La quimioquinesis en cambio es el incremento en la movilidad de los neutrófilos ante un estímulo, dependiendo de su concentración independientemente de que exista o no gradiente y por tanto es una movilidad no dirigida hacia un estímulo, sino en todas las direcciones (12).

Gracias al desarrollo de técnicas in vitro, la Quimiotaxis y la Quimioquinesis han sido extensamente estudiadas. Las técnicas que emplean la cámara de Boyden, utilizan uno o varios filtros que separan los neutrófilos del estímulo quimiotáctico.

Después de un período de incubación, los filtros se tiñen y se cuantifica el número de células que ha migrado. Los que emplean isótopos radiactivos, precisan de la colocación de dos filtros separando las células del estímulo. Tras la incubación, se determina la radioactividad acumulada en cada uno de ellos.

Para que exista Quimiotaxis es preciso que se generen factores quimiotácticos. Estos pueden ser muy variados, como por ejemplo inmunocomplejos, factores del Complemento, polisacàridos bacterianos, leucotrienos, etc. Además de los factores quimiotácticos, existen muchas otras sustancias que sin ser quimiotácticas influyen considerablemente en el movi miento celular. A concentraciones no citotóxicas, la colchicina y la citocalasina B inhiben la quimiotaxis y la fagocitosis por su acción sobre los microtúbulos y microfilamentos respectivamente. Por el contrario, la liberación de enzimas tras la fagocitosis o la estimulación con factores quimiotácticos se incrementan considerablemente tras la incubación con Citocalasina B.

Recientemente se ha podido comprobar que factores quimiotácticos producidos por los neutrófilos, pueden alterar las funciones de otras estirpes celulares y a la inversa. Por ejemplo: las proteasa liberadas por las plaquetas después de su estimulación , son capaces de degradar productos del Complemento liberando fragmentos muy activos como agentes

quimiotácticos para los neutrófilos. Igualmente, la agregación de las plaquetas conduce a la liberación no sólo de 12-HETE, sino tambien a la producción de LTB4, que es uno de los factores quimiotácticos más potente. Las linfoquinas liberadas en gran número de circunstancias pueden así mismo estimular o inhibir la Quimiotaxis (13).

En general se puede afirmar que los estímulos que son capaces de activar la movilidad de los neutrófilos, pueden así mismo originar liberación de enzimas, agregación, producción de superóxido, etc.

C. Anormalidades de la función de los Neutrófilos en diversas enfermedades

Los pacientes con gran suceptibilidad para las infecciones bacterianas, pueden presentar un defecto aislado en su capacidad fagocítica, siendo todas las otras funciones normales. Estas anormalidades de la Fagocitosis pueden ser congénitas o adquiridas, permanentes o transitorias y ninguna de ellas está directamente asociada a la patogénesis de las diversas enfermedades reumáticas. Por otro lado, los pacientes que presentan además de un defecto en la Fagocitosis, alteraciones en la Quimiotaxis, muestran entidades clínicas bien definidas. Igualmente, una excesiva Quimiotaxis puede así mismo originar diversas entidades clínicas. Tablas I y II.

En un trabajo previo con el que optábamos al grado de Licenciado y que presentamos como una tesina, estudiamos la Quimiotaxis y Liberación de Superóxido en pacientes con enfermedad de Behçet. Existían múltiples trabajos en la literatura respecto a la función de los neutrófilos en dicha enfermedad y algunos de ellos señalaban un incremento en la Quimiotaxis y Fagocitosis en estos pacientes, pero llamaban la atención las diferencias geográficas. En nuestro trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas que mostraran un incremento en la Quimiotaxis en los pacientes con enfermedad de Behçet en actividad ni en remisión. Sólo presentaron ésta alteración dos pacientes que eran madre e hija y que además presentaban un fenómeno patérgico positivo, expresión clínica de incremento en la Quimiotaxis. A la vista de estos datos y de otros existentes en la literatura, se puede concluir que tanto la hiper como la hipofunción de los neutrófilos pueden estar presentes en la etiopatogenia de varias enfermedades bien como trastornos transitorios o permanentes (14).

Las alteraciones en los neutrófilos que se presentan por defectos intrínsecos pueden ser transitorias en gran cantidad de procesos, por ejemplo: enfermedades víricas, sepsis bacterianas y algunas enfermedades reumàticas. Es de especial interés que los defectos en la migración de los neutrófilos en el Síndrome de Chediak-Higashi y en el Síndrome de Quir-Hill pueden responder in vitro y en algunos casos in vivo al tratamiento con ácido ácido ascórbico . El mecanismo de acción de dicho ácido

no está completamente aclarado, pero al menos en el Síndrome de Chediak-Higashi, su efecto se debe a que el ácido ascórbico disminuye los niveles de AMP cíclico y concomitantemente restaura la función de los microtúbulos.

En los procesos en los que la función de los neutrófilos aparece alterada de un modo transitorio, el único modo de corregir este defecto es tratando la enfermedad de base.

En nuestro laboratorio previamente hemos comprobado que la función de los neutrófilos está deprimida en las personas de edad avanzada. Este defecto se corrige con la administración de Levamisol pero no de ácido ascórbico. Del mismo modo, en algunas enfermedades originadas por virus, el defecto en la función de los neutrófilos puede corregirse administrando levamisol (15).

Uno de los primeros procesos, por tanto, que tienen lugar en la activación de los neutrófilos es el incremento de su adherencia al endotelio vascular y el aumento de agregación intercelular. Estos dos fenómenos no son totalmente superponibles, pero ambos son precoces en la activación celular.

El aumento en la agregación viene dado por un incremento en el número de receptores de superficie en la membrana del neutrófilo, concretamente el CR_3, receptor para el FMLP, laminina, etc. (17)(18).

La mayoría de las funciones de los neutrófilos son estímulo--específicas. Así, la liberación de enzimas, superóxido, o la quimiotaxis, responden a estímulos específicos en la superficie celular, cuyos receptores son los responsables de la identificación del agente quimiotáctico.

D. Deficiencias de Glicoproteinas implicadas en la Adherencia

La Adherencia de neutrófilos a células y a superficies está mediada por un grupo de glicoproteinas que incluyen el receptor CR_3, el LFA-1, y el p 150,95, cada una de las cuales posee una alfa subunidad beta, que es común a todas ellas y de un tamaño de 95.000 (19).

El CR_3 es el receptor del fragmento iC_{3b} del Complemento, que a su vez es un fragmento del C_3. Este receptor actúa sinergícamente con el receptor para la F_c de las Ig.

El LFA-1 se encuentra en linfocitos y monocitos además de en el neutrófilo. La función del p 150,95 es desconocida (20).

La deficiencia en CR_3 es una enfermedad rara. Los pacientes presentan una respuesta inflamatoria disminuida, con frecuentes infecciones de piel y mucosas y posteriormente infeccio-

nes de caracter más grave, encontrandose en los mismos una disminución en la adherencia, así como en la agregación de los neutrófilos. En estos pacientes no existe un pool intravascular marginado, ya que siempre presentan neutrofilia, incluso sin infección (21). Es posible que el CR_3 active el citoesqueleto (22).

Calcio

En los neutrófilos el Calcio está unido a la membrana celular, que actúa como almacen, y bajo un estímulo apropiado, se libera. Este fenómeno fue estudiado empleando clortetraciclina fluorescente. La clortetraciclina es una molécula hidrofóbica, y la fluorescencia asociada es más intensa si se une con iones divalentes. Cuando se liberan iones, disminuye la fluorescencia. Según el espectro, se puede diferenciar si lo liberado es Calcio o Magnesio. Cuando se añade C_5 o FMLP, se observa una disminución inmediata de la fluorescencia. Probablemente, el Calcio se dirige al citoplasma. Además, los factores quimiotácticos aumentan el flujo de calcio hacia adentro y afuera de la célula, es decir, aumentan la permeabilida para el calcio. Estos cambios en la permeabilidad para el calcio pueden ser causa y consecuencia de los metabolitos del ácido araquidónico de membrana.

El FMLP origina entrada o salida de Ca, dependiendo de la concentración extracelular del mismo. Si la concentración extracelular es baja, el FMLP origina salida; en cambio, si el Ca extracelular es alto , se origina entrada (24).

En resumen, los estímulos quimiotácticos dan lugar a:
a)Liberación del Calcio unido a la membrana.
b)Aumento de permeabilidad al Calcio.

El Calcio liberado de la membrana, puede asociarse con la calmodulina, y al activar la fosfolipasa A_2, originar liberación de ácido araquidónico, siendo éste a su vez transformado en productos activos que amplifican la inflamación (25).

La entrada de Ca en el enutrófilo puede estar regulada como por puertas, es decir, es posible que inicialmente entre mucho calcio, pero posterior y súbitamente se "cierra" la puerta. Así, se ha comprobado que el Ca debe estar presente cuando se añade el estímulo quimiotáctico. Si añadimos el estímulo, y más de cuatro minutos más tarde el Ca, ya no se produce agregación (26).

A. *Mecanismo de acción de los bloqueantes de los canales del Calcio*

Estas drogas forman un grupo muy heterogéneo y se pueden denominar "antagonistas del Calcio", "bloqueantes de los canales del Calcio" o "antagonistas de los canales lentos". Su empleo clínico mayoritario tiene lugar en pacientes con enfermedades vasculares, aunque estan apareciendo muchos otros usos clínicos. Uno de los aspectos más llamativos de este grupo de fármacos es su heterogeneidad, y de hecho muchos de ellos se descubrieron independientemente.Para comprender adecuadamente su mecanismo de acción, vamos a revisar brevemente la importancia de los iones Ca. Estos, habitualmente asociados a determinadas proteinas tales como la calmodulina, o troponina, regulan muchas funciones como: contracción muscular, secreción de neurotransmisores y hormonas y la actividad de varios enzimas. Aunque las concentra ciones de Calcio extracelular esten en rango milimolar, los niveles de Ca intracelular son de 1 a 22 nM. Esta marcada diferencia debe ser mantenida regulando la entrada de Ca en la célula y secuestrando el Ca intracitoplasmático en el retículo sarcoplásmico y mitocondrías, o uniendo el Ca a la cara interna de la membrana plasmática (27).

Cuando la célula es estimulada adecuadamente, responde bien liberando el Ca de los depósitos intracelulares o abriendo canales para el Ca en la membrana plasmática. Las células

musculares tanto de la musculatura lisa como de la musculatura cardíaca al ser despolarizadas, inician la contracción al originarse apertura de los canales del calcio. Por el contrario, cuando una célula de músculo liso es estimulada por norepinefrina, una gran parte del calcio liberado proviene de los depósitos intracelulares.

La mayoría de los estudios han puesto de manifiesto que los antagonistas del calcio actúan impidiendo la entrada de Ca a través de los canales de voltaje sensitivos, mientras que los procesos que dependen de la liberación de calcio intracelular, son relativamente insensibles a esas drogas (28).

Los estudios biofísicos sugieren que los antoagonistas del calcio no bloquean los poros a través de los cuales penetra el Ca. Los cationes divalentes tales como el bario y el estroncio, tienen acciones biofísicas similares a las del Ca y se les puede considerar por tanto como antagonistas del mismo. Tanto en las células caredíacas como en las del músculo liso, el acoplamiento entre los procesos de excitación y contracción esta mediado por la movilidad del calcio de un lado a otro de la membrana (29). En el músculo cardíaco, esta transferencia se realiza a través del canal lento del calcio. Las sustancias que inhiben el canal lento poseen tambien la propiedad de inhibir la entrada en la musculatura celular. En el caso del

corazón, los inhibidores selectivos del canal lento (Verapamil, Nifedipina) poseen efecto inotropo negativo y vasodilatador (30).

Actualmente se conocen dos clases de canales del Calcio
1) Dependientes del voltaje. Estos se abren cuando la célula se despolariza y se cierran con la repolarización.
2) Canales que se regulan por receptores adrenérgicos (31).

Cuando el Calcio entra en la célula (en el músculo liso), se une a la calmodulina (en el miocito es la troponina). La calmodulina se une con avidez al Ca y entonces se activa una enzima especial, la cinasa de cadenas ligeras de miosina, que a su vez permite activar a los miofilamentos (32).Para que ceda la contracción, deben extraerse iones del Ca del citoplasma y ser conducidos al medio extracelular.

Los bloqueantes de los canales del Ca actúan impidiendo la entrada del Calcio en la célula, bien bloqueando el canal propiamente dicho, o bien incorporandose a la membrana plasmática y alterando la configuración de la misma, con la consiguiente distorsión de los canales (33).

Metabolismo del Acido Araquidónico

A lo largo del pasado decenio se ha puesto de manifiesto la importancia que en la inflamación, como mediadores de la misma, tienen los productos derivados de la oxigenación del Acido araquidónico. Son varias estirpes celulares las que tras un determinado estímulo tienen la capacidad de liberar Acido Araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana

A través de la Ciclooxigenasa se originan diversas prostaglandinas y leucotrienos, y por medio de la Lipooxigenasa aparecen los derivados hidroxieicosatetraenoicos y otros metabolitos más complejos (34). Tanto la cilooxigenasa como la lipooxigenasa dependen de la disponibilidad de Acido araquidónico libre y del oxígeno.

La mayoría de los metabolitos del Acido araquidónico obtenidos, tienen importancia en el normal funcionamiento celular. Por ejemplo, las prostaglandinas participan en la regulación de la ovulación, parto, manteniendo el tono vascular, etc.. Pero en determinadas condiciones, la producción excesiva o deficiente de uno de estos metabolitos puede mediar una reacción inflamatoria. Este es el caso de la dismenorrea, alteraciones en las anormales respuestas vasculares etc., que aparecen como consecuencia de una mala regulación en la producción de prostaglandinas.

UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE MEDICINA BIBLIOTECA

Del mismo modo, los productos de la lipooxigenasa tienen importancia en la fisiología celular, pero en determinadas circunstancias originan respuestas que son deletereas para el organismo. Los productos de esta vía metabólica son muy importantes ya que por ejemplo, la capacidad de originar constricción de las vias aereas respiratorias es cien mil veces superior a las que originan los productos de la ciclooxigenasa (35).

Aunque los estímulos que originan la liberación de Acido Araquidónico son diferentes para cada estirpe celular, existen al menos tres mecanismos generales que son comunes a todas las células:

1) En los neutrófilos y en algunas células cebadas, el Acido Araquidónico es liberado a partir de la fosfatidilcolina, a través de la Fosfolipasa A_2.

2) El Acido araquidónico puede así mismo liberarse del fosfatidilinosicol a través de una Fosfolipasa C (ésta es capaz tambien de liberar otros potentes mediadores inflamatorios).

3) Un tercer mecanismo incluye la conversión de fosfatidiletanolamina a través de una metilación secuencial en un derivado suceptible de ser desdoblado por la Fosfolipasa A_2 (36).

La ciclooxigenación y la lipooxigenación estan representadas en la Figura 2.

Además de éstas vías enzimáticas, los metabolitos del A. Araquidónico pueden originarse a través del efecto directo de radicales libres sobre las membranas celulares. En concreto, la exposición de A. Araquidónico a un sistema capaz de generar Superóxido origina producción de varios metabolitos similares a los obtenidos al incubar dicho ácido con ciclo o lipooxigenasa. La naturaleza exacta de los productos obtenidos no es completamente conocida.

Esta vía descrita, a través de la cual, los metabolitos del A. araquidónico pueden originarse por el efecto de radicales tóxicos de oxígeno, puede ser muy importante en muchas de las reacciones inflamatorias habituales. Por ejemplo, todas las células fagocíticas (monocitos, neutrófilos, etc.) al ser atraidas a los focos inflamatorios, fagocitan bacterias, detritus celulares, etc.. Esta fagocitosis origina una importante liberación de radicales tóxicos, especialmente anión Superóxido, que será el encargado de producir potentes estímulos flogóticos a partir del a partir del metabolismo del A. Araquidónbico (37).

A. Efectos proinflamatorios de las Prostaglandinas

Es un hecho bien conocido que las Prostaglandinas estables, leucotrienos y prostaciclinaposeen gran importancia como mediadores de la inflamación.

En primer lugar, estos compuestos son capaces de originar fiebre, eritema, dolor y edema. Además, son sintetizados por las células fagocíticas y liberados al medio durante las reacciones inflamatorias.

Prostaglandinas de la serie E, y el propio ácido Araquidónico producen fiebre cuando se inyectan en los animales de experimentación. Así mismo, existe un marcado incremento en los niveles de prostaglandinas del líquido cefalorraquídeo al producir fiebre en el animal tras la inyección de pirógenos (tanto exógenos como endógenos).

B. Dolor y edema

Por sí mismas, las prostaglandinas no son capaces de originar dolor, pero potencian el originado por otros mediadores, tales como histamina, bradiquinina, etc.. Igualmente potencian enormemente la capacidad de estas sustancias para producir edema. Además de la PGE citada, la PGI_2, por su potente efecto vasodilatador, es capaz de contribuir a la aparición de edema (38).

C. Daño tisular

Existe escasa evidencia que demuestre que las PG originan daño tisular, y probablemente sean los radicales tóxicos de O_2 los que al aparecer durante el proceso inflamatorio originen

la destrucción tisular. En cambio, la PGE_1 puede jugar un importante papel en la reabsorción ósea que aparece en la artritis reumatoide

D. Prostaglandinas como inhibidoras de la función de los neutrófilos.

Durante la pasada década se ha podido saber que las células implicadas en la respuesta inflamatoria aguda y crónica, pueden ser moduladas por los nucleóticos cíclicos. Así, varios mediadores de la inflamación son liberados en cantidades menores cuando las células son incubadas con AMPc o con fármacos que incrementen su producción. Lógicamente, por tanto, las PGE_1 y PGE_2, al incrementar los niveles de AMPc intracelulares, puden inhibir la secreción de varios mediadores de la inflamación, inhibir la quimiotaxis, proliferación celular a mitógenos, etc.. Por el contrario, la incubación de las células con GMPc o con drogas que incrementen sus niveles, aumentan varias de las funciones leucocitarias (39).

E. Leucotrienos como mediadores de la inflamación

La 5-lipooxigenasa del A. Araquidónico en los leucocitos, genera el ácido 5-hidroxieicosatetranoico, que es el

precursor de una amplia y compleja familia, ácidos 5-HETEs, que son agrupados tambien bajo el nombre de leucotrienos. De estos, tienen especial importancia el LTA_4, LTB_4 que es un potente estímulo para la quimiotaxis y otras funciones celulares, y los componentes del SRS-A, que se origina en el pulmón y otros tejidos tras la estímulación inmunológica y que tiene propiedades vasoconstrictoras y contráctiles, etc.

Estudios reciente demuestran que la incorporación a la dieta de ácidos grasos tales como el eicosapeptanoico durante 8 semanas, origina producción de LTB_5, que es mucho menos potente como mediador de la inflamación que LTB_4. Lógicamente, este hecho abre importantes posibilidades terapeúticas en las que los contenidos dietéticos pueden influir activamente en la respuesta inflamatoria (4o).Tabla III.

De todos los metabolitos citados anteriormente, existen dos que tienen especial importancia en la respuesta inflamatoria de los neutrófilos: a) las Prostaglandinas (41); b) el Leucotrieno B_4 (42). Ambos son proinflamatorios y lógicamente su adición debería originar agregación.

Antiinflamatorios no esteroideos

En sentido estricto, fueron los salicilatos los primeros antiinflamatorios no esteroideos (AINE) descritos. No obstante, se introdujo el término "no esteroideo" cuando al comprobar el excesivo número de efectos secundarios que presentaban los corticoides, se inició la búsqueda de otros fármacos con capacidad antiinflamatoria y menor número de efectos secundarios (43).

La fenilbutazona fue el primer compuesto de este nuevo grupo, introducida en 1.950. Posteriormente se descubrió la Indometacina, y en los últimos años han sido incorporados un sinnúmero de AINE en el arsenal terapeútico.

A. Modo de acción

Además de poseer efectos antiinflamatorios y analgésicos, posiblemente ejercen muchas otras acciones. El mecanismo principal es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Estas, especialmente las de la serie E, son capaces de producir inflamación y, como se ha dicho, su inhibición probablemente sea el mecanismo principal de inhibición de los AINE (44).

El Acido Araquidónico se libera de los fosfolípidos de membrana por medio de varias fosfolipasas, especialmente la A_2*. Los corticoides deben parte de su efecto antiinflamatorio*

a la capacidad que poseen de estimular la producción de un inhibidor de la fosfolipasa A_2. Existen otras drogas, tales como la quinacrina que directamente inhiben dicha enzima (45).

El A. Araquidónico es el substrato tanto para la ciclooxigenasa (síntesis de prostaglandinas), como para la lipooxigenasa (46). La primera cataliza la síntesis de prostaglandinas F1D y E, además de prostaciclina y tromboxano. La 5,lipooxigenasa y 15,lipooxigenasa catalizan la conversión de ácido araquidónico a 5-HETE y leucotrienos, especialmente LTB_4, potentes mediadores de la inflamación. Para que una droga sea verdaderamente efectiva como antiinflamatorio, deberá inhibir a la ciclo y lipooxigenasa. La mayoría de los AINE inhiben solamente a la primera, ya que el Benoxaprofén, único AINE con capacidad para inhibir las dos es de empleo imposible debido a su toxicidad (47). Dado que las prostaglandinas regulan muchas otras funciones, gran número de los efectos secundarios de los AINE son el resultado directo de ese bloqueo.

La hipótesis descrita es la generalmente aceptada, pero probablemente no explica todos los efectos de los AINE a todas las dosis. Por ejemplo, son necesarias dosis más altas de antiinflamatorios para suprimir la inflamación que para suprimir la síntesis de prostaglandinas. Además, el salicilato sódico a las dosis empleadas no inhibe su síntesis. Es necesario por tanto, que los AINE posean otros efectos en la inflamación

además de inhibir la síntesis de prostaglandinas.

Cuando estímulos tales como C_{5a} y FMLP activan los neutrófilos, éstos son estimulados por la denominada "señal doble", que se produce por la movilización del Ca intracelular y por la activación de la proteinquinasa C. Los AINE además, se insertan en las capas de lípidos de la membrana impidiendo la transducción de la señal a través de la membrana plasmática.

Todo lo expuesto ha llevado a sugerir explicaciones alternativas. Hoy dia, esta bien probado que los movimientos del Ca a través de la membrana se ponen en marcha gracias a una serie de complejos fenómenos en el plasmalema. De este modo la estímulación de la membrana pone en marcha la producción del segundo mensajero: aumento del calcio citoplásmico y activación de la proteinquinasa C. Actualmente se postula que los AINE actúan interfiriendo con los fenómenos intramembranosos, especialmente bloqueando la proteina G. Figura 3.

B. Clasificación

Los principales AINE empleados en el presente trabajo se recogen en la Tabla IV. En ella se agrupan según su estructura química.

Es interesante reseñar, que aunque un fármaco de los

descritos sea ineficaz en un paciente, o le produzca toxicidad, no todos los fármacos de este grupo van a resultar ineficaces o tóxicos para ese paciente. La suceptibilidad individual es muy importante en los AINE (48).

