

54
zey



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"ENSAYO QUIMIOTACTICO "bajo agarosa" DE LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES EN PACIENTES ADULTOS CON
DIAGNOSTICO DE ANGIOEDEMA, URTICARIA Y RINITIS
ALERGICA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARTHA NORMA RIVAS TOVAR

Asesor: M. en C. Víctor Manuel Zendejas Buitrón

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1986

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAINE KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo
La tesis:

"Ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" de leucocitos polimorfonucleares en
pacientes adultos con diagnóstico de angioedema, urticaria y rinitis -
alérgica".

que presenta la pasante: Martha Norma Rivas Tovar

con número de cuenta: 7227187-0 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 22 de Agosto de 1995

PRESIDENTE Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez

VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

SECRETARIO M. en C. Victor M. Zendejas Buitrón

1er. SUPLENTE Dr. Marco A. Vega López

2do. SUPLENTE M.V.Z. Angel Martínez Sosa

[Firmas manuscritas de los miembros del tribunal]

A mi querida hija Fabiola

Una hija maravillosa a la que amo sin medida. Siempre será el mejor aliciente de mi vida para continuar superándome.

A mi madre

Que convirtió todo lo que pudo en éxitos y esperanzas. Todo mi amor, respeto y admiración a un ser maravilloso.

A mi padre

Todo mi amor y agradecimiento para quien me entregó todo su cariño y esfuerzo pero al que nunca expresé lo suficiente el mío.

Agradecimientos

A Crisanta por su apreciable ayuda, paciencia y amistad incondicional. Gracias Miss Cris .

A mis hermanos Jorge, Arturo y Joaquín que son un ejemplo de superación profesional y personal. Por su cariño y ayuda incondicional que siempre me han brindado, Gracias.

A mi Asesor de tesis, M. en C. Victor Manuel Zendejas Buitrón. Por su paciencia, colaboración y gran apoyo recibidos durante la realización de esta tesis, Gracias.

A mis amigas y compañeras: Ana Rosa, Crisanta, Dalila, Edith, Guadalupe, Irma, Lourdes, Magdalena, y Teresa por su amistad, apoyo y colaboración para la realización de esta meta tan importante para mi. Gracias por estar conmigo en los momentos cruciales de mi vida.

Al Dr. Jaime Mejía Ortega Jefe del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades del C.M.N.SXXI del IMSS por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Al personal del Laboratorio de Alergia e Inmunología Clínica por su apoyo y colaboración durante la elaboración de esta tesis.

A todas aquellas personas que de alguna manera influyeron y colaboraron en la realización de esta tesis Mil Gracias.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE TABLAS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
1.0 ANTECEDENTES	2
2.0 ASPECTOS CELULARES Y HUMORALES DE LA QUIMIOTAXIS	3
2.1 Neutrófilos	3
2.2 Eosinófilos	3
2.3 Basófilos y células cebadas	15
2.4 Monocitos y macrófagos	15
2.5 Células endoteliales	16
2.6 Plaquetas	18
2.7 Moléculas de adhesión	18
2.8 Componentes humorales implicados en la quimiotaxis	22
3.0 MECANISMO DE LA QUIMIOTAXIS DE LEUCOCITOS	
POLIMORFONUCLEARES	27
3.1 Activación, marginación, adherencia y diapédesis	28
3.2 Reconocimiento y fagocitosis	31
4.0 ASPECTOS CLINICOS DE LAS ENFERMEDADES DE TIPO ALERGICO	31
4.1 Urticaria y angioedema	32
4.2 Rinitis alérgica	33

	Página
5.0 HIPOTESIS	35
6.0 OBJETIVOS	35
7.0 MATERIAL Y METODO	36
7.1 Protocolo clínico	36
7.2 Material biológico	37
7.3 Material y equipo	37
7.4 Ensayo quimioláctico "bajo agarosa"	38
8.0 RESULTADOS	44
9.0 DISCUSION	62
10.0 CONCLUSIONES	67
11.0 BIBLIOGRAFIA	68

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Origen de las células del sistema inmune.	4
Figura 2 Diagrama esquemático que muestra las relaciones entre los sistemas de coagulación, fibrinolítico, del complemento y de las cininas.	23
Figura 3 Vías de activación del sistema del complemento.	24
Figura 4 Productos metabólicos del ácido araquidónico.	26
Figura 5 Representación esquemática del mecanismo de la quimiotaxis.	29
Figura 6 Diagrama de flujo del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa".	39
Figura 7 Patrón de distribución de las series de pozos para el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa".	41
Figura 8 Patrón de migración del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa".	43
Figura 9 Representación gráfica de la diferencial quimiotáctica para estandarizar la concentración del suero activado con zimosan.	45
Figura 10 Representación gráfica del índice quimiotáctico para estandarizar la concentración del suero activado con zimosan .	46
Figura 11 Representación gráfica de la diferencial quimiotáctica para estandarizar el concentrado de leucocitos polimorfonucleares.	48
Figura 12 Representación gráfica del índice quimiotáctico para estandarizar el concentrado de leucocitos polimorfonucleares.	49
Figura 13 Representación gráfica de la diferencial quimiotáctica para estandarizar el tiempo de incubación de las placas de agarosa .	50

	Página
Figura 14 Representación gráfica del índice quimiotáctico para estandarizar el tiempo de incubación de las placas de agarosa.	51
Figura 15 Representación gráfica de los promedios de la quimiotaxis entre los diferentes grupos estudiados.	53
Figura 16 Representación gráfica de los promedios de la quimioquinesis entre los diferentes grupos estudiados.	56
Figura 17 Representación gráfica de los promedios de la diferencial quimiotáctica entre los diferentes grupos estudiados.	57
Figura 18 Representación gráfica de los promedios del índice quimiotáctico entre los diferentes grupos estudiados.	58

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Principales sustancias químicas implicadas en la quimiotaxis.	5
Tabla 2 Productos del ácido araquidónico implicados en la quimiotaxis.	10
Tabla 3 Fragmentos de factores del complemento implicados en la quimiotaxis.	12
Tabla 4 Receptores de membrana celular para los fragmentos derivados de C3.	14
Tabla 5 Principales sustancias secretadas por los macrófagos.	17
Tabla 6 Moléculas de adhesión.	20
Tabla 7 Clasificación de urticaria-angioedema.	34
Tabla 8 Resultados de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico obtenidos en sujetos no alérgicos.	54
Tabla 9 Análisis comparativo de los promedios obtenidos de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico entre los diferentes grupos estudiados.	55
Tabla 10 Resultados de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico obtenidos en pacientes con angioedema, angioedema-urticaria y rinitis alérgica.	59

ABREVIATURAS

A	▪ Quimiotaxis
B	▪ Quimiocinesis
A-B	▪ Diferencial quimiotáctica
A/B	▪ Índice quimiotáctico
Ag	▪ Antígeno
Ac	▪ Anticuerpo
APCs	▪ Células presentadoras de antígeno
BAS	▪ Basófilo
DAF	▪ Factor acelerador de la disociación
ECP	▪ Proteína catiónica de los eosinófilos
EDN	▪ Neurotoxina derivada de los eosinófilos
EOS	▪ Eosinófilo
ECF-A	▪ Tetrapéptidos quimiotácticos para eosinófilos
ECF- oligopéptidos	▪ Oligopéptidos quimiotácticos para eosinófilos
ELAM	▪ Molécula del endotelio ligadora de leucocitos
EPO	▪ Peroxidasa de los eosinófilos
FMPL	▪ N-formil metionil leucil fenil alanina
FQ	▪ Factores quimiotácticos
G-CSF	▪ Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	▪ Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HEV	▪ Vénulas endoteliales altas
HMW-NCF	▪ Factor quimiotáctico de alto peso molecular para neutrófilos
ICAM-	▪ Molécula de adhesión intercelular
IFN	▪ Interferón
IL-	▪ Interleucina
LECCAM	▪ Molécula de adhesión celular de lectinas
LFA-1	▪ Antígeno funcional del leucocito
PMNL	▪ Leucocitos polimorfonucleares
LT-	▪ Leucotrieno
Mac-1	▪ Glicoproteína 1 del macrófago
MAC	▪ Complejo de ataque a la membrana
MBP	▪ Proteína básica mayor
M-CSF	▪ Factor estimulante de colonias de macrófagos
NCF	▪ Factor quimiotáctico para neutrófilos

NEU	▪ Neutrófilos
K	▪ Linfocito asesino
NK	▪ Linfocito asesino natural
PAF	▪ Factor activador de plaquetas
PBS	▪ Solución amortiguadora salina-fosfatos
PG-	▪ Prostaglandina
TGF	▪ Factor del crecimiento transformante
TH	▪ Linfocito T ayudador
TNF	▪ Factor de necrosis tumoral
VCAM	▪ Molécula vascular de adhesión celular
VLA-	▪ Molécula de activación de antígeno muy tardía
ZAS	▪ Suero activado con zimosan

**Este trabajo fue realizado en el
Laboratorio del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica,
del Hospital de Especialidades del C.M.N.SXXI,
del Instituto Mexicano del Seguro Social,
a cargo del Dr. Jaime Mejía Ortega.**

Resumen

Se estudió el método para la cuantificación de la quimiotaxis propuesto por Nelson en 1975, el cual se basa en la migración de los leucocitos "bajo agarosa". Se estudiaron tres grupos de pacientes con: angioedema en fase aguda, angioedema-urticaria y rinitis alérgica, y se compararon con un grupo de sujetos no atópicos, para determinar si la técnica evaluada tenía algún valor como apoyo al médico alergólogo para el mejor manejo de los pacientes con estas enfermedades. Se estandarizaron los parámetros de: densidad celular, concentración del quimioattractante y tiempo de incubación. Se utilizaron cajas Petri con agarosa; con series de 3 pozos con diámetro de 2.5 mm y distancia entre los pozos de 2.5 mm. En el pozo central se pusieron 10 μ l de una suspensión celular de $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ PMNL/ml; en el pozo externo 10 μ l de ZAS (dilución 1:2 de una relación 1 mg de zimosan : 1ml mezcla de sueros); y en el pozo interno 10 μ l de RPMI-1640; después de 22 horas de incubación a 37°C con atmósfera de aire más 5% de CO₂, se midió la migración de las células hacia el pozo del quimioattractante. Los resultados obtenidos mostraron que se trata de una técnica sencilla, económica, reproducible y no requiere de material especial por lo que podría implementarse en cualquier laboratorio clínico. Se encontró que la quimiotaxis de los grupos de angioedema en fase aguda y de rinitis alérgica, al compararlos con el grupo control, presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.05$ respectivamente), respaldando este resultado con la diferencial quimiotáctica ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente). El grupo de pacientes con angioedema-urticaria no mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control de sujetos no atópicos. Estos resultados permiten considerar la posible utilidad de esta técnica, aunque se requiere de estudios más profundos y con una población más amplia para su evaluación final.

1.0 Antecedentes

Las primeras investigaciones sobre quimiotaxis se iniciaron en 1888 con los experimentos de Theodor Leber que sentaron las bases de su teoría sobre el origen de la inflamación [1].

En la investigación sobre la relación que existía entre la quimiotaxis, la inflamación y la fagocitosis, destacan los estudios realizados por Elie Metchnikoff en 1890. En 1893 Metchnikoff, en su teoría fagocítica, puso de manifiesto la importancia de la quimiotaxis de los fagocitos dentro del proceso de la inflamación [1].

Menkin en 1938 utilizando la técnica del tubo capilar aisló un factor quimiotáctico y concluyó que se trataba de un polipéptido al que llamó "leucotaxina" [1].

Fue hasta 1962, cuando Boyden desarrolló la técnica de "filtro de membrana", diseñó una cámara que lleva su nombre y estandarizó la evaluación de la quimiotaxis "in vitro" [2,3].

En 1972 Goetzi y Austen desarrollaron el método de radioensayo utilizando cromo 51 como marcador, para el estudio de la locomoción de neutrófilos [4].

En 1974 Cutler describió el método "bajo gel de agarosa", y lo comparó con el método de Boyden para el estudio de la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares [5].

En 1975 Nelson describió una modificación del método de Cutler, el cual permite medir la quimiotaxis o migración dirigida y la quimioquinesis o migración al azar; requiere pocas células, es rápido, simple, reproducible y económico [6,7].

2.0 Aspectos celulares y humorales de la quimiotaxis

En la quimiotaxis participan, entre otros componentes, una serie de células que se originan de una célula madre pluripotencial que se multiplica continuamente en la médula ósea. Entre estas células se encuentran los leucocitos polimorfonucleares (PMNL): neutrófilos, basófilos y eosinófilos; y los leucocitos mononucleares: monocitos, macrófagos y linfocitos [8] (Fig.1).

2.1 Neutrófilos

Las funciones principales de los neutrófilos son: la fagocitosis y la destrucción de agentes invasores, en la fase temprana de la respuesta inmunológica [8].

Los neutrófilos poseen receptores en su superficie para: la porción Fc de la IgG y de la IgA; la N-formil metionil leucil fenil alanina (fMLP); para diversos factores quimiotácticos y citocinas (Ver Tabla 1); los productos derivados del ácido araquidónico (Ver Tabla 2); los fragmentos derivados del sistema del complemento (Ver Tabla 3); los fragmentos derivados de C3 (Ver Tabla 4) y para los fragmentos de la colágena, laminina y fibronectina que son componentes de la matriz extracelular [8,31].

Los neutrófilos poseen moléculas de adhesión, sobre su superficie celular, como la L-selectina cuya actividad para unirse a las células endoteliales parece incrementarse después de la exposición a los factores quimiotácticos; así como las integrinas que se encuentran presintetizadas sobre la membrana de pequeñas vesículas en el citoplasma. Cuando el neutrófilo es activado, estas vesículas se fusionan con la membrana y las integrinas son transportadas hacia la superficie celular [32].

2.2 Eosinófilos

Los eosinófilos son células esencialmente secretoras y reguladoras así como con cierta actividad fagocítica en el proceso de la inflamación [8,13].

