



**FUNCIÓN DE LOS POLIMORFONUCLEARES EN
LA CIRROSIS HEPÁTICA**



ARCHIVO

TESIS DOCTORAL

M. CRISTINA GARFIA CASTILLO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. J.A. Solís Herruzo, director de esta tesis, sin cuyo apoyo, conocimientos, orientaciones y consejos no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A B. Fernández, I. Hernández, M.P. de la Torre, y J.A. Sánchez Alcázar, del Centro de Investigación del Hospital 12 de Octubre, por su inestimable ayuda, enseñanzas y compartir conmigo su visión científica en el campo de la investigación.

Mi recuerdo y agradecimiento a todas las personas del Servicio de Medicina de Aparato Digestivo del Hospital 12 de Octubre, por su apoyo, comprensión y estímulos continuos durante todos estos años.

A mi familia

ABREVIATURAS

A: Agonistas

A23187: Ionóforo de calcio A23187

DG: Diacilglicerol

FAI: Fluoruro de aluminio

FC: Factores citosólicos

FMLP: N-formil-metionil-fenilalanina

FNa: Fluoruro sódico

G: Proteína G

Ins3P: Inositol tri-fosfato

O₂⁻: anión superóxido

PA: Ácido fosfatídico

PAF: Factor activador de las plaquetas

PKA: Protein-cinasa-A

PKC: Protein-cinasa-C

PLA2: Fosfolipasa A2

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PMA: Acetato de miristato-forbol

SMM: Sistema monocítico-macrofágico

SOD: Superóxido dismutasa

TNF: Factor de necrosis tumoral

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

ÍNDICE

	Página
-INTRODUCCIÓN	1
-Factores predisponentes de infección en la cirrosis hepática	3
-Factores yatrogénicos	3
-Alteraciones de la barrera intestinal	3
-Depresión de la actividad del sistema monocítico- macrofágico	5
-Alteraciones de la inmunidad humoral	7
-Alteraciones de la inmunidad celular	9
-Disfunción de los neutrófilos	10
-Leucocitos polimorfonucleares o neutrófilos	11
-Aspectos ultraestructurales y citológicos	11
-Aspectos funcionales	14
-Quimiotaxis	14
-Fagocitosis	15
-Degranulación	16
-Explosión respiratoria	17
-Receptores	20
-Proteína G	25
-Fosfolipasas	33
-Calcio	42
-Protein-cinasas	44
-NADPH oxidasa	49

-OBJETIVOS	53
-PACIENTES Y MÉTODOS	54
-Pacientes	54
-Métodos	62
A. Aislamiento de neutrófilos	62
B. Número y tipo de experimentos	63
C. Preparación y opsonización del zimosan	65
D. Medida de la producción del anión superóxido	66
E. Reactivos	67
F. Método estadístico	68
-RESULTADOS	69
I. Estimulación a nivel de receptor	69
A. Respuesta a los estímulos utilizados	69
B. Correlación clínica	73
II. Estimulación a nivel de la Proteína G	82
A. Estímulos utilizados	82
B. Correlación clínica	86
III. Estimulación a nivel de los canales del calcio	98
A. Respuesta a los estímulos utilizados	98
B. Correlación clínica	99
IV. Estimulación a nivel de la protein-cinasa C (PKC)	104
A. Respuesta a los estímulos utilizados	104
B. Correlación clínica	105

-DISCUSIÓN	110
-CONCLUSIONES	134
-RESUMEN	136
-BIBLIOGRAFÍA	138

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con cirrosis hepática presentan con frecuencia complicaciones derivadas de la hipertensión portal, tales como ascitis, encefalopatía o hemorragia digestiva, y de la insuficiencia hepatocelular. Las infecciones bacterianas constituyen también una complicación frecuente y grave de la cirrosis hepática (1).