C. El proceso inflamatorio en Reumatología y efecto de los AINE

A pesar de la aparente diversidad de procesos reumáticos, existe una cierta uniformidad en los estadíos iniciales del proceso inflamatorio. Son numerosos los agentes desencadenantes de dicho proceso: cristales, bacterias, inmunocolplejos, productos resultantes de la destrucción tisular, etc.. Todos ellos pueden actuar sobre las paredes celulares, principalmente del neutrófilo, originando activación de la cascada del Complemento y la liberación de múltiples mediadores de la inflamación, incluyendo histamina, serotonina, proteasas neutras, superóxido y otros radicales procedentes del Oxígeno, prostaglandinas, etc.. Estos mediadores causan dolor e inician una serie de interacciones que tienden a perpetuar el proceso inflamatorio (49).

Cualquier discusión sobre el modo de acción de los AINE tiende a enfatizar sobre su capacidad para inhibir a la prostaglandinas, olvidandose de la importancia que otros mediadores tienen en el proceso inflamatorio. De hecho, en muchas ocasiones, la medida de la efectividad de algunos antiinflamatorios se

basa únicamente en su cpapcidad para inhibir in vitro a las prostaglandinas, olvidando además que en el proceso de la inflamación aparecen muchos inhibidores fisiológicos, no solamente de la prostaglandinas, sino de otrosmediadores. De este modo, en muchas ocasiones se da importancia a la ceruloplasmina (capaz de inhibir al superóxido y otros radicales tóxicos del Oxígeno), a la alfa,1 antitripsina, alfa,2 macroglobulina, colagenasa, etc. (50).

En resumen, esperar que la inhibición de un sólo mediador de la inflamación pueda alterar de un modo dramático la respuesta inflamatoria es ilusorio. En algunas enfermedades reumáticas, la respuesta, puede ser debida a mediadores químicos, pero en otros casos (como Artritis Reumatoide y otras enfermedades del colágeno) existen complejos mecanismos celulares e inmunológicos que conllevan la aparición de un proceso crónico. De hecho, los sitios potenciales de activación de los AINE son múltiples, y recientemente se le esta dando mucha más importancia a su efecto inhibidor sobre los mecanismos inmunlógicos (51). Probablemente, las diferencias encontradas en la eficacia de un AINE con respecto a otro, tengan mucho que ver con otros efctos sobre la inflamación, además de la inhibición de las prostaglandinas.

Sulfasalacina

La Sulfasalacina ha sido el tratamiento estandar para la enfermedad inflamatoria intestinal durante más de 40 años, aunque inicialmente fue introducida por Svartz (52) como tratamiento de la Artritis Reumatoide en 1.941. En un principiose pensó que esta enfermedad era de origen infeccioso y las sulfamidas el único agente antibacteriano conocido entonces. La Sulfapiridina, unida a una molécula de salicilato mediante enlace azo, formaban un preparado con capacidad antibacteriana y antiinflamatoria (53). En un estudio inicial, el resultado fue prometedor, pero posteriormente, un trabajo realizado por Sinclair (54), hizo abandonar el uso de dicha droga. Treinta años más tarde, un estudio de Mc Conkey en 74 pacientes, puso de manifiesto que la Sulfasalacina (Sulfapiridina) podía ser eficaz en el tratamiento de fondo de la Artritis Reumatoide (55). Posteriormente, Bird (56), demostró que la Sulfasalacina ejercía un efecto relativamente similar al de otras drogas usadas como tratamiento de fondo en la A.R., comparandose desde entonces la eficacia de la Sulfasalacina a la del oro y D-Penicilamina.

La Sulfasalcina se absorbe muy poco en intestino delgado, y es en colon, donde por acción de las bacterias se desdobla en Sulfapiridina, que se absorbe, y en 5,aminosalicílico, que es eliminado por las heces (57).

Dado que la Sulfasalacina provoca efectos secundarios (28 %) en la mayoría de las series), se han realizado estudios de eficacia terapeútica , administrando sulfapiridina o 5,aminosalicílico por separado, demostrandose que la primera molécula es la eficaz en la A.R., mientras que el ácido aminosalicílico (y el 4,aminosalicílico) son eficaces en el tratamiento de lA enfermedad inflamatoria intestinal (58).

El mecanismo de acción en la A. R. no se conoce adecuadamente. Se sabe que la sulfapiridina es capaz de inhibir la lipooxigenasa (y por tanto la producción de leucotrienos) (59). Otros autores han postulado que al inhibir la síntesis de ácido fólico, la Sulfasalazina originaría un efecto similar al del metrotexata (fármaco antifólico por excelencia). Es capaz, además de deprimir los reactantes de fase aguda (prot. C, VSG, etc.), así como de disminuir los niveles de IgG, IgA, e IgM y factor Reumatoide (60).

Se ha demostrado que la Sulfasalacina no disminuye el número de linfocitos, ni altera las proporciones de linfocitos B, T de ayuda o T supresores, pero sí origina una disminución en la proporción de linfocitos de baja densidad (LDL). Estos representan un subgrupo de células activadas (61). Se ha comprobado además, que en aquellos pacientes en los que al inicio del tratamiento existía una anormal respuesta a mitógenos, ésta se corregía. En resumen, es posible que uno de los efectos

de la Sulfasalacina sea la recuperación de algunas de las anormalidades funcionales en los linfocitos (62).

Tras una dosis de 2 grs. de Sulfasalacina, la concentración que se obtiene en sangre es de 50 uM (63). Se ha comprobado así mismo, que la Sulfapiridina es capaz de penetrar en la articulación, que su concentración es más elevada en los lugares de inflamación y que a igual dosis, los niveles alcanzados en sangre periférica son más altos en los pacientes con A. R. que en los que padecen colitis ulcerosa.

Estímulos Quimiotácticos.

Dentro del amplio grupo de péptidos formil-metionil, los más activos estimuladores de los neutrófilos son los que poseen el radical N-formil, y grupos sulfuros contenidos en las cadenas laterales de la metionina. La sustitución de los aminoácidos isovalina y valina, disminuye dicha capacidad estimuladora. El más activo de todos ellos es Formil-metionil--leucil-fenilalanina (FMLP) (64) (65).

La Pepstatina A, es un inhibidor de las proteasas producido por Estreptomyces Testaceus. Es quimiotáctico para los neutrófilos y comparte el mismo receptor (o un receptor muy cercano) que el FMLP (66).

El C_{5a} es la fracción del Complemento denominado anafilotoxina. Origina Quimiotaxis, liberación de enzimas y producción de superóxido por los neutrófilos (67).

A. Factores quimiotácticos en enfermedades reumáticas.

Los trabajos iniciales demostraron que el factor quimiotáctico más importante extraido de la membrana sinovial en la Artritis Reumatoide y en extractos de lesiones vasculitícas era C_{5a} y sus fragmentos, siendo éstos generados por proteasas liberadas por los propios neutrófilos.

En estudios posteriores se pudo averiguar que en la Artritis Reumatoide el C_{5a} aparecía junto a LTB_4, mientras que en la espondiloartritis, el leucotrieno B_4 juega un papel fundamental.

A pesar no obstante, de que han sido descritos varios factores quimiotácticos e inhibidores de los mismos, todavía no se sabe por qué en la A. R. se acumulan células mononucleares en la membrana sinovial, mientras que los neutrófilos aparecen fundamentalmente en el líquido sinovial.

En el Psoriasis se ha comprobado que los extractos de piel afecta, contienen productos liberados del ácido araquidónico a través de la lipooxigenasa, especialmente LTB_4 con

marcada capacidad para estimular a los neutrófilos. SE ha encontrado además en el Psoriasis, otro factor quimiotáctico que probablemente sea una proteasa con capacidad para fragmentar el C_{5a}.

B. Efectos celulares de los factores quimiotácticos

Los pasos bioquímicos mediante los cuales los factores quimiotácticos ponen en marcha la activación celular no son bien conocidos. Inicialmente estos factores se unen a receptores específicos originando varios efectos metabólicos rápidos y transitorios. En primer lugar se activan las ATP asa para el Na y K; posteriormente se producen cambios en los potenciales de membrana con el consiguiente aumento de Ca intracelular, aumenta el metabolismo del fosfatidilinositol disminuyendo el de O_2*, y cambian los niveles de los nucleótidos cíclicos y del Acido áraquidónico. El hecho de que se efectúen todas estas alteraciones metabólicas no implica que se realicen todas aquellas de las que es capaz el neutrófilo. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica no son capaces de producir anión superóxido, pero en cambio, sus neutrófilos son metabolicamente activos y pueden originar quimiotaxis (68).*

En el caso de la Quimiotaxis y Agregación de los neutrófilos más importante que el incremento en los niveles de nucleótidos cíclicos, son los valores extracelulares de Calcio.

La exposición de los neutrófilos a factores quimiotácticos origina como ya hemos apuntado una disminución de la metilación de los fosfolípidos. Esto se correlaciona con un rápido incremento en la disponibilidad de A. Araquidónico y por tanto de sus productos metabólicos.

No es bien conocido el mecanismo por el cual tienen lugar la transducción de la señal de mambrana al interior de la célula. Se ha comprobado, al menos para dos factores quimiotácticos (FMLP y LTB_4) que existen dos clases de receptores en la membrana; uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. En el primero, el Km se correlaciona con la respuesta quimiotáctica y puede ser convertido en receptor de baja afinidad incubando las membranas celulares con nucleótidos de guanidina. La interacción del receptor endógeno puede inhibirse preincubando las células con la toxina pertusis (70). Esta toxina es capaz de inhibir procesos metabólicos tales como el flujo de Ca, el metabolismo del fosfoinositol y del A. Araquidónico y posee la capacidad de suprimir la quimiotaxis y la exocitosis.

Ritmos Circadianos

Todas las células eucarioticas experimentan variaciones circadianas (71). En el hombre se han descrito varios marcapasos endógenos, pero las bases fisiológicas de su regulación no estan completamente aclaradas (72). La exposición a la luz solar y el subsecuente efecto en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal es considerado el mecanismo básico de los ritmos circadianos.

Además de las variaciones fisiológicas de muchos parámetros clínicos y bioquímico, son bien conocidas las modificaciones que en la sintomatología clínica experimentan a lo largo del dia muchas enfermedades (73). La rigidez matutina de la artritis reumatoide es un ejemplo clásico de estas modificaciones.

Las variaciones en el comportamiento celular, bien intrínsecas o bien dependientes de hormonas, etc. (con probado ritmo circadiano), pueden ser la base fisiológica de esas modificaciones clínicas (74).

El estudio de los ritmos circadianos ha evolucionado en la pasada década de ser una mera curiosidad biológica a ser una ciencia importante con notables implicaciones diagnósticas y terapeúticas.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA BIBLIOTECA

Los ritmos circadianos estan relacionados con la medicina clínica en varios aspectos: En primer lugar son un hecho tan constante en biología que su reconocimiento ha introducido la necesidad de tenerlos en cuenta a la hora de considerar los valores normales y los métodos diagnósticos más adecuados. La medida de parámetors bioloógicos tales como constituyentes de la sangre u orina, temperatura corporal, e incluso conducta y humor, varían considerablemente a lo largo del día. Igualmente la respuesta a diversos fármacos , a la radiación e incluso a la cirugía estan considerablemente influenciados por el momento del dia de su administración.

En segundo lugar se ha podido comprobar un creciente número de entidades nosológicas en las cuales se implican alteraciones en el ritmo circadiano. Muchos de estos procesos son de reciente aparición debido a la posibilidad de realizar viajes de larga distancia, y al hecho de que muchos profesionales estan sometidos a frecuentes cambios de turno. Muchos trastornos del sueño, enfermedades endocrinas e incluso la enfermedad maníaco depresiva dependen al menos en parte de alteraciones en el ritmo circadiano normal.

Se han identificado al menos, dos marcapasos fundamentales denominados X e Y, que estan probablemente coordinados por el núcleo supraquiasmático, aunque para muchos autores el marcapaso X estaría localizado fuera del citado núcleo, proba-

blemente en la región preóptica.

Existen numerosas enfermedades en las cuales los síntomas son dependientes de modificaciones a lo lardo del día de diversos parámetros. Así, son bien reconocidas el down, fenómeno de la diabetes a primeras horas de la mañana, la mayor incidencia de infartos de miocardio tambien a primeras horas de la mañana. En este último caso, es especialmente importante el hecho de que esa mayor incidencia puede estar en relación con una mayor agregación espontanea de plaquetas a esa hora del día (75). En la Artritis reumatoide se ha descrito como un signo clásico la rigidez matutina. Esta, se atribuía a factores mecánicos, es decir, durante la noche se acumulaba más líquido sinovial en la articulación al no existir el fenómeno de bomba debido al movimiento, y ese aumento de volumen en líquido dificultaría el movimiento hasta pasadas unas horas. Esta explicación no podría justificar las variaciones que se han descrito en esa enfermedad en muchos componentes séricos, y además, en nuestro laboratorio hemos descrito previamente la existencia de un ritmo circadiano en la quimiotaxis de los neutrófilos de individuos normales. Los valores máximos se obtenían por las mañanas y los mínimos por las noches. Estas variaciones celulares tan importantes en el proceso inflamatorio, deben justificar al menos en parte, las modificaciones que muchos signos y síntomas experimentan a lo largo del día.

Pero además de los procesos inflamatorios, el hecho de que el pirógeno endógeno presente tambien variaciones circadianas ha llevado a postular que la suceptibilidad a las infecciones esta así mismo sometida a cambios a lo largo del día. en ocasiones no obstante, es dificil averiguar si la alteración en el ritmo circadiano es causa o consecuencia de la enfermedad (76).

C. C. F.

El fenómeno inicial en la aparición de un ataque agudo de gota es la existencia de cristales de ácido úrico y neutrófilos en el interior de la articulación (77). En 1.969, Phelps publicó que neutrófilos que previamente habían fagocitado cristales de ácido úrico, liberaban una sustancia con propiedades quimiotácticas para otros neutrófilos (78). Posteriormente, Spilberg y cols. (79), han realizado múltiples trabajos consiguiendo caracterizar dicho factor, al que han denominado C.C.F. o factor quimiotáctico inducido por cristales.

El C.C.F. es una proteina sintetizada por los neutrófilos, (pero no por los macrófagos ni por células sinoviales), en respuesta a la facocitosis de algunas partículas cristalinas (tambien ciertos agregados de gammaglobulina, levaduras, etc. son capaces de originar C.C.F., aunque en menor cuantía) (80).

A nivel subcelular, la mayor parte del C.C.F. se encuentra en la fracción lisosomal. Su peso aproximado es de 11.500 dalton y su composición de aminoácidos puede verse en la Tabla V. (81). Aunque la secuencia completa no se conoce, sí se sabe que los siete primeros aminoácidos son asparagina--leucina-glicina-glutamina-glutamina-histidina-fenilalanina. Es sensible a 80º de Tª durante 30 minutos, y es pronasa positivo. Su actividad no se afecta por la extracción del residuo siálico terminal. El C.C.F. origina, además de quimiotaxis, liberación de enzimas.

El mecanismo de acción de la Colchicina en la gota es interesante, ya que probablemente su acción sea debida a la capacidad que posee de inhibir la producción de C.C.F. Así, si a un animal de experimentación tratado con dosis altas de Colchicina se le inyectan cristales de ácido úrico, no se produce artritis. En cambio, si se le inyecta C.C.F. ya formado, sí se produce artritis. Además, se requieren dosis mucho menores de Colchicina para inhibir la producción de C.C.F. que para inhibir la liberación de enzimas lisosómicas, lo que sugiere que dicha droga actúa inhibiendo el C.C.F., antes de ser almacenado en los lisosomas (82).

Una característica importante del ataque agudo de gota es su capacidad de autolimitación, incluso espontaneamente, aún existiendo todavía cristales en la articulación (83).

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA BIBLIOTECA

Este peculiar hallazgo ha llevado a la búsqueda de uno o varios inhibidores de la inflamación, que van apareciendo durante el ataque agudo. En nuestro laboratorio se ha podido comprobar, que las lipoproteinas de baja densidad inhiben la fagocitosis de los cristales de ácido úrico por los neutrófilos, ya que éstas, al recubrir a los cristales les confieren unas características físico-químicas, haciendo imposible su fagocitosis (84). Además de este posible efecto inhibidor de las LDL, el propio C.C.F. puede tambien disminuir la intensidad del proceso. Se ha comprobado que cuando las cantidades de dicha sustancia se incrementan en la articulación, se alcanza un dintel por encima del cual, el C.C.F. posee efectos inhibidores de la fagocitosis. Este efecto pondría fín al ataque agudo de gota, puel al no existir fagocitosis, desaparece la producción de C.C.F. y de otros mediadores de la inflamación (85).

Por todo lo expuesto, el C.C.F. es de importancia esencial en las artropatías inducidas por cristales, siendo además un excelente modelo experimental de los procesos inflamatorios. Todo ello nos ha conducido a estudiar:

1. Si el C.C.F. purificado estimula la Agregación.

2. El C.C.F. posee numerosos aminoácidos. Nos interesa saber si sus propiedades aglutinantes se conservan al emplear 3 o 7 de los mismos.

Sustancia P

El neurotransmisor denominado sustancia P, es un compuesto que puede jugar un papel en la Artritis Reumatoide. Se une tambien a los receptores del FMLP (86).

La Artritis Reumatoide es una sinovitis inflamatoria, de diagnóstico clínico. Característica importante de esta enfermedad es su simetría, y el hecho de que algunas articulaciones se afectan más que otras (pie más que rodilla y ésta más que cadera), ha llevado a considerar que el S.N.C. juegue un papel en el desarrollo de la entidad. Esto no es nuevo en Reumatología, ya que por ejemplo en la gota, se dan menos ataques en el miembro parético, igual que los nódulos de Heberden (87).

En los últimos años, se han descubierto varios péptidos en el Sistema Nervioso que componen una nueva y amplia familia de mensajeros con importantes funciones. Inicialmente se reconocían nueve o diez de estos péptidos, pero en muy pocos años se han descrito treinta o cuarenta más. Este impulso tuvo su inicio estudiando las encefalinas y otros péptidos derivados del opio, aunque la mayoría de los descritos recientemente no estan en relación con éstos. Todos los neuropéptidos estan implicados en diversas funciones moduladoras del Sistema Nervioso, que incluyen desde la adecuada calibración de las finas terminaciones nerviosas, hasta la regulación del apetito,

del sistema reproductor o de la conducta.

Especial interés ha despertado el hecho de descubrirse que varios de estos péptidos se encuentran en las terminaciones sensitivas donde pueden actuar como transmisores sensitivos.

La Sustancia P es un péptido compuesto por doce aminoácidos y se encuentra en una subpoblación de fibras sensitivas C, pudiendo actuar como transmisor liberado en la médula espinal y en los núcleos de la base para las fibras aferentes que transmiten la información nociceptiva. Esta sustancia y otros neuropéptidos se encuentran tambien en altas concentraciones en las terminaciones distales sensitivas de la piel, articulaciones y vísceras. Se piensa que la liberación de Sustancia P de esas terminaciones sensitivas juega un importante papel en el proceso inflamatorio. Este neuropéptido es un poderoso vasodilatador y aumenta la permeabilidad capilar. Estas propiedades pueden contribuir a la extravasación de componentes plasmáticos y al aumento de la hiperemia que acompañan a los procesos inflamatorios. Además, la Sustancia P puede estimular directamente a las células cebadas cerca del foco inflamatorio.

Dale fue el primer autor en proponer que la liberación de factores neurógenos podía ser responsable del fenómeno de la triple respuesta.

Como ya hemos expuesto, la Sustancia P es sólo uno de los péptidos que se encuentran en las terminaciones nerviosas. Por ejemplo, una sustancia similar, denominada Neuroquinina A y B, y el péptido relacionado con la Calcitonina (CGRP5), es un potente vasodilatador y algunas de sus acciones son sinérgicas con las de la Sustancia P. En otras terminaciones se encuentra somatostatina, péptido intestinal vasoactivo, colecistoquinina, etc.

Una de las dificultades que tenemos para estudiar el verdadero valor de los neuropéptidos es que disponemos de muy pocos inhibidores de su función y que probablemente muchas de sus acciones estan imbricadas. Recientemente se ha comprobado que la Sustancia P se encuentra descendida en sangre periférica de pacientes con hipertensión arterial y el tratamiento con prazosín y captopril incrementa dichos niveles. Parece ser que una población de fibras no mielínicas del SNP, es el componen aferente, incluyendo algunas fibras que contienen el neurotransmisor undecapéptido Sustancia P. Se ha comprobado que la aplicación local de esta sustancia, produce muchos de los cambios tisulares de la inflamación, tales como vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular, estimulación de la fagocitosis por los PMN y degranulación de las células cebadas (al parecer, la Sustancia P tiene un N-terminal en el tetrapéptido último de su secuencia) (88).

Existe evidencia de que en las articulaciones hay sustancia P derivada de las neuronas. Además, en las ratas en las que se produce artritis experimental, la cantidad de Sustancia P se incrementa en las neuronas que suplen a las terminaciones nerviosas de las articulaciones inflamadas. En la rata, las articulaciones que presentan más artritis son auqellas que estan suplidas por más cantidad de fibras que contienen Sust. P . La inyección articular de dicha sustancia produce artritis (89).

Se ha encontrado receptores en las lineas celulares Monocitos-Macrófagos.

Además de Sustancia P, existen otros neuropéptidos en las fibras aferentes, tales como el VIP, somatostatina, etc., pero el más proinflamatorio es la Sustancia P (90).

TABLA I: ENTIDADES CLINICAS EN LAS QUE EXISTE UN DEFECTO EN LA QUIMIOTAXIS IN VITRO:

I. DEFECTOS CELULARES:

A: Permanentes: *Síndrome del leucocito perezoso*
Síndrome de Chédiak- Higashi
Síndrome de Qui- Hill
Trastornos en la polimerización de lecitina

B. Transitorios: *Infecciones víricas y septicemias*
Trasplantes de médula ósea
Período neonatal
Artritis Reumatoide
LES

II. DEFECTOS EN LA SINTESIS DE MEDIADORES:

A. Inadecuada generación de actividad quimiotáctica : *deficiencias del Complemento*
S. de Wiskott- Aldrich

B. Excesiva producción de inhibidores : *Enfermedad de Hodgkin*
Lepra
Sarcoidosis
Hipogammaglobulinemia
Cirrosis

C. Inhibidores directos de los leucocitos : *Aumento de niveles de polímeros de IgA*
Infecciones recurrentes en la infancia

TABLA II: ENTIDADES CLINICAS EN LAS QUE EXISTE UN EXCESO DE QUIMIOTAXIS IN VITRO

I. CELULARES :	*Enfermedades bacterianas agudas*
	Enfermedad de Behçet
	Artritis reactivas B_{27} +
II. TRASTORNOS EN LA SINTESIS DE MEDIADORES:	
A. Aumento en la producción de factores quimiotácticos	*urticaria al frio*
	psoriasis
	gota
	Artritis Reumatoide
B. Deficiente inactivación de factores quimiotácticos	*déficit de alfa*$_1$ *antitripsina*
C. Aumento de la activación de los neutrófilos	*Pioderma gangrenosa*
	Tratamiento con corticoides

TABLA III: ACEITE DE PESCADO Y ENFERMEDADES REUMATICAS

.*E P A* *Suprime el Lupus murino en cepas* F_1

.*E P A* *Suprime el Lupus murino en cepas B y SB*

.*E P A* *Mejora la función renal pero aumenta la vasculitis en cepas MRL*

.*E P A* *Aumenta la incidencia de artritis inducida por colágeno en ratas Sprague--- Dawleys*

EPA: Acido Eicosapeptanoico

TABLA IV: CLASIFICACION DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

A. SALICILATOS Y DERIVADOS:

- *Aspirina en varias formas*
- *Trisilicato de Magnesio*
- *Salsalato*
- *Diflunisal*

B. ACIDOS ANTRANILICOS:

- *Acido Mefenámico*
- *Meclofenamato Sódico*
- *Acido Flufenámico*

C. ACIDO ARILACETICO:

- *Diclofenato*
- *Fenclofentao*

D. ACIDO ARILOPROPIONICO:

- *Ibuprofen*
- *Flurbiprofen*
- *Ketoprofen*
- *Naproxen*
- *Fenoprofen*
- *Indoprofen*

TABLA IV. (continuación).