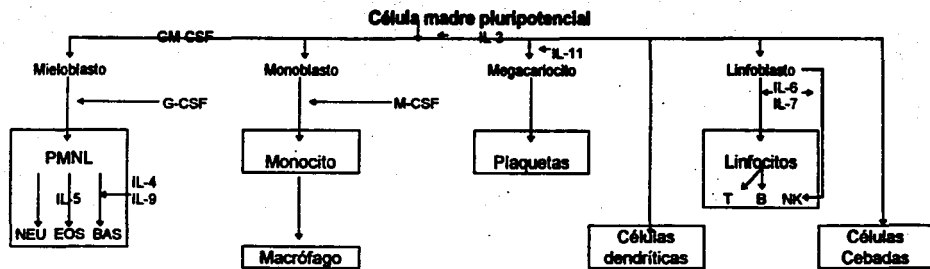


Figura 1.- Origen de las células del sistema inmune

- | | |
|---|---|
| GM-CSF= Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos | G-CSF= Factor estimulante de colonias de granulocitos |
| M-CSF = Factor estimulante de colonias de macrófagos | IL = Interleucina |
| NEU = Neutrófilos | EOS = Eosinófilos |
| BAS = Basófilos | T = Linfocitos T |
| B = Linfocitos B | NK = Linfocitos asesinos naturales |
| PMNL = Leucocitos polimorfonucleares | |

Ref. [9,10]

Tabla 1.- Principales sustancias químicas implicadas en la quimiotaxis

Sustancia	Origen	Funciones en la quimiotaxis	Ref.
HISTAMINA	Sintetizada en las células cebadas y en los basófilos. Se libera de inmediato con la desgranulación celular.	Interactúa con los receptores H1, H2 y H3 de la célula blanco. Como mediador, es ligando de receptores H1; como regulador, es ligando de receptores H2. La estimulación del receptor H1 incrementa: la permeabilidad vascular, la contracción del músculo liso de los bronquios y de la mucosa intestinal, la vasoconstricción pulmonar, la producción de moco nasal, incrementa la quimiotaxis de leucocitos, y producción de prostaglandinas en tejido pulmonar. La estimulación del receptor H2 inhibe la desgranulación del basófilo, incrementa la producción de moco en las vías respiratorias, incrementa la secreción gástrica, disminuye la liberación de enzimas, aumenta la permeabilidad e inhibe la quimiotaxis de leucocitos. La estimulación del receptor H3 inhibe la liberación de histamina y disminuye su síntesis.	11,12
FIBRINOPEPTIDO A Y B	Fragmentos menores del fibrinógeno originados por la acción de la trombina.	Factores quimiotácticos para monocitos y macrófagos.	13
TETRAPEPTIDOS QUIMOTACTICOS PARA EOSINOFILOS (ECF)	Sintetizados en las células cebadas y en los basófilos. Liberación a consecuencia de la desgranulación celular.	Ligando de receptores de membrana. Quimiotaxis débil de eosinófilos. Incrementan la expresión de receptores para el complemento en los eosinófilos y la síntesis de PAF.	11,13

Tabla 1.-Continuación

Sustancia	Origen	Funciones en la inmunidad	Ref.
<p>OLIGOPEPTIDOS QUIMIOACTIVOS PARA EOSINOFILOS (ECF- Oligopéptidos)</p>	<p>Sintetizados en las células cebadas y en los basófilos. Liberación a consecuencia de la desgranulación celular.</p>	<p>Ligando de receptores de membrana. Quimiotaxis débil de eosinófilos y neutrófilos.</p>	<p>13</p>
<p>FACTOR QUIMIOACTIVO DE ALTO PESO MOLECULAR PARA NEUTROFILOS (HMW-NCF)</p>	<p>Sintetizado y almacenado en los gránulos de las células cebadas y de los basófilos. Liberación a consecuencia de la desgranulación celular.</p>	<p>Ligando de receptores de membrana. Leucocitosis neutrofilica transitoria. Incremento en la expresión de receptores para el complemento en los neutrófilos. Quimiotaxis de neutrófilos. Se ha identificado durante la inducción experimental de urticaria y broncoconstricción mediada por alérgenos. Induce la expresión de receptores para el C3b en neutrófilos y macrófagos.</p>	<p>11,13</p>
<p>INTERFERONES (IFN) IFN-α IFN-β IFN-γ</p>	<p>IFN α sintetizado principalmente por leucocitos. IFN γ sintetizado por linfocitos TH1 y NK.</p>	<p>Ligando de receptores de membrana. El IFN γ activa los macrófagos, neutrófilos, linfocitos NK, y células endoteliales. Inducción del MHC clase II sobre APCs y células somáticas. Efectos antivirales. El IFN γ incrementa la actividad de los linfocitos TH1 y por lo tanto incrementa la inmunidad celular, pero inhibe la proliferación de los linfocitos TH2 y así tiende a suprimir la inmunidad humoral. Esto no sólo disminuye la producción de IL-4 por los linfocitos TH2, sino también potencializa la inhibición de los efectos de la IL-4 sobre los linfocitos B, particularmente inhibiendo la producción de la IgE.</p>	<p>14,15, 16</p>

Tabla 1.- Continuación

Sustancia	Origen	Funciones en la quimiotaxis	Ref.
FIBRINA	Polímero del fragmento mayor del fibrinógeno originado por la acción de la plasmina.	Se asocia a la fibronectina, este complejo sirve de matriz para la migración, activación y proliferación de monocitos, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales.	13
INTERLEUCINA 1 (IL-1)	Sintetizada por monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos T, B y NK; y músculo liso, entre otros.	Ligando de receptores de membrana. Estimula a los linfocitos T y B e induce la respuesta inflamatoria, la producción de prostaglandinas y enzimas de degradación como la colagenasa. Virtualmente todas las células del cuerpo tienen receptores para IL-1. Actúa específicamente sobre fagocitos mononucleares y el endotelio vascular incrementando la síntesis adicional de IL-1 e induciendo la síntesis de IL-6, PGs, IL-8, GM-CSF, TNF α , ICAM-1. A bajas concentraciones la IL-1 es mediador de la inflamación local, al igual que el TNF α , actúa sobre las células endoteliales promoviendo la coagulación e incrementando la expresión de moléculas de adhesión. Cuando se secreta en grandes cantidades, entra al torrente circulatorio y muestra efectos endocrinos. La IL-1 sistémica comparte con el TNF α la capacidad de causar fiebre, de inducir la síntesis de proteínas de fase aguda (proteína sérica amiloide A) por el hígado e iniciar el desecho metabólico (caquexia). En los neutrófilos estimula la producción de citocinas.	11,13, 16

Tabla 1.- Continuación

Sustancia	Origen	Funciones en la quimiotaxis	Ref.
FACTOR DEL CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF β)	Sintetizado en macrófagos activados, eosinófilos, neutrófilos y plaquetas, entre otros.	Regulador que inhibe la inmunidad y la hematopoyesis. Inhibe la producción de linfocinas y anticuerpos. Quimiotáctico para los macrófagos, monocitos y neutrófilos. Estimula la expresión de las moléculas de adhesión en los monocitos. Inhibe la proliferación de células epiteliales y endoteliales.	14,16
INTERLEUCINA 8 (IL-8)	Sintetizada en monocitos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos NK y fibroblastos.	Activación, desgranulación y quimiotaxis de neutrófilos. Participación importante en la inflamación aguda. La IL-8 se encuentra en la sangre de pacientes que padecen una reacción inflamatoria sistémica y traumas severos; puede ser rápidamente detectada en los sitios de inflamación, fluidos sinoviales, artritis reumatoide, y torrente circulatorio de pacientes con shock séptico. Así, la IL-8 es uno de los principales participantes en la inflamación aguda.	14,18, 17
FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (PAF)	Se genera de un fosfolípido complejo que se almacena en forma de precursor en la membrana celular de neutrófilos, monocitos, macrófagos, basófilos, músculo liso, plaquetas, eosinófilos y células cebadas.	Ligando de receptores de membrana. Activa a las plaquetas, induce la agregación y liberación de gránulos de las plaquetas. Activa a neutrófilos y eosinófilos, provocando la liberación de constituyentes granulares. Es un poderoso quimiotáctico para eosinófilos. Provoca reacción de mícula y púpila e infiltración de leucocitos. Quimiotaxis de neutrófilos. Desgranulación, agregación y producción de radicales superóxido.	11,13, 18,19, 20,21

Tabla 1.- Continuación

Estructura	Origen	Funciones en la estructura	Ref.
<p>FIBRONECTINA</p>	<p>Es producida por el hígado, fibroblastos, endotelio vascular, queratinocitos, macrófagos y linfocitos T.</p>	<p>Se encuentra en forma soluble en la sangre y en las secreciones, y en forma insoluble en la superficie de las células y en las matrices celulares; tiene un papel importante en la adherencia entre células o gérmenes. Interactúa con las integrinas, la colágena y el fibrinógeno. La interacción entre la fibronectina y sus receptores regula: el anclaje de las células, su polaridad, su capacidad de migración y su estado de diferenciación, lo cual tiene importancia en la embriogénesis, en la regeneración de las fibras nerviosas y como guía en la extensión de los epitelios en el proceso de cicatrización de heridas; y para facilitar la migración de ciertas células permitiendo o facilitando el que se puedan deslizar sobre la superficie celular.</p>	<p>22</p>

Tabla 2.- Productos del ácido araquidónico implicados en la quimiotaxis

Sustancia	Origen e inactivación	Funciones en la quimiotaxis
PROSTAGLANDINA D₂ (PGD ₂)	Eicosanoide (vía de la ciclooxigenasa) a partir de prostaglandina H (PGH) por una isomerasa en células cebadas y leucocitos polimorfonucleares. Inactivación enzimática.	Ligando de receptores de membrana. Aumento de la permeabilidad vascular lo que origina mácula y pápula en la piel. Media un infiltrado de neutrófilos hacia la piel e incrementa la quimiotaxis y quimioquinesis de leucocitos "in vitro". Sinergismo con la acción de los leucotrienos. Vasodilatación.
PROSTAGLANDINA E₂ (PGE ₂)	Eicosanoide (vía de la ciclooxigenasa) a partir de PGH por una isomerasa en células endoteliales y macrófagos. Inactivación por deshidrogenación enzimática.	Ligando de receptores de membrana. Inhibición de la desgranulación de las células cebadas. Vasodilatación. Sinergismo con leucotrienos, anafilatoxinas, bradicinina e histamina en el incremento de la permeabilidad vascular. Broncodilatador moderado.
ACIDO HIDROXIHEPTADECÁ TRIENOICO (HHT)	Eicosanoide (vía de la ciclooxigenasa) a partir de PGH por la tromboxano sintetasa en plaquetas y macrófagos.	Ligando de receptores de membrana. Quimiotaxis de eosinófilos.
ACIDO 12-HIDROPEROXI EICOSATETRAENOICO (12-HPETE)	Eicosanoide (vía de la 12-lipooxigenasa) a partir del ácido araquidónico en plaquetas. Inactivación enzimática por transformación en 12-HETE.	Quimiotaxis de neutrófilos. Estimulación de la actividad de la 15-lipooxigenasa en los neutrófilos. Regulación de la respuesta inmunológica.

Tabla 2.- Continuación

Sustancia	Origen e inactivación	Funciones en la quimiotaxis
ACIDO 5-HIDROPEROXI EICOSATETRAENOICO (5-HPETE)	Eicosanoide (vía de la 5-lipooxigenasa) a partir del ácido araquidónico en neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, células cebadas y queratinocitos. Inactivación enzimática por transformación en 5-HETE o en LTA ₄ .	Quimiotaxis y quimioquinesis de neutrófilos. Incremento en la liberación de histamina.
ACIDO 5-HIDROXI EICOSATETRAENOICO (5-HETE)	Eicosanoide (vía de la 5-lipooxigenasa) por la reducción del 5-HPETE en los leucocitos. Inactivación enzimática.	Quimiotaxis y quimioquinesis de neutrófilos. Aumento de la secreción de los mediadores contenidos en los gránulos de los neutrófilos.
LEUCOTRIENO B₄ (LTB₄)	Eicosanoide (vía de la 5-lipooxigenasa) por hidrólisis enzimática del LTA ₄ en neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, y células cebadas. Inactivación enzimática.	Ligando de receptores de membrana. Activación, adherencia, quimiotaxis, y quimioquinesis de neutrófilos y eosinófilos. Incremento de la expresión del receptor CR1 en los macrófagos. Regulación de la respuesta inmunológica. Incremento en la permeabilidad vascular.

Ref. [11,13,23]

Tabla 3.- Fragmentos de factores del complemento implicados en la quimiotaxis

Fragmento	Origen e inactivación	Funciones en la quimiotaxis
C4a	Originado por la fragmentación de la cadena alfa de C4 por medio de C1s. Desactivación a cargo del inactivador de anafilatoxinas (cininasa 1)	Ligando de receptores de membrana. Desgranulación de baja potencia de células cebadas y de basófilos. Anafilatoxina de muy baja actividad. Promueve la adherencia inmunológica.
C4b	Fragmento mayor de C4 originado por la acción de C1s o de otras proteinasas (plasmina, trombina). Inactivación enzimática por la acción del factor I cuando C4b está unido a la glicoproteína 45-70, al factor C4BP o al receptor CR1. Inactivación competitiva por unión con el factor acelerador de la disociación (DAF).	Unión a superficies celulares. Intermediario en la activación del sistema del complemento por la vía clásica. Ligando de receptores (CR1) en monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y plaquetas. Actúa como opconina.
C3a	Originado por la fragmentación de la cadena alfa de C3 por medio de las C3 convertasas: clásica (C4b2a), alterna (C3bBb y C3bBbP) o de otras proteinasas. Desactivación a cargo de cininasa I.	Ligando de receptores de membrana. Desgranulación potente de células cebadas y de basófilos. Anafilatoxina de mediana actividad. Aumento de la permeabilidad capilar. Contracción del músculo liso. Aumento de la liberación de histamina y de otros mediadores de la inflamación.
C3b	Fragmento mayor de C3 originado por la acción de las C3 convertasas: clásica (C4b2a), alterna (C3bBb y C3bBbP) o de otras proteinasas (plasmina, trombina). Inactivación enzimática por la acción del factor I y cuando C3b está unido al factor H; a la glicoproteína 45-70 o al receptor CR1. Inactivación competitiva por la unión al factor acelerador de la disociación (DAF).	Unión a las membranas celulares. Intermediario en la activación de las vías clásica y alterna del sistema del complemento. Ligando de receptores CR1 en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, linfocitos B y K, y eritrocitos. Opsonización. Depuración de complejos antígeno-anticuerpo circulantes. Regulación de la respuesta inmunológica.

Tabla 3.- Continuación

Fragmento	Origen e inactivación	Funciones en la quimiotaxis
C5a	Originado por la fragmentación de la cadena alfa de C5 por medio de las C5 convertasas: clásica (C4b2a3b), alterna (C3bBbP3b) o de las otras proteinasas. Inactivación a cargo de la cininasa I	Ligando de receptores de membrana. Desgranulación potente de las células cebadas y de los basófilos. Anafilatoxina de alta actividad. Factor quimiotáctico para neutrófilos, eosinófilos, monocitos, y macrófagos. Activación, marginación y adherencia de los neutrófilos. Contracción del músculo liso. Activación del metabolismo oxidativo de los neutrófilos.
C5b67	Formado por la acción secuencial no catalítica de sus componentes. Inactivación por despolimerización espontánea o por la unión a la proteína S (vitronectina).	Ligando de receptores de membrana. Factor quimiotáctico para neutrófilos, monocitos y macrófagos. Se fija sobre las células "blanco" e inicia la formación del MAC.
C5a-des-arg-	Originado de C5a por la pérdida del residuo de arginina carboxi terminal.	Anafilatoxina de baja potencia. Difiere de C5a, únicamente en que pierde la capacidad de liberar histamina de las células cebadas.
Ba	Originado por la fragmentación del factor B en presencia de Mg ²⁺ y por la activación proteolítica de D en la vía alterna del complemento.	Quimiotáctico de neutrófilos.