En diversos estudios, se ha observado que del 30% al 50% de todos los pacientes cirróticos presentan infecciones bacterianas en el momento de su ingreso o desarrollan este tipo de complicación durante su estancia hospitalaria (2-4). Esta incidencia es muy superior a la hallada en la población hospitalaria general, la cual se sitúa en torno al 10% (5). El elevado riesgo de infecciones bacterianas en pacientes con cirrosis hepática parece estar relacionado con la gravedad de la hepatopatía subyacente y es consecuencia de un estado de inmunodeficiencia multifactorial (6,7) a la que nos referiremos más tarde.

Una gran parte de las infecciones bacterianas que presentan los pacientes cirróticos son de adquisición intrahospitalaria (8). Además, la

mortalidad hospitalaria es más elevada en los cirróticos que desarrollan infecciones bacterianas, de forma que estas son la causa inmediata de muerte en el 7% de los pacientes con cirrosis hepática (9). Incluso algunos estudios han mostrado que las infecciones que aparecen precozmente durante el ingreso de estos pacientes (en los primeros siete días) pueden influir negativamente sobre la superación de otras complicaciones. Por ejemplo, pueden constituir un factor de riesgo para el resangrado por varices esofagogástricas (9).

Las infecciones urinarias, las peritonitis bacterianas espontáneas, las infecciones respiratorias, las bacteriemias, e incluso la asociación de varias de ellas son las complicaciones infecciosas observadas más frecuentemente en los pacientes cirróticos (4,10).

FACTORES PREDISPONENTES DE INFECCIÓN EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

La elevada incidencia de complicaciones infecciosas en los enfermos cirróticos puede atribuirse a la existencia de alteraciones de los mecanismos defensivos frente a las infecciones. Entre estos destacan factores yatrogénicos, trastornos de la barrera intestinal, disminución en la actividad del sistema monocítico-macrofágico, alteraciones en la inmunidad humoral y celular, y trastornos funcionales de los neutrófilos (11,12).

FACTORES YATROGÉNICOS

Además de procedimientos bien conocidos que predisponen a la infección, como son los catéteres intravenosos o las sondas uretrales, los pacientes cirróticos son sometidos a menudo a otras maniobras diagnósticas o terapéuticas (esclerosis de varices gastroesofágicas, taponamiento esofágico, cirugía, derivaciones peritoneo venosas..) que pueden alterar las barreras defensivas naturales y aumentar el riesgo de invasión bacteriana (11,13).

ALTERACIONES DE LA BARRERA INTESTINAL

Las bacterias gramnegativas normalmente presentes, aunque en número reducido, en el intestino delgado de los individuos sanos son los

agentes que se aislan con más frecuencia en las infecciones bacterianas de los pacientes con cirrosis hepática. Se ha observado que estos microorganismos están significativamente aumentados en la flora intestinal yeyunal de muchos cirróticos (14). Las alteraciones de la flora intestinal de los cirróticos provocadas por la colonización anómala del intestino delgado por gérmenes aumentan las probabilidades de que bacterias gram negativas aerobias invadan el torrente circulatorio y causen infecciones de origen entérico. Por ello, se ha sugerido que el intestino pueda ser la principal fuente de esas bacterias. Sin embargo, hasta ahora, solamente se ha documentado el paso directo de bacterias desde la luz intestinal al líquido ascítico cuando la mucosa intestinal había perdido su integridad. Recientemente, en un modelo experimental de ratas cirróticas con ascitis, se ha demostrado una elevada frecuencia de traslocación bacteriana desde el tracto gastrointestinal a los nódulos linfáticos mesentéricos (15,16). Es interesante reseñar que en este estudio los cultivos de los nódulos linfáticos mesentéricos fueron positivos en todas las ratas cirróticas con peritonitis bacteriana espontánea o bacteriascitis, lo que sugiere que la traslocación bacteriana es un paso importante en la patogénesis de las infecciones asociadas a la cirrosis hepática. Si las bacterias son capaces de sobrevivir en los nódulos linfáticos, por un fracaso de estos para eliminarlas, las bacterias podrán pasar también a la sangre y producir bacteriemia espontánea, o directamente al líquido ascítico produciendo bacteriascitis.