E. ACIDO TERARILACETICO:

. *Tolmetin*

. *Zomepirac*

F. ACIDO INDOLACETICO

. *Indometacina*

. *Sulindac*

G. PIRAZOLIDINAS:

. *Fenilbutazona*

. *Oxifenbutazona*

. *Azapropazona*

. *Feprazona*

H. OXICAN:

. *Piroxican*

TABLA V: COMPOSICION DEL C. C. F.

AMINOACIDOS	Nº DE RESIDUOS
ASPARAGINA	8
TREONINA	5
SERINA	8
GLUTAMINA	14
PROLINA	3
GLICINA	12
ALANINA	9
CISTEINA	2
VALINA	5
METIONINA	2
ISOLEUCINA	4
LEUCINA	14
TIRONINA	3
FENILALANINA	4
HISTIDINA	3
LISINA	5
ARGININA	5

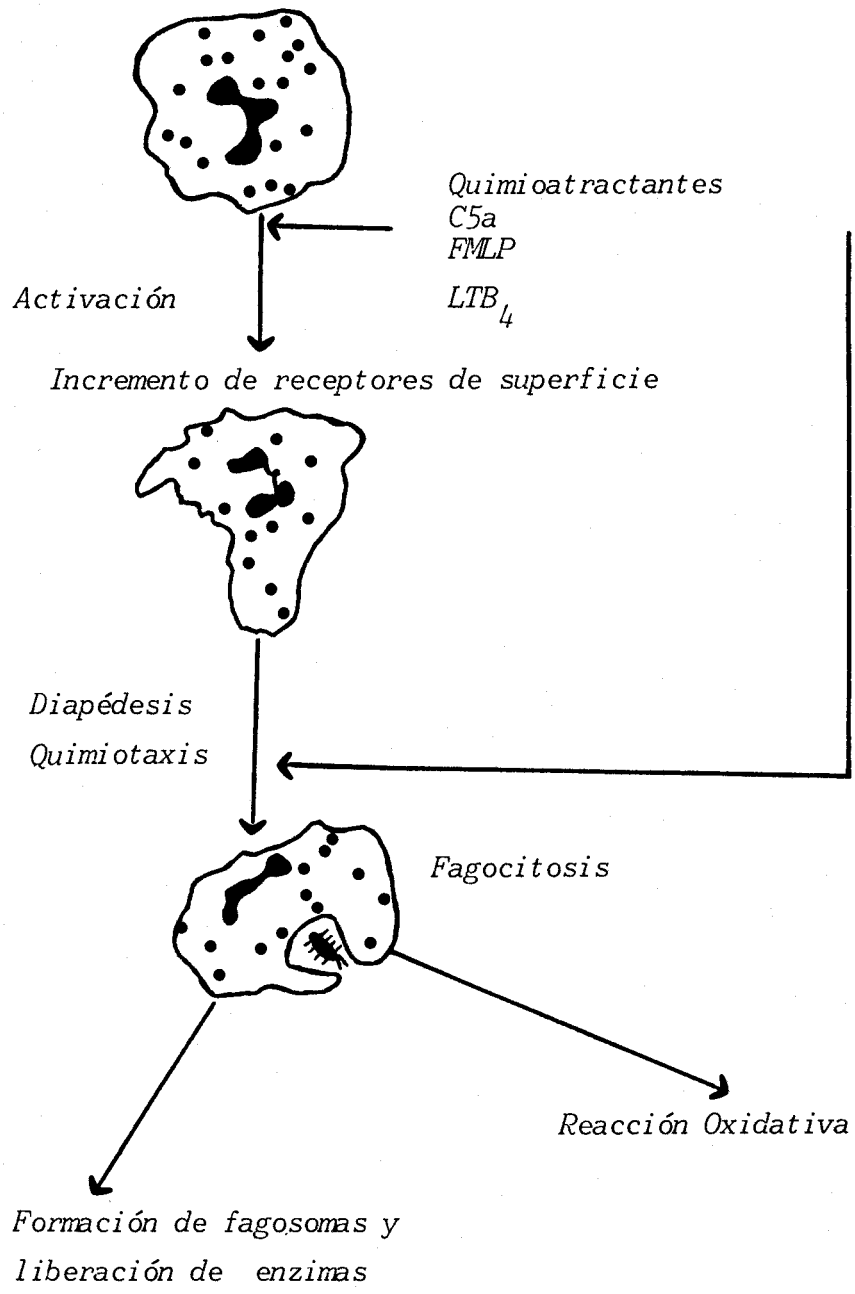

FIGURA 1: ACTIVACION DEL NEUTROFILO

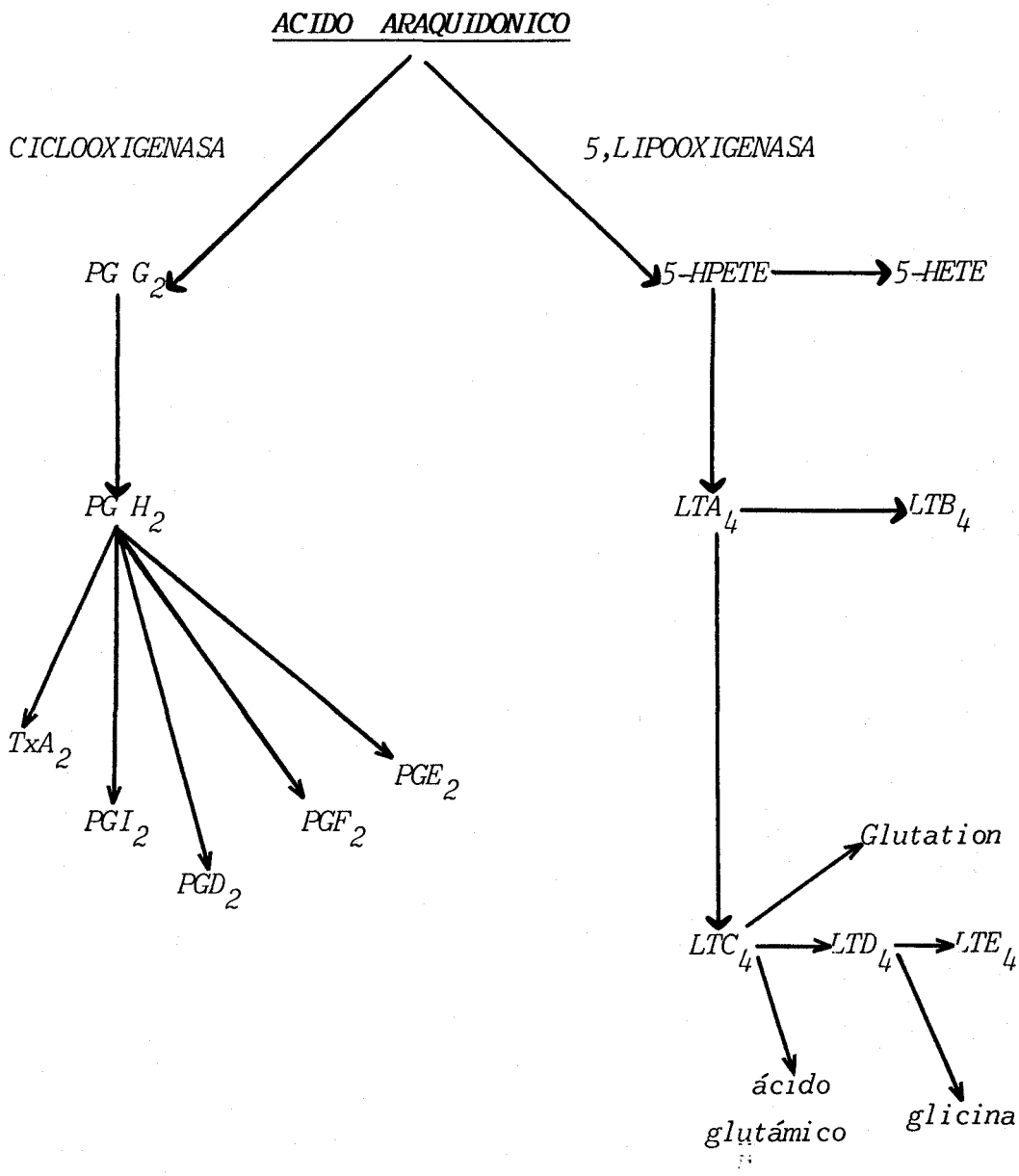

FIGURA 2: METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO

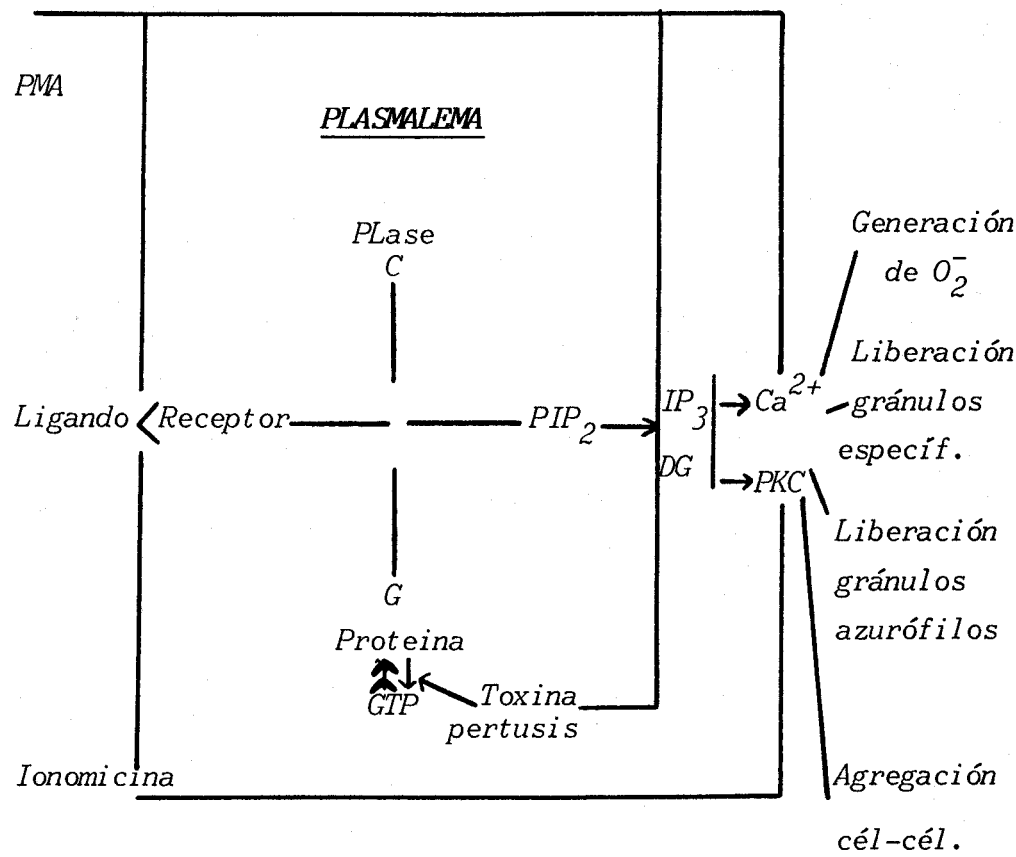

FIGURA 3: *Mecanismo de acción de los AINE propuesto por Abramson.*

PLase C: Fosfolipasa C; PIP_2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; IP_3: inositol 1,4,5-trifosfato; DG: sn-1,2-diacilglicerol; PKC: proteincinasa C; GTP trifosfato de adenosina; PMA: miristato acetato de forbol.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en los mecanismos defensivos ante las infecciones y en los procesos inflamatorios y autoinmunes.

El neutrófilo, al ser activado a través de receptores de superficie, libera una gran cantidad de enzimas, produce radicales tóxicos de Oxígeno, adquiere capacidad fagocítica y quimiotáctica. Estas son las funciones que habitualmente se determinan al analizar sustancias estimuladoras o inhibidoras de los neutrófilos.

Para que un neutrófilo se active, debe ser atraido al lugar lesionado (Quimiotaxis), pero previamente debe adherirse a las paredes vasculares, y agregarse entre sí. Es decir, la agre-

gación sería la primera función de los neutrófilos activados.

La Agregación de los neutrófilos ha sido escasamente estudiada, a pesar de que recientemente se ha comprobado que una excesiva agregación in vivo, puede ser la responsable de importantes alteraciones clínicas, tales como el Síndrome de salida de bomba, shock tóxico, algunas manifestaciones de la pancreatitis, etc.

Por todo ello nos propusimos estudiar:

1. Los efectos que diversos compuestos a los que se atribuye capacidad estimuladora o inhibidora de las funciones clásicas de los neutrófilos ejercen en la agregación de los mismos. Para ello, hemos empleado sustancias que activen diferentes receptores en los neutrófilos, tales como péptidos sintéticos, factores del Complemento, productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico a través de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa, neuropéptidos, etc.

Entre los inhibidores se trata de conocer los efectos de los antiinflamatorios no esteroideos, Colchicina, bloqueantes de los canales del Calcio, etc.

2. Si la agregación es un fenómeno inespecífico, es decir, si se pone en marcha ante cualquier estímulo celular, o está

mediada por receptores. Para esto, hemos realizado experimentos de desactivación cruzada, que están basados en el hecho, bien conocido, de que cuando una función está ,mediada por receptores específicos, éstos se agotan ante la repetición del mismo estímulo, pero son capaces de responder a un segundo estímulo diferente.

3. La sensibilidad de la agregación. Para esto hemos empleado C.C.F. (Factor quimiotáctico inducido por cristales).Este péptido, liberado específicamente cuando los neutrófilos fagocitan cristales, es capaz de estimular a estas células para realizar las funciones clásicamente estudiadas. Nos propusimos saber si era capaz así mismo de originar agregación, y si toda la molécula o solamente una parte de la misma, era la responsable de esta función.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODO

MATERIAL

Se ha trabajado con neutrófilos de sujetos sanos, de edades comprendidas entra 20 y 40 años.

Para la separación de células se siguió el método de Boyun (91) modificado (92), necesitandose para todo ello:

A. REACTIVOS

1. Anticoagulación de las muestras de sangre con Heparina sódica al 1 % (10 U/ml de sangre).

2. Solución de Dextrán al 6 % en buffer PBS. El Dextrán es un polímero de la glucosa de pM 510.000 (Sigma Chemical Company Nº 5251).

3. P.B.S., buffer fosfato salino 0,15 M., pH 7,4.

4. Hanks con EDTA: 500 ml de Hanks, 0,93 grs. de EDTA y 5 mlde Hepes 1 M., pH 7,4.

5. Mezcla de separación constituida por Ficoll-Hypaque. El primero es un polímero de la sucrosa de pM 400.000 (Sigma Chemical Company Nº 4357). El Hypaque sódico es diatrizoato sódico con acetato cálcico disódico 1: 10.000 como estabilizador, y CO_3Na_2NaOH y ClH para ajustar el pH (Winthrop Lab. NDC 0024--0766-02) R. La mezcla se prepara de la siguiente forma: 14 ml de agua destilada, 106 ml de Ficoll al 9 % y finalmente 30 ml de Hypaque, debiendo ser la densidad de 1.077.

6. Medio de suspensión celular: Solución de Hanks enriquecida con seroalbúmina bovina a una concentración de 1 mgr/ml (Sigma Chemical Company Nº A 4503), pH 7,4.

7. Solución de Türck para el contaje celular, compuesto por: 3 grs. de ácido acético glacial, 3 gotas de azul de metileno o violeta de genciana en 300 ml de agua destilada.

8. FMLP: N-formil-2, metionil-2, leucil-L-fenilalanina, péptido sintético de pM 437. Almacenado de DMSO a una concentración de 10^{-2} M. (Sigma Chemical Company Nº F6004).

9. Citocalasina B, sustancia mediadora de la Agregación, de pM 479,6. (Sigma Chemical Company Nº C6762).

10. Pepstatina A, Sustancia P, glicina-histidina-glicina, Nifedipina, Verapamil, Trifluoperazina, Colchicina, Acido acetilsalicílico, Sulindac, Ibuprofen, Piroxican, PGE_1, Salazopirina, Septapéptido. Fueron adquiridos de Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. U.S.A.

11. Leucotrieno B_4. Suministrado por el Profesor Mc. Dermoth. Washington University, St. Louis, Mo. U.S.A.

12. Fracción 5a del Complemento (C_{5a}).Se obtuvo tras la activación del suero con Zymosan. Posteriormente, el suero activado se pasaba por una columna de Sephadex, y el C_{5a} se obtenía en un colector de fracciones. La cantidad de C_{5a} se expresa en peso de proteina/volumen en todos los experimentos.

B. OBTENCION DE C.C.F.

El C.C.F. se aisló de la fracción lisosómica de granulocitos obtenidos de sangre periférica de individuos normales. Para ello, las células fueron incubadas con cristales de urato monosódico. Tras la fagocitosis de cristales, los neutrófilos se lisaron y la fracción lisosómica se purificó por centrifugación diferencial y cromatografía en columna de Sephadex G-50. La fracción que contenía C.C.F. era pura en un 98 %, estimación por HPLC.

C. APARATAJE

1. Para procesar la sangre se emplearon tubos de 50 ml de polipropileno, de fondo cónico, para evitar las adherencias de los granulocitos al cristal

2. En Agregación fueron empleados tubos de 5 mm. de diámetro de cristal siliconado.

3. Centrífuga Beckman, modelo TS-R con unidad de refrigeración y rotor TH-4.

4. Incubador con CO_2 al 5 %, modelo 3164 de Farma Scientific

5. *Microscopio Leitz, con objetivo de 40 aumentos.*

6. *Cámara de Thoma,para contaje celular.*

7. *Lumiagregómetro Payton mod. 1010. Payton Scientific Limited. Ca M1S3R2.*

METODO

Los neutrófilos empleados en el presente trabajo procedían de sujetos sanos que no hubieran ingerido ningún medicamento, al menos siete dias antes de la extracción. Se obtuvieron de cada uno de ellos 20 ml de sangre en material heparinizado previamente, siendo procesadas las muestras inmediatamente después de la extracción.

A. SEPARACION CELULAR Y CONTAJE

Se coloca la sangre en tubo Falcon y se centrifuga a 600 r.p.m. durante 10 minutos con freno al mínimo.

Se desprecia el sobrenadante y el sedimento se diluye en

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA BIBLIOTECA

Hanks con EDTA , hasta completar un volumen de 40 ml, y se coloca a continuación sobre la mezcla de separación con pipeta Pasteur estéril, cuidando que no se mezcle, y se centrifuga durante 30 minutos a temperatura ambiente, a 1.350 r.p.m. con freno al mínimo. Transcurrido el tiempo se observan cuatro capas:

- *sobrenadante amarillento*
- *interfase conteniendo mononucleares*
- *mezcla de separación*
- *última capa que contiene eritrocitos y neutrófilos*

Esta última capa se diluye en un volumen de PBS igual al inicial de sangre y 1/3 de Dextrán, mezclando sin agitar.

Incubar en estufa con ambiente de CO_2 de 35 a 45 minutos a 37º C. Posteriormente se toma el sobrenadante y se coloca en tubo Falcon, completando el volumen con PBS hasta 40 ml.

Se centrifuga a temperatura ambiente, 15 minutos a 1.500 r.p.m., con freno alto.

Se desprecia el sobrenadante, y como el pellet de neutrófilos suele quedar contaminado por eritrocitos, se realiza un choque hemolítico con agua destilada para eliminarlos. Para ello, se añaden dos o tres ml de agua destilada, pipeteando energicamente durante 15 segundos, y se añade rápidamente PBS hasta un volumen de 35-40 ml.

Se vuelve a centrifugar 15 minutos a 1.500 r.p.m., temperatura ambiente y freno alto.

Se elimina el sobrenadante y el pellet resultante es diluido en 1 ml de medio, pasando entonces al contaje celular, para el que se procede de la siguiente forma:

Se prepara una dilución 1/10 con solución de Türk y la suspensión de células, tomando 20 microlitros de ésta y 180 microlitros de sol. de Türck.

De esta dilución se toma una muestra, que es colocada en la cámara de Thoma y se procede al contaje. No es necesario contar los 16 cuadros de que consta la cámara. Se pueden contar cuatro o seis, calcular la media, y ésta multiplicarla por 16. El resultado se multiplica por 10 porque el volumen de la cámara es de 0,1 mm_3, y por 1.000 porque las células estan contenidas en 1 ml. Una vez obtenido el número de células, se preparan a la dilución adecuada.

B. AGREGACION

Se ha seguido el método de Craddock y col. Para ello, se empleó el Agregómetro descrito. Se han utilizado tubos siliconiza-

dos con agitador metálico, a 900 r.p.m.. La calibración del aparato se realizó de modo que la máxima transparencia de luz se realizara con una dilución de 50 % (volumen/volumen).

En el tubo control se colocaron $2x10^6$ neutrófilos en un volumen total de 0,5 ml.

En el tubo problema se colocaron $3,5x10^6$ neutrófilos, en un volumen inicial de 0,4 ml.

Tras dos minutos para que se equilibraran ambas soluciones, se añadían 50 ul de Citocalasina B (5 µgr/ml) al tubo problema, permitiendo de 3 a 5 minutos de incubación.

Posteriormente se depositaban 50 µl del estímulo (FMLP, Pepstatina, etc.) y comenzaba a determinarse la Agregación durante los tres minutos siguientes.

La medida de la Agregación se realizó mediante un planímetro integrado, y los resultados se expresan en cm^2/minuto.

C. EXPERIMENTOS DE DESACTIVACIÓN CRUZADA

En estos experimentos se modificaron los volúmenes del

tubo problema. En un volumen de 0,350 ml se suspendieron $3,5x10^6$ neutrófilos.

Adición posterior de Citocalasina B hasta un volumen de 0,400 ml.

Tras cinco minutos, se añadió el primer estímulo, incubando las células durante cinco minutos, sin registrar la Agregación.

Transcurrido el tiempo se añadió el segundo estímulo, midiendo entonces la Agregación.

En algunos experimentos, tras la incubación con el primer estímulo, las células fueron lavadas, centrifugadas, y el volumen recontruido.

D. RITMO CIRCADIANO

Se realizó obteniendo muestras de sangre a las 8.00, 14.00, y 20.00 horas, realizando los experimentos inmediatamente después de la extracción de sangre.

E. ESTUDIO ESTADISTICO

Para los ritmos circadianos se empleó el Análisis de Vaiaciones (ANOVA) bifactorial, para todas las muestras, y el test de Scheffe para encontrar las diferencias significativas (grado de confianza más de 0,05) (93) (94).

Para el resto de los experimentos se utilizó la T de Student, y el Test de Maun-Whitney-Wilcoxon para muestras independientes, con datos numéricos no apareados.

Se han empleado los paquetes informáticos estadísticos SPSS y Statgraf.