Tabla 4.- Receptores de membrana celular para los fragmentos derivados de C3

Receptor	Ligando	Células que poseen los receptores
CR1 (Receptor para C3b) [CD35]	C3b>iC3b, C4b, C3c	Eritrocitos, linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, células dendríticas foliculares, neutrófilos, eosinófilos, células de Langerhans.
CR2 (Receptor para C3d) [CD21]	C3d, C3dg, iC3b	Linfocitos B, timocitos, células dendríticas foliculares, células epiteliales, linfocitos efectores.
CR3 (Receptor del complemento tipo 3, Mac-1) [CD11b/CD18]	iC3b, C3d, zimosan, ciertas bacterias	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos K y NK, eosinófilos, células dendríticas foliculares.
CR4 (Receptor del complemento tipo 4, p150,95) [CD11c/CD18]	iC3b, C3dg [CD11a]	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos K y NK.
CR5	C3dg, C3d	Neutrófilos, plaquetas.
C3aR (Receptor C3a/C4a)	C3a, C4a	Neutrófilos, células cebadas, basófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T, eosinófilos, células de músculo liso.
C3eR	C3e	Neutrófilos.
C5aR (Receptor C5a) [CD68]	C5a, C5a-des-arg	Células cebadas, basófilos, células endoteliales, neutrófilos, monocitos, macrófagos.

Ref.[26,27,28,29,30]

Los eosinófilos como células efectoras pueden elaborar lípidos mediadores que incluyen al LTC_4 , y al PAF; sintetizan cuatro proteínas catiónicas: la proteína catiónica de los eosinófilos (ECP), la proteína básica mayor (MBP), la peroxidasa de los eosinófilos (EPO), y la neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN), que podrían estar involucradas en la respuesta inmunológica de tipo alérgico aguda y tardía [21].

Los eosinófilos poseen receptores para: la porción Fc de la IgG y de la IgE (receptores de baja afinidad), el factor activador de plaquetas (PAF), la histamina, el factor quimiotáctico para eosinófilos (ECF) (Ver Tabla 1), los productos derivados del ácido araquidónico (Ver Tabla 2), los fragmentos del complemento (Ver Tabla 3), y los fragmentos derivados de C3 (Ver Tabla 4), entre otros [21,31,33].

2.3 Basófilos y células cebadas

Las células cebadas se localizan en los tejidos y los basófilos en el torrente circulatorio, tienen una función importante en la inflamación mediada por IgE. Interactúan rápidamente con alérgenos inhalados o ingeridos, secretan una amplia gama de mediadores primarios o preformados y de mediadores secundarios que producen un incremento en la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso y secreción de moco [8,11,12] (Ver Tabla 1).

Los basófilos y las células cebadas poseen receptores de alta afinidad para: la porción Fc de la IgE, los fragmentos derivados del sistema del complemento (Ver Tabla 3) y para los fragmentos derivados de C3 (Ver Tabla 4) [8,12,33].

2.4 Monocitos y macrófagos

Las funciones principales de los monocitos y de los macrófagos son: fagocitosis, secreción de sustancias activas, regulación homeostática, función citotóxica, son células presentadoras de

antígeno, tienen interacciones reguladoras con los linfocitos y juegan un papel importante para iniciar y coordinar a casi todos los tipos de la respuesta inmunológica [32,34].

Se han descrito más de cien sustancias diferentes producidas por los macrófagos. La Tabla 5 enumera varias de estas sustancias, algunas de las cuales están implicadas en el mecanismo de la quimiotaxis [35].

Los macrófagos contienen más receptores de membrana para inmunoglobulinas y fragmentos del complemento que los monocitos. Los macrófagos y los monocitos poseen receptores específicos en su superficie para la IgG y la IgE (de baja afinidad); para diversos factores quimiotácticos y citocinas (Ver Tabla 1); para los productos derivados del ácido araquidónico (Ver Tabla 2); para los fragmentos derivados del sistema del complemento (Ver Tabla 3); y para los fragmentos derivados de C3 (Ver Tabla 4) [8,32,34,35,36].

2.5 Células endoteliales

Las células endoteliales participan activamente en la respuesta inmunológica promoviendo la regulación y emigración de las células circulantes. Cuando las células endoteliales se ven expuestas a citocinas (como IL-1, TNF α y β e IFN γ), o a sustancias liberadas en el sitio donde ha ocurrido un daño tisular, se activan incrementando su adhesividad para monocitos, neutrófilos y otras células circulantes para atraerlas al sitio del daño [12].

Las células endoteliales producen y expresan selectinas E y selectinas P por el estímulo de mediadores como la histamina y la trombina, que se producen en los sitios donde ha ocurrido un daño tisular. Al expresarse estas selectinas permiten que se les adhieran los leucocitos que circulan por el torrente sanguíneo. Esta adherencia también se ve incrementada por la expresión, sobre las células endoteliales, de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) [22,32,37].

Tabla 6.- Principales sustancias secretadas por los macrófagos

Enzimas	Proteína de unión
Lisozimas Colagenasa	Proteases neutras Elastasa
Hidrolasas ácidas	Metabolitos del oxígeno
Proteases	Anión superóxido
Lipasas	Peróxido de hidrógeno
Ribonucleasas	Radicales hidroxílicos
Fosfatasa	Singlete de oxígeno
Derivados del ácido araquidónico	Citocinas*
Prostaglandinas *	TNF α IL-8
Leucotrienos *	PAF NCF
Prostaglandinas	TGF β IL-1
Tromboxanos	IFN α IFN β
Componentes del complemento	Factores estimuladores de colonias
C1 al C9	GM-CSF
Factor B, factor D	M-CSF
Propedina	G-CSF

* = Sustancias implicadas en la quimiotaxis

Ref. [32,35]

Los ICAM son de tipo 1, 2 y 3, bajo el efecto de las citocinas producidas en los tejidos afectados interactúan con las integrinas para facilitar o incrementar la adhesión entre las células del sistema inmunológico. Las células endoteliales producen: ICAM 1 y 2, selectinas E y P; fibronectina, colágena, fibrinógeno, IL-1, y TNF (Ver Tabla 1) [22,37].

2.6 Plaquetas

Las plaquetas almacenan una serie de mediadores que actúan en el proceso de la inflamación, al ser activadas se produce un incremento en su agregación e inician su desgranulación liberando factores de la coagulación, PAF, y eicosanoides, entre otros, (Ver Tabla 1 y 2) [12,37].

2.7 Moléculas de adhesión

La adherencia y el movimiento de las células circulantes al endotelio vascular y a las células tisulares están controladas por citocinas, factores quimiotácticos, y moléculas de adhesión (proteínas) que se localizan en la superficie celular y permiten la interacción de las células circulantes al endotelio vascular, a las células tisulares y a la matriz extracelular; esta adhesión se lleva al cabo por la unión de la molécula de adhesión con su respectivo receptor [22,38].

Frecuentemente las moléculas de adhesión son transductoras de mensajes al interior de la célula y llegan a unirse al citoesqueleto de la célula fagocítica induciendo su movilidad en forma de tracción sobre otras células o en la matriz celular. En muchos casos una molécula de adhesión puede unir a más de un ligando usando diferentes sitios de unión. Las células pueden regular sus interacciones con otros tipos celulares incrementando el número de moléculas de adhesión sobre la superficie o alterando su afinidad-avidez. Las células pueden alterar los niveles de expresión de sus moléculas de adhesión por dos vías: reteniendo o almacenando un gran número de moléculas de adhesión en vesículas, que pueden ser dirigidas a la superficie

celular en minutos después de la activación celular; y sintetizando y transportando nuevas moléculas a la superficie en un proceso que normalmente ocurre en varias horas [38].

Hasta la fecha se han identificado un gran número de moléculas de adhesión (Ver Tabla 6), que se encuentran en proceso de investigación para definir su función precisa [38].

Familias de moléculas de adhesión

1. Las selectinas o moléculas de adhesión celular de lectinas (LECCAM) son moléculas transmembranales producidas principalmente por las células endoteliales al través de un estímulo de mediadores como la histamina y la trombina que son producidos en los tejidos dañados. Se han identificado tres tipos: L, E, y P. La L-selectina se expresa esencialmente sobre los neutrófilos, macrófagos y algunas poblaciones de linfocitos T. La P-selectina y la E-selectina, se expresan sólo en las células endoteliales activadas [22,38].
2. La superfamilia de las inmunoglobulinas o moléculas de adhesión intracelular incluyen al ICAM-1, 2, 3 y VCAM. Excepto el ICAM-3, todos los demás miembros de esta familia son expresados o inducidos sobre el endotelio vascular. El ICAM-3 es una glicoproteína encontrada exclusivamente sobre los linfocitos T, monocitos y neutrófilos [22,38].
3. Las integrinas comprenden el mayor grupo de las moléculas de adhesión; cada miembro consiste de dos polipéptidos unidos no covalentemente (α y β) y ambos atraviesan la membrana. Las β 1-integrinas están implicadas en la unión de las células a la matriz extracelular; las β 2-integrinas a la adhesión del leucocito al endotelio; y las β 3-integrinas (citoadhesinas) en las interacciones de las plaquetas y los neutrófilos en los sitios del daño o de la inflamación [22,38].

Tabla 6.- Moléculas de adhesión

Receptor	Familia	Distribución	Ligando
ICAM-1	Superfamilia Ig	Endotelio vascular, APCs.	VLA , LFA-1, MAC-1, CR3
ICAM-2	Superfamilia Ig	Endotelio vascular, APCs.	LFA-1
ICAM-3	Superfamilia Ig	Neutrófilos, linfocitos T, monocitos.	LFA-1, Mac-1
LFA-1 (CD11a/CD18) LEU-CAMs.	Integrinas	Leucocitos.	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
Mac-1, CR3 (CD11b/CD18)	Integrinas	Fagocitos mononucleares, neutrófilos, algunos linfocitos.	ICAM-1, C3b, C4b, iC3b, endotelio, fibrinógeno
gp 150-95 (CD11c/CD18) CR4	Integrinas	Granulocitos, monocitos.	ICAM-1, C3b, C4b, endotelio, iC3b, fibrinógeno
VLA-1 (CD49a)	Integrinas	Linfocitos T, fibroblastos.	Laminina, colágena
VLA-2 (CD49b)	Integrinas	Linfocitos T activados, plaquetas.	Cotágena, laminina
VLA-3 (CD49c)	Integrinas	Riñón, tiroides.	Fibronectina, laminina, colágena
VLA4 (CD49d/CD29)	Integrinas	La mayor parte de las células hematopoyéticas.	VCAM-1, fibronectina
VLA-5 (CD49e)	Integrinas	Algunos leucocitos, plaquetas.	Fibronectina
VLA-6 (CD49f)	Integrinas	Extensa distribución.	Laminina
VCAM	Superfamilia Ig	Superficie del endotelio activado por citocinas y por los linfocitos T unidos a él.	VLA-4

Tabla 6.- Moléculas de adhesión

Receptor	Familia	Distribución	Ligando
L-selectina (CD62P) LECAM-1	Selectinas LECCAM	Neutrófilos, monocitos, subpoblaciones de linfocitos.	Ligando de L-selectina
E-selectina (CD62E) ELAM-1	Selectinas LECCAM	Células endoteliales activadas por citocinas.	Ligando de E-selectina
P-selectina (CD62P) PADGEM	Selectinas LECCAM	Células endoteliales y plaquetas activadas por trombina. Células endoteliales activadas por citocinas.	Ligando de P-selectina

Ref. [22,32,38,39,40,]

4. Las adreínas vasculares, otro grupo de moléculas de adhesión, se expresan en las vénulas endoteliales altas (HEV) y también pueden inducir su expresión en los endotelios adyacentes a los sitios de inflamación crónica. Estas moléculas regulan el tránsito de los linfocitos en los tejidos linfoides secundarios y en los sitios de la inflamación [38].

2.8 Componentes humorales implicados en la quimiotaxis

Los factores quimiotácticos son ligandos de receptores de membrana de leucocitos, que inducen una respuesta quimiotáctica; esto es, un movimiento celular direccional en un gradiente dado. Sin embargo, estos factores no sólo actúan en la respuesta quimiotáctica, sino también en la actividad metabólica, generación de metabolitos del oxígeno, secreción, adhesión y otras funciones de los leucocitos [41].

Muchos de los factores quimiotácticos son moléculas derivadas del huésped que se producen ya sea directamente como resultado del daño al tejido, o indirectamente por la respuesta del huésped a ese daño. En general, los factores quimiotácticos son sustancias que indican la presencia de un daño más que la causa de ese daño [32].

Tanto los leucocitos polimorfonucleares como los macrófagos poseen, en su membrana, receptores para los factores quimiotácticos, estos se derivan de los productos metabólicos bacterianos, del sistema de la coagulación, del sistema de las cininas, de los productos metabólicos derivados del ácido araquidónico (Ver Fig.2), pero en forma especial del sistema del complemento [8,11,25] (Ver Fig 3 y Tabla 3).

Al activarse el sistema del complemento, ya sea por la vía clásica o por la vía alterna, se generan fragmentos pequeños que participan en la respuesta inflamatoria e inmunitaria, y fragmentos grandes que continúan la cascada del complemento. Las fracciones C5a, C3a

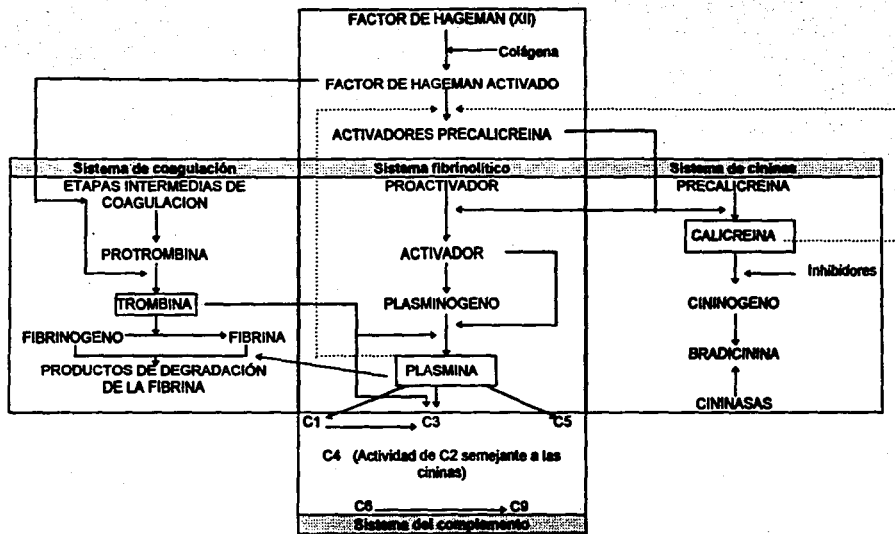


Figura 2.- Diagrama esquemático que muestra las múltiples relaciones entre los sistemas de coagulación, fibrinolítico, del complemento y de las cininas.