Por otra parte, el riesgo de infección por microorganismos

intestinales se encuentra frecuentemente aumentado por la intervención de diversos factores, que frecuentemente concurren en los pacientes cirróticos. Entre ellos figura la hipovolemia aguda o la administración de fármacos vasoconstrictores esplácnicos. Estos disminuyen la capacidad defensiva de la barrera intestinal, al descender la perfusión sanguínea de la mucosa intestinal (17- 19). Además, la mucosa intestinal de los cirróticos parece ser más permeable a las bacterias, lo que conlleva que sea frecuente en ellos la diseminación bacteriana extraintestinal (20).

DEPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA MONOCÍTICO-MACROFÁGICO

Aunque el sistema monocítico-macrofágico (SMM o sistema retículo-endotelial, SRE) está ampliamente distribuido por todo el organismo, aproximadamente el 90% de él se encuentra en el hígado, representado por las células de Kupffer y las endoteliales sinusoidales (21- 23). La especial localización intravascular de las células del SMM, en particular en el hígado, confiere a este sistema las condiciones idóneas para eliminar microorganismos circulantes por el torrente sanguíneo.

.

Diversos grupos de autores han demostrado que los pacientes cirróticos presentan con frecuencia una depresión de la función del SMM, en especial de la fracción del SMM correspondiente al hígado (24 - 27).

No está clara la patogenia de la depresión de la actividad fagocitaria del SMM en la cirrosis, pero se han propuesto diversos mecanismos para explicarla. La mayoría de los estudios sugieren que estaría provocada por una derivación intrahepática de la sangre, que escaparía así a la acción fagocitaria de las células del SMM de los sinusoides. De acuerdo con esta teoría, una fracción de flujo sanguíneo hepático circularía a través de las derivaciones intrahepáticas, anatómicas o funcionales, y no estaría disponible para su intercambio con los tejidos (28,29).

También pudieran estar implicados otros mecanismos:

1°. Algunos investigadores han observado que en la cirrosis hepática existe una disminución de la capacidad fagocitaria de los monocitos circulantes, precursores de las células de Kupffer, lo que indicaría que existe un defecto intrínseco en las células del SMM de estos pacientes (30,31).

2°. En la mayoría de los enfermos cirróticos se ha observado una notable disminución de la actividad opsonica sérica, probablemente como consecuencia de una disminución de la concentración sérica de complemento y de fibronectina. Estas sustancias normalmente facilitan la fagocitosis de los microorganismos al intensificar su capacidad de adhesión a la superficie de las células del SMM (32 - 34).

3°. Gómez et al (25) observaron, en un estudio in vivo, una alteración de los receptores de los macrófagos esplénicos de pacientes con cirrosis alcohólica. Esta alteración parece guardar paralelismo con el grado de insuficiencia hepática

y con el desarrollo de infecciones, pero no con el alcoholismo, la malnutrición, las alteraciones del flujo sanguíneo esplácnico, la esplenomegalia, la presencia de inmunocomplejos circulantes o con el haplotipo HLA. Sin embargo, estos mismos autores, en un estudio in vitro con monocitos de la sangre periférica de pacientes con cirrosis alcohólica, observaron una menor unión de estos a eritrocitos cubiertos de inmunoglobulinas, pero sin diferencias estadísticamente significativas. La aparente discrepancia de los resultados in vivo e in vitro se atribuyó a la existencia de receptores diferentes en los monocitos de la sangre periférica y en los macrófagos tisulares.

4°. Por último, los pacientes cirróticos presentan además otros factores tales como alcoholismo, malnutrición, o hipovolemia aguda, o son sometidos a intervenciones quirúrgicas que podrían exacerbar la disfunción preexistente del SMM (35,36).

ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD HUMORAL

Los enfermos cirróticos muestran habitualmente una inmunidad humoral específica que es normal o está aumentada. La mayoría de los estudios muestran que existen títulos elevados de anticuerpos frente a diversos microorganismos, especialmente contra bacterias de origen entérico, o incluso, frente a productos de la dieta (37 - 40).

Por otra parte, hay pruebas que demuestran que en la cirrosis

hepática existe una depresión de la inmunidad humoral inespecífica. En la mayoría de los pacientes cirróticos se observa una disminución de la actividad bactericida y opsonica del suero y un descenso de los niveles séricos del complemento y fibronectina (41,42).

La actividad opsonica del líquido ascítico de los cirróticos se ha relacionado directamente con la concentración de sustancias defensivas tales como las inmunoglobulinas, el complemento, la fibronectina, la concentración de proteínas totales en el líquido ascítico (43). Diversos investigadores han observado que la concentración de proteínas totales en el líquido ascítico se correlaciona significativamente con el riesgo de peritonitis bacteriana espontánea en los pacientes cirróticos con ascitis (44). Runyon et al (45) demostraron que los enfermos con una concentración proteica en el líquido ascítico inferior a 1 g/dl desarrollan peritonitis durante su estancia hospitalaria con una frecuencia significativamente más elevada que la de los pacientes con un contenido proteico mayor en la ascitis (15 frente al 2%, respectivamente).

No se conoce el por qué de la variación de las propiedades antimicrobianas, la concentración de las sustancias defensivas y el contenido proteico total del líquido ascítico de los pacientes cirróticos. No obstante, diversos autores han sugerido que todos estos cambios pudieran estar en relación con: a) los niveles séricos de las sustancias relacionadas con los mecanismos antibacterianos del líquido ascítico (46,47), b) el grado de hipertensión portal y

de insuficiencia hepática (48), y c) el volumen de agua en el que se diluyen los solutos del líquido ascítico (49).

Además, en pacientes con cirrosis descompensada e infecciones se han observado niveles séricos elevados persistentemente de interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF) en comparación con sujetos no cirróticos (50). Esta elevación se ha atribuido a un aumento de su secreción por parte de las células monomacrofágicas tras su estímulo y una disminución de su catabolismo por el hígado cirrótico, ya que estas citocinas son metabolizadas principalmente por los hepatocitos tras la unión a sus receptores (51).

ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD CELULAR

Existen numerosos estudios, "in vitro" e "in vivo", que han demostrado que la mayoría de los cirróticos presentan una depresión de la inmunidad celular (52 - 54). Tanto la activación y proliferación de los linfocitos T incubados con diferentes productos inmunoestimulantes, como la respuesta a la inyección intradérmica de antígenos (hipersensibilidad retardada) se encuentran notablemente disminuidas en la mayoría de los cirróticos descompensados (55).

Aunque el mecanismo preciso de la inmunoincompetencia en

la cirrosis no está claro, diversos autores han descrito una íntima relación entre la alteración de la inmunidad celular y la malnutrición de los pacientes cirróticos (56 - 60). Otros autores han observado otras anomalías del sistema inmune, tales como un aumento en la activación de las células T y disminución de las células B en pacientes con cirrosis hepática alcohólica, pero esos cambios han sido atribuidos a un efecto directo del alcohol o de sus metabolitos (61,62).

DISFUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS

Una proporción elevada de enfermos cirróticos muestra alteraciones de la función de los neutrófilos que se sitúa a diferentes niveles. La alteración más frecuente es la que se refiere a la disminución de la quimiotaxis (63).

En algunos estudios se han intentado justificar las alteraciones de los neutrófilos por la existencia en el suero de sustancias antagonistas o inhibidores de la función de esas células (64,65). La naturaleza de estas sustancias inhibidoras no se ha determinado todavía.