RESULTADOS

RESULTADOS

A. EFECTO DEL MEDIO

Para alcanzar una curva óptima de Agregación de neutrófilos, es necesaria la presencia de Calcio en el medio. Cuando se emplea solución de Hanks con una concentración de Calcio de 1,9 x 10^{-3}, la curva de Agregación alcanza valores de 4.678 cm^2/min. En cambio, empleando medio sin calcio, los valores son de 2.000 cm^2/minuto.

Si la concentración de Calcio es de 1 x 10^{-4} M, el valor obtenido en la curva es de 30 % menor. Si la concentración es de 1 x 10^{-3} M, la curva es un 20 % menor.

Diversas concentraciones de Magnesio no influyeron en la Agregación de los neutrófilos.

B. CITOCALASINA B

En condiciones basales, la estimulación de los neutrófilos con factores agregantes origina una curva de pequeñas dimensiones. Por esta razón, siguiendo a otros autores, los neutrófilos se preincubaron previamente con Citocalasina B, durante cinco minutos, antes de ser estimulados, con los siguientes resultados:

Preincubación sin Citocalasina B ..... 2000 ± 800 cm^2/min.

Preincubación con Cito. B, 0,5 µgr/ml..... 5900 ± 870 cm^2/min.

Preincubación con Cito. B, 1 µgr/ml..... 4500 ± 750 cm^2/min.

Preincubación con Cito B, 5 µgr/ml..... 3600 ± 500 cm^2/min.

Como puede observarse, los valores óptimos se obtuvieron al preincubar las células con 0,5 µgr/ml de Citocalasina B. Figura 1

C. RITMOS CIRCADIANOS

Se estudiaron once individuos normales y seis pacientes con Artritis Reumatoide (Figura 2). No hemos encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos a diversas horas del dia, aplicando el ANOVA bifactorial, aunque existen unos valores algo menores a última hora. En los controles, las cifras obtenidas han sido: 5600 ± 1000; 5600 ± 800 y de 5100 ± 300 cm^2/min. a las 8.00, 14.00 y 20.00 horas respectivamente.

Tampoco se modifican los valores a lo largo del dia en la agregación de pacientes con Artritis Reumatoide, siendo los valores obtenidos: 6000 ± 1700; 5480 ± 700 y 5300 ± 0,900, a las 8.00, 14.00 y 20.00 horas. Como puede observarse, son superponibles las cifras obtenidas en ambos grupos.

D. ESTIMULOS QUIMIOTACTICOS

1. FMLP: Hemos empleado este péptido a las concentraciones que se sabe es activo, tanto para originar quimiotaxis como superóxido. Obtuvimos, como se expresa en la Figura 3, los siguientes valores de agregación, en cm^2/min, al estimular con diversas concentraciones de FMLP:

FMLP 1 x 10^{-4} M ..... 2.200 ± 200 cm^2/min.
FMLP 1 x 10^{-5} M ..... 2925 ± 340 cm^2/min.
FMLP 1 x 10^{-6} M ..... 2154 ± 620 cm^2/min.
FMLP 1 x 10^{-7} M ..... 1468 ± 174 cm^2/min.
FMLP 1 x 10^{-8} M ..... 1050 ± 350 cm^2/min.

La concentración de FMLP 1 x 10^{-8} no originaba prácticamente agregación, y a concentraciones de 1 x 10^{-5} esta era óptima.

Para originar Agregación, por tanto, son precisas concen--

traciones de FMLP (cien veces más), que las necesarias para obtener una quimiotaxis adecuada. La morfología de la curva es similar a la de otras curvas de función de neutrófilos, en las que concentraciones excesivas de estímulo, inhiben la función celular.

2. FRACCION 5a del complemento (C_{5a}): Como hemos indicado, la preparación de complemento empleada, es una purificación parcial de C_{5a}, y la concentración por tanto, es sólo aproximada.

A una concentración de 50 µgr/ml, la agregación obtenida es considerable (2229 ± 224 cm^2/min), pero es aún mayor cuando se emplea C_{5a} a 25 µgr/ml (2513 ± 175 cm^2/min), Figura 4.

3. LEUCOTRIENO B4: La agregación originada por el LTB_4, es óptima a una concentración de 10^{-8} M, con 2747 ± 230 cm^2/min., aunque a 1 x 10^{-9} todavía es capaz de producir agregación.

La curva completa empleando diversas concentraciones se representa en la Figura 5.

4. PEPSTATINA A: Los resultados han sido de 1295 ± 434 cm^2/min. al emplear 1 x 10^{-4} M; 2153 ± 162 cm^2/min. con 1 x 10^{-5} y 1340 ± 614 cm^2/min con Pepstatina A, 1 x 10^{-6} M.

Aunque es activa, ésta sustancia requiere concentraciones mayores. Su margen de acción es más estrecho que el de otros péptidos. Figura 6.

5. GLICINA-HISTIDINA-GLICINA: Al incubar las células con 100 µgr/ml, se obtuvo una agregación de 1463 ± 300 cm^2/min; con 200 µgr/ml, 2774 ± 240 cm^2/min, y por fín 1860 ± 350 cm^2/min, al,emplear una concentración de 300 µgr/ml. Como puede observarse en la Figura 7, esta sustancia fue capaz de originar una agregación considerable, siendo la concentración óptima de 200 µgr/ml.

La curva, en la que concentraciones excesivas inhiben la función, es tambien típica de los estímulos quimiotácticos.

6. SEPTAPEPTIDO Y C.C.F.: Como se ha expuesto en la sección Material y Métodos, el C.C.F. está constituido por 14 aminoácidos. En el presente experimento, se han empleado los 7 últimos aminoácidos, y se ha comparado su acción con la de la molécula de C.C.F. completa.

El Septapéptido originaba una agregación de 2458 ± 240 cm^2/min a una concentración de 1×10^{-4} M, y de 2643 ± 308 cm^2/min con 5×10^{-5} M. Estos valores son superponibles a los obtenidos empleando la molécula completa de C.C.F. a una concentración de 1 µgr/ml (2409 ± 610 cm^2/min). De acuerdo con estos experimentos por tanto, la capacidad agregante del C.C.F. estaría en la unión de siete de sus aminoácidos. Figrua 8.

E. BLOQUEANTES DE LOS CANALES DEL CALCIO

Se han empleado tres bloqueantes de los canales del Calcio: Nifedipina, Verapamil y Trifluoperazina (ésta última más empleada como antidepresivo que como antianginoso). En el diseño experimental, iniciamos el trabajo con otras drogas para comprobar si eran capaces de inhibir la agregación inducida por otras sustancias. Como control, realizamos experimentos en los que se demuestra que los bloqueantes de los canales del Calcio son capaces no sólo de inhibir (como se expondrá más adelante), sino de estimular la Agregación.

Obtuvimos los siguientes resultados:

1. *Nifedipina:*

   1×10^{-3} M ..... 2942 ± 305 cm^2/min

   1×10^{-4} M ..... 2234 ± 207 cm^2/min

   1×10^{-5} M ..... 1160 ± 410 cm^2/min

   Concentración óptima, 1×10^{-3} *M. Figura 9.*

2. *Verapamil:*

   1×10^{-4} M ..... 1200 ± 170 cm^2/min

   1×10^{-5} M ..... 1898 ± 190 cm^2/min

   Concentración óptima, 1×10^{-5} *M. Figura 10.*

3. *Trifluoperazina:*

   1×10^{-4} M ..... 1500 ± 430

   5×10^{-4} M ..... 1990 ± 650

   1×10^{-5} M ..... 1600 ± 480

   Concentración óptima, 5×10^{-4} *M. figura 11*

F. DESACTIVACION CRUZADA

1. Para valorar si la activación de la Agregación era estímulo-específica, se realizaron los experimentos representados en la Tabla I. La preincubación de las células con FMLP, impide su activación posterior al FMLP. Algo similar sucede cuando la preincubación se realiza con Pepstatina y posteriormente se añade FMLP, ya que ambos péptidos comparten un mismo receptor (o receptores muy próximos). En cambio, la preincubación de las células con C_{5a} no impide la subsecuente agregación al FMLP (o a la inversa). No existe por tanto desactivación cruzada.

En estos experimentos, la preincubación de las células con Sustancia P, no impide la agregación inducida por el FMLP.

2. En la Tabla II se representan los resultados de la desactivación cruzada FMLP-Nifedipina y C_{5a}-Nifedipina.

La preincubación de los neutrófilos con Nifedipina a 1×10^{-4} M, origina una marcada desactivación (desactivación cruzada) al estimular con FMLP. Esta desactivación va desapareciendo parcialmente cuando van descendiendo las concentraciones de Nifedipina en la preincubación.

Igualmente, tanto la preincubación de las células con FMLP como con C_{5a}, las desactiva cuando son estimuladas con Nifedipina.

G. INHIBIDORES DE LA AGREGACION

1. COLCHICINA:EFECTOS DEL TIEMPO. Como se expresa en la Figura 12, la Colchicina es capaz de inhibir la agregación de los neutrófilos inducida por FMLP, solamente si la preincubación es prolongada. Con cuatro minutos de preincubación, la inhibición es escasa. Son precisos 30 minutos (no se representan los tiempos intermedios), para originar una inhibición en la agregación del 52 %, empleando una concentración de Colchicina de 1×10^{-3} M. Con 1×10^{-4} M, la inhibición es del 60 % y del 79 % cuando la concentración es de 1×10^{-5} M.

2. ACIDO ACETILSALICILICO Y OTROS AINES:

a. Acido Acetilsalicílico: En la Tabla III se representan los resultados obtenidos al preincubar los neutrófilos con la citada sustancia. Existe una inhibición en la agregación a concentraciones de 1×10^{-5} M, aunque la máxima inhibición se obtiene a 1×10^{-2} M. No obstante, la liberación de LDH, a esta concentración era del 15 % (habitualmente la concentración óptima no debería originar más liberación de LDH que 5 %).

b. Sulindac. Ibuprofen. Piroxican: Los resultados se encuentran expresados en las Tablas IV,V y VI respectivamente. Todos estos productos son capaces de originar inhibición en

la agregación, pero las concentraciones son bastante elevadas (máxima inhibición con 1 x 10^{-2}; a 1 x 10^{-5} M, la inhibición prácticamente desaparece).

c. *Antiinflamatorios no esteroideos más prostaglandinas*

En estos experimentos se trata de evitar la inhibición producida por los antiinflamatorios no esteroideos, reponiendo en el medio PGE_1. Preincubando las células con Piroxican, se comprueba que existe una inhibición en la agregación, pero la reconstrucción del medio con PGE_1, no sólo no evita la agregación, sino que la potencia.Tabla VII.

d.*Salazopirina: La preincubación de los neutrófilos con Salazopirina, origina una disminución dosis-dependiente de la agregación. Pero al preincubar los neutrófilos con Sulfapiridina o con 5,aminosalicçilico (los dos componentes de la Salazopirina) se observa que la inhibición es debida al 5, aminosalicílico. Tabla VIII.*

DESACTIVACION CRUZADA F.M.L.P.- PEPSTATINA- C5a

1er Estímulo	*2º Estímulo*	*Agregación* cm^2
FMLP 10^{-5} *M*	*FMLP* 10^{-5} *M*	*0*
Pesptatina 10^{-5}*M*	*FMLP* 10^{-5} *M*	*0*
FMLP 10^{-5} *M*	*Pepstatina* 10^{-5} *M*	*0*
C_{5a} *25 ugr/ml*	*FMLP* 10^{-5} *M*	*80 % ± 10 %*
FMLP 10^{-5} *M*	C_{5a} *25 ugr/ml*	*67 % ± 7 %*
FMLP 10^{-5} *M*	C_{5a} *50 ugr/ml*	*24 % ± 6 %*
Sustancia P	*FMLP* 10^{-5} *M*	*100 % ± 8 %*

TABLA I: Neutrófilos preincubados durante cinco minutos con el estímulo, lavados posteriormente. Tras añadir el segundo estímulo, se mide la Agregación.

DESACTIVACION CRUZADA FMLP-NIFEDIPINA; NIFEDIPINA- C5a

1er Estímulo	*2º Estímulo*	*Agregación* cm/min
Nifedipina $10^{-4}M$	*FMLP* $10^{-5}M$	1080 ± 500
Nifedipina 10^{-5} *M*	*FMLP* $10^{-5}M$	1090 ± 300
Nifedipina 10^{-6} *M*	*FMLP* $10^{-5}M$	1229 ± 110
Nifedipina 10^{-7} *M*	*FMLP* $10^{-5}M$	2238 ± 630
Medio	*FMLP* $10^{-5}M$	2990 ± 410
FMLP 10^{-5} *M*	*Nifedipina* $10^{-4}M$	1000 ± 62
FMLP 10^{-6} *M*	*Nifedipina* $10^{-4}M$	1550 ± 110
Medio	*Nifedipina* $10^{-4}M$	2234 ± 160
C_{5a} 50 u/ml	*Nifedipina* $10^{-4}M$	1536 ± 180

TABLA II

PREINCUBACION CON ACIDO ACETIL SALICILICO

Concentración	Estímulo	Agregación cm^2/min
10^{-5} M	FMLP 10^{-7}M	5200 ± 320
10^{-4} M	FMLP 10^{-7}M	4100 ± 130
10^{-3} M	FMLP 10^{-7}M	3500 ± 310
10^{-2} M	FMLP 10^{-7}M	1600 ± 230
Medio	FMLP 10^{-7}M	6250 ± 490

TABLA III: Efectos de diversas concentraciones de ácido acetil-salicílico en la agregación de los neutrófilos origi_ nada por FMLP.

PREINCUBACION CON SULINDAC

Concentración	Estímulo	Agregación
		cm^2/min
4×10^{-5} M	FMLP 10^{-7}M	7200 ± 1000
10^{-4} M	FMLP 10^{-7}M	3900 ± 500
10^{-3} M	FMLP 10^{-7}M	2500 ± 250
Medio	FMLP 10^{-7}M	7500 ± 1000

TABLA IV: Efectos de diversas concentraciones de Sulindac en la agregación de los neutrófilos originada por FMLP.

PREINCUBACION CON IBUPROFEN

Concentración	*Estímulo*	*Agregación*
		cm^2/min
10^{-3} M	FMLP 10^{-8}M	7787 ± 1020
10^{-2} M	FMLP 10^{-8}M	2547 ± 430
Medio	FMLP 10^{-8}M	8631 ± 1100

TABLA V: Efectos de diversas concentraciones de Ibuprofen en la agregación de los neutrófilos originada por FMLP:

PREINCUBACIÓN CON PIROXICAN

Concentración	*Estímulo*	*Agregación* cm^2/min
10^{-3} M	FMLP 10^{-7}M	5896 ± 300
10^{-2} M	FMLP 10^{-7}M	2549 ± 600
Medio	FMLP 10^{-7}M	10200 ± 2045

TABLA VI: *Efectos de diversas concentraciones de Piroxican en la Agregación de los neutrófilos originada por FMLP.*

PREINCUBACION	ESTIMULO	AGREGACION
		cm^2/min
Piroxican $10^{-3}M$	FMLP $10^{-7}M$	5896 ± 800
Piroxican $10^{-3}M$ +		
PGE_1 (5nM)	FMLP $10^{-7}M$	1987 ± 300
PGE_1 (5nM)	FMLP $10^{-7}M$	10126 ± 1150
Medio	FMLP $10^{-7}M$	11851 ± 2300

TABLA VII: *La inhibición de la agregación originada por el Piroxican no es revertida por la adición de PGE_1.*

PREINCUBACION CON SULFASALAZINA Y SUS METABOLITOS

Concentración	*Estímulo*	*Agregación* cm^2/min
Sulfasalazina $1o^{-4}M$	*FMLP* 10^{-7} *M*	7500 ± 300
Sulfasalazina $10^{-3}M$	*FMLP* 10^{-7} *M*	6000 ± 200
Sulfasalazina $5x10^{-3}M$	*FMLP* 10^{-7} *M*	3000 ± 200
Sulfasalazina $10^{-2}M$	*FMLP* 10^{-7} *M*	3200 ± 150
Medio	*FMLP* 10^{-7} *M*	7900 ± 100
Sulfapiridina 10^{-4} *M*	*FMLP* 10^{-7} *M*	6800 ± 300
5,aminosalicílico $10^{-4}M$	*FMLP* 10^{-7} *M*	1500 ± 150

TABLA VIII: *Efectos de Sulfasalazina y sus metabolitos en la Agregación de los neutrófilos originada por FMLP.*

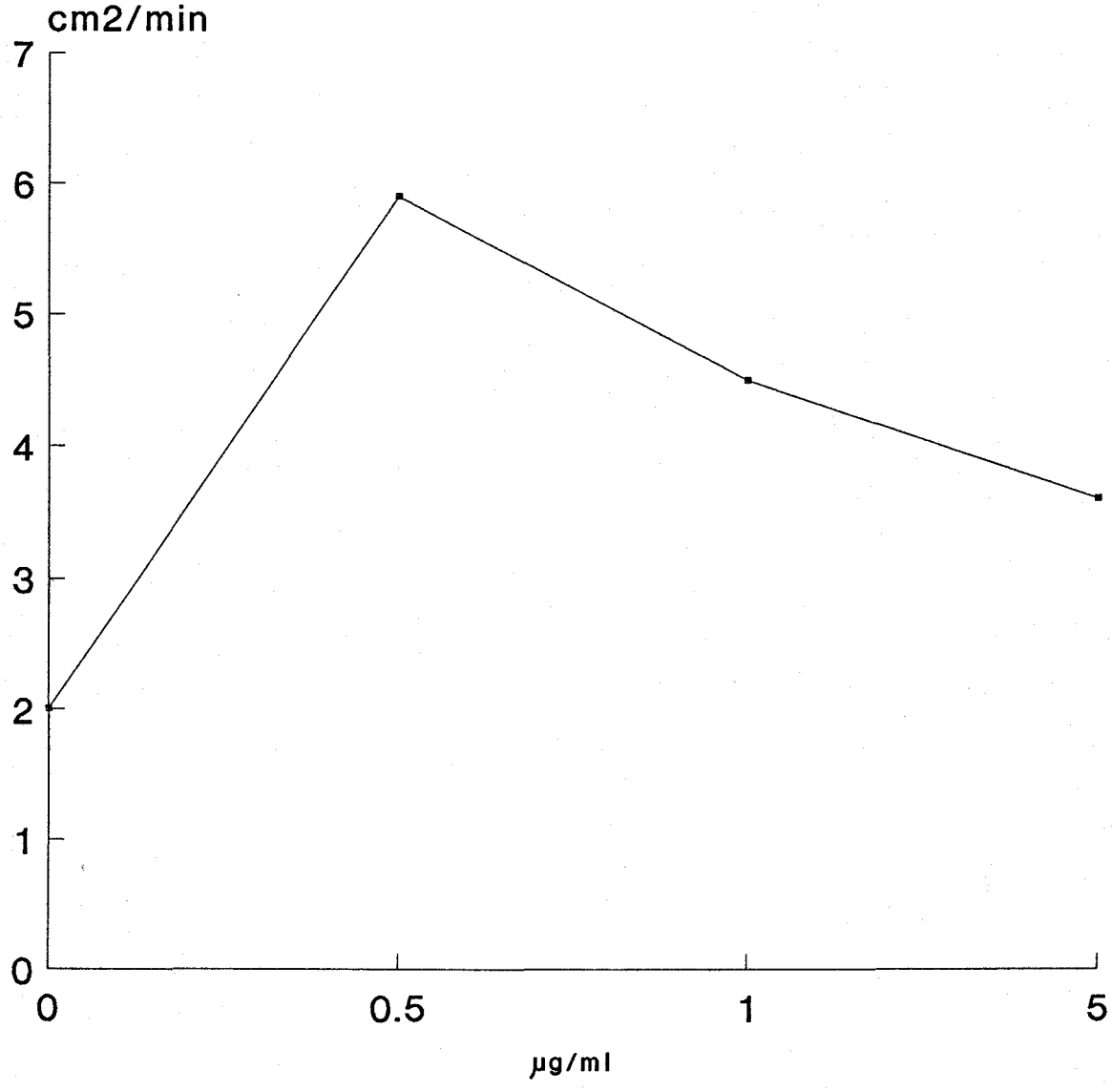

Fig.1: Preincubación de los neutrófilos con diversas concentraciones de citocalasina B.

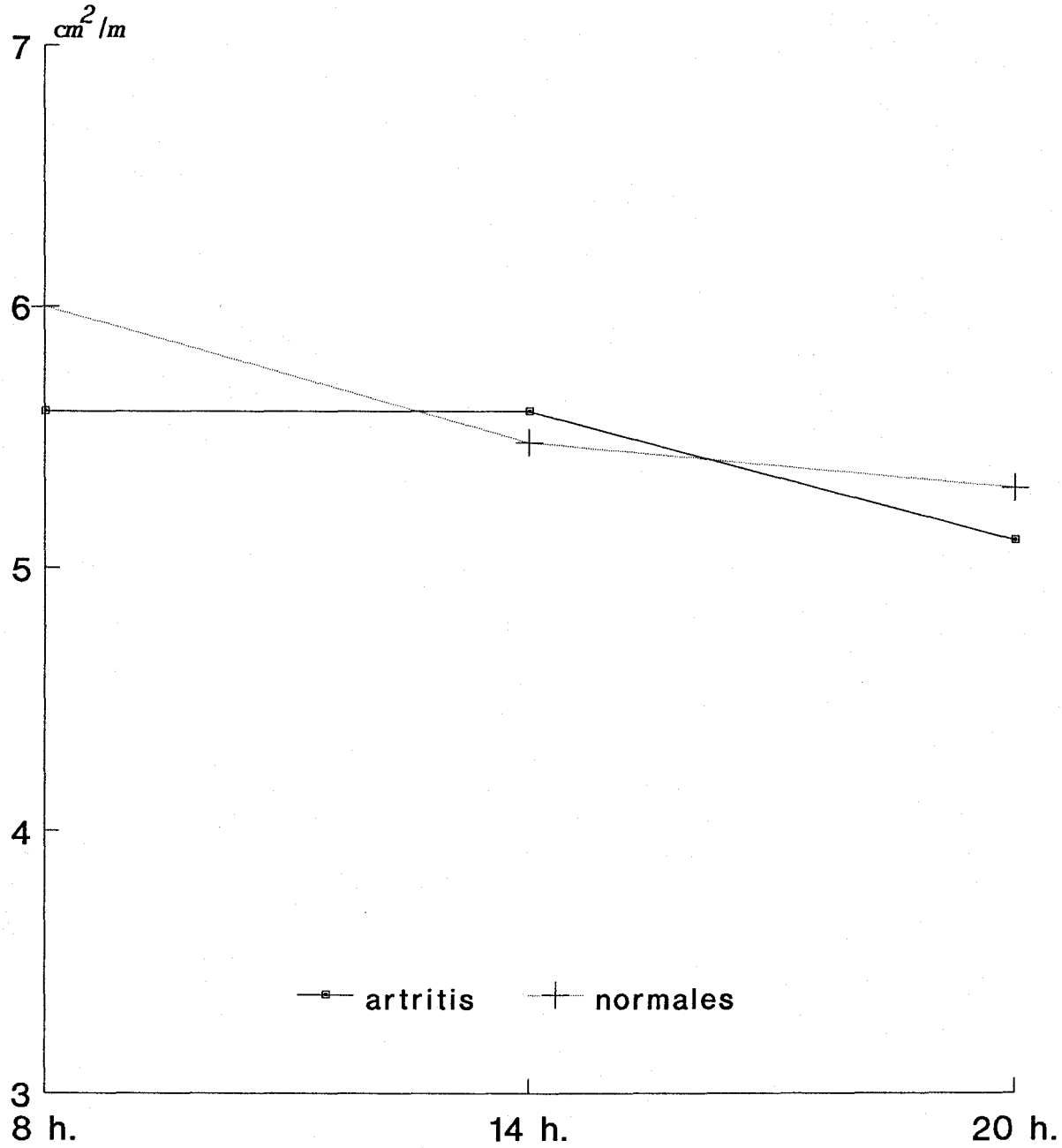

Fig.2: agregación de los neutrófilos en individuos normales y en pacientes con artritis reumatoides en tres tomas a diversas horas del dia.