Ref [42]

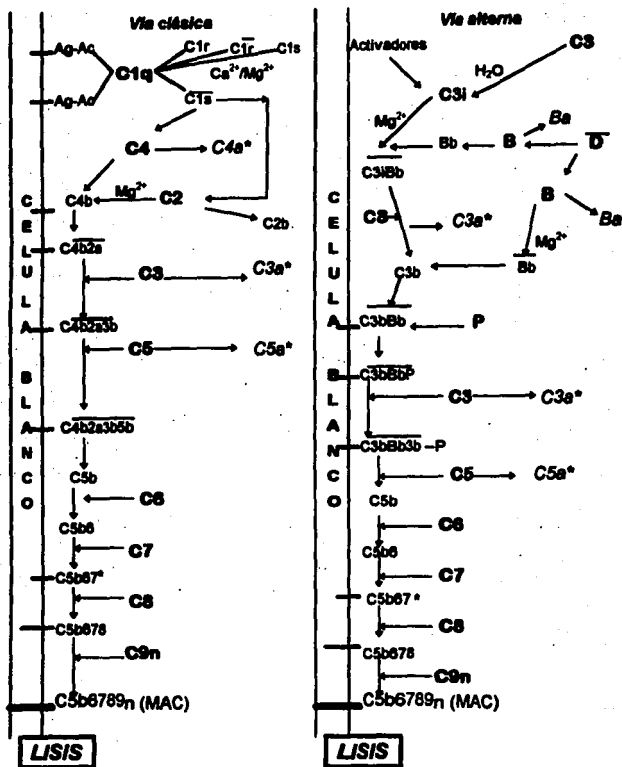


Figura 3.- Vías de activación del sistema del complemento

* = Fragmentos del sistema del complemento con actividad quimiotáctica

C3i = C3 H₂O

MAC = complejo de ataque a la membrana

(anafilatoxinas) y C5b67 son fragmentos con una actividad quimiotáctica importante [11,25] (Ver Fig 3 y Tabla 3).

Las anafilatoxinas producen contracción del músculo liso, y desgranulación de las células cebadas y de los basófilos con la consecuente liberación de histamina y de otras sustancias vasoactivas que inducen la infiltración capilar [43].

El ácido araquidónico está contenido entre los fosfolípidos de la membrana celular. Cuando se presenta un estímulo inmunológico, químico, hormonal o físico que desestabiliza la organización del ácido araquidónico, éste se libera por la acción directa de la fosfolipasa A2, o por la acción secuencial de la fosfolipasa C y de la diacilglicerolipasa; una vez liberado se metaboliza por las vías de la ciclooxigenasa o de la lipooxigenasa dando lugar a prostaglandinas y leucotrienos respectivamente [11,31] (Ver Fig.4 y Tabla 2).

Las prostaglandinas tienen una función importante en el control de la respuesta inmunológica regulando la producción de anticuerpos y de citocinas. En general, las prostaglandinas de clase E potencian la acción de otros mediadores de la inflamación, en tanto que las prostaglandinas de la clase F las antagonizan [33].

Los medicamentos esteroideos inhiben parcialmente la fosfolipasa, disminuyendo por lo tanto la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos inhiben la vía de la ciclooxigenasa directamente, disminuyendo la producción de prostaglandinas [33].

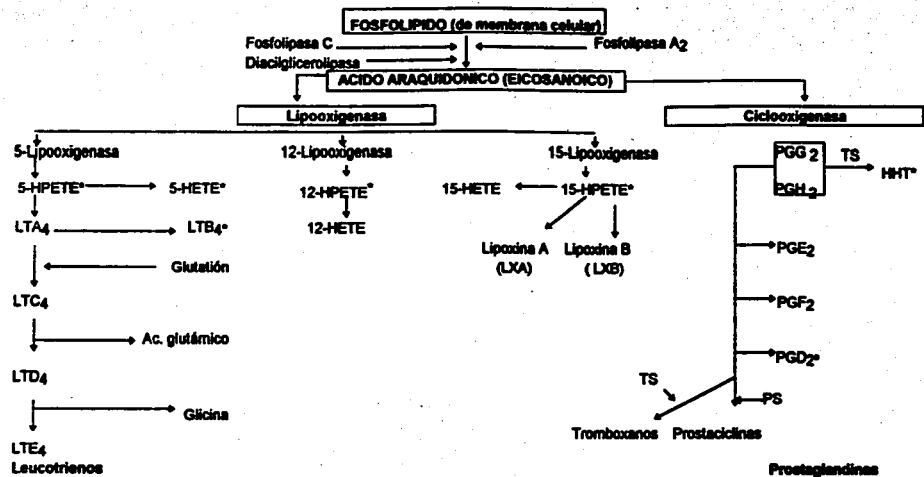


Figura 4.- Productos metabólicos del ácido araquidónico o eicosanoico

TS = Tromboxano sintetasa

HHT = Acido hidroxihexadecatrienoico

Ref. [11,13,23,31,33]

PS = Prostaciclina sintetasa

* = Productos del ácido araquidónico con actividad quimiotáctica

3. Mecanismo de la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares

En un organismo sano se encuentran factores quimiotácticos en concentraciones isotrópicas (invariables). Cuando en su recorrido se encuentran con una célula de la cual son ligandos, se unen a ella lo que da lugar a la polarización y a la redistribución de sus receptores, lo que permite un movimiento al azar o quimio-cinesis, sin dirección fija y con un cambio constante de orientación [44].

Cuando se presenta un daño tisular (trauma agudo, partículas extrañas, quemaduras térmicas o químicas, infecciones bacterianas, etc.), el tejido dañado o infectado libera factores quimiotácticos como: fragmentos de fibrina; colágena; factores solubles liberados por las plaquetas, células cebadas u otras células; y fragmentos derivados de la activación del sistema del complemento, etc. [32].

Los factores quimiotácticos se difunden radialmente desde el tejido dañado hasta el endotelio vascular cercano en donde pueden ser detectados por los leucocitos circulantes. Durante su trayecto, los factores quimiotácticos se encuentran con la población de fagocitos mononucleares residentes (en tejidos, órganos y cavidades serosas) induciendo su activación [32,44].

Al activarse, los fagocitos mononucleares secretan una gran variedad de sustancias con actividad quimiotáctica (Ver Tabla 5), que al liberarse a los tejidos circundantes incrementan la concentración de factores quimiotácticos y estimulan a otros tipos de células involucradas en la respuesta inmunológica [32].

Al aumentar la concentración de los factores quimiotácticos (concentración variable o anisotrópica), el desplazamiento de la célula fagocítica se hace unidireccional y su velocidad de

migración se incrementa de 4 a 5 veces, lo que implica un cambio de quimiotaxis a quimiotaxis [35].

El mecanismo de la quimiotaxis (Ver Fig.5) en las células fagocíticas comprende una serie de pasos, desde la activación, marginación, adherencia, y diapédesis hasta el reconocimiento de la partícula "blanco" para fagocitarla y finalmente, destruirla [45,46].

3.1 Activación, marginación, adherencia y diapédesis.

Las células fagocíticas poseen sobre su superficie, receptores para diferentes ligandos que llevan un mensaje específico. Al unirse el ligando al receptor, la célula es activada y sus receptores se redistribuyen hacia el frente de la célula, la membrana se hiperpolariza debido a una mayor entrada de calcio que queda disponible para ser utilizado en el proceso de locomoción, el sodio y el potasio se traslocan dando lugar a cambios en el potencial de la membrana. Durante la polarización, se forman ondas contráctiles que dan origen a la locomoción [11,13,44].

La movilidad de las moléculas dentro del citoplasma, la distribución de los receptores y los movimientos de traslación de la célula, cuando es libre o independiente, están condicionados por proteínas estructurales y contráctiles como: la tubulina, que al polimerizarse da lugar a la formación de microtúbulos; y la actina que al despolimerizarse origina la formación de microfibrillas. La interacción de los microtúbulos y de las microfibrillas inicia la formación de un pseudópodo que permite el desplazamiento de la célula en una dirección determinada [9,44,47].

Los neutrófilos en movimiento adoptan una morfología polarizada con un lamelipodio anterior que se extiende en la dirección del gradiente anisotrópico de factores quimiotácticos, el cuerpo celular que está elongado paralelamente al eje de la prominencia lamelar, y un urópodo. El lamelipodio, es una región achatada relativamente extensa que se encuentra en el sitio

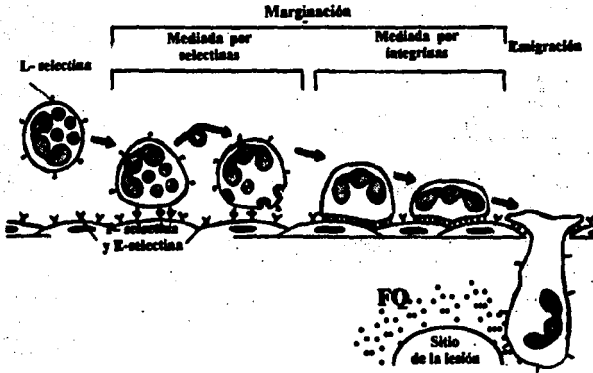


Figura 5.- Representación esquemática del mecanismo de la quimiotaxis

Marginación y emigración de los neutrófilos. Al contacto con el endotelio, la L-selectina es rápidamente expresada en la membrana del neutrófilo, y las integrinas presintetizadas (incluyendo Mac-1 y LFA-1) son transportadas del citoplasma a la superficie celular. Las integrinas median la unión del neutrófilo al endotelio, y facilitan la diapédesis hacia los tejidos adyacentes.

Ref. [32].

en donde la actina del citoesqueleto sufre alteraciones dinámicas, este sitio se considera como el frente de la célula e indica la primera unión del receptor al ligando [44,48].

El neutrófilo en movimiento tiene características morfológicas específicas: el borde conductor del pseudópodo está libre de gránulos, mientras que el borde rezagado o urópodo muestra delgadas fibrillas de retracción que se adhieren a las células endoteliales. El borde conductor del pseudópodo se llena de filamentos de actina que forman una fina capa submembranosa alrededor de la célula para luego aparecer como haces densos en el urópodo de la célula [31,44].

Los neutrófilos tienen sobre su membrana celular, fuertes cargas electronegativas que los mantienen separados entre sí. Los factores quimiotácticos antagonizan estas cargas y le permiten su marginación dentro de los vasos sanguíneos [9].

La marginación de los neutrófilos en las paredes de los vasos sanguíneos y su adherencia a las células endoteliales está mediada por un grupo de moléculas de adhesión que incluyen a las selectinas y a las integrinas [32,38].

La L-selectina se expresa esencialmente sobre los neutrófilos y su capacidad de unión a las células endoteliales parece incrementarse después de que han sido sometidos a un influjo de factores quimiotácticos [32].

Los neutrófilos al contacto con el endotelio expresan rápidamente sobre su superficie celular a las integrinas. Cada integrina se une estrechamente a una proteína particular, sobre la superficie de la célula endotelial (el Mac-1 y LFA se unen cada uno al ICAM-1). Esta fuerte unión mediada por las integrinas, induce la migración de los neutrófilos de la vena hacia el tejido adyacente [32].

Los neutrófilos ya en tejido viajan con movimiento ameboideo, sus integrinas interactúan con los componentes de la matriz extracelular (fibronectina, colágena, laminina), hacia el gradiente de factores quimiotácticos hasta que llegan al sitio del daño o infección [32].

3.2 Reconocimiento y fagocitosis

Una vez que la célula fagocítica llega al sitio en donde se encuentra la mayor concentración de factores quimiotácticos, debe identificar al agente invasor que va a ser fagocitado. Esta función se lleva al cabo por receptores que reconocen al agente invasor, a los anticuerpos adheridos a ellos o a los fragmentos C3b; a estos dos últimos se les conocen como opsoninas [33].

En el sitio de unión del neutrófilo con el agente invasor ("blanco"), se forma un pseudópodo que rodea al "blanco" dando lugar a una vesícula fagocítica o fagosoma que se desplaza hacia el interior de la célula hasta fundirse con los gránulos intracitoplásmicos que degradan al "blanco" por su acción enzimática [8].

4.0 Aspectos clínicos de las enfermedades de tipo alérgico

La alergia (hipersensibilidad Tipo I) se refiere a ciertas enfermedades en las cuales la respuesta inmunológica a diversos estímulos (alergenos) provoca inflamación tisular y mal funcionamiento orgánico. La frecuencia de las enfermedades alérgicas depende de las características del individuo, del alérgeno y hasta de las condiciones de la exposición [49].

Cuando un individuo atópico tiene una primera exposición a un alérgeno, se produce una "sensibilización" en la cual el individuo está asintomático. Si se produce una segunda exposición a ese mismo alérgeno, éste puede reaccionar con el anticuerpo específico o con el linfocito T efector sensibilizado, dando lugar a una respuesta inflamatoria que puede provocar un padecimiento localizado en la mucosa nasal, la mucosa bronquial, la piel, el aparato digestivo, o una combinación de dos o más de estos sitios [50].

La atopía se refiere a la predisposición hereditaria para responder inmunitariamente a diversos alérgenos que se encuentran en el medio ambiente, ya sea inhalados o ingeridos [40].

Las manifestaciones alérgicas a los alérgenos ambientales se deben en particular a las reacciones de hipersensibilidad, mediada por IgE, entre las que se encuentran: rinitis, urticaria, angioedema, asma y anafilaxis [50].

4.1 Urticaria y angioedema

La urticaria y el angioedema presentan manifestaciones clínicas de: edema localizado, cutáneo o subcutáneo; incremento en la permeabilidad vascular, vasculitis necrosante, vasculitis no necrosante, perivasculitis; y diversas reacciones inflamatorias en la piel. Se considera que la liberación de la histamina, así como de otros mediadores de la inflamación (en particular los leucotrienos), contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad [50,51].

La urticaria sólo afecta la porción superficial de la dermis, aparece en múltiples áreas, como placas edematosas bien delimitadas que son muy pruriginosas; blancas, rodeadas de eritema, o rojas que se tornan blancas a la presión [50,51].

El angioedema es un edema localizado y bien delimitado que afecta hasta las capas profundas de la dermis, incluyendo al tejido celular subcutáneo. Se presenta frecuentemente en labios, ojos, cara, extremidades y genitales externos [50,52].

Se ha demostrado que muchos casos de urticaria y angioedema son de origen alérgico. En estos casos la IgE, que está unida a las células cebadas cutáneas o subcutáneas, se une al alérgeno provocando una serie de eventos que conducen a la desgranulación de la célula con la consiguiente liberación de los mediadores de la inflamación como ocurre en la anafilaxis y en la atopía [50,51,53].

La Tabla 7 muestra la clasificación de urticaria-angioedema con los diferentes mecanismos que pueden causar la enfermedad [50,52].

4.2 Rinitis alérgica

La rinitis alérgica es la expresión clínica más frecuente de la hipersensibilidad atópica. La capacidad de los alérgenos para desencadenarla se atribuye al tamaño de los alérgenos (entre $10\mu\text{m}$ y $100\mu\text{m}$), y a su retención en el interior de las fosas nasales. No obstante, aunque el alérgeno penetre hasta las vías respiratorias inferiores, el hecho de que se desencadene una respuesta broncoconstrictora por la liberación de mediadores depende de que las vías respiratorias presenten una hiperirritabilidad crónica [50,53].

Los síntomas de la rinitis alérgica son: rinores profusa, estomudo paroxístico, obstrucción nasal, prurito de nariz y paladar; en general, existe una blefaroconjuntivitis alérgica concomitante, con prurito intenso de conjuntiva y párpados, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia; los síntomas aparecen en minutos y son ocasionados por los efectos de la liberación endógena de la histamina, leucotrienos y PGD_2 en la fase temprana de la respuesta alérgica. Los factores quimiotácticos producen un exudado inflamatorio, lo que conduce a una congestión persistente e hiperirritabilidad no específica del tejido, en la fase tardía de la respuesta alérgica [49,50].