Por otra parte, la capacidad fagocitaria y bactericida de los neutrófilos está disminuida en muchos pacientes cirróticos (66), lo que se ha considerado que juega un papel significativo en la susceptibilidad que estos pacientes tienen para las infecciones.

A continuación, describiremos las características morfológicas y funcionales de los leucocitos polimorfonucleares o neutrófilos.

LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES O

NEUTRÓFILOS

ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES Y CITOLÓGICOS

El neutrófilo muestra, al microscopio electrónico de transmisión, uno o varios segmentos nucleares, un citoplasma repleto de orgánulos y la membrana citoplasmática. En el núcleo predomina la heterocromatina y no existen nucleolos. La membrana citoplasmática ofrece una estructura clásica trilaminar, con dos capas fosfolipídicas densas y otra proteica intermedia más clara. En la superficie externa existe una capa de mucopolisacáridos, donde asientan los diversos receptores que participan en la fase de reconocimiento con la que se inicia la fagocitosis (67).

Desde el punto de vista funcional, merecen una descripción más detallada los componentes citoplásmicos:

-*Gránulos*: contienen las sustancias destinadas a conseguir la degradación microbiana. Atendiendo a su morfología y contenido, se distinguen dos tipos

principales:

a) Granulación azurófila primaria: constituye una tercera parte de los gránulos y contienen mieloperoxidasa, fosfatasa ácida y otras hidrolasas ácidas, proteínas catiónicas antibacterianas, mucosustancias ácidas, y lisozima.

b) Granulación específica o secundaria: constituye las dos terceras partes de la granulación y carece de mieloperoxidasa e hidrolasas ácidas. Contiene lactoferrina, colagenasa, lisozima y, tal vez, fosfatasa alcalina.

Aunque la diferenciación entre ambos tipos de granulación es eminentemente morfológica (los azurófilos son más electrodensos), es más precisa si se demuestra citoquímicamente de actividad peroxidásica característica de los gránulos azurófilos (68).

Además de las granulaciones azurófilas, se ha demostrado la existencia de otros gránulos más pequeños que contienen catalasa y que se denominan peroxisomas. Por último, parece existir un tercer tipo de gránulos, que contendrían hidrolasas ácidas.

- *Centriolos y microtúbulos*. La función del centriolo consiste en regular el proceso de división celular y, con la participación de los microtúbulos, en intervenir como vector de la migración dirigida o quimiotaxis.

Los microtúbulos suelen organizarse de forma radial alrededor del centriolo, pero también se encuentran en la región submembranosa,

insertándose preferentemente en los puntos de contacto con alguna superficie externa. Están formados por la polimerización de la tubulina. Funcionalmente constituyen una parte importante del citoesqueleto, e intervienen en la adhesión, quimiotaxis, formación de pseudópodos y degranulación.

- *Microfilamentos*: Se trata de finas estructuras fibrilares, compuestas funcionalmente por actina, que forman una malla irregular en la zona submembranosa. Los filamentos de actina están íntimamente relacionados con dos proteínas contráctiles, la miosina y la proteína ligadora de la actina (69).

- *Otras estructuras*:

Las mitocondrias son escasas, como corresponde a una célula terminal. Además, los fenómenos metabólicos dirigidos a determinar la muerte microbiana no precisan de la producción mitocondrial de ATP. En el citoplasma se encuentran dispersas abundantes partículas de glucógeno, fuente energética esencial de los fenómenos de ingestión microbiana (67).

En ocasiones, pueden observarse gotas lipídicas que corresponden, probablemente, a los triglicéridos requeridos para la síntesis de las membranas de la fase postfagocítica.

Por último, en los neutrófilos no existe retículo endoplásmico rugoso ni ribosomas libres, y el aparato de Golgi tiene aspecto de encontrarse

inactivo.