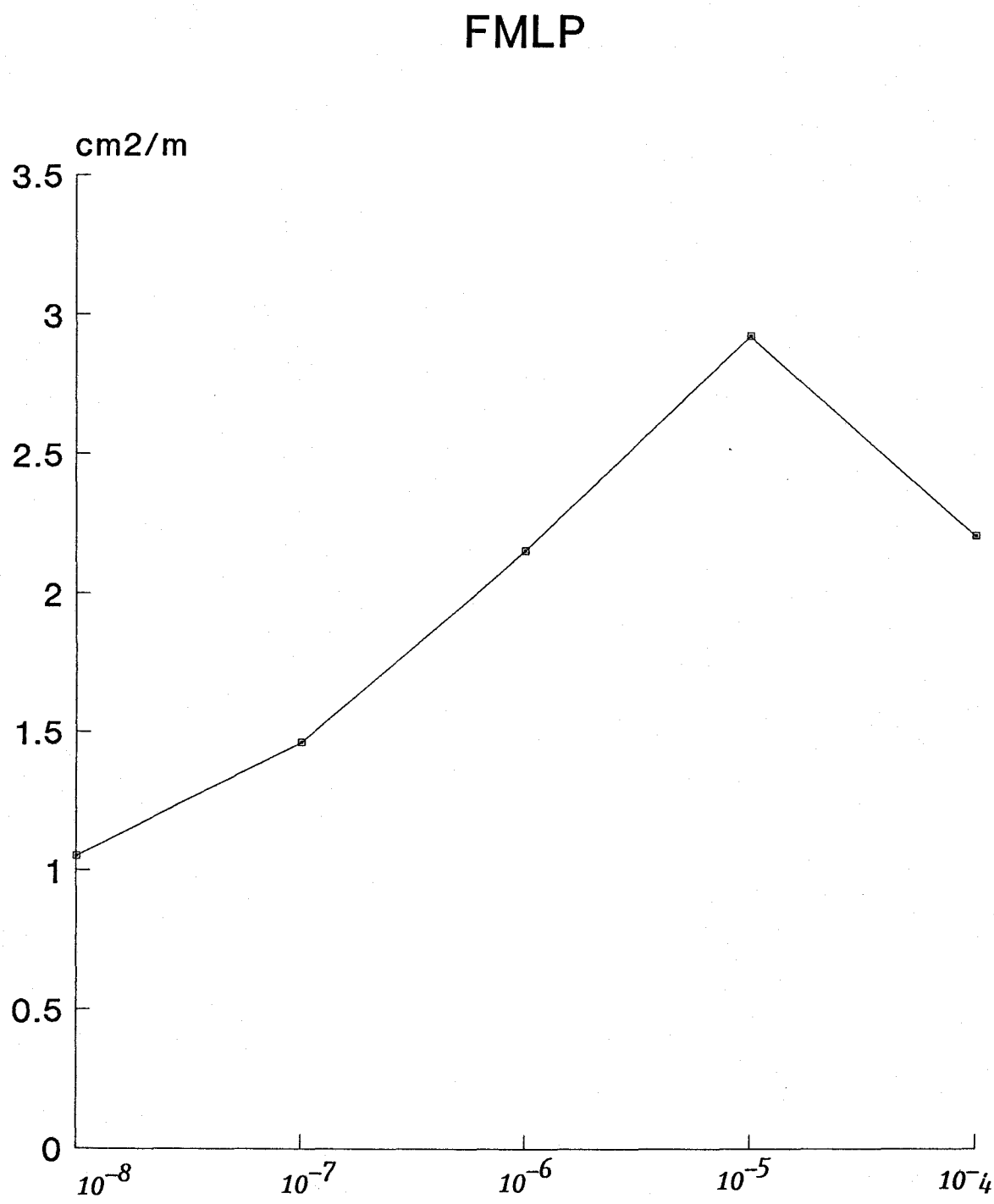

Fig.3: Agregación originada por concentraciones crecientes de FMLP (molar).

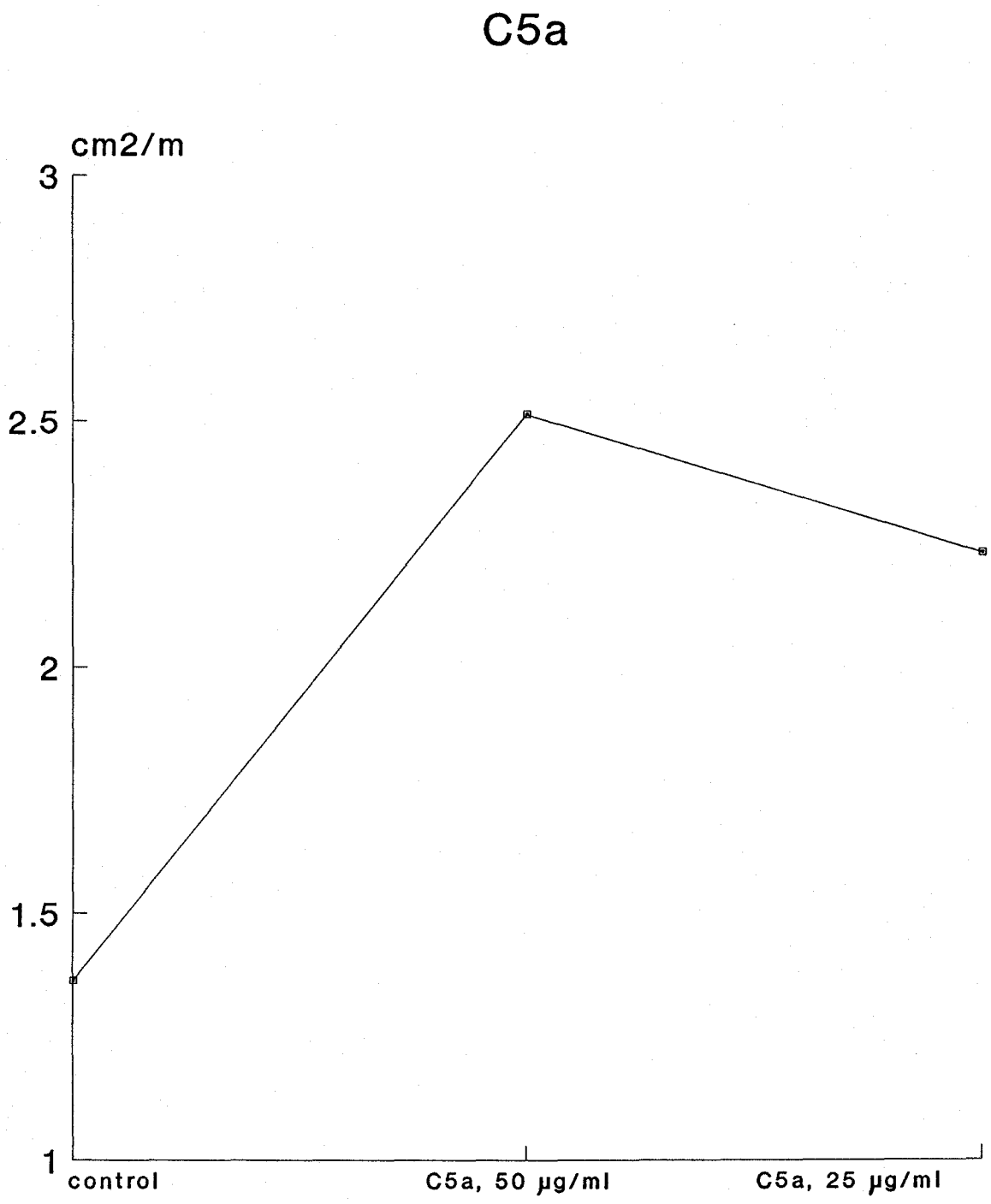

Fig.4: Inducción de la agregación por una fracción del complemento parcialmente purificado (C5a).

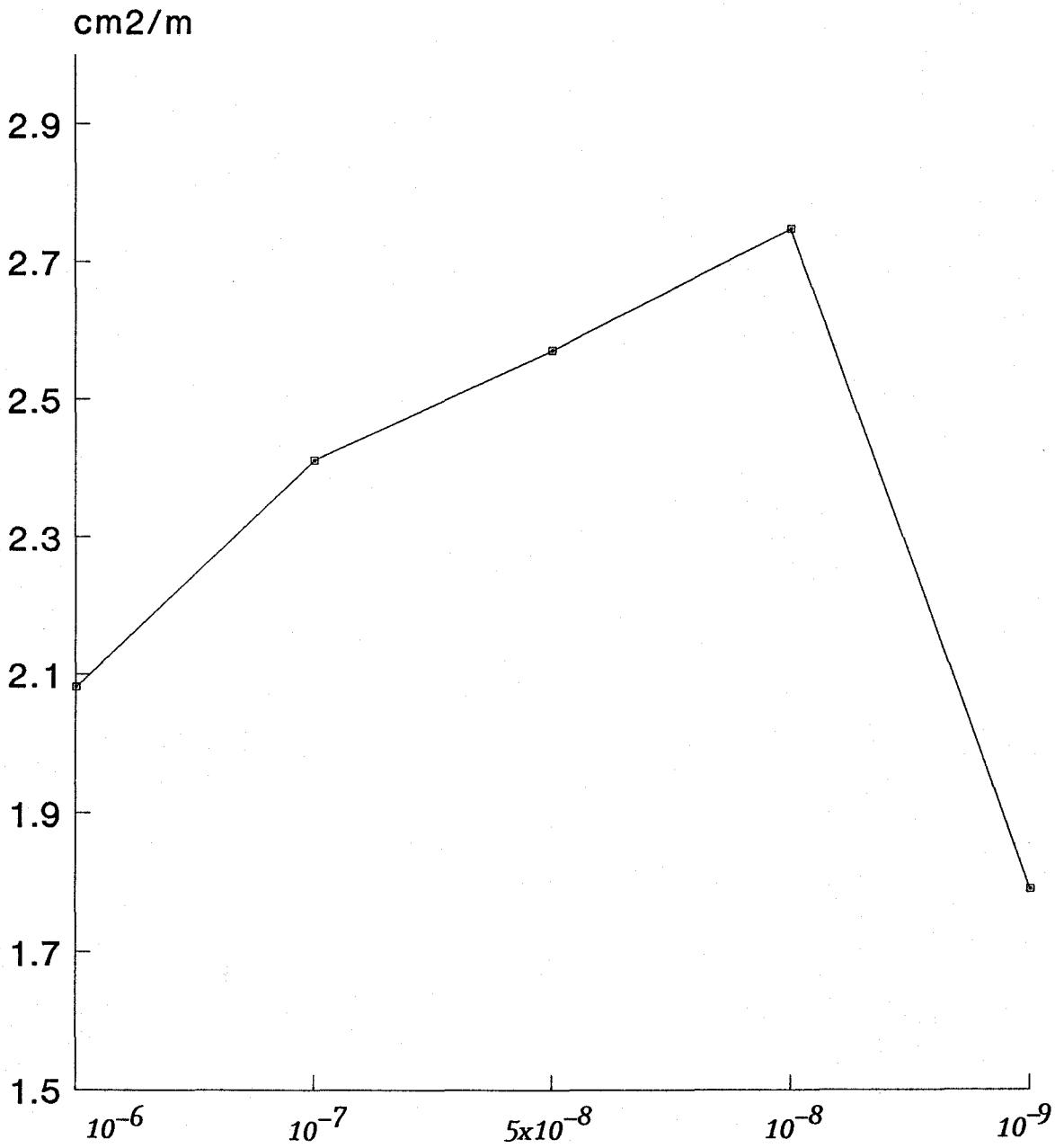

Fig.5: Efecto de concentraciones decrecientes de leucotrieno B4 (molar).

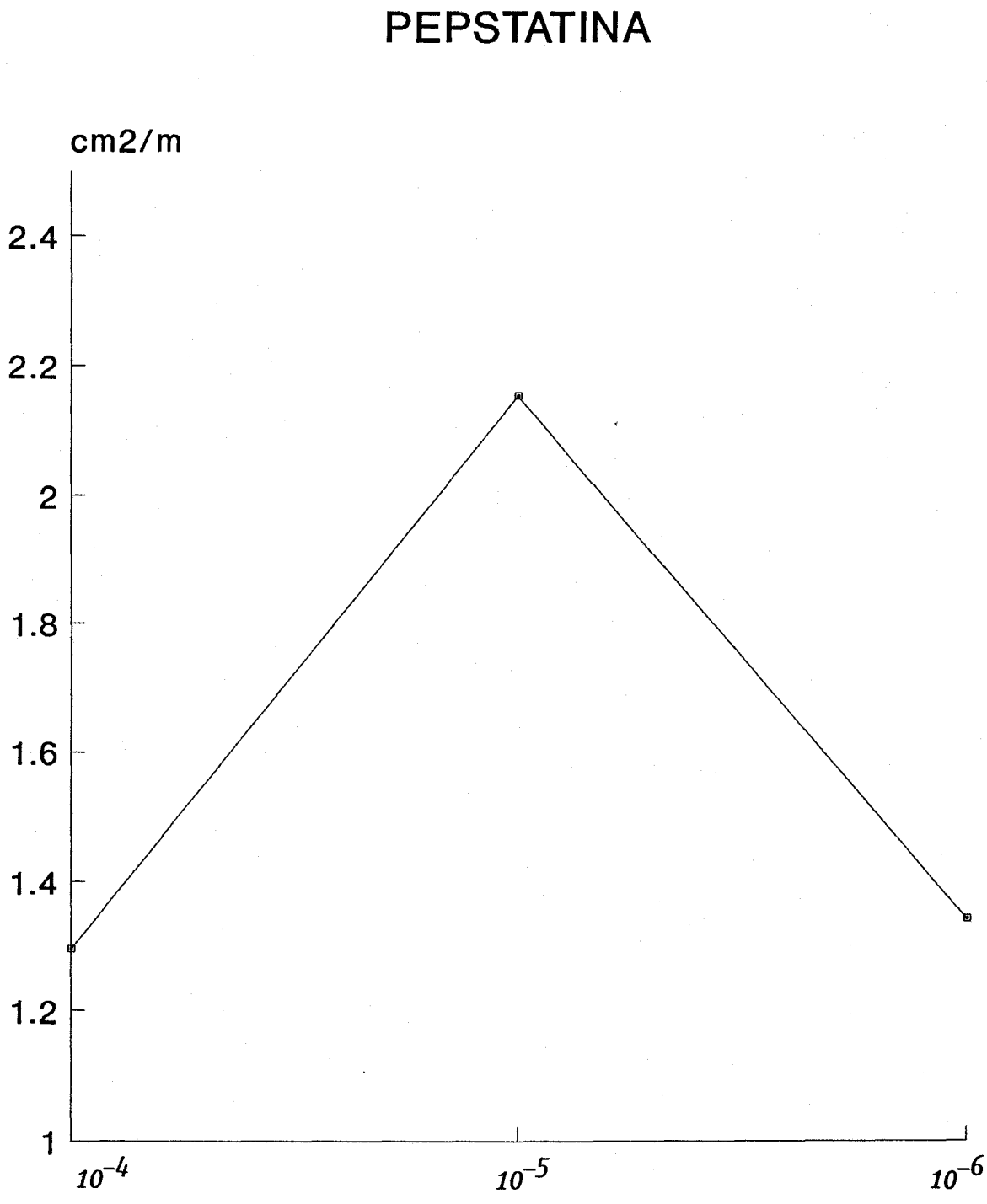

Fig.6: Agregación inducida por pepstatina (molar).

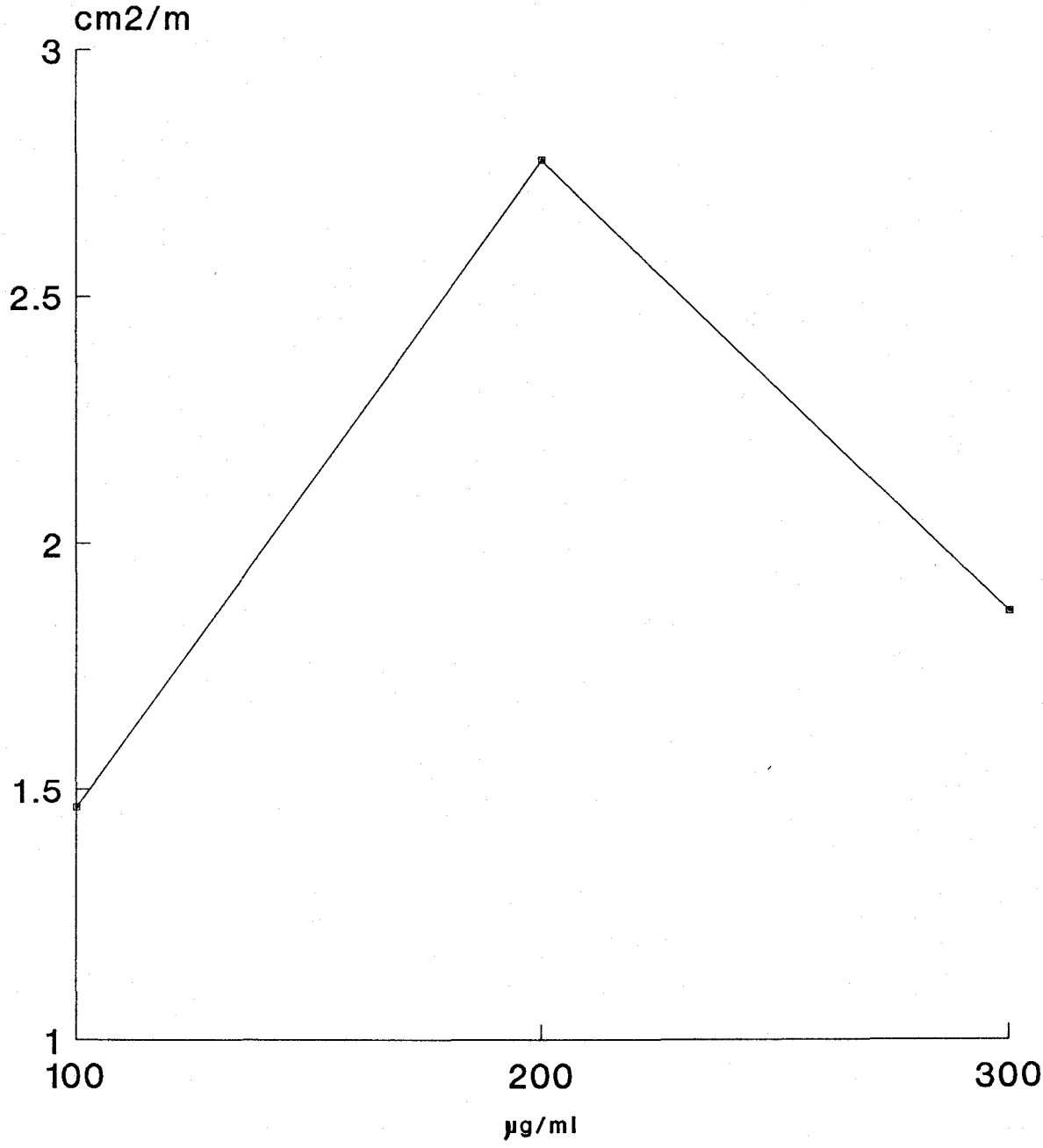

Fig.7: Agregación obtenida con dosis crecientes de glicina-histidina-glicina.

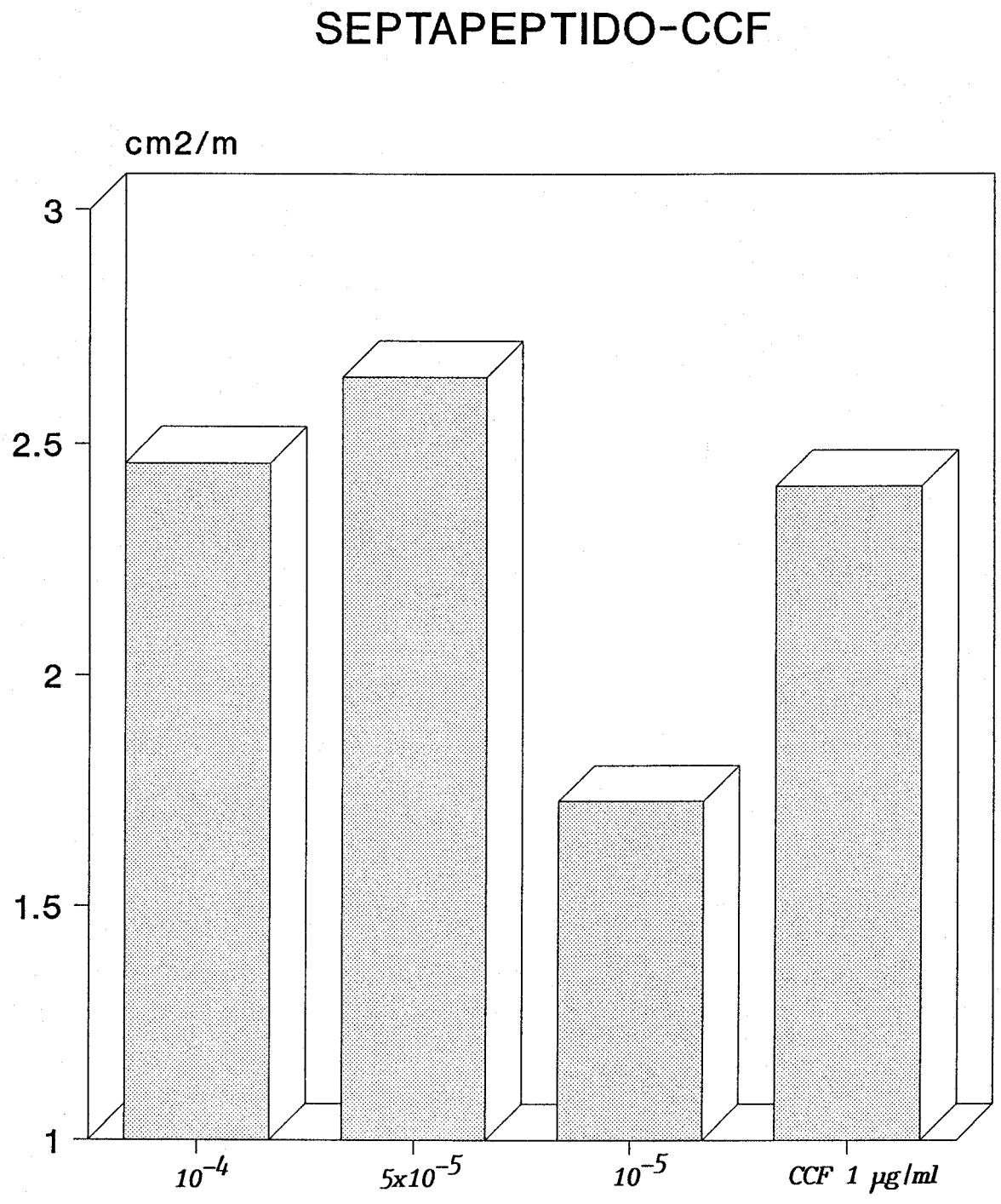

Fig.8: Comparación de la agregación entre septapeptido y CCF.