El mecanismo desencadenante de la rinitis alérgica se atribuye a la interacción inicial entre el alérgeno y las células cebadas intraepiteliales, sensibilizadas con IgE específica. Las muestras de biopsia de la mucosa nasal durante una reacción alérgica, muestran edema submucoso importante con infiltración, en especial de eosinófilos, aunque también se observan algunos neutrófilos [50].

Tabla 7.- Clasificación de urticaria-angioedema

<p>I Mediada por la IgE</p> <p>a Diátesis atópica.</p> <p>b Sensibilidad antigénica específica (alimentos, fármacos, venenos de himenópteros, helmintos, pólenes, epitelios de animales, hongos).</p> <p>c Estímulos físicos: demografismo; frío; luz solar; estimulación colinérgica (estrés, calor o ejercicio vigoroso).</p>
<p>II Mediada por el complemento</p> <p>a Angioedema hereditario</p> <p>b Angioedema adquirido</p> <p>c Vasculitis</p> <p>d Enfermedad del suero</p> <p>e Reacciones a hemoderivados</p>
<p>III No inmunológica</p> <p>a Agentes desgranuladores de las células cebadas de acción directa: opiáceos (codeína, morfina), relajantes musculares (curare, d-tubocurárina), medios de contraste radiológicos, antibióticos.</p> <p>b Agentes que puedan alterar el metabolismo del ácido araquidónico (aspirina y antiinflamatorios no esteroideos; colorantes azoicos y benzoatos).</p>
<p>IV Idiopática (atípica)</p>

5.0 Hipótesis

¿Existe alguna diferencia entre la quimiotaxis y/o la quimioquinesis de leucocitos polimorfonucleares de pacientes con angioedema en fase aguda, angioedema-urticaria y rinitis alérgica, en relación con la quimiotaxis y la quimioquinesis de leucocitos polimorfonucleares de sujetos no alérgicos?

6.0 Objetivos

1. Estandarización del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" para la cuantificación de la diferencial quimiotáctica y del índice quimiotáctico de leucocitos polimorfonucleares .
2. Determinación del intervalo de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico de leucocitos polimorfonucleares en sujetos no alérgicos; y en pacientes con angioedema, angioedema-urticaria y rinitis alérgica.
3. Analizar si existe diferencia en la quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico entre los grupos estudiados y el grupo control.
4. Valorar la conveniencia de implementar este ensayo en el laboratorio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades del C.M.N.SXXI, para su uso de rutina.

7.0 Material y método

7.1 Protocolo clínico

Pacientes valorados en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades del C.M.N.SXXI, con diagnóstico de angioedema, urticaria, rinitis alérgica, y sujetos no atópicos.

Criterios de inclusión para el estudio en sujetos no atópicos:

Adultos entre 20 y 50 años de edad

Sexo femenino y masculino

Clínicamente sanos

Criterios de no inclusión para el estudio en sujetos no atópicos:

Antecedentes alérgicos

Tabaquismo

Alcoholismo

Haber estado sometido a ejercicio vigoroso

Estar en tratamiento con medicamentos

Criterios de inclusión para el estudio en pacientes alérgicos

Adultos entre 20 y 50 años de edad

Sexo femenino y masculino

Diagnóstico clínico de angioedema en fase aguda, angioedema-urticaria y rinitis alérgica

Criterios de no inclusión para el estudio en pacientes alérgicos:

Tabaquismo

Alcoholismo

Haber estado sometido a ejercicio vigoroso

Si el paciente se encuentra sometido a algún tratamiento con medicamentos, realizarlo 15 días después de haberlo suspendido.

7.2 Material biológico

7.2.1 Sangre total heparinizada de pacientes y de sujetos no atópicos para obtener leucocitos polimorfonucleares.

7.2.2 Mezcla de sueros de sujetos no atópicos (tipo O Rh positivo), como fuente de factores quimiofácticos.

7.3 Material y equipo

Centrífuga

Congelador a -40°C

Baño de agua

Estufa bacteriológica

Parrilla eléctrica

Tanque con aire más 5% de CO_2

Balanza analítica

Termómetro

Mechero Bunsen

Plantilla de acero inoxidable con perforaciones de 2.5 mm de diámetro separadas entre sí por espacios de 2.5 mm de diámetro.

Horador de acero inoxidable de 2.5mm de diámetro

Material de vidrio común en el laboratorio, estéril

Micropipetas

Placas Petri de vidrio de 15 X 50 mm, sin rayar y desengrasadas con alcohol absoluto

Microscopio invertido

Placa graduada con subdivisiones de 0.1 mm

Cámara de Neubauer

Potenciómetro

7.4 Ensayo quimiotáctico "bajo agarosa"

(Ver Figura 6)

Realizar el ensayo en condiciones de esterilidad

Preparación del suero activado con zimosan (ZAS)

1. Pesar 5 mg de zimosan (Nutritional Biochemical Corporation).
2. Lavar el zimosan con 5 ml de solución amortiguadora salina-fosfatos (PBS) pH 7.2 ± 0.05 , centrifugar a 500 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Eliminar el sobrenadante y agregar 5 ml de la mezcla de sueros (7.2.2), para conservar la relación peso:volumen de 1 mg de zimosan:1 ml de suero.
4. Incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Centrifugar a 500 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Separar cuidadosamente el sobrenadante e inactivarlo a 56°C por 30 minutos.
7. Preparar una dilución 1:2 de ZAS:PBS.
8. Conservar en alícuotas a -40°C . Utilizar este ZAS durante todo el estudio.

Preparación del medio de agarosa al 1%

1. A 0.94 g de agarosa (Bloxon de México) agregar 47 ml de agua destilada estéril precalentada, agitar y colocar en baño de agua hirviendo hasta su completa disolución.
2. Mezclar la solución de agarosa con un volumen igual de medio de cultivo RPMI 1640 2X suplementado [RPMI 1640 2X (Gibco), 4 mM/ml de L-glutamina (Gibco) y suero fetal bovino al 20% (Gibco)], precalentado a 56°C en baño de agua.
3. Sobre una superficie plana colocar las cajas Petri; depositar en cada una 7 ml del medio de agarosa al 1%. Permitir que el medio solidifique y dejar las placas a 4°C por una hora.

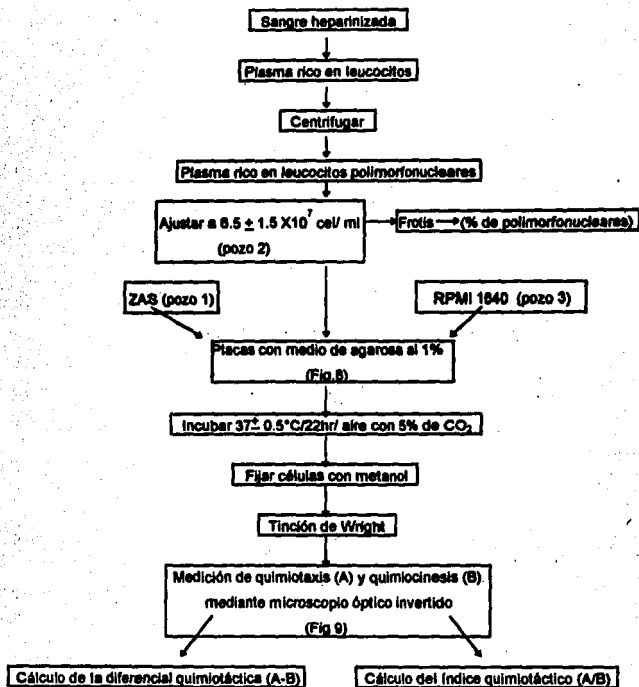


Figura 6.- Diagrama de flujo del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa"

4. Horadar 3 series de pozos, con 3 pozos cada una, según la Figura 7, utilizando la plantilla y el horador de acero inoxidable.

Obtención de leucocitos polimorfonucleares

1. Recolectar 20 ml de sangre heparinizada (50 U/ml de sangre).
2. Colocar la jeringa con la sangre en la estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos para que sedimenten los eritrocitos.
3. Separar el plasma y centrifugar a 500 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Lisar los eritrocitos con NH₄Cl 0.83% incubando a 37°C por 10 minutos en baño de agua.
5. Centrifugar a 100 g por 10 minutos a temperatura ambiente, para obtener el concentrado de leucocitos polimorfonucleares.
6. Lavar el paquete de leucocitos polimorfonucleares, dos veces con PBS pH 7.2 ± 0.05 centrifugando a 100 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Resuspender en RPMI 1640 1X suplementado [2 mM/ml de L-glutamina (Gibco) y suero fetal bovino (Gibco) al 10% pH final 7.0 ± 0.02].
8. Ajustar los leucocitos polimorfonucleares a una concentración de $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ cel/ml, contando las células al microscopio con cámara de Neubauer mediante la técnica de exclusión de colorante azul tripano (98 ± 1 % de viabilidad).
9. Hacer un frotis, tefir con colorante de Wright y determinar el % de leucocitos polimorfonucleares.

Prueba quimiotáctica "bajo agarosa"

La prueba se realiza por duplicado

1. Utilizar el patrón de distribución que se indica en la Figura 7. Colocar 10µl de ZAS en el pozo 1; 10µ de células en el pozo 2; y 10µl de RPMI 1640 1X en el pozo 3.
2. Incubar por 22 horas en la estufa bacteriológica a 37°C ± 0.5 con atmósfera de aire y 5% de CO₂ colocando las placas sobre una superficie nivelada.

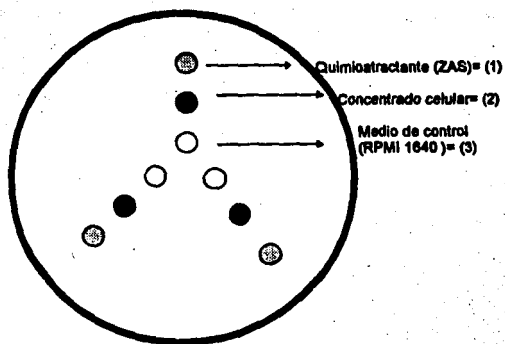


Figura 7.- Patrón de distribución de las series de pozos para el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa"

- 1 = Quimioattractante (ZAS)
- 2 = Concentrado celular de leucocitos polimorfonucleares
- 3 = Medio de control RPMI 1640

Ref. [8, 7]

3. Sacar las placas y dejarlas a temperatura ambiente por 15 minutos. Fijar las células a la caja Petri agregando 5 ml de alcohol metílico y dejar actuar por una hora.
4. Decantar el alcohol metílico y desprender cuidadosamente el agar.
5. Teñir la placa Petri con colorante de Wright.

Medición de los patrones de migración

Medir los patrones de migración como lo indica la Figura 8, utilizando un microscopio invertido (Invertoscop D Zeiss), y una placa graduada con subdivisiones de 0.1 mm.

Medir la distancia A: quimiotaxis con referencia al pozo del quimioattractante; y la distancia B: quimioquinesis con referencia al pozo del medio de control.

Cálculos para evaluar la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares

Diferencial quimiotáctica = Distancia de quimiotaxis - Distancia de quimioquinesis

$$A - B = \text{Distancia A} - \text{Distancia B}$$

Índice quimiotáctico = $\frac{\text{Distancia de quimiotaxis}}{\text{Distancia de quimioquinesis}}$

$$A/B = \frac{\text{Distancia A}}{\text{Distancia B}}$$

Ref. [5,6,7,54,55,56,57,58,59,60,61,62]

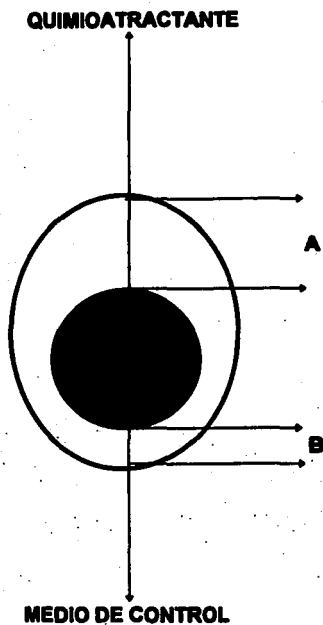


Figura 8.- Patrón de migración del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa"

A= Quimiotaxis o migración dirigida con referencia al pozo del quimioattractante (ZAS)

B = Quimioinesis o migración al azar con referencia hacia el pozo con medio de control (RPM: 1640)

Ref. [54]

8.0 Resultados

8.1 Estandarización del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa"

Para estandarizar el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" se determinaron las condiciones, en las que se observó el punto más alto de la diferencial quimiotáctica y del índice quimiotáctico, de los siguientes parámetros de referencia: concentración del suero activado con zimosan; concentrado de leucocitos polimorfonucleares y tiempo de incubación de las placas de agarosa.

8.1.1 Concentración del suero activado con zimosan

Se probaron los ZAS sin diluir y las diluciones 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20 de las relaciones peso:volumen de :

25 mg de zimosan : 1 ml de mezcla de sueros normales

12.5 mg de zimosan : 1 ml de mezcla de sueros normales

1 mg de zimosan : 1ml de mezcla de sueros normales

Las diluciones fueron realizadas a partir del sobrenadante de la suspensión de zimosan:mezcla de sueros, de cada relación peso:volumen señalada.

El punto más alto de la diferencial quimiotáctica y del índice quimiotáctico corresponde a la dilución 1:2 de la relación 1 mg de zimosan : 1 ml de mezcla de sueros normales, respectivamente (Ver Fig .9 y 10).

8.1.2 Concentrado de leucocitos polimorfonucleares

Se probaron los concentrados celulares de $5 \pm 1.5 \times 10^7$, $8 \pm 1.5 \times 10^7$ y $10 \pm 1.5 \times 10^7$ leucocitos polimorfonucleares por ml.

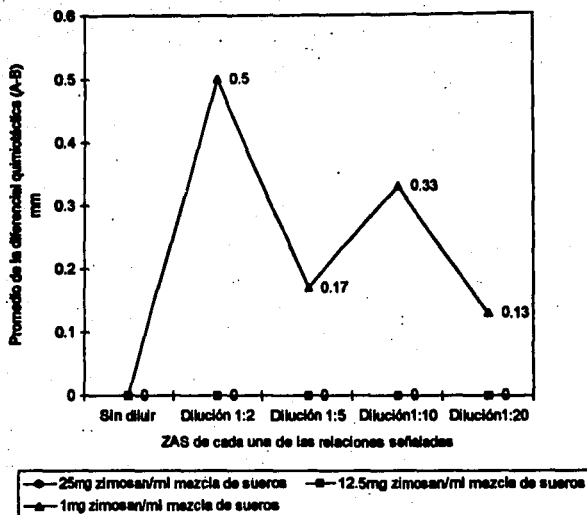


Figura 9.- Representación gráfica de la diferencial quimiotáctica para estandarizar la concentración del suero activado con zimosan

Promedio de los valores obtenidos, por duplicado, de la diferencial quimiotáctica de tres sujetos no atópicos para cada concentración de ZAS, realizadas a partir del sobrenadante de la suspensión zimosan:mezcla de sueros en el ensayo quimiotáctico bajo agarosa*. Se utilizaron $5.0 \pm 1.0 \times 10^5$ PMNL/pozo, 18 horas de incubación a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 con base en reportes previos [6,54,62].