ASPECTOS FUNCIONALES

QUIMIOTAXIS

Los neutrófilos responden a señales quimiotácticas procedentes de áreas de infección o inflamación, mediante su adherencia al endotelio vascular y su diapédesis a través de las paredes de los pequeños vasos de los tejidos afectados.

Las sustancias quimiotácticas son generadas por las bacterias, los macrófagos, los neutrófilos en el lugar de la invasión o por la activación del complemento sérico. Son factores quimiotácticos bien definidos: C5a, leucotrieno B4 (LTB4), el factor activador de las plaquetas (PAF), y una linfocina producida por los linfocitos estimulados, y productos de la síntesis proteica bacteriana (péptidos formil-metionil, como el N-formil-metionil-fenilalanina o FMLP).

La adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular parece ser un fenómeno complejo dependiente de los efectos de los mediadores inflamatorios sobre las células endoteliales. Bajo la influencia de la interleucina 1 y de otros mediadores inflamatorios las células endoteliales llegan a ser específicamente

adherentes para los neutrófilos. La especificidad de la adherencia sugiere que pueda estar mediada por receptores, si bien estos no han sido identificados.

El movimiento de los leucocitos es generado por la actividad de los microfilamentos de actina, miosina y otras proteínas asociadas que determinan las contracciones y relajaciones de las partes móviles de la célula. En ello, probablemente, intervienen los cambios en la concentración local de calcio. Se acepta que los leucocitos muestran una respuesta motora a agentes químicos del entorno no sólo por quimiotaxis, una reacción por la cual estos agentes determinan la dirección de la locomoción celular, sino también, por quimiocinesis, una reacción por la cual las sustancias químicas determinan la velocidad del movimiento (69).

FAGOCITOSIS

La mayoría de partículas, para ser ingeridas por los neutrófilos, deben ser rodeadas por opsoninas, sustancias que indican al neutrófilo que la partícula debe ser ingerida. Aunque el C3bi actúa como opsonina, es menos efectiva que los anticuerpos IgG. No obstante, la máxima fagocitosis parece precisar de la presencia tanto del anticuerpo como del complemento. Los receptores específicos para el dominio Fc de la IgG son precisos para mediar la fagocitosis de las partículas opsonizadas por el anticuerpo IgG. La activación del receptor Fc de la superficie celular del neutrófilo, supone un potente estímulo para la formación de H₂O₂ a partir del anión superóxido (70).

Para producir la muerte y digestión de las bacterias y el desarrollo de la respuesta inflamatoria tienen lugar dos importantes procesos que se relacionan entre sí y actúan de forma cooperativa para que el neutrófilo ejecute su potencial destructivo (71):

a) Degranulación: liberación del contenido de los gránulos en las vacuolas endosómicas

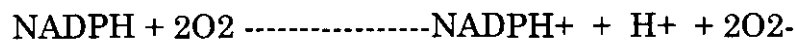
b) Cadena de explosión respiratoria: consiste en una rápida y marcada activación del metabolismo oxidativo produciendo anión superóxido (O_2^-) y derivados tóxicos del oxígeno.

DEGRANULACIÓN

En contacto con la bacteria opsonizada o con los inmunocomplejos, la membrana plasmática de los granulocitos, que contiene en su superficie receptores para las opsoninas C3b o la Fc de las inmunoglobulinas, se invagina. Los gránulos azurófilos y específicos (lisosomas) se unen a esta vacuola por su borde interno y descargan su contenido. Los gránulos azurófilos contienen diversas enzimas microbicidas: lisozima, mieloperoxidasa, proteasas neutras e hidrolasas ácidas. Los gránulos específicos contienen: lisozima, lactoferrina y proteínas ligadoras de la vitamina B12. Estas sustancias actúan sobre el material extraño situado dentro de la vacuola. Sin embargo, si hay excesivo material para digerir, la vacuola puede permanecer abierta y alguna de las enzimas puede escapar y dañar a los tejidos del huésped (67).