NIFEDIPINA

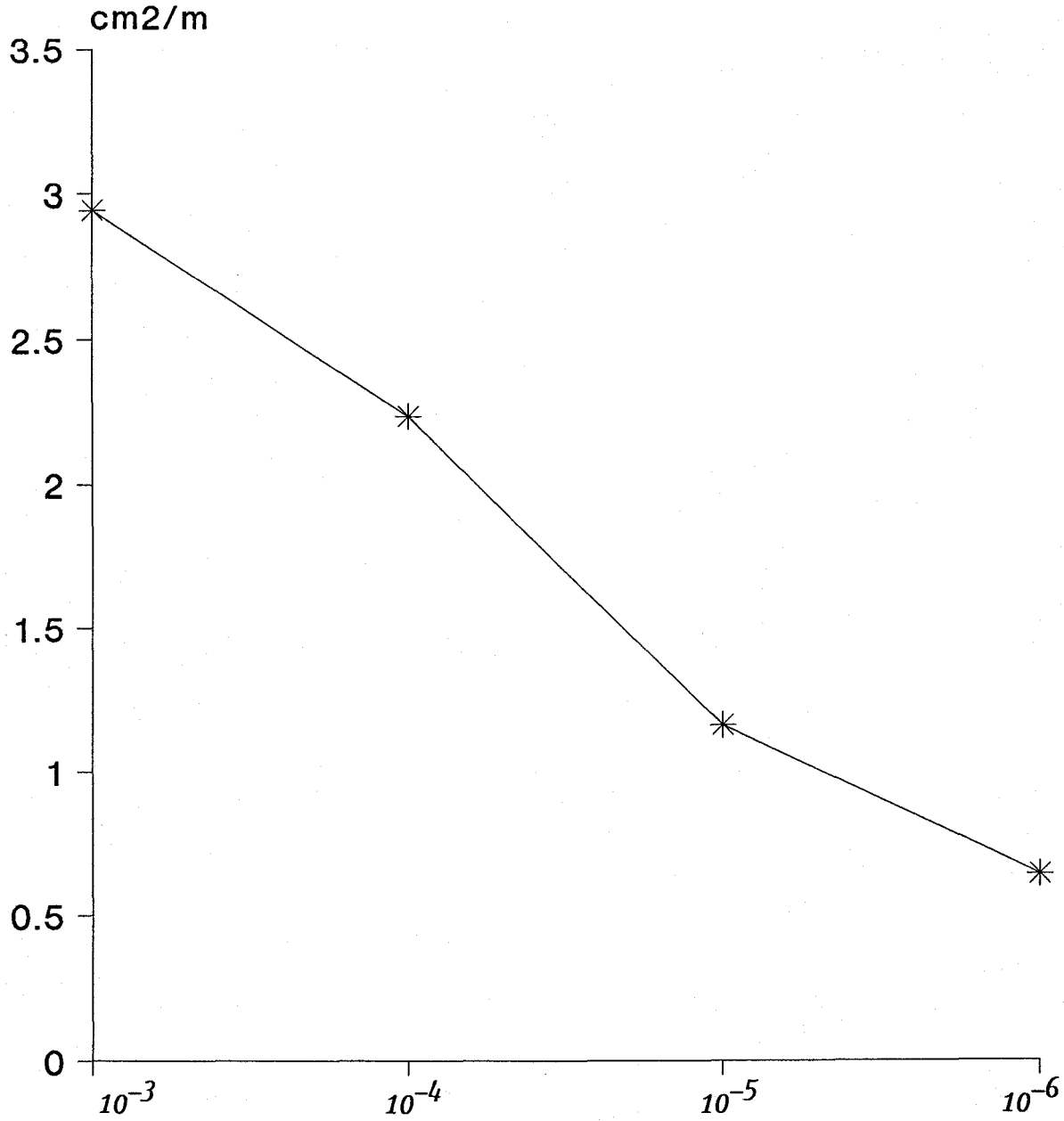

Fig.9: Agregación inducida por nifedipina (molar).

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA BIBLIOTECA

VERAPAMIL

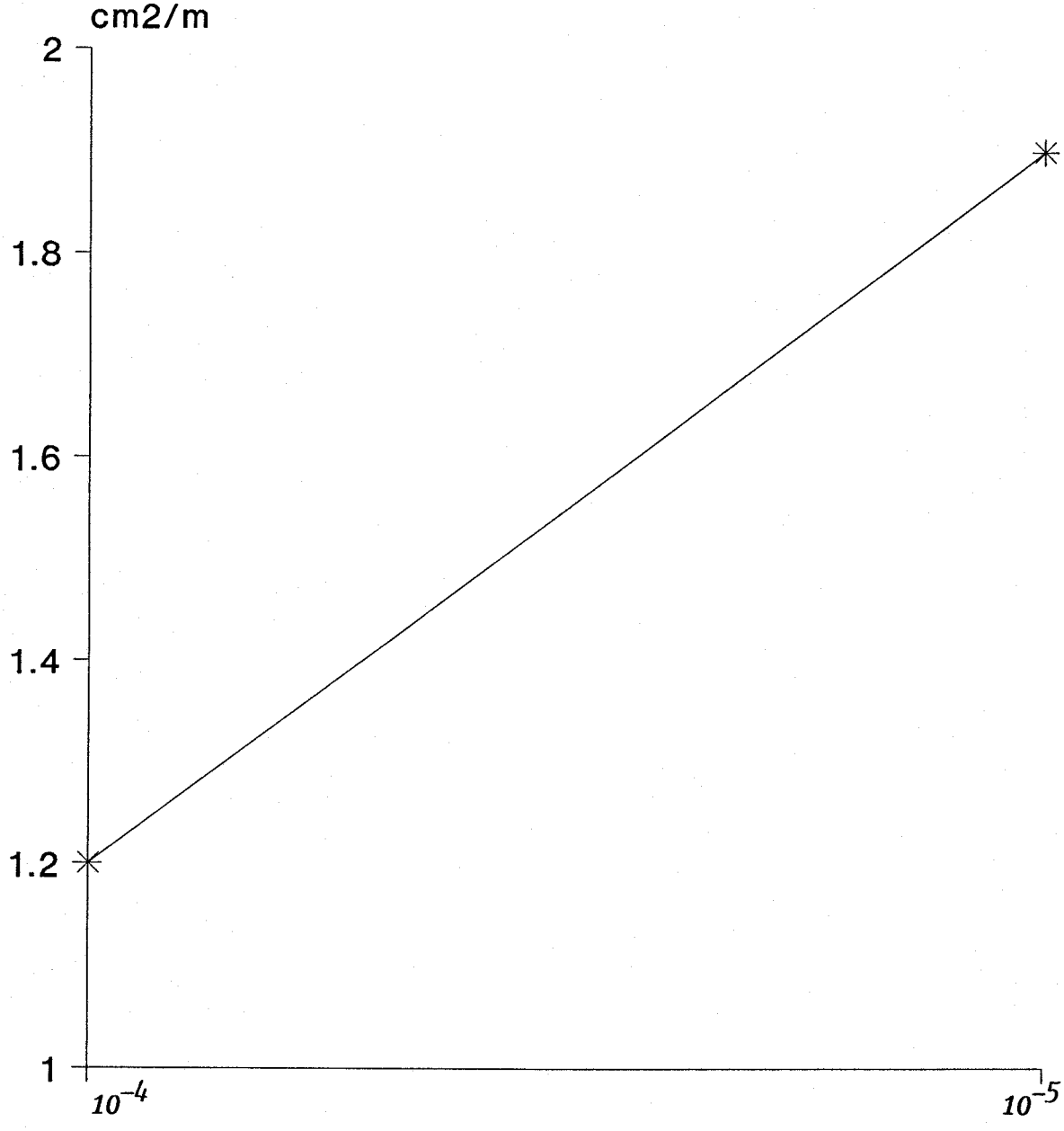

Fig.10: Agregación inducida por Verapamil (molar).

TRIFLUOPERAZINA

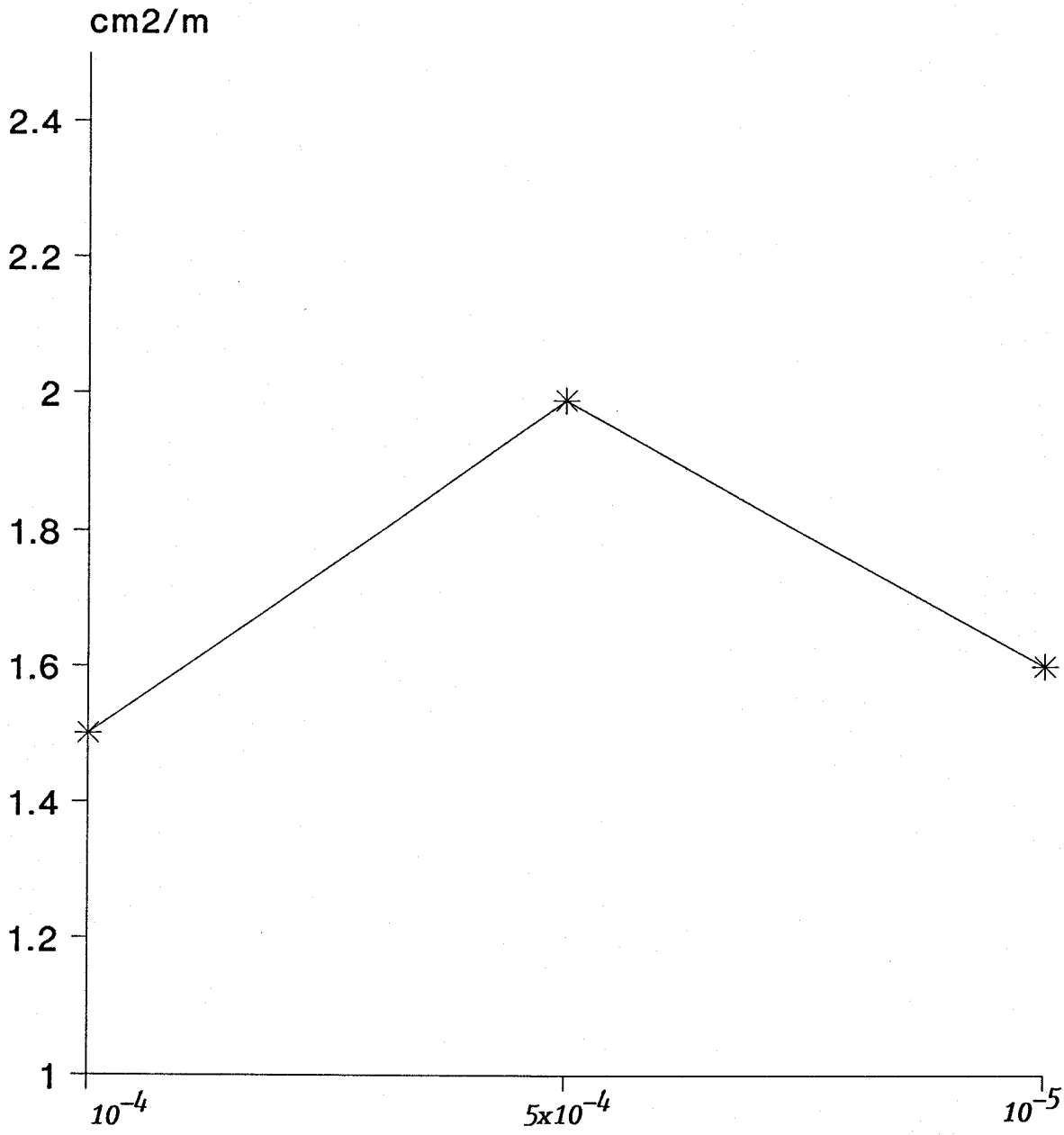

Fig.11; Agregación inducida por trifluoperacina (molar).

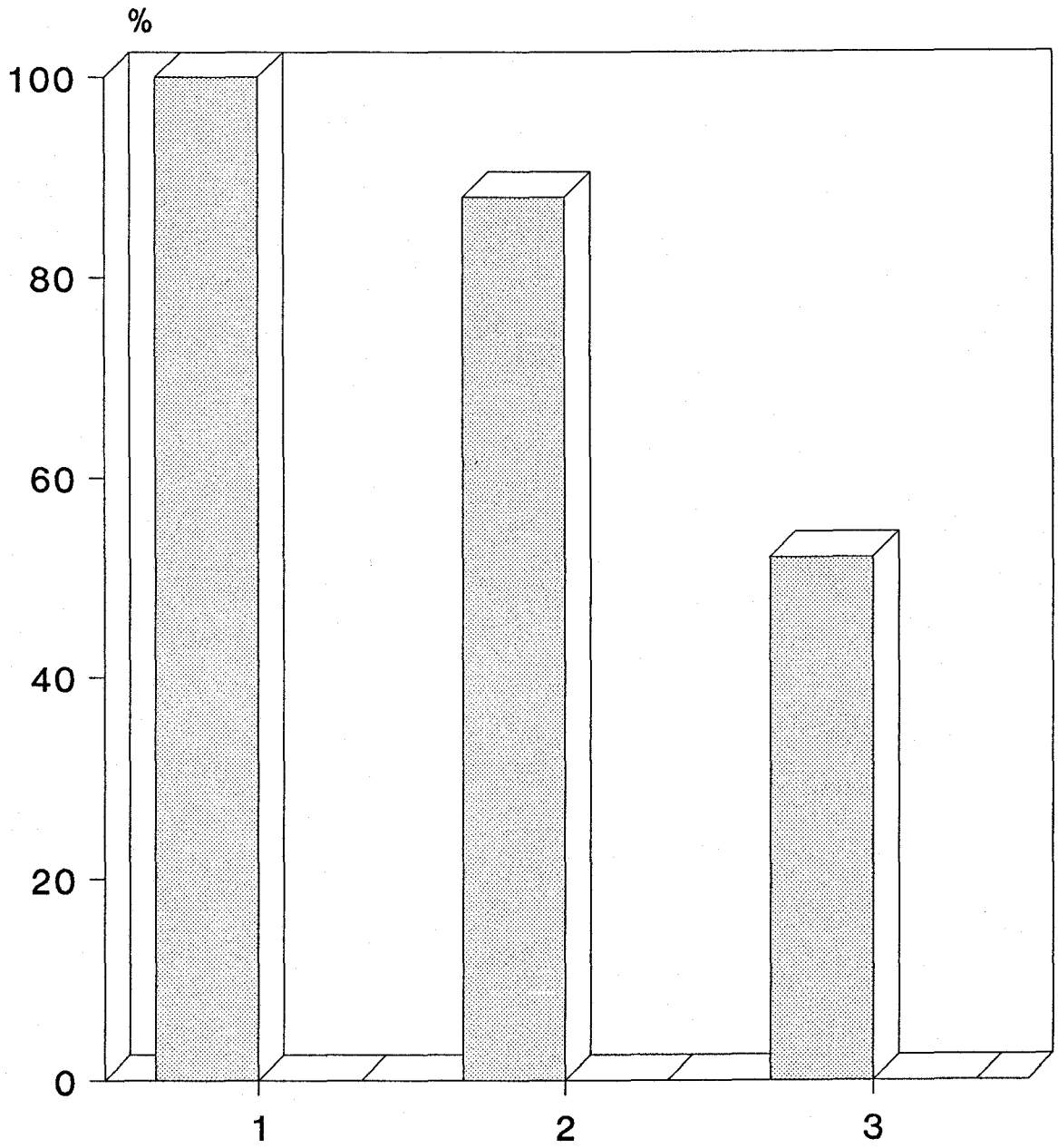

Fig.12: 1.Estimulación con FMLP 10^{-6}
2.Preincubación durante 4 min. con colchicina 10^{-3} y estimulación con FMLP 10^{-6}
3.Preincubación durante 30 min. con colchicina 10^{-3} y estimulación con FMLP 10^{-6}

D I S C U S I O N

DISCUSION

A. Importancia de la Agregación de neutrófilos en diversas enfermedades

La capacidad de las células sanguineas para agregarse, cuyo mejor ejemplo se encuentra en la respuesta de las plaquetas frente a la injuria vascular, se considera generalmente beneficiosa (95). Sin embargo, cuando la agregación se produce de forma inapropiada, es decir, con independencia de la hemostasia, se pueden provocar síndromes isquémicos (96). Por ejemplo, la isquemia miocárdica de la angina de Prinzmetal, quizá refleje la agregación de las plaquetas en las arterias coronarias (97).

Recientemente, se ha comprobado que los granulocitos, al igual que las plaquetas pueden agregarse dentro de los vasos, y que el fenómeno consiguiente de leucoembolización, no sospechado con anterioridad, puede constituir la causa subyacebte del daño tisular en situaciones clínicas diversas (98). La disfunción pulmonar en los pacientes hemodializados (99), la ceguera súbita con infarto retiniano después de traumas o pancreatitis agudas (Síndrome de Purtscher) (100), el infarto agudo de miocardio (101), y el Síndrome de distress respiratorio del adulto (102) son ejemplos de este proceso.

Las causas y mecanismos que inducen y regulan la agregación de neutrófilos no estan bien aclaradas (103). Es probable que el sistema del Complemento del plasma, que proporciona un mecanismo antimicrobiano beneficioso (104), pueda activarse de forma caótica en situaciones como la perfusión extracorporéa (105), los traumas (106), las sepsis (107), o la pancreatitis aguda (108). En estos casos, el componente C_{5a} quizás agregue los leucocitos y cause leucoembolización (109). Además, las sustancias oxigenadas tóxicas que producen los granulocitos activados por el C_{5a}, pueden dañar a otras células y cuando esto sucede en los pulmones quizá contribuya al síndrome de distress respiratorio del adulto. Por tanto el empleo previamente empírico de los corticoides a grandes dosis en los estados de shock (110) y en el síndrome de distress respiratorio, podría tener una base fisiológica, puesto que las concentra-

ciones muy altas de tales fármacos inhiben tanto la producción de superóxido como la agregación de los neutrófilos (111).

B. Ritmos

En el presente estudio no se han encontrado variaciones circadianas en la agregación de los neutrófilos. Como se ha expresado en la introducción, se puede afirmar que es menor el número de parámetros biológicos que no tienen variaciones circadianas que los que tienen (112). Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la quimiotaxis y la producción de superóxido sí presentan variaciones a lo largo del día (113). La liberación de enzimas lisosómicos, al igual que la agregación no experimentan variaciones (114). Es posible que efectivamente, algunas de las funciones de los neutrófilos manifiesten variaciones a lo largo del día y otras no lo hagan. De hecho, en trabajos previos, hemos encontrado así mismo, que el número de receptores de superficie no se modifica (115). No obstante, es posible que existan variaciones a lo largo del día, pero éstas no son mesurables con los métodos empleados. Para poder determinar tanto la liberación de enzimas como la agregación, es preciso preincubar las células con Citocalasina B (116). Esta sustancia es capaz de multiplicar la respuesta de los neutrófilos, y de este modo es posible medirla (117). Cabe la posibilidad por tanto, de que este multiplicador de

la respuesta pueda abolir pequeñas diferencias , es decir, que la citocalasina homogeneice la respuesta. Sea como sea, nosotros no hemos encontrado variaciones circadianas.

Además de estudiar el ritmo circadiano en la agregación en la agregación de los neutrófilos en individuos normales, lo hemos estudiado tambien en pacientes con Artritis Reumatoide. La razón por la que hemos escogido esta enfermedad es porque presenta grandes variaciones en la sintomatología clínica a lo largo del día (118). Estas variaciones se han atribuido clásicamente a factores mecánicos (119). La rigidez matutina, se dice, es consecuencia de la mayor distensión sinovial debido al menor "bombeo" del líquido sinovial como consecuencia del reposo. En trabajos previos hemos encontrado un incremento en la quimiotaxis de los neutrófilos por la mañana,y postulabamos que las variaciones en la sintomatología fueran debidas no a manifestaciones mecánicas, sino a verdaderas variaciones en la inflamación (120). No hemos encontrado diferencias entre la curva de agregación en los pacientes con A.R. y los individuos control. Tampoco la intensidad de la agregación es mayor en los pacientes.

C. Importancia del Calcio

El requerimiento de cationes divalentes para la adecuada respuesta celular ha sido estudiada previamente (121). En el presente trabajo se ha encontrado que el medio sin Calcio y sin Magnesio, era poco adecuado para conseguir una correcta agregación. Pero además, los experimentos realizados con diversas concentraciones de Ca y Mg, demuestran que es el Calcio el catión fundamental para mantener la agregación. Esto hace considerar que la presencia de cationes divalentes e-- jerce un papel fundamental no sólo por variaciones electrostática sino como por un auténtico acoplamiento del Calcio en los mecnismos funcionales celulares (122).

En este sentido, es de interés y precisamente no se había comunicado, el hallazgo de que los bloqueantes de los canales del calcio estimulan la agregación celular, cuando al bloquear la entrada del Ca, deberían de inhibirla. Es posible que estas sustancias tengan otros efectos sobre la célula, además de los ya conocidos sobre los canales del calcio.

D. Citocalasina B

Como ha sido descrito, el tratamiento con Citocalasina B origina un marcado incremento en la agregación en todos

los estímulos empleados (123). El mecanismo para esta incremento no está aclarado, pero puede estar en relación con un aumento en la expresión del receptor de superficie para los estímulos, o un incremento en los flujos de calcio, o por otras funciones dependientes de los microfilamentos. No obstante, es posible que la preincubación con Citocalasina B, haga desaparecer diferencias en la morfología de la agregación de neutrófilos, según cual sea el estímulo.

E. F.M.L.P. (formil-metionil-leucil-fenilalanina) (124).

En 1.975 Schiffman (125), demostró que los dipéptidos formil-metionil poseian capacidad para estimular a los neutrófilos. Posteriormente, Showell comprobó que los tripéptidos formilados eran más activos que los dipéptidos (126).

Estos péptidos son quimiotácticos para los neutrófilos, macrófagos y monocitos. En cambio, no lo son para los linfocitos maduros (127). Además originan liberación de radicales tóxicos y de enzimas (128).

En nuestro trabajo hemos encontrado que el FMLP es capaz tambien de originar agregación. Por los experimentos de desactivación cruzada, podemos afirmar que la agregación es estímu-

lo-específica, lo que junto con los estudios previamente realizados, aporta evidencia sobre la hipótesis de que el neutrófilo, al menos para algunos estímulos, posee un receptor plurifuncional, que una vez estimulado, pone en marcha todas las funciones de esa célula (129).

F. PEPSTATINA (130)

Se ha demostrado que la Pepstatina A es capaz de inhibir algunas proteasas, en concreto la pepsina, renina, catepsina D en los macrófagos de conejo, y las proteinasas de algunos hongos (131). De hecho, por las propiedades expuestas anteriormente, no deja de ser interesasnte el que se hayan realizado ensayos clínicos Pepstatina A tratando de prevenir el ulcus péptico, con buenos resultados en los animales pero no en el hombre.