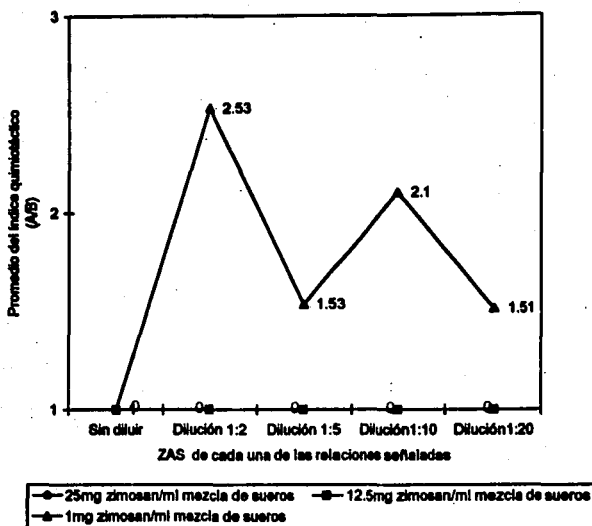


Figura 10.- Representación gráfica del índice quimiotáctico para estandarizar la concentración del suero activado con zimosan

Promedio de los valores obtenidos, por duplicado, del índice quimiotáctico de tres sujetos atópicos para cada concentración de ZAS, realizadas a partir del sobrenadante de la suspensión zimosan:mezcla de sueros en el ensayo quimiotáctico bajo agarosa. Se utilizaron $5.0 \pm 1.5 \times 10^5$ PMNL/pozo, 18 horas de incubación a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 con base en reportes previos [6,54,62].

El punto elegido de la diferencial quimiotáctica y del índice quimiotáctico corresponde al promedio de los concentrados $5 \pm 1.5 \times 10^7$ y $6 \pm 1.5 \times 10^7$ células/ml que es igual a $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ células/ml. (Ver Fig. 11 y 12).

8.1.3 Tiempo de incubación

Se probaron los tiempos de incubación de: 18 horas, 22 horas y 24 horas, manteniendo constante la temperatura de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 .

El punto más alto de la diferencial quimiotáctica y del índice quimiotáctico corresponde al tiempo de incubación de 22 horas (Ver Fig. 13 y 14).

8.2 Valores promedio de quimiotaxis, quimiocinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico, obtenidos en los ensayos quimiotácticos.

Por medio del ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" se cuantificó la quimiotaxis y la quimiocinesis de leucocitos polimorfonucleares, en respuesta al quimioattractante ZAS (dilución 1:2 a partir de una relación 1 ml de zimosan : 1 ml mezcla de sueros normales), el concentrado celular fue de $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ células /ml; y el tiempo de incubación de 22 horas, a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 . Se mantuvieron constantes estos parámetros durante todo el estudio.

Se realizó el análisis estadístico utilizando la prueba de Análisis de Variancia y se corroboró con la Prueba de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey [83,64].

8.2.1 Sujetos no atópicos

Se cuantificó la quimiotaxis y la quimiocinesis de leucocitos polimorfonucleares de quince sujetos no atópicos (94.53 ± 3.34 % de PMNL en el concentrado celular). Se calcularon las medias \pm desviación estándar de:

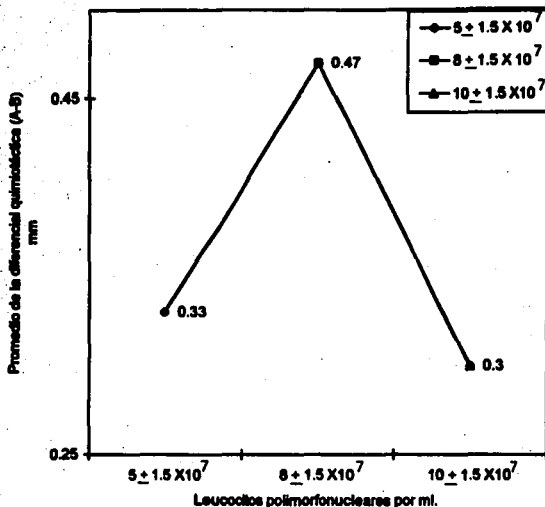


Figura 11.- Representación gráfica de la diferencial quimiotáctica para estandarizar el concentrado de leucocitos polimorfonucleares

Promedio de los valores obtenidos, realizados por duplicado, de la diferencial quimiotáctica de tres sujetos no atópicos para cada concentración celular en el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa".

Se utilizó la dilución 1:2 de la relación 1mg de zimosen : 1 ml mezcla de sueros con 18 horas de incubación a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 [0,54,62].

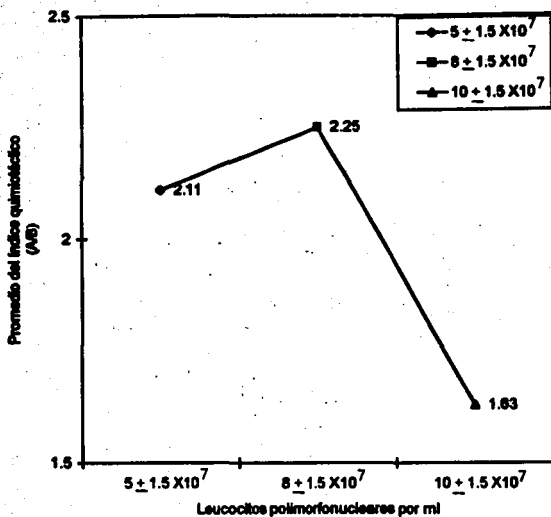


Figura 12.- Representación gráfica del índice quimiotáctico para estandarizar el concentrado de leucocitos polimorfonucleares

Promedio de los valores obtenidos, realizados por duplicado, del índice quimiotáctico de tres sujetos no atópicos para cada concentración celular en el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa".

Se utilizó la dilución 1:2 de la relación 1mg de zimosan : 1 ml mezcla de sueros con 18 horas de incubación a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 [6,54,62].

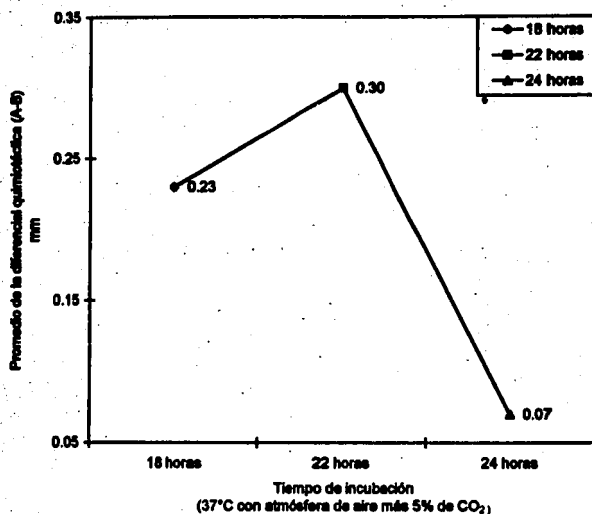


Figura 13.- Representación gráfica de la diferencial quimiotáctica para estandarizar el tiempo de incubación de las placas de agarosa

Promedio de los valores obtenidos, por duplicado, de la diferencial quimiotáctica de tres sujetos no alérgicos para cada tiempo de incubación en el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa"; la temperatura se mantuvo constante a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 .

Se utilizó la dilución 1:2 de la relación 1 mg de zimosan : 1 ml mezcla de sueros y un concentrado celular de $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ PMNL/ml.

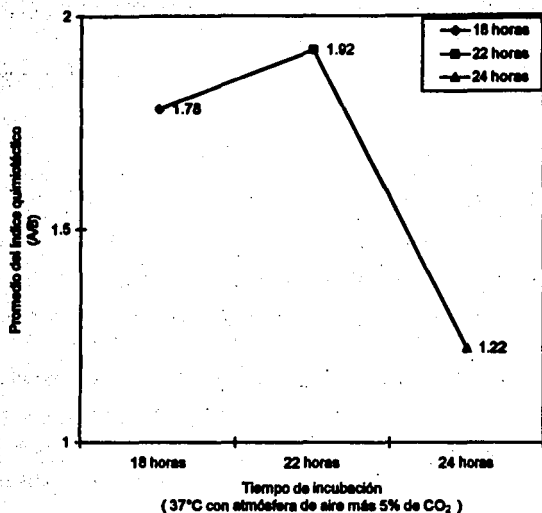


Figura 14.- Representación gráfica del índice quimiotáctico para estandarizar el tiempo de incubación de las placas de agarosa

Promedio de los valores obtenidos, por duplicado, del índice quimiotáctico de tres sujetos no atópicos para cada tiempo de incubación en el ensayo quimiotáctico bajo agarosa; la temperatura se mantuvo constante a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 .

Se utilizó la dilución 1:2 de la relación 1 mg de zimosan : 1 ml mezcla de sueros y un concentrado celular de $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ PMNL/ml.

Quimiotaxis (A) = 1.31 ± 0.46 mm con un intervalo de 0.7 a 2.0 mm (Ver Fig. 15, Tabla 8 y 9).

Quimiocinesis (B) = 0.75 ± 0.42 mm con un intervalo de 0.2 a 1.3 mm (Ver Fig. 16, Tabla 8 y 9).

Diferencial quimiotáctica (A-B) = 0.56 ± 0.16 mm con un intervalo de 0.3 a 0.9 mm (Ver Fig. 17, Tabla 8 y 9).

Índice quimiotáctico (A/B) = 2.11 ± 0.86 mm con un intervalo de 1.3 a 4.0 mm (Ver Fig. 18, Tabla 8 y 9).

8.2.2 Pacientes adultos con angioedema en fase aguda

Se cuantificó la quimiotaxis y la quimiocinesis de leucocitos polimorfonucleares de seis pacientes con angioedema en fase aguda (91.67 ± 3.44 % de PMNL en el concentrado celular).

Se calcularon las medias \pm desviación estandar de:

Quimiotaxis (A) = 0.7 ± 0.25 mm con un intervalo de 0.4 a 1.0 mm. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del grupo estudiado en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 15, Tabla 9 y 10).

Quimiocinesis (B) = 0.55 ± 0.26 mm con un intervalo de 0.2 a 0.9 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 16, Tabla 9 y 10).

Diferencial quimiotáctica (A-B) = 0.15 ± 0.06 mm con un intervalo de 0.1 a 0.2 mm. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 17, Tabla 9 y 10).

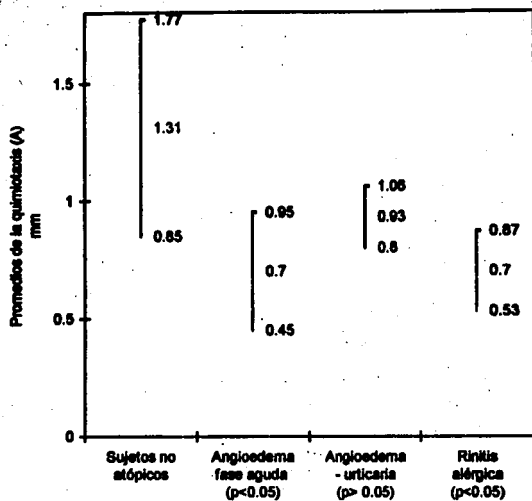


Figura 15.- Representación gráfica de los promedios de la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares entre los diferentes grupos estudiados

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Análisis de Variancia y se confirmó con la Prueba de Tukey, entre cada uno de los grupos estudiados con respecto al grupo de sujetos no atópicos.

Tabla 8.- Resultados de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico obtenidos en sujetos no atópicos

No.	A mm	B mm	A-B mm	A/B
1	1.6	1.2	0.4	1.3
2	1.8	1.0	0.8	1.8
3	1.7	0.8	0.9	2.1
4	2.0	1.3	0.7	1.5
5	1.0	0.5	0.5	2.0
6	0.8	0.2	0.6	4.0
7	0.7	0.3	0.4	2.3
8	1.0	0.5	0.5	2.0
9	0.7	0.3	0.4	2.3
10	0.8	0.2	0.6	4.0
11	1.0	0.4	0.6	2.5
12	1.5	1.2	0.3	1.3
13	1.5	1.0	0.5	1.5
14	1.8	1.2	0.6	1.5
15	1.7	1.1	0.6	1.5
\bar{x}	1.36	0.75	0.59	2.11
DE	0.48	0.42	0.16	0.66

Sujetos no atópicos

A = Quimiotaxis

B = Quimioquinesis

A-B = Diferencial quimiotáctica

A/B = Índice quimiotáctico

\bar{x} = Promedio

DE = Desviación estandar

Tabla 9.- Análisis comparativo de promedios obtenidos de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico entre los diferentes grupos estudiados.

Grupo	Intervalo de A	Intervalo de B	Intervalo de A-B	Intervalo de A/B
Sujetos no atópicos n= 15	0.7 a 2.0 mm	0.2 a 1.3 mm	0.3 a 0.9 mm	1.3 a 4.0 mm
	media +DE	media +DE	media +DE	media +DE
	1.31 + 0.46 mm	0.75 + 0.42 mm	0.56 + 0.16 mm	2.11 + 0.86 mm

Grupo	Intervalo de A	Intervalo de B	Intervalo de A-B	Intervalo de A/B
Angioedema n= 6	0.4 a 1.0 mm	0.2 a 0.9 mm	0.1 a 0.2 mm	1.1 a 2.0 mm
	media +DE	media +DE	media +DE	media +DE
	0.7 + 0.25 mm	0.55 + 0.26 mm	0.15 + 0.06 mm	1.38 + 0.32 mm

Grupo	Intervalo de A	Intervalo de B	Intervalo de A-B	Intervalo de A/B
Angioedema -urticaria n=4	0.8 a 1.1 mm	0.4 a 0.7 mm	0.3 a 0.4 mm	1.5 a 2.0 mm
	media +DE	media +DE	media +DE	media +DE
	0.93 + 0.13 mm	0.58 + 0.13 mm	0.35 + 0.06 mm	1.65 + 0.24 mm

Grupo	Intervalo de A	Intervalo de B	Intervalo de A-B	Intervalo de A/B
Rinitis alérgica n= 6	0.5 a 0.9 mm	0.2 a 0.6 mm	0.3 a 0.5 mm	1.5 a 2.5 mm
	media +DE	media +DE	media +DE	media +DE
	0.7 + 0.17 mm	0.37 + 0.14 mm	0.33 + 0.08 mm	2.0 + 0.35 mm

A = Quimiotaxis B = Quimioquinesis A-B = Diferencial quimiotáctica A/B = Índice quimiotáctico DE = Desviación estandar

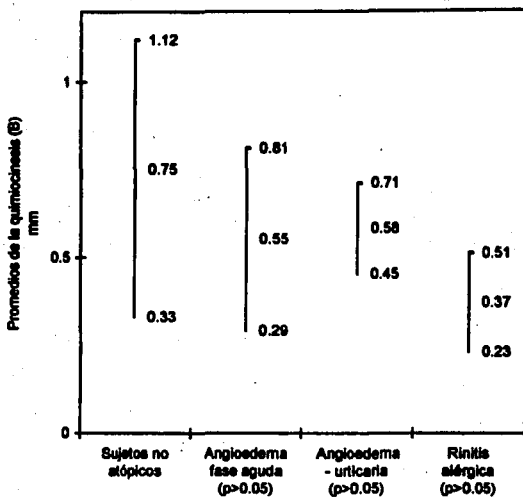


Figura 16.- Representación gráfica de los promedios de la quimioquinesis de leucocitos polimorfonucleares entre los grupos estudiados

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Análisis de Variancia y se confirmó con la Prueba de Tukey, entre cada uno de los grupos estudiados con respecto al grupo de sujetos no atópicos.