EXPLOSIÓN RESPIRATORIA ("RESPIRATORY BURST")(71)

Representa un elemento fundamental para la fagocitosis. El anión superóxido (O₂⁻) es el producto inicial de la cadena de explosión respiratoria. Se forma por la reducción monoelectrónica del oxígeno molecular (O₂) por el NADPH como donante específico de electrones de acuerdo con la siguiente reacción:



El complejo enzimático que cataliza la generación de O₂⁻ desde el O₂ se llama "oxidasa de explosión respiratoria" o "NADPH oxidasa". Un "pool" continuo de NADPH es generado por el "shunt" de las hexosas monofosfato.

El metabolismo oxidativo también genera peróxido de hidrógeno. La mieloperoxidasa, liberada de los gránulos azurófilos durante la degranulación, cataliza la reacción de peróxido de hidrógeno con cloruros presentes en las células, para generar ácido hipocloroso, un potente compuesto antibacteriano. Una reacción mayor que afecta al ácido hipocloroso es la N-cloronización de compuestos, formando cloraminas.

Otros derivados del oxígeno que pueden formarse son el OH⁻ y el oxígeno simple.

La muerte de las bacterias depende de estos metabolitos del oxígeno, y más particularmente, de los hipocloritos y cloraminas. Sin embargo,

la muerte bacteriana también incluye la participación de proteínas catiónicas y defensinas y su digestión por diferentes hidrolasas, incluyendo proteinasas, que pertenecen todas ellas al arsenal antimicrobiano de las células fagocíticas.

Parece existir un mecanismo común para la activación de los neutrófilos, y la consiguiente producción de metabolitos de oxígeno. Este se inicia con la unión del ligando (A) a su receptor específico (R). Ello afecta a una proteína G (G), y se sigue de aumentos de las concentraciones internas de inositol-trifosfato (Ins3P) y diacilglicerol (DG) como consecuencia de la digestión del fosfatidil-inositol por las fosfolipasas C y D (PLC, PLD). La liberación del calcio intracelular (Ca) por el Ins3P, estimula la fosforilación de diversos componentes citosólicos (CF) con la intervención de una protein cinasa C (PKC) y la consiguiente activación de la oxidasa (Fig 1).

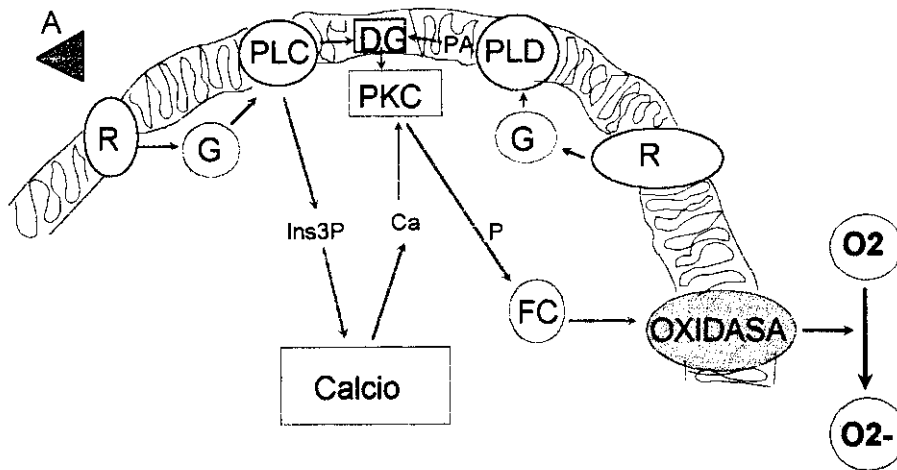


Figura 1. Vías de activación de la oxidasa en los neutrofilos
 A: Agonista R: Receptor G: Proteína G PLC: Fosfolipasa C
 DG: Diacilglicerol PKC: Protein-cinasa-C PA: Ac fosfatidico
 PLD: Fosfolipasa D Ins3P: Inositol-trifosfato P: Fosforilacion
 FC: factores citosolicos

A continuación describiremos, más detalladamente, cada uno de estos pasos.