No esta bien aclarado si su capacidad de inhibir las proteasas juega algún papel en la activación de los neutrófilos (132). En favor de esta hipótesis hay que considerar que otros estímulos de los neutrófilos poseen tambien actividad antiproteásica. En contra iría el hecho de que la capacidad de inhibir a las proteasas y más en concreto a la pepsina,

se realiza a un pH entre 2 y 4, lejos de los pH fisiológicos con los que se ha trabajado en estos experimentos (133).

Por trabajos previos se sabe que la Pepstatina A compite probablemente por el mismo receptor o en estrecha proximidad con el FMLP, a pesar de la diferente composición en aminoácidos entre ambos péptidos (134). En este sentido los trabajos de Freer y cols. han señalado que más importante que la composición de los péptidos, son algunas características estructurales de los mismos, los que dan su capacidad estimuladora (135).
En concreto, dentro del amplio grupo formil-metionil, los más activos estimuladores de los neutrófilos son aquellos que poseen el radical N-formil, y grupos sulfuros contenidos en las cadenas laterales de la metionina. La sustitución de las aminoácidos isovalina y valina disminuye dicha capacidad estimuladora. Esta puede ser la razón de por qué la Pesptatina A, que tiene una composición de aminoácidos diferente que el FMLP, pueda competir con él. La Pepstatina A es un pentapéptid hidrofóbico N- bloqueado que contiene dos moléculas de valina (136).

Pepstatina A y FMLP presentan una desactivación cruzada casi completa en ambas direcciones, en la Agregación (137).
Esto no puede ser debido a la pérdida de viabilidad o agotamiento de los neutrófilos, ya que cuando éstos tras ser incubados con Pepstatina, son nuevamente estimulados con C_{5a}, son capaces de responder. Por tanto, parece que se

trata de una verdadera desactivación y que Pepstatina y FMLP compiten entre sí ni sólo por el binding, como demostraron Showell y cols., sino tambien con las función (138). Estos experimentos tomados en conjunto añaden evidencia posterior a la hipótesis de Becker de un receptor plurifuncional en los neutrófilos, al menos en su activación (139).

G. Factores derivados de las fracciones del Complemento (C_{5a})

En estudios previos, se pudo comprobar cómo, algunos componentes del Complemento podían causar leucostasis intravascular (140). Los neutrófilos expuestos al Complemento activado, mostraron cambios superficiales rápidos y notables, incluyendo distensión de la membrana, desarrollo de pseudópodos y extrusión de prolongaciones ameboides (141). Estas características sugirieron que esos granulocitos podrían adherirse al endotelio con más facilidad que las células no expuestas. Estudios con técnicas nefelométricas, similares a las utilizadas para detectar la agregación plaquetaria in vitro, han revelado que la adición del Complemento activado a los neutrófilos en un agregómetro, causa una onda de transmisión lumínica aumentada (142). Esta agregación se ha producido con Complemento activado con Zymosan, o por plasma activado con dializadores de celofán. En estudios

previos de nuestro laboratorio, se ha comprobado que el suero activado con nylon de los oxigenadores empleados en circulación extracorporea, es capaz de activar el Complemento dotandole de capacidad agregante (143).

Posteriormente se comprobó, que la sustancia agregante del plasma, tenía un peso molecular y una antigenicidad compatibles con el C_{5a} (144).

En el presente trabajo hemos comprobado cómo la fracción C_{5a} del Complemento, origina una marcada agregación de los neutrófilos. Este efecto agregante es expresión de la activación celular a través de receptores de superficie y por lo tanto está sometido al fenómeno de desactivación cruzada. Además, este fenómeno no ocurría cuando el suero añadido había sido calentado a 37º durante 30 minutos, antes de incubar el suero con Zymosan.

H. Modos de acción de aspirina y antiinflamatorios no esteroideos

Generalmente se acepta que estos fármacos ejercen su efecto antiinflamatorio inhibiendo la ciclooxigenasa de varias células, bloqueando por tanto la liberación extracelular de prostaglandinas estables (145). Mientras que esta hipótesis

puede explicar la reducción que los antiinflamatorios no esteroideos ejercen en la fiebre, dolor y edema, varios problemas no estan aclarados. En primer lugar, los AINE y sus análogos, no sólo inhiben la activación de la inflamación in vitro, sino que mejoran la artritis experimental y la nefritis inducida por inmunocomplejos in vivo (146). Además, el salicilato sódico, la más antigua de estas drogas, es un escaso inhibidor de la ciclooxigenasa, pero es igual de potente que la aspirina para mejorar las enfermedades reumáticas (147). En tercer lugar, mientras que dosis bajas de aspirina y de otros antiinflamatorios inhiben intensamente la síntesis de prostaglandinas in vivo e in vitro, son necesarias dosis muy elevadas para conseguir su efecto antiinflamatorio in vivo, sugiriendo la posibilidad de que a dosis más elevadas el efecto antiinflamatorio se consigue no sólo por inhibición de las prostaglandinas (148). En recientes publicaciones se había comunicado que los antiinflamatorios son capaces de inhibir la activación de los neutrófilos. En el presente trabajo se comprueba que estas drogas son capaces de inhibir la agregación de un modo dosis-dependiente.

La capacidad de los antiinflamatorios no esteroideos para inhibir la agregación, en respuesta al FMLP, demuestra que los productos de la ciclooxigenasa se requieren para conseguir la activación celular a niveles óptimos. Pero como tambien se ha expuesto en la sección de resultados, la resposición

con prostaglandinas de las células tratadas con antiinflamatorios no esteroideos, no fue capaz de restablecer la agregación. Además, dado que la PGE_1 inhibe la inflamación, la adición de la misma origina una mayor inhibición en la agregación (149).

En resumen, el presente estudio indica que los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la agregación de los neutrófilos, y que ésta inhibición no está mediada exclusivamente por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Para obtener un efecto antiinflamatorio son precisas dosis de AINE superiores a las necesarias para inhibir la Ciclooxigen--asa.

I. Sustancia P

La sustancia P es un potente vasodilatador y es capaz de originar contracción del músculo liso. Estimula la quimiotaxis y la liberación de enzimas, y puede inhibir la unión del FMLP a su receptor en los neutrófilos de conejo (150). Por su capacidad para unirse al receptor del FMLP, lógicamente puede modificar

algunas respuestas de los granulocitos a este péptido. En este trabajo, en cambio, hemos observado que el FMLP origina agregacion de neutrófilos aunque las células hayan sido previamente incubadas con sustancia P. Hay que tener en cuenta que los trabajos referidos empleaban neutrófilos de rata (151). Las diferencias funcionales de los neutrófilos en diversas especies son bien conocidas (152), y nosotros hemos empleado neutrófilos humanos. La Sustancia P por tanto, no inhibe la capacidad agregante de los mismos, ni es capaz de originar agregación.

J. Leucotrieno B4. (LTB4)

El leucotrieno B_4 (153) es un producto del metabolismo del Acido Araquidónico por la vía de la lipooxigenasa. Es uno de los factores quimiotácticos endógenos más activos. Así mismo, hemos podido comprobar que es un eficaz estímulo para la agregación de los neutrófilos.

Dado que los niveles de LTB_4 en el líquido sinovial de la Artritis Reumatoide están muy elevados, su importancia en la etiopatogenia de esta enfermedad es cada vez mayor (154).

K. Colchicina

El mecanismo de acción de la Colchicina ha sido objeto de múltiples debates (155). Inicialmente se pensó que su efecto terapeútico era debido a su capacidad de inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos. Los estudios preliminares que comunicaban este efecto inhibidor no han sido posteriormente comprobados (156).

En el presente estudio, la agregación de los neutrófilos es inhibida por la Colchicina, pero necesita un largo período de preincubación. Por esta razón, creemos que el efecto beneficioso de la Colchicina en las artropatías inducidas por cristales, no puede ser debido únicamente a su acción sobre los neutrófilos.

L. Sulfasalazina

La Sulfasalzina es un conjugado del ácido 5,aminosalicílico, análogo de los salicilatos, y Sulfapiridina, una sulfonamida, unidos por enlace azo. Aproximadamente, la cuarta parte de la droga se absorbe, detectándose en sangre periférica

entre 1 y 2 horas después de la ingesta; una pequeña parte se excreta por el riñón. El resto, se excreta por la bilis sin experimentar ningún cambio, y junto con la sulfasalazina no absorbida, alcanza el colon. Allí, por acción de las bacterias se desdobla en sulfapiridina, que se absorbe, y 5, aminosalicílico que no se absorbe (157).

En los últimos años se ha comprobado que para ser eficaz en la colitis ulcerosa, la Sulfasalazina debe estar en contacto con la pared del colon, y en concreto que el 5,aminosalicílico es el metabolito eficaz tanto por vía oral como por vía rectal (158). En la Artritis Reumatoide, por el contrario, parece que los estudios clínicos demuestran que el metabolito activo es la Sulfapiridina (159).

En el presente trabajo hemos encontrado que el efecto de depresión sobre la agregación de neutrófilos es debida al 5,aminosalicílico y no a la Sulfapiridina.

Los neutrófilos son células centrales de la inflamación, pero además juegan tambien un importante papel en los estadíos iniciales de muchos procesos autoinmunes. La Sulfasalazina, a través de su metabolito, 5,aminosalicílico, es capaz de deprimir las funciones de los neutrófilos estudiadas, y es posible que el efecto antiinflamatorio pueda ser el responsable de la buena respuesta de la colitis ulcerosa a esta droga (160).

Pero el mecanismo de acción descrito no puede justificar su efecto terapeútico en los pacientes con Artritis Reumatoide, ni en la Espondilitis Anquilosante (161). Estas entidades se benefician del tratamiento con antiinflamatorios, y se podría postular que la molécula completa de Sulfasalazina, al retener las acciones inhibidoras sobre los neutrófilos, atribuibles al 5,aminosalicílico, fuera la responsable de su eficacia terapeútica. Pero los niveles de Sulfasalazina en sangre periférica son muy bajos, y los estudios clínicos demuestran que el metabolito responsable del efecto beneficioso en la A.R. es la Sulfapiridina (162). Además, la Sulfasalazina actúa en los procesos reumatológicos como tratamiento de fondo, no como antiinflamatorio de efecto inmediato. Creemos por tanto, que en la A.R. y Espondilitis Anquilosante, la eficacia terapeútica debe ser atribuida a su capacidad para inhibir las células mononucleares, y no a su efecto antiinflamatorio.

M. Desactivación cruzada

La agregación de los neutrófilos, como hemos expuesto, es una propiedad precoz en su activación. Por esta razón, podría pensarse que la agregación fuera un mecanismo inespecí-

fico, no mediada por receptores de superficie. Es decir, cualquier alteración del medio interno, sería capaz de originar agregación.

Por dicha razón, hemos realizado experimentos de desactivación cruzada, del mismo modo que se ha estudiado la presencia de receptores específicos para otras funciones celulares (163).

El diseño experimental consiste en producir agregación de los neutrófilos con un estímulo, por ejemplo, FMLP. Posteriormente, a esas mismas células se les añade el mismo estímulo y se determina la agreegación. En este caso, la segunda adición de FMLP no debería de originar agregación. En cambio, si el segundo estímulo es diferente al primero, por ejemplo C_{5a}*, las células deberían ser capaces de ser estimuladas nuevamente, es decir, si la agregación está mediada por un receptor específico, un segundo estímulo, diferente al primero originaria una onda de agregación. Pero si el mismo estímulo se añade dos veces, no debe existir agregación la segunda vez.*

En el presente trabajo, hemos encontrado que efectivamente, la preincubación con FMLP no impide la posterior agregación de las células cuando el segundo estímulo es C_{5a}*, y en cambio, sí se desactiva la célula, cuando el segundo estímulo comparte receptor con el primero (caso de Pepstatina y FMLP). Aunque no hemos estudiado receptores específicamente, estos experimentos*

de desactivación cruzada permiten afirmar que la agregación es una respuesta de los neutrófilos que responde a las mismas leyes que el resto de las funciones, y debe por tanto ser mediada por receptores. Pero además, permite comprobar que la agregación no es irreversible, al menos con los estímulos empleados.

N. C.C.F.

El factor quimiotáctico inducido por cristales (C.C.F.) es una sustancia que ha mostrado tener especial importancia en la génesis de los ataques agudos de gota. Su inyección intraarticular origina una artritis superponible a la gotosa. Para que una sustancia sea capaz de atraer a los granulocitos es preciso que pueda incrementar su adherencia a las paredes vasculares. Una vez "pegado", podrá atravesarla y llegar al foco inflamatorio. Probablemente todas las sustancias quimiotácticas son capaces de producir agregación (aunque no a la inversa). En estudios previos, se había demostrado que el C.C.F. era quimiotáctico y capaz de liberar superóxido (164). Nos propusimos, por tanto, averiguar si podía producir agregación Efectivamente, incluso a concentraciones no muy elevadas, pudimos comprobar que induce una agregación superponible a la de sustancias tan activas como el FMLP.

El C.C.F. está compuesto de 14 aminoácidos. Si esta sustanci es el mediador fundamental en los ataques agudos de la artropatía por cristales, sería interesante conocer qué parte de este péptido es activo. Para ello, fuimos probando diversas partes del mismo, hasta obtener con siete aminoácidos, el mismo efecto agregante que con toda la molécula. Creemos que este hallazgo tiene especial importancia por lo que a continuación exponemos: Las células responden al C.C.F. mediante un receptor de superficie (165). este receptor, al reconocer al C.C.F. (o a una parte del mismo), pone en marcha los complejos fenómenos de activación celular. Pero el número de estímulos con capacidad para activar los neutrófilos es muy elevado. Es posible que muchos de ellos actúen a través de los mismos receptores. Por esto, el desarrollo de un anticuerpo monoclonal específico para los siete péptidos activos, puede servir no solamente para abolir la respuesta al C.C.F., sino a otros estímulos inflamatorios.

CONCLUSIONES

1. *LOS NEUTROFILOS DE SANGRE PERIFERICA POSEEN LA CAPACIDAD DE AGREGARSE. ESTE FENOMENO PUEDE MEDIRSE IN VITRO EMPLEANDO APARATOS UTILIZADOS PARA CUANTIFICAR LA AGREGACION DE LAS PLAQUETAS.*

2. *LA AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS SE POTENCIA CUANDO SON PREINCUBADOS CON CITOCALASINA B.*

3. *PARA CONSEGUIR UNA AGREGACION OPTIMA; SE REQUIERE LA PRESENCIA DE CALCIO EN EL MEDIO. EL MAGNESIO EN CAMBIO,NO ES NECESARIO.*

4. *LOS BLOQUEANTES DE LOS CANALES DEL CALCIO, VERAPAMIL, NIFEDIPINA Y TRIFLUOPERAZINA, ESTIMULAN LA AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS.*

5. *NO EXISTE RITMO CIRCADIANO EN LA AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS DE LOS SUJETOS NORMALES NI EN LOS PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.*

6. *FMLP,* C_{5a}, *PEPSTATINA, LEUCOTRIENO* B_4, *GLICINA-HISTIDINA--GLICINA, SON EXCELENTES SUSTANCIAS AGREGANTES.*

7. *LA SUSTANCIA P NO PRODUCE AGREGACION NI BLOQUEA EL EFECTO AGREGANTE DEL FMLP.*

8. *LA AGREGACION ES ESTIMULO-ESPECIFICA Y SE PONE EN MARCHA POR MEDIO DE RECEPTORES DE SUPERFICIE DE LOS NEUTROFILOS.*

9. *EL FACTOR QUIMIOTACTICO INDUCIDO POR CRISTALES (C.C.F.) PRODUCE AGREGACION DE LOS NEUTROFILOS.*

10. *EL EFECTO AGREGANTE DEL C.C.F. ES DEBIDO A SIETE PEPTIDOS DE LOS CATORCE QUE LO CONSTITUYEN.*

11. *LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE), ACIDO ACETIL--SALICILICO, IBUPROFEN, SULINDAC Y PIROXICAN, INHIBEN LA A--GREGACION DE LOS NEUTROFILOS.*

12. *LA INHIBICION DE LA AGREGACION INDUCIDA POR LOS AINE, NO PUEDE ATRIBUIRSE EXCLUSIVAMENTE A SU EFECTO INHIBIDOR DE LAS PROSTAGLANDINAS.*

13. *LA COLCHICINA PRODUCE INHIBICION DE LA AGREGACION SOLAMENTE SI LA PREINCUBACION ES LARGA (30 MINUTOS).*

14. *LA SULFASALAZINA INHIBE LA AGREGACION. ESTA INHIBICION ES DEBIDA AL 5,AMINOSALICILICO Y NO A LA SULFAPIRIDINA.*

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

BIBLIOGRAFIA

1.- *GOETZL E, GOLDSTEIN IM.Cellular components of inflammation: Granulocytes. En "Textbook of Rheumtology". Ed. Kelley. Philadelphia WB. Saunders. 115-144, 1.985*

2.- *ROTROSEN A, GALLEN JI. Disorders of phagocyte function. Ann Rev Inmunol. 5:127-150, 1987*

3.- *WILKINSON P. Clinicl disordes of chemotactic function. En "Chemotaxis and inflammation". Churchill Livingstone. Londre. 172-183, 1982*

4.- *ALLAN RB, WILKINSON PC. A visual analyses of chemotactic locomotion of human neutrophil Leucocytes. Experimental cell Research. 111: 191-203, 1978.*

5.- *BOXERGJ, CURNUTTE JT, BOXER LA. Polymorphonuclear leukocyte function. Hospital Practice. p.69-90, 1985.*

6.- *KELLER HU, BOREL JF. Chemotaxis of phagocytes. In the Reticuloendothelial System and Immune Phenomena. Ed. Di Luzio N.A. New York. Plenum Press. p. 53, 1971.*

7.- *ZIGMOND SH, SULLIVAN SJ. Sensory adaptation of leukocytes to chemotactic peptides. Journal of cell Biology. 82: 517-527, 1979.*

8.- *WILKINSON PC, BRADLEY G. Chemotactic and enzyme releasing activity of amphipathic proteins for neutrophils. A possible role for proteases in chemotaxis-On substratum--bound protein gradients. Immunology 42: 637-648, 1981.*

9.- *GOETZL E, GOLDSTEIN IM. "Granulocytes", en Textbook of Rheumatology. Kelley W. Saunders. p. 323, 1989.*

10.- *NICOLA NA, Hemopoietic growth factors and their interactions with specific receptors. J Cell Physiol (Suppl) 5: 9, 1987.*

11.- *WELLER PF, GOETZL E. The regulatory and effector roles of eosinophils. Adv. Immunol. 27: 339, 1979.*

12.- *SNYDERMAN PF, GOETZL E. Molecular and cellular mechanism of leukocyte chemotaxis. Science. 213: 830, 1981.*

13.- *GOLDMAN DW, GIFFORD LA, MAROTTO T y cols. Molecular cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B_4. Fed. Proc. 42: 200, 1987.*

14.- *RODRIGUEZ MD. Aspectos funcionales de los PMN en Enfermos con Síndrome de Behçet. Tesina de Licenciatura. Universidad de Sevilla, 1984.*

15.- *MUNIAIN MA, RODRIGUEZ C. y cols. Chemotaxis in the elderly: modifications after the intake of ascorbic acid and levamisole. Age, 11: 88-92, 1988.*

16.- *KENNEDY DW, ROHRBACH DH, MARTIN GR, MOMOI T and YAMADA K: The adhesive glycoprotein laminin is an aglutinin. J Cell Physiol. 114: 257-262, 1983.*

17.- *ASWANIKUMAR S, CORCORAN B, SCHIFFMAN E y cols. Demonstration of a receptor on rabbit neutrphils for chemotactic peptides. Biochemical and Biophysical Research Communications. 74: 810-817, 1977.*

18.- *YOON PS, BOXER LA, YOUNG AY, WICHA MS. Human neutrphil laminin receptors: activation dependent receptor expression. J Immunol, 139: 259-265, 1987.*

19.- *SPRINGER TA, THOMSON WS, MILLER J y cols. Inherited deficiency of the Mac-1, LFA 1, p 150,95 glycoprotein family and its molecular bases. J Exp Med. 160: 1901-1918, 1984.*

20.- *MALECH HL, GALLIN JI. Neutrophils in human diseases. N Engl J Med. 313: 687-694, 1987.*

21.- *ANDERSON DC, SPRINGER TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac 1, LFA 1 and p 150,95 glycoproteins. Ann Rev Med. 38: 175-194, 1987.*

22.- NAUSEEF WN, DE ALARCON P, BOLE JF y cols. Aberrant activa-- tion and regulation of the oxidative burst in neutrophils with Mo 1 glycopretin deficiency. J Immunol 137: 636- -642, 1986.

23.- NACCACHE PH, SHOWELL HJ, BECKER EL y cols. Involvement of membrane calcium in the response of rabbit neutrophils to chemotactic factors as evidenced by the fluorescence of chlortetracycline. J Cell Biol. 33: 179-186, 1979.

24.- NACCACHE PH, SHOWELL HJ, BECKER EL y cols. Changes in ionic movements across rabbit polymorphonuclear leukocyte membranes during lysosomal enzyme release. J Cell Biol. 75: 635-649, 1977.

25.- SHAZAFI RI, NACCACHE PH. Ionic events in neutrphil chemotaxis and secretion. In advances in Inflammation Research. Vol 2. Ed. Weissmann. New York. Raven Press, 1981.

26.- O'FLAHERTY JT, KREUTZER DL, SHOWELL HS y cols. Desensitization of neutrophil aggregation response to chemotactic factor. Ann J Pathol, 93: 693-705, 1978.

27.- SNYDER SH, REYNOLDS IJ. Calcium antagonist drugs. N Engl J Med, 313: 995-1002, 1985.

28.- MILLER RJ, FEEDMAN SB. Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels ?. Life Sci, 34: 1205- -1221, 1984.

29.- AUTMAN EM, STONE PH, MULLER JE, BRAWNWALD E. Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular

disorders. Part I: basic and clinical Electrophysiologic effects. Ann Intern Med. 93: 875-885, 1980.