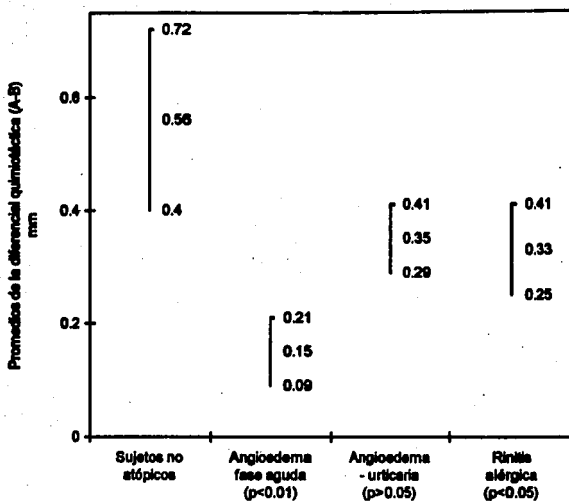


Figura 17.- Representación gráfica de los promedios de la diferencial quimiotáctica entre los diferentes grupos estudiados

El análisis estadístico se realizó utilizando la Prueba de Análisis de Variancia y se confirmó con la Prueba de Tukey, entre cada uno de los grupos estudiados con respecto al grupo de sujetos no atópicos.

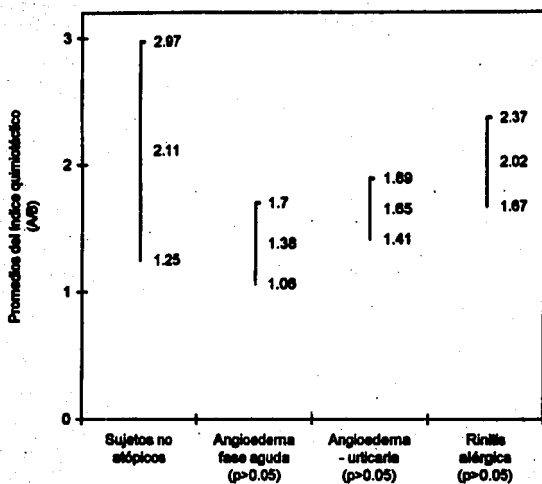


Figura 18.- Representación gráfica de los promedios del índice quimiotáctico entre los diferentes grupos estudiados

El análisis estadístico se realizó utilizando la Prueba de Análisis de Variancia y se confirmó con la Prueba de Tukey, entre cada uno de los grupos estudiados con respecto al grupo de sujetos no atópicos.

Tabla 10.- Resultados de quimiotaxis, quimioquinesis, diferencial quimiotáctica e índice quimiotáctico obtenidos en pacientes con angioedema, angioedema-urticaria y rinitis alérgica.

No.	A mm	B mm	A-B mm	A/B
1	0.7	0.5	0.2	1.4
2	1.0	0.8	0.2	1.3
3	0.4	0.2	0.2	2.0
4	0.8	0.5	0.1	1.2
5	0.5	0.4	0.1	1.3
6	1.0	0.9	0.1	1.1
\bar{x}	0.7	0.58	0.18	1.36
DE	0.26	0.26	0.06	0.32

Angioedema

No.	A mm	B mm	A-B mm	A/B
1	0.9	0.4	0.5	2.3
2	0.8	0.3	0.3	2.0
3	0.5	0.2	0.3	2.5
4	0.7	0.4	0.3	1.8
5	0.8	0.3	0.3	2.0
6	0.9	0.6	0.3	1.5
\bar{x}	0.7	0.37	0.33	2.0
DE	0.17	0.14	0.08	0.38

Rinitis alérgica

No.	A mm	B mm	A-B mm	A/B
1	0.9	0.6	0.3	1.5
2	1.1	0.7	0.4	1.6
3	0.8	0.4	0.4	2.0
4	0.9	0.6	0.3	1.5
\bar{x}	0.93	0.58	0.35	1.65
DE	0.13	0.13	0.06	0.24

Angioedema-urticaria

A = Quimiotaxis

B = Quimioquinesis

A-B = Diferencial quimiotáctica

A/B = Índice quimiotáctico

 \bar{x} = Promedio

DE = Desviación estándar

Indice quimiotáctico (A/B) = 1.38 ± 0.32 mm con un intervalo de 1.1 a 2.0 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 16, Tabla 9 y 10).

8.2.3 Pacientes adultos con angioedema-urticaria

Se cuantificó la quimiotaxis y la quimiocinesis de leucocitos polimorfonucleares de cuatro pacientes con angioedema-urticaria (91.25 ± 5.38 % de PMNL en el concentrado celular). Se calcularon las medias \pm desviación estandar de:

Quimiotaxis (A) = 0.93 ± 0.13 mm con un intervalo de 0.6 a 1.1 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 15, Tabla 9 y 10).

Quimiocinesis (B) = 0.58 ± 0.13 mm con un intervalo de 0.4 a 0.7 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 16, Tabla 9 y 10).

Diferencial quimiotáctica (A-B) = 0.35 ± 0.06 mm con un intervalo de 0.3 a 0.4 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 17, Tabla 9 y 10).

Indice quimiotáctico (A/B) = 1.38 ± 0.32 mm con un intervalo de 1.1 a 2.0 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 18, Tabla 9 y 10).

8.2.4 Pacientes adultos con rinitis alérgica

Se cuantificó la quimiotaxis y la quimiocinesis de leucocitos polimorfonucleares de seis pacientes con rinitis alérgica (91.30 ± 4.59 % de PMNL en el concentrado celular). Se calcularon las medias \pm desviación estándar de:

Quimiotaxis (A) = 0.7 ± 0.17 mm con un intervalo de 0.5 a 0.9 mm. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 15, Tabla 9 y 10).

Quimiocinesis (B) = 0.37 ± 0.14 mm con un intervalo de 0.2 a 0.6 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 16, Tabla 9 y 10).

Diferencial quimiotáctica (A-B) = 0.33 ± 0.08 mm con un intervalo de 0.3 a 0.5 mm. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Ver Fig. 17, Tabla 9 y 10).

Índice quimiotáctico (A/B) = 2.0 ± 0.35 mm con un intervalo de 1.5 a 2.5 mm. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos (Fig. 18, Tabla 9 y 10).

9.0 Discusión

El mecanismo de la quimiotaxis ha sido estudiado desde 1888 [1] hasta la fecha, al través de una variedad de métodos que han sido modificados por los autores que han estudiado la locomoción celular. Sin embargo, ninguno de los métodos utilizados está libre de limitaciones [6,7,62].

De los resultados obtenidos en este trabajo al compararlos con los estudios de la bibliografía revisada se hacen las siguientes observaciones :

Los estudios sobre la eficiencia de la polarización de los neutrófilos con diferentes concentraciones de fMLP sugieren que: a bajas concentraciones ($<10^{-8}M$) sólo algunas células polarizan bien; cuando las concentraciones se elevan a un nivel óptimo ($10^{-8}M$) la proporción de las células que polarizan bien se eleva a casi un 100%; y que a concentraciones supraóptimas ($10^{-6}M$) las células polarizan pobremente; lo que sugiere que a concentraciones subóptimas y óptimas de factores quimiotácticos las células pueden distinguir la primera unión ligando-receptor de las uniones subsecuentes; y que cuando la concentración del ligando es supraóptima, los ligandos ocupan simultáneamente muchos receptores sobre la superficie celular siendo la célula incapaz de redistribuir sus receptores y mostrar una clara polarización [44].

En la Fig.9 se mostró la curva de dosis-respuesta, obtenida en este estudio, de los leucocitos polimorfonucleares con diferentes gradientes de ZAS en donde la dilución 1:2 de 1 mg de zimosan: 1 ml mezcla de sueros, es la concentración cercana a la óptima; ya que es en la que se observó la mayor diferencial quimiotáctica. Las relaciones 25 y 12.5 mg de zimosan : 1 ml mezcla de sueros, correspondieron a concentraciones supraóptimas ya que dieron una diferencial quimiotáctica igual a cero. La concentración óptima encontrada de ZAS corresponde a la señalada por Schaack [62.]

Si se realizaran estudios similares se deberán probar las diluciones intermedias, entre el ZAS sin diluir y la dilución 1:10 de la relación 1 mg de zimosan : 1 ml mezcla de sueros, con el objeto de encontrar una concentración más adecuada de ZAS.

En estudios previos se ha establecido que la densidad celular es una variable importante para que se lleve al cabo la migración *in vitro* [54,62]. En la Fig. 11 se mostró que la densidad óptima correspondió a $8 \pm 1.5 \times 10^7$ PMNL/ml ya que fue en la que se obtuvo la mayor diferencial quimiotáctica. Sin embargo, se eligió el promedio entre las dos primeras densidades estudiadas, que fue de $6 \pm 1.5 \times 10^7$ PMNL/ml, por la dificultad de obtener una mayor concentración celular con la cantidad de sangre tomada a los pacientes adultos bajo estudio.

En estudios previos se ha señalado que la migración de leucocitos polimorfonucleares es viable entre las 2 y 18 horas de incubación [6,54]. Si se incrementa este tiempo, el movimiento celular presenta un retroceso debido probablemente a un cambio en su orientación, ya que el pozo hacia el cual migran, contiene poca concentración de ZAS el cual se ha difundido totalmente bajo el agar al cabo de varias horas. Sin embargo, en el presente estudio el tiempo de incubación en el que se observó la mayor diferencial quimiotáctica fue de 22 horas (Fig.13). Recomendamos para estudios subsecuentes, utilizar tiempos de incubación entre 18 y 22 horas para precisar el tiempo óptimo de incubación.

En este estudio, el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" permitió cuantificar la quimiotaxis y la quimioquinesis de leucocitos polimorfonucleares de pacientes alérgicos con angioedema en fase aguda, angioedema-urticaria y rinitis alérgica contra el suero activado con zimosan. La activación del suero humano con zimosan desencadena la cascada del sistema del complemento por la vía alterna generando los siguientes fragmentos solubles o anafilatoxinas: C3a, C4a y C5a. Este último fragmento se considera como el principal factor quimiotáctico, debido a su elevada actividad como quimioatrayente [54,57]. Sin embargo, se podría valorar la

respuesta quimiotáctica con diferentes quimioattractantes, así como estudiar diferentes poblaciones celulares incluso en forma simultánea [54].

Los resultados que se obtuvieron en el grupo de pacientes con angioedema en fase aguda (Ver Tabla 9), formado sólo por mujeres, mostraron: quimiotaxis disminuida ($p < 0.05$ Ver Fig. 15); quimioquinesis normal ($p > 0.05$ Ver Fig. 16); diferencial quimiotáctica disminuida ($p < 0.01$ Ver Fig. 17); e índice quimiotáctico normal ($p > 0.05$ Ver Fig. 18) en comparación con el grupo de sujetos no atópicos. Lo que indica la diferencial quimiotáctica es una quimiotaxis real, ya que se elimina matemáticamente la quimioquinesis, mientras que el índice quimiotáctico indica cuantas veces es mayor la quimiotaxis en relación con la quimioquinesis.

Una posible explicación "in vivo" para la disminución de la quimiotaxis observada en los pacientes con angioedema en fase aguda, es que al encontrarse una concentración elevada y generalizada de factores quimiotácticos (gradientes supraóptimos), las células polarizan pobremente dando una respuesta quimiotáctica deficiente [44]; debido a que en el angioedema alérgico se presenta una reacción sistémica con elevada liberación de histamina y producción de leucotrienos que inducen vasodilatación aguda, incremento en la permeabilidad capilar, extravasación de líquidos y una importante producción de factores quimiotácticos derivados de los sistemas y de las células implicadas en la respuesta inmunológica [50, 51, 52]. Sin embargo, en el estudio "in vitro" el gradiente del quimioattractante fue controlado, lo que podría sugerir que la concentración de factores quimiotácticos no es la única causa de la disminución de la quimiotaxis, sino que podría haber un defecto a nivel del citoesqueleto, quizás por una deficiente polimerización o despolimerización de la actina y la tubulina que podría originar la formación defectuosa de pseudópodos disminuyendo así la locomoción celular [44].

Los resultados que se obtuvieron en el grupo de pacientes con angioedema-urticaria (Ver Tabla 9), formado por 3 mujeres y 1 hombre, mostraron: quimiotaxis normal ($p > 0.05$ Ver Fig. 15);

quimioquinesis normal ($p > 0.05$ Ver Fig.16); diferencial quimiotáctica normal ($p > 0.05$ Ver Fig.17); e índice quimiotáctico normal ($p > 0.05$ Ver Fig. 18); al compararlos con el grupo de sujetos no atópicos. Estos datos indican que, en el sistema de agarosa, la respuesta quimiotáctica se presenta sin alteraciones.

Los resultados que se obtuvieron en el grupo de pacientes con rinitis alérgica (Ver Tabla 9), formado por 4 mujeres y 2 hombres, mostraron: quimiotaxis disminuida ($p < 0.05$ Ver Fig.15); quimioquinesis normal ($p > 0.05$ Ver Fig.16); diferencial quimiotáctica disminuida ($p > 0.05$ Ver Fig.17); e índice quimiotáctico normal ($p > 0.05$ Ver Fig.18); al compararlos con el grupo de sujetos no atópicos

En el caso de la rinitis alérgica, se observó una quimioquinesis disminuida. Una posible explicación sería que los leucocitos polimorfonucleares no son adecuadamente activados dando lugar a una pobre respuesta quimioquínética, lo que conduce a una quimiotaxis deficiente. Para aseverar la anterior suposición, se recomienda aumentar el tamaño de la muestra para su confirmación o rechazo ya que la diferencia encontrada no es estadísticamente significativa con respecto al grupo de sujetos no atópicos; y no hay referencias bibliográficas que respalden la suposición.

Para determinar la normalidad de los valores de la quimiotaxis y de la quimioquinesis en la población mexicana deberá calcularse un tamaño de muestra que sea representativa de ésta. El estudio no es concluyente, en virtud de que la muestra estudiada fue pequeña y sólo se realizó un estudio transversal. Sin embargo, se observaron deficiencias significativas en dos de los tres grupos estudiados, lo que sugiere que el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" permite determinar alteraciones en la respuesta quimiotáctica, siendo un ensayo reproducible si se controla: la concentración del quimioattractante, la densidad celular, el tiempo de incubación y

otras variables (distancia y diámetro de los pozos, forma de lectura de las migraciones) que puedan afectar la confiabilidad de los resultados [6,7,54,57,62].

Para determinar un posible valor diagnóstico que pueda apoyar y ampliar el criterio del alérgico en el manejo del paciente alérgico, se deberá realizar un estudio longitudinal y comparar el ensayo "bajo agarosa" con una técnica de referencia. Sería conveniente contar con datos sobre la cuenta total de leucocitos y la cuenta diferencial (fórmula blanca) para conocer con mayor exactitud las poblaciones absolutas con las que se trabaja.

El ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" puede introducirse a las pruebas de rutina de un laboratorio convencional, ya que no necesita de equipo o material sofisticado, es rápido, reproducible y económico. La determinación de la quimiotaxis puede ser útil como apoyo diagnóstico de otras enfermedades en las que se ha reportado una quimiotaxis anormal como en el angioedema hereditario, en la periodontitis juvenil y en los síndromes: de Chediak-Higashi, del leucocito perezoso, de Job, de Hiper-IgE, entre otros [50,51,52].

10.0 Conclusiones

1. Las condiciones óptimas determinadas para el ensayo quimiotáctico "bajo agarosa" fueron : una dilución 1:2 del quimioatrayente (ZAS) a partir de una suspensión inicial de 1 mg de zimosan : 1 ml mezcla de sueros ; un concentrado celular de leucocitos polimorfonucleares de $6.5 \pm 1.5 \times 10^7$ células / ml; y un tiempo de incubación de 22 horas a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con atmósfera de aire más 5% de CO_2 .
2. El grupo de pacientes con angioedema en fase aguda presentó una quimiotaxis disminuida, estadísticamente significativa con respecto al grupo de sujetos no atópicos, lo cual concuerda con el resultado disminuido de la diferencial quimiotáctica ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente).
3. El grupo de pacientes con rinitis alérgica presentó una quimiotaxis disminuida, estadísticamente significativa con respecto al grupo de sujetos no atópicos, lo cual concuerda con el resultado disminuido de la diferencial quimiotáctica ($p < 0.05$ y $p < 0.05$ respectivamente). Se detecta una quimioquinesis que tiende a estar disminuida, pero no es estadísticamente significativa con respecto al grupo de sujetos no atópicos ($p > 0.05$).
4. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de sujetos no atópicos y el grupo de pacientes con angioedema-urticaria ($p > 0.05$).
5. Como estudio preliminar, se considera que el ensayo quimiotáctico es económico, de fácil realización, con una diferencia aparente entre los grupos estudiados a pesar del pequeño tamaño de la muestra estudiada, por lo que se recomienda hacer estudios más profundos para su aceptación definitiva.

11.0 Bibliografía

1. Wilkinson, P. C., The history of the study of chemotaxis leucocytes, "in" *Chemotaxis and Inflammation*, Wilkinson P.C. Churchill Livingstone, Edinburg and London, 1974; 22-32.
2. Boyden, S.V., The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes, *J. Exp. Med.* 1962; 115; 453-466.
3. Wilkinson, P.C., Principles of the measurement of leukocyte chemotaxis using Boyden's method, "in" *Chemotaxis and Inflammation*, Wilkinson P.C. Churchill Livingstone, Edinburg and London, 1974; 33-53.
4. Gellin, J.I., Chromium-51 radioimmunoassay for chemotaxis, "in" *Methods in Enzymology*, 162, Immunochemical Techniques, Part. L; Chemotaxis and Inflammation, Di Sabato Giovanni, Academic Press, INC. USA; 1988; 59.
5. Cutler, J.E., A simple in vitro method for studies on chemotaxis(38367), *Proc. Soc. Exp. Biol. med.* 1974; 147; 471-474.
6. Nelson, R.D., Quie, P.G., and Simmons, R.L., Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *J. Immunol.* 1975; 115; 6; Dec; 1650-1656.
7. Nelson, R.D., Fiegel, V.D., and Simmons, R.L., Chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils under agarose: morphologic changes associated with the chemotactic response, *J. Immunol.* 1976; 117; 5; Part 1; Nov; 1676-1683.
8. Broide, D.H., *Inflammatory Cells: Structure & Function*, "in" *Basic and Clinical Immunology*, 7th ed., Stites, D.P., Terr, A.I., Appleton & Lange, USA, 1991; 141-153.
9. Rojas, W., *Generalidades Sobre Inmunología*, "En" *Inmunología*, 9ª ed., Rojas, W., Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia, 1993; 1-9.
10. Stevens, R.L., Biochemical characteristics distinguish subclasses of mammalian mast cells, "in" *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity*, Befus, A.D., Bienenstock, J., Denburg, J.A., Raven Press, 1986; 183-203.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

69

11. Wasserman, S.I., Mediators of Inflammation, "In" Basic and Clinical Immunology, 7th ed., Ssites, D.P., Terr, A.I., Appleton & Lange, 1991; 154-160.
12. Terr, A.I., Inflammation, 1n° Basic and Clinical Immunology, 8th ed., Ssites, D.P., Terr, A.I., Appleton & Lange, USA, 1994; 137-150.
13. Escobar, G.A., Moléculas de la inflamación, "En" Bioquímica e inmunología, 1° ed., Hicks, J.J., Díaz Z.J.C., Facultad de Medicina UNAM, México, Vol. II, 1988; 505-523.
14. Oppenheim, J.J., Ruscetti, F.W., & Faltynek, C., Cytokines, "In" Basic and Clinical Immunology, 7th ed., Ssites, D.P., Terr, A.I., Appleton & Lange, 1991; 78-100.
15. Santos, A.L., Moléculas mediadoras de la respuesta inmune celular, "En" Bioquímica e inmunología, 1° ed., Hicks, J.J., Díaz Z.J.C., Facultad de Medicina UNAM, México, Vol. II, 1988; 493-504.
16. Oppenheim, J.J.; Ruscetti, F.W.; & Connie Faltynek, Cytokines, 1n° Basic & Clinical Immunology, 8th ed, Ssites D.P.; Terr, A.I., Parslow, T.G., Appleton & Lange, USA, 1994; 105-123.
17. Willems, J., Joniau, M., Cinque, S., & Damme, J.V., Human granulocyte chemotactic peptide (IL-8) as a specific neutrophil degranulator: comparison with other monokines, Immunol, 1989; 67; 540-542.
18. Cerami, A., Inflammatory Cytokines, Clin. Immunol. Immunopathology, 1992; 62; 1; Jan; 83-810.
19. Nabe, M., Miyagawa, H., Agrawal, D.K., Sugiyama, H., Townley, R.G., The effect of ketotifen on eosinophils as measured at LTC₄ release and by chemotaxis, Allergy. Proc; 1991; Jul-Aug; 12(4); 267-272.
20. Gay, J.C., Priming of neutrophil oxidative responses by platelet-activating factor, J. Lipid Mediat., 1990; 2 Suppl; S161-S175.
21. Weiler, P.F., Eosinophils: Structure and functions, Current Opinion in Immunology, 1994; 6;85-90.

22. Rojas, W., Moléculas y sistemas moduladores de la respuesta inmune, "En" *Inmunología*, 8ª ed., Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia, 1993; 142-154.
23. Voet, D., Voet, J.G., Lipid Metabolism, "In" *Biochemistry*, Voet, J. and Voet, J.G., John Wiley & Sons, USA, 1990; 618-677.
24. Rott, I., Brostoff, J., Male, D., Complement, "In" *Immunology*, 2nd ed., Rott, I., Brostoff, J., Male, D., The C.V. Mosby Company, Gower Medical Publishing, USA; 1989; 13.1-13.6.
25. Frank, M.M. and Louis F. Fries, The role of complement in inflammation and phagocytosis, *Immunol. Today*; 1991; Vol. 12; 9; 322-326.
26. Kinoshita, T., Biology of complement: the overture, *Immunol. Today*, 1991; 12; 9; 291-295.
27. Cooper, N.R., Complement evasion strategies of microorganisms, *Immunol. Today*; 1991; Vol. 12; 327-331.
28. Zimmerli, W., Reber, A.M., and Dahinden C.A., The Role of Formylpeptide Receptors, C5a Receptors, and Cytosolic-Free Calcium in Neutrophil Priming, *J., Infect. Dis.*, 1990; 161; 242-249.
29. Rott, I., Brostoff, J., Male, D., Complement, "In" *Immunology*, 3rd ed., Rott, I., Brostoff, J., Male, D., Editorial Consultant Mosby, USA; 1993; 12.0-12.17.
30. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., The Complement System, "In" *Cellular and molecular immunology*, 2nd ed, Edit. W.B. Saunders Company, USA, 1994; 293-316,
31. Rojas, W., Inflamación, "En" *Inmunología*, 8ª ed., Rojas, W., Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, 1990; 60-65.
32. Parslow Tristram G. The Phagocytes: Neutrophils & Macrophages, "In" *Basic & Clinical Immunology*, 6th ed, SITES, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G., Appleton & Lange, USA, 1994; 9-21.
33. Rojas, W., Inflamación, "En" *Inmunología*, 8ª ed., Rojas, W., Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia, 1993; 40-58.

34. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., *Adaptative and Innate Immunity*, "in" *Immunology*, 2nd ed., Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., The C.V. Mosby Company, Gower Medical Publishing, USA; 1989; 1.1.
35. Rojas, W.; *Fagocitosis*, "En" *Inmunología*, 9ª ed., Rojas, W., Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia, 1993; 17-39
36. Lanier, Lewis., *Cells of the Immune Response: Lymphocytes & Mononuclear Phagocytes*, "in" *Basic and Clinical Immunology*, 7th ed., Stites, D.P., Terr, A.I., Appleton & Lange, 1991; 61-71.
37. Lydyard, P. and Grasi C., *Cells involved in Immune Responses*, "in" *Immunology*, 3rd ed., Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., Editorial Consultant Mosby, USA; 1993; 2.0-2.20.
38. Male, D., *Cell Migration and Inflammation*, "in" *Immunology*, 3rd ed., Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., Editorial Consultant Mosby, USA; 1993; 13.1-13.8.
39. Albedis, S.M. and Buck, C.A.; *Integrins and other cell adhesion molecules*, *FASEB J.* 4; 1990; 2868-2880.
40. Hogg, N., Roll, roll, roll, your leucocyte gently down the vein, *Immunology Today*, 13; 4; 1992; 113-115.
41. Wilkinson, P.C., *Chemotactic factor: an overview*, "in" *Methods in Enzymology*, 162, *Immunochemical Techniques, Part.L Chemotaxis and Inflammation*, Di Sabato Giovanni, Academic Press, INC. USA; 1988; 127-132.
42. Wells, J.V., *Daño tisular mediado por anticuerpos. mecanismos Inmunitarios de daño tisular*. "En" *Inmunología Básica y Clínica*, 5ª ed., Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V., Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., 1985; 145
43. Frank, M.M., *Complement & Kinin*, "in" *Basic & Clinical Immunology*, 8th ed., Stites D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G., Appleton & Lange, USA, 1994; 124-136.
44. Wilkinson P.C., and Wendy S. Haston. *Chemotaxis: an overview*, "in" *Methods in Enzymology*, 162, *Immunochemical Techniques, Part.L; Chemotaxis and Inflammation*, Di Sabato Giovanni, Academic Press, INC. USA; 1988; 3-16.

45. Martínez, R.D., Mecanismos microbicidas de los leucocitos "En" Bioquímica e Inmunología, 1ª ed., Hicks, J.J., Díaz Z.J.C., Facultad de Medicina UNAM, México, Vol. II, 1988; 399-406.
46. Werb, Z. Macrófagos. Células Fagocíticas: Funciones quimiotácticas y efectoras de los macrófagos y los granulocitos, "En" Inmunología Básica y Clínica, 5ª ed., Sites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V., Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., 1985; 103-118.
47. Rojas, W., Generalidades sobre inmunología, "En" Inmunología, 8ª ed., Rojas, W., Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, 1990; 1-18.
48. Downey, G.P., Mechanisms of leucocyte motility and chemotaxis. *Current Opinion in Immunology*, 1994; 6: 113-124.
49. Terr, A.I., Las enfermedades atópicas, "En" Inmunología básica y clínica, 7ª ed., Sites, D.P., Terr, A.I., El Manual Moderno, 1993; 441-484
50. Harrison, Isselebeche, Braunwald, Wilson, Enfermedades por hipersensibilidad de tipo inmediato, "En" Principios de Medicina Interna, 13ª ed., McGraw-Hill, 1994; 1648-1853.
51. Terr, A.I., Anafilaxia y Urticaria, "En" Inmunología básica y clínica, 7ª ed., Sites, D.P., Terr, A.I., El Manual Moderno, 1993; 465-476.
52. Finerman, S.M. Urticaria and angioedema in Manual of Allergy Immunology, 2nd ed, Lawlor, G.J., Fischer, T.J., Little, Brown and Company, USA, 1988; 214-224.
53. Rojas, W., Alergia, "En" Inmunología, 9ª ed., Rojas, W., Corporación para Investigaciones Biológicas, Colombia, 1993; 258-276.
54. Nelson, R.D., and Michael J. Heron, Agarose method for human neutrophil chemotaxis. "In" *Methods in Enzymology*, 162, Immunochemical Techniques, Part.L Chemotaxis and Inflammation, Di Sabato Giovanni, Academic Press, INC. USA; 1988; 50-58
55. Griffin, E., Hakansson, L., Formgren, H., Jörgensen, K., and P. Venge, Increased chemokinetic and chemotactic response of eosinophils in asthmatic patients. *Allergy*, 46; 1991; 255-265.

56. Samberger, D.M., Hemdon, B.L., Bettin, K.M., and Dale N. Garding, Neutrophil chemotaxis and adherence in vitro and localization in vivo in rabbits with *Staphylococcus aureus* abscesses, *J. Lab. Clin. Med.* August; 2: 1969; 135-141.
57. Ward, P.A., and Eufonio G. Maderazo. Quimiotaxis leucocitaria. "En" *El Laboratorio en Immunología Clínica*, Rose and Friedman, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 1984; 281-296.
58. Fukushima K., Ando M., Ito K., Suga M., Araki, S., Stimulus and cumulative dose depend inhibition of O_2^+ production by polymorphonuclear leukocytes of patients receiving corticosteroids. *J. Clin. Lab. Immunol*; 1990; Nov; 33(3); 117-123.
59. Lanfrenberger, D.A., Tranquillo, R.T. and Zigmund, S.H., Concentration gradients of chemotactic factors in chemotaxis, "in" *Methods in Enzymology*, 162, Immunochemical Techniques, Part.L Chemotaxis and Inflammation, Di Sabato Giovanni, Academic Press, INC. USA; 1988; 85-100.
60. Maderazo, E.G., Woronick, C.L. and Ward, P.A., Inhibitors of chemotaxis, "in" *Methods in Enzymology*, 162, Immunochemical Techniques, Part.L; Chemotaxis and Inflammation, Di Sabato Giovanni, Academic Press, INC. USA; 1988; 223-235.
61. Neelson, R.D., McCormack, R.T., and Fiigel, V.D., Chemotaxis of human leukocytes under agarose, "in" *Leukocyte Chemotaxis*, Gallin, J.I., Quie, P.G., USA. 1978; 25-42.
62. Schaack, I.M. and Persellin, R.H., Chemotaxis under agarose: dependence upon polymorphonuclear leukocyte density, *J. Immunol. Met.*, 1981; 47; 359-364.
63. Daniel, W.W., *Bioestadística*, 1^a ed., Editorial Limusa; México, 1987; 283-354.
64. Dawson Saunders, B., Trapp, R.G., *Bioestadística médica; El Manual Moderno*, México 1963; 143-163.