30.- *ONO H, HASHIMOTO K. Ca^{++} antagonism in various parameters of cardiac function including coronary dilatation with the use of nifedipine, perhexiline and verapamil. In: Winbury MM, Abiko Y, eds. Ischemic Myocardium and antianginal Drugs. New York: Raven Press, 77-88, 1979.*

31.- *CREVEY BJ. Mecanismo de acción de los bloqueadores de los canales del Calcio. Cardiovascular, RR. 6: 357-364, 1985.*

32.- *STONE PH, AUTMAN EM, MULLER JE, BRAWNWALD B. Calcium Calcium channel blocking agents in treatment of cardiovascular disorders. Part II. Hemodynamic effects and clinical applications. Ann Intern Med, 93: 886-904, 1980.*

33.- *SYNDER SH, REYNOLDS IR. Calcium antagonist drugs: Receptor interactions that clarify therapeutic effects. N Engl J Med, 313: 995-1003, 1985.*

34.- *SAMUELSON B. Prostaglandins, tromboxanes and leukotrienes. Formation a bilogical roles. The Harvey Lectures. Series 75. New York. Academic Press, 1981.*

35.- *HAYAISHI O, YAMAMOTO S. Advances in Prostaglandine, tromboxane and leukotriene research. New York. Raven Press,1985.*

36.- *MAJERUS PW. The metabolism of phosphoinositide messenger molecules. Science 234: 1519-1526, 1986.*

37.- *FRIDARICH SE, PORTER VA. Oxidation of arachidonic acid in micelles by $O-_2$. J Biol Chem 256: 260-265, 1981.*

38.- *DAVIES P. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. Ann Rev Immunol, 2:335-357, 1984.*

39.- *GOODWIN JS, WEBB. Regulation of the immune response by prostaglandines. Clin Immunol Immunopathol, 15: 106-122,1980*

40.- *GOETZL EJ, PICKEH WC. The human leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetranoic acids (HETES). J Immunol 125: 1789-1791, 1980.*

41.- *FORD-HUTCHINSON AW, BRAY MA, DOIG MV y cols. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature, 286: 264-265,1980*

42.- *HIGGS GA, Mc CALL , YOULTEN LJF. A chemotactic role for prostaglandines released from polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. British J Pharmacol 53: 539--546, 1975.*

43.- *ABRAMSON S, KORCHAK H, LUDEWIG R y cols. Modes of action of Aspirin-like drugs. In advances in Inflammation research. Russo-Marie. Ed. Raven Press. New York. 10:31-36, 1985.*

44.- *VARCE JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirine-like drugs. Nature New Biol. 231: 232-235, 1971.*

45.- *ROMERO A, MUNIAIN MA, MATA R y cols. Efectos de los corticosteroides, quinacrina y del L 652.731 sobre la agregación experimental de los polimorfonucleares inducida por el Complemento y F.A.P. Rev Esp Fisiol, 44: 407-412, 1988.*

46.- *STENSON WF, PARKER CW. 12-L hydroxi 581014-eicosatetranoic acid, a chemotactic fatty and, is incorporated into neutrophil phospholipids and triglyceride. Prostaglandins 18: 285-292, 1979.*

47.- *BETNY H. Choosing NSAID therapy. Ed Hart D, Klinenberg J. Adis Press. U.S.A. p. 59, 1985.*

48.- *HOCHBERG MC. AINE: patrones de utilización y efectos secundarios. Hosp Prac (Ed. española), 4: 74-81, 1989.*

49.-*WEISMANN G, SMOLEN JE, KORCHOK HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrphils. N Engl J Med. 307: 27-54, 1980.*

50.- *KREUTZER DL, CLYPOOL WD, JONES M y cols. Isolation by hydrophobic chromatography of the chemotactic factor inactivators from human serum. Clin Immunol Immunopathol. 12: 162-176, 1979.*

51.- *FONEE Q, THOEN J, NATVIGD J. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the immune network. Sem Arthrit Rheum. 13: 130-143, 1983.*

52.- *SWUARTZ N. Salazopyrin, a new sulphonilamida preparation. Acta Med Scan, 60: 577-598, 1942.*

53.- SCHRODER HM, CAMPBELL. Absorption, metabolism and excretion of salicylasulphapyridine in man. Clin Pharmacol Ther 13: 539-551, 1972.

54.- SINCLAIR RJG, DUTHIE JJR. Salazopyrin in the treatment rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 8: 226-231, 1948.

55.- Mc CONKEY B, AMOS RS, DURHAM S y cols. Sulphasalazine in rheumatoid arthritis. Br Med J 280: 442-444, 1980.

56.- BIRD HA, DIXON JS, PICKUP ME y cols. A biochemical assessmen of sulphasalzazine in rheumatoid artrhitis. J Rheumatol. 9: 36-45, 1982.

57.- PEPPERCON MA, Sulfasalazine. Ann Intern Med. 101: 377--389, 1984.

58.- SCHROEDER RW, TREMAINE VJ, ILSTRUP DL. Coated oral 5--aminosalicilyc acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis: a randomized study. N Engl J Med, 317: 1625-1630, 1987.

59.- STENSON WF, LOBOS E. Sulfasalazine inhibit the synthesis of chemotactic lipids by neutrphils. J Clin Invest. 69:494--497, 1982.

60.- PULLAR TB, CAPELL HA. Sulfasalazine: a "new" antirheumatic drug. Br J Rheum 23: 26-35, 1984.

61.- THAYER WR, CHARLAND C, FIELD C. Effects of sulphasalazine on selected lymphocyte subpopulations in vivo and in vitro. Dig Dis Sci. 24: 672-679, 1979.

62.- *SHELDON P, WEBB C, GRINDULES A. Effect of sulfasalazine and its metabolites on mitogen induced transformation of lymphocytes-clues to its clinical action ?. Brit J Rheum. 27: 344-350, 1988.*

63.- *DAS KM, CHOWDORY JR, ZAPP B y cols. Sulfasalazine. Gastroenterology. 77: 280, 1972.*

64.- *SHOWELL HJ, FREER RJ, ZIGMOND SH y cols. The structure activity relations of synthetics peptides as chemotactic factors and induced of lisosomal enzyme secretion for neutrophils. J Exp Med, 143: 1154-1169, 1976.*

65.- *SCHIFFMAN E, CORCORAN BA, WAHL SA. N-formylmethionil peptides as chemoattractants for leucocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 72: 1059-1062, 1975.*

66.- *OKADA K, NAGOCI S. Pepstatin A. Pharm Bull. 27: 2163--2170, 1979.*

67.- *BECKER EL. The relations ship the chemotactic behavior of the complemente-derived factors C_{3a}, C_{5a} and C_{567} and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the protease 1 of rabbit polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med. 135: 376-387, 1972.*

68.- *SPILBERG I. Dissociation of the neutrphil function of exocytosis and chemotaxis. J Lab Clin Med. 92297-92302,1978.*

69.- *KOO C, LEFOWITZ RJ, SNYDERMAN R. Guanine nucleotides*

modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. J Clin Invest. 72:748-753,1983.

70.- *BECKER EL. The inhibition of neutrphil granule enzyme secretion and chemotaxis by pertossis toxine. J Cell Biol. 100: 1641-1646, 1985.*

71.- *MOORE-EDE MC. The circadian timing system in mammals: two pacemakers preside over many secondary oscillators. Fed Prac 42: 2802-2808, 1983.*

72.- *MOORE-EDE MC, CZEISLER CA, RICHARDSON GS. Circadian timekeeping in health and disease. Part II. Clinical implications of circadian rhythmicity. N Engl J Med, 309: 530-536,1983.*

73.- *MUNIAIN MA, RODRIGUEZ MD, ROMERO A y cols. Circadian variations in the superoxide production, enzyme release neutrphil aggregation in patients with Rheumatoid Arthritis and controls. En prensa.*

74.- *MUNIAIN MA, MATA R, POZUELO F, y cols. Circadian rhytmicity in neutrophil chemotaxis. J Rheum. 15: 1044-1045, 1988.*

75.- *TAPLER G, BREZINSKI D, SCHAFER A y cols. Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. N Engl J Med. 316: 1515-1518, 1987.*

76.- *UCAR DA, TOCCO RA, KUGLER M. Circadian variations in circulating pyrogen: Possible role in resistence to infection. Proc Soc Exp Bio Med. 173:319-323, 1983.*

77.- WINBERG A, SCHUMACHER HR, AGUDELO CA. Urate crystals in asyntomatic metattarsophalangeal joints. Ann Intern Med. 91: 56-77, 1975.

78.- SPILBERG I, GALLACHER A, METHA J y cols. Urate crystal induced chemotactic factor. Isolation and partial characterization. J Clin Invest 58: 815-819, 1976.

79.- SPILBERG I, METHA J. Demostration of a specific neutrophil receptor for a cell-derived chemotactic factor. J Clin Invest. 63: 85, 1979.

80.- SPILBERG I, METHA J. Chemotaqctic factor modulation and cytoeskeletal structures. Infect Immunity. 32: 268-272,1981.

81.- SPILBERG I, MANDELL BF. Crystal induced chemotactic factor. In "Advances in Inflammation Research". Vol 5. Ed. Weissmann New York. Raven Press. 5765, 1983

82.- SPILBERG I, MANDELL BF, SIMCHOWITZ L y cols. Mechanism of action of colchicine in acute urate crystal-induced arthritis. J Clin Invest. 64: 775-780, 1979.

83.- SIMCHOWITZ L, ATKINSON J, SPILBERG I. Stimulation of respiratory burst in human neutrophils by crystal phagocytosis. Arthritis Rheum. 25: 181-188, 1982.

84.- MUNIAIN MA, RODRIGUEZ MD, NARANJO A y cols.Efectos de la lipoproteina de baja densidad sobre los cristales de ácido úrico. Rev Clin Esp, 183: 22-28, 1988.

85.- SPILBERG I, ALVARELLAS A, MUNIAIN MA y cols. Modulation of the acute attack of gout and pseudogout by crystal induced chemotactic factor. Houston. U.S.A. American

Rheumatism Association, 1988.

86.- *LEVINE J, COLLIER D, BASBAUM A y cols. Hypothesis: The nervous system may contribute to the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol. 12: 406-411, 1985.*

87.- *HOWELL D. Etippathogenesis of osteoarthritis. En Arthritis and allied conditions. Ed. Mc Carty. Lea y Febiger. Londres. 1400-1408, 1985.*

88.- *FOREMAN JC, JORDAN C, PIOTROSKI W. Interaction of neurotensin with substance P receptor mediating histamine release from rat mast cells and the place in human skin. Br J Pharmacol, 77: 531-539, 1982.*

89.- *LEVINE JD, CLARK R, DEVER M y cols. Intraneural substance P contributes to the severity of experimental arthritis. Science, 226: 547-549, 1984.*

90.- *IVERSEN L. The possible role of neuropeptides in the pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol, 12: 399-400, 1985.*

91.- *BOYUM A. Cell separation. Scand J Clin Lab Invest. 21: 27-32, 1968.*

92.- *RODRIGUEZ HORNILLO C. Variaciones Fisiológicas de la Quimiotaxis: implicaciones etiopatogénicas y terapeúticas. Facultad de Medicina de Sevilla, 1985.*

93.- *COHEN LL, HOLLIDAY M. Statiscics for social Sciences. Harper and Row. Publishers. London, 1982.*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE MEDICINA

94.- LOTHAR SACHS R. En "Estadística Aplicada". Editorial Labor. Barcelona, 1978.

95.- ZUCKER MB, NACHMICES VT. Platelet activation. Arteriosclerose, 5: 2-18, 1985.

96.- WOOD MA, SPORES J, NOTSKE R y cols. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. N Engl J Med, 303: 897-902, 1980.

97.- MULLER JE, STONE PH, TURI ZG y cols. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. N Engl J Med, 313: 1315-1322, 1985.

98.- CRADDOCK PR, HAMMERSCHMIDITZ D, WHITE JG y cols. Complement (C_{5a})- induced granulocyte aggregation in vitro: a possible mechanism of complement-mediated leukostases and leukopenia. J Clin Invest, 60: 260-264, 1977.

99.- CRADDOCK PR, FEHR J, BRIGHAM KJ y cols. Complement and leukocyte- mediated pulmonary dysfunction in hemodialyses. N Engl J Med, 296: 769-774, 1977.

100.- Purtscher O. Citado en Ashton N, Henkind P. Experimental occlusion of retinal arterioles. Br J Ophthalmol, 49: 222-234, 1965.

101.- HILL JH, WARD PA. The phlogistic role of C_3 leukostatic fragments in myocardial infarcts of rats. J Exp Med, 133: 885-900, 1971.

102.- JACOBS HS, CRADDOCK PR, HAMMERSCHMIDIT DE y cols. Comple-

ment induced granulocite aggregation. N Engl J Med, 302: 789-794, 1980.

103.- TERRANOVA V, FLORO R, HUJANEN E y cols. Laminin promotes rabbit neutrophil motility and attachment. J Clin Invest, 77: 1180-1186, 1986.

104.- CRADDOCK PR, FEHRD J, DALMASSO AP y cols. Hemodyalysis leukopenia by dialyzer cellophane membranes. J Clin Invest, 59: 879-888, 1977.

105.- NUSBACHERD J, ROSENFIELD SI, MAC PHERSON y cols. Nylon fiber leukopheresis: associated complement component changes and granulocytopenia. Blood, 51: 359-365, 1978.

106.- HENAO F, ALDRETE JS. Multiple systems organ faillure; It is a specific entity ?. South Med J, 78: 329-334, 1985.

107.- HAMMERSCHMIDITZ DE, WHITE JG, CRADDOCK PR y cols. Corticosteroids inhibit complement-induced granulocyte aggregation: a possible mechanism for their afficacy in shock states. J Clin Invest, 63: 798-803, 1979.

108.- GOLDSTEIN IM, CALA D, RODIN A y cols. Evidence of complement catabolism in acute pancreatitis. Am J Med Sci, 275: 257-264, 1978.

109.- KAPLOW LS, GOFFINET JA. Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. JAMA, 203: 1135-1137, 1968.

110.- SLADEN A. Methylprednisolone: pharmacologic doses in shock lung-syndrome. J Thorac Cardiovasc Sing, 71: 800--806, 1976.

111.- The Veteranes Administration systemic sepsis. Cooperative study group. Effect of high-dose glucocorticoid therapy in systemic sepsis. N Engl J Med, 317: 659-666, 1987.

112.- ASCHOFF J. Circadian rhythms in man a selfsustanined oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. Science, 148: 1427-1432, 1965.

113.- TRUEBA A. Ritmo circadiano de la liberación de enzimas y producción de superóxido por los polimorfonucleares. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sevilla, 1986.

114.- MUNIAIN MA, RODRIGUEZ MD, MATA R. Variaciones circadianas en la producción de superóxido, y liberación de enzimas lisosómicas por los neutrófilos de sangre periférica. Rev Clin Esp, 148: 40-43, 1988.

115.- MUNIAIN MA. Circadian variation in neutrophil chemotaxis. Congreso Europeo de Reumatología. Atenas. Grecia, 1987.

116.- GOLDSTEIN IM, HOFFSTEIN S, GALLIN J y cols. Mechanism of lysosomal enzyme release from human leukocytes: microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement. Proc Nat Acad Sci, 70: 2916-1920,1973.

117.- CRADDOCK PR, HAMMERSCHMIDTZ DE, MOLDOW CF y cols. Granulocyte aggregation as a manifestation of membrane . Intera-

tions with complement. Seminars in Hematology, 16: 140--147, 1979.

118.- BROTHERS GB, HADLER NM. Diurnal variations in rheumatoid synovial effusions. J Rheum 10 (3): 471-474, 1983.

119.- ZVAIFFER NJ. Etiology and Pathogenesis of Hreumatoid Arthritis. En "Arthritis and allies conditions". Ed. Mc Carty. Lea and Fibeger. London, 659-674, 1989.

120.- MATA ALCAZAR-CABALLERO R: Variaciones diarias de los Polimorfonucleares. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sevilla, 1984.

121.- OWEN NE, FEINBERG H, LE BRETON GC. Epinephrine induces Ca^{2+} uptake in human platelets. Am J Physiol, 239: 483-488,1980.

122.- FOSSET M, DE BARRY J LENOIR J y cols. Analyses of molecular aspects of Na^{+} y Ca^{++} uptakes by embryonic cardiac cells in culture. J Biol Chem, 252: 6112-6117, 1977.

123.- HARTWING JF, STOSSEL. Interaction of actyn, myosin and an acting-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. Effects of cytochalasin B. J Cell Biol, 71: 295-303,1976.

124.- ASWANIKUMAR S, SCHIFFANN E, CORCORAN BA y cols. Antibiotics with agonist and antagonist chemotactic activity. Biochem and Byophysic Res Communications, 80: 464-471, 1978.

125.- SCHIFFMANN E, CORCORAN BA, WAHL SA. N-formylmethionil peptides as chemoattaractants for leukocytes. P Nat Acad Sci, 72: 1059-1062, 1975.

126.- SHOWELL HJ, BECKER EL. The effects of external K^+ and Na^+ on the chemotaxis of rabbit peritoneal neutrophils. J Immunol, 116: 99-105, 1976.

127.- SIMCHOWITZ L, METHA J, SPILBERG I. Chemotactic factot--induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. Art Rheum, 22: 755-763, 1979.

128.- RODRIGUEZ MD. Aspectos funcionales de los PMN en enfermos con Síndrome de Behçet. Tesina de Licenciatura. Universidad de Sevilla, 1984.

129.- VAN EPPS, WILLIAMS R. "Serum inhibitors of leukocyte chemotaxis and their relationship to skin test anergy". En: Leukocyte Chemotaxis. Gallin y Quie edit. Raven Press. New York, 1978.

130.- ACKERMAN SK, DOUGLAS SD. Pepstatin A a human leukocyte chemoattracktant. Clin. Immunol Immunopathol, 14: 244--250, 1979.

131.- UMEZAWA H, AAYAGI T, MORISHIMA H y cols. Pepstatin A. J Antibiotics, 23: 259-262, 1970.

132.- AAYAGI T, FUMIMOTO SK, TAKENCHI T y cols. Pepstatin A, a protease inhibitor. J Antibiotics, 24:687-694, 1971.

133.- NELSON RB, ACKERMAN SK, FIEGEL VD y cols. Cytotaxin receptors of neutrophils: evidence that F-methyonil peptides and Pepstatin have a commom receptor. Infection

and Immunity, 26: 996-999, 1979.

134.- MUNIAIN MA, POZUELO F, PEREZ-VENEGAS JJ y cols. Efectos de la Pepstatina A sobre los neutrófilos; desactivación cruzada con el FMLP. Rev Esp Fisiol, 41: 125-132, 1985.

135.- FREER RJ, DAY AR, RADDING JA. Further studies on the structural requeriments for synthetic peptide chemoattractants. Biochemisty, 19: 2404-2410, 1980.

136.- UMEAZAWA H, AAYAGI Y, MORISHIMA H. Pepstatin. J Antibiotics, 23 : 259-262, 1970.

137.- PEREZ-VENEGAS JJ. Efecto de la Pepstatina A sobre los neutrófilos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sevilla, 1984.

138.- SHOWELL H, FREER RJ, ZIGMOND SH y cols. FMLP and Pepstatin. J Exp med, 143: 1154-1169, 1978.

139.- BECKER EJ, FALLEY JV, SHOWELL H y cols. Activation of the rabbit polymorphonuclear leukocyte membrane Na^+, K^+ ATPasa by chemotactic factor. J Cell Biol, 77: 329--333, 1978.

140.- FEHRD J, JACOBS HS. In vitro granulocyte adherence and in vivo margination. J Exp Med, 146: 641-652, 1977.

141.- RINGERTZ B, PAHUBLARD J, LINDREGN JA. Stimulus-specicic neutrophil aggregation: Evaluation of possible mechanism for the stimulus-response apparahes. J Lab Clin Med, 106: 132-140, 1985.

142.- O'FLAHERTY JF, KREUTZER DL, WARD PA. Neutrophil aggregation and swelling induced by chemotactic agents. J Immunol, 119: 232-239, 1977.

143.- MUNIAIN MA, POZUELO F, ROMERO A y cols. Aumento de la movilidad de los polimorfonucleares inducida por suero incubado con nylon de los oxigenadores. Inmunología, 3: 21-24, 1984.

144.- CHENOWETH DE, COOPER SW, HUGLE TE y cols. Complement activation during cardiopulmonary bypass. N Engl J Med, 304: 499-502, 1981.

145.- ABRAMSON S. Mechanism of action of monoesteroidal antiinflammatory drugs. En "Advances in Immflammation Research". Ed. F.Russo-Macal. Raven Press. New York, 10: 111, 1985.

146.- ABRAMSON S. Mechanism of action of monoesteroidal antiinflammatory drugs. En "Advances in Inflammation Research". Ed. F. Russo-Macal. Raven Press. New York, 5: 116, 1985.

147.- VANE JR. Inhibition of prostaglandin byosybthesis as a mechanism of action of aspirin- like drugs. Nature New Biol. 231-232, 1971.

148.- ABRUZZO JL, GORDON GV, MEYERS AR. Double blind study

comparing piroxicam and aspirin in the treatment of osteoarthritis. Am J Med, 45-49, 1982.

149.- *KAPLAN HB, EDELSON H, KORCHA K y cols. Effects of non--steroidal antiinflammatory agents on human neutrophil functions in vitro and in vivo. Biochem Pharmacol, 33: 371-378, 1987.*

150.- *BAR-SHAVOT Z, GOLDMAN R, STABINSKI Y y cols. Enhancement of phagocitoses-a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. Biochem Biophys Res Commun, 94: 1445-1451, 1980.*

151.- *COLLIER DH, ACHTEN MI, LEVINE JD. The role of the peripheral nervous system in experimental arthritis. Arthritis Rheum 27: 522, 1984.*

152.- *OSEAS R, BOXER L, BUTTERICK CH y cols. Differences in polymorphonuclear leukocyte aggregation responses among several species in response to chemotactic stimulation. J Lab Clin Med, 96: 213-221, 1980.*

153.- *WEISMANN G. Activation of neutrophils and the lesion of Rheumatoid Arthritis. J Lab Clin Med, 100: 322-333,1982.*

154.- *ELMGREEN J NIELSEN OH, AHNFELT-RONNE I. Enhanced capacity for release of Leukotriene B_4 by neutrphils in Rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 46: 501-505, 1987.*

155.- *DAUGHADAY C, BOHRER AN, SPILBERG I. Lack of effect of Colchicine on human neutrphil chemotaxis under agarose. Experientia, 37: 199-200, 1981.*

156.- *EDELSON PJ, FUDENBERG HH. Effect of vinblastine on the chemotactic responsiveness of human neutrophils. Infection and Immunity, 8: 127-129, 1973.*

157.- *PINALS RS, KAPLAN SB, LAWSON JG y cols. Sulfasalazine in Rheumatoid Arthritis: a double-blind placebo-controlled trial. Arthritis Rheum, 29: 1427-1435, 1986.*

158.- *CAMPIEW M, LANPANCHI GA, BAZZOCHI G y cols. Treatment of ulcerative colitis with high-dose 5,aminosalicylic acid enemas. Lancet, 2: 270-271, 1981.*

159.- *BAX DE, AMOS RS. Sulfasalazine: a safe, effective agent for prolonged control of Rheumtoid Arthritis: a comparison with sodium amothionalate. Ann Rheum Dis, 44: 194-199,1985.*

160.- *ALI AT, BASRAM GS, MORLEY J y cols. Mode of action of sulphasalazine: an alternative view. Lancet, 4: 506--507, 1982.*

161.- *NISSILA M, LEHTINEN K, LEINISALE-REPO M y cols. Sulfasalazine in the treatment of Ankylosis spondylitis. Arthritis Rheum, 31: 1111-1116, 1988.*

162.- *SITUNAYAKE RD, Mc CONKEY B. Resin coated 5,aminosalicylic acid (Asacol) in Rheumatoid Arthritis. Br J Rheum, 24: 226, 1985.*

163.- *SPILBERG I, MANDELL B, HOFFSTEIN S. A proposed model for chemotactic deactivation. J Lab Clin Med, 94:361--369, 1979.*

164.- *SIMCHOWITZ L, MEHTA J, SPILBERG I. Chemotactic factor--induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. Arthritis Rheum, 22: 755-763, 1979.*

165.- *SPILBERG I, MEHTA J, SIMCHOWITZ L. Induction of a chemotactic factor from human neutrophils by diverse crystals. J Lab Clin Med, 100: 399-403, 1982.*

Reunido el Tribunal [illegible] firmantes en el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de D.ª María Dolores Rodríguez López titulada Estudio in vitro de la aparición de los neutrófilos

acordó otorgarle la calificación de Apto "cum laude"

Sevilla, 21 de noviembre de 19[illegible]

El Vocal, El Vocal, El Vocal,

El Presidente, El Secretario, El Doctorado,