RECEPTORES

En la actualidad se conocen las características y composición de varios receptores para agonistas quimiotácticos presentes en los neutrófilos. Entre ellos se encuentran dos isoformas del receptor para el formil-metionil-fenilalanina (FMLP) (72), el receptor para la fracción 5a del complemento (C5a) (73), dos receptores para la interleukina 8 (74), el receptor del péptido activador de las plaquetas (PAF) y el receptor para la fracción 3a del complemento (C3a) (75).

Todos los receptores que han sido estudiados contienen 7 segmentos hidrofóbicos que alternan con 8 zonas hidrofílicas. Los dominios hidrofóbicos están constituidos por 21-25 aminoácidos, tienen una conformación α helicoidal, y son lo suficientemente largos como para extenderse a la membrana plasmática. Estos datos indican que dichos receptores pertenecen a la familia de receptores con 7 segmentos transmembrana (7-TMS) (76).

Diferentes regiones de los distintos receptores pueden tener secuencias similares. Así, en algunos de los dominios que se extienden dentro de la membrana esta similitud puede ser especialmente alta. En cambio, en el extremo N-terminal suele ser pequeña, aunque todos ellos poseen numerosos residuos de ácido glutámico y/o ácido aspártico. Además, en todos los receptores 7-TMS, con la única excepción del oncogén mas, la segunda y tercera asa

extracelular contienen cisteína, y la región N-terminal de todos, excepto el receptor para el PAF, tiene zonas potencialmente para N-glicosilación (76). Estas zonas de supuesta glicosilación adicional se encuentran en el segundo asa extracelular de los receptores de IL-8 y FMLP. No se conoce bien el papel que juega la glicosilación (77). No parece ser necesaria para la interacción del ligando, pero pudiera ser requerido para el transporte intracelular y la expresión en la superficie de los nuevos receptores sintetizados y reciclados (78).

El receptor interacciona por un lado con el agonista y por el otro con una proteína G. La especificidad hacia el ligando o agonista y la iniciación en la señal de transducción están mediados por diferentes dominios del receptor.

La fosforilación del receptor por algunas quinasas puede reducir su afinidad por la proteína G, produciendo la llamada desensibilización (79). Se ha publicado la existencia de unas proteínas, llamadas arrestinas, que tienen analogía estructural con las subunidades alfa de las proteínas G, y se unen con mayor afinidad a la forma fosforilada de los receptores que a las formas no fosforiladas, por lo que dejan al receptor inactivo (forma fosforilada) al competir con las proteínas G. La defosforilación disminuye de nuevo la afinidad de las arrestinas y el receptor puede volver a unirse a las proteínas G (80). Tal proceso podría ser la base para la desensibilización rápida y transitoria del receptor. Por ello, en muchos aspectos el sistema receptor-agonista se asemeja a

los sistemas hormona-receptor-neurotransmisor:

a) la interacción receptor-agonista inicia la señal de transducción y la afinidad por el agonista está regulada por los nucleótidos de guanina y sus análogos.

b) el receptor está regulado en exposiciones posteriores y repetidas a agonistas a desensibilización de la vía de transducción.

Entre los receptores de los agentes quimiotácticos, el **receptor del formilpéptido FMLP** de los neutrófilos humanos es de los más estudiados. Los receptores del formilpéptido (R-FMLP) se encuentran localizados en la membrana y en los gránulos específicos. Cuando el neutrófilo es estimulado, los receptores se trasladan desde los gránulos a la membrana (81).

El R-FMLP es una proteína glicosada con un PM de 55-70 KDa, que puede presentarse en dos isoformas con puntos isoeléctricos (pI) de 6.0 y 6.5, respectivamente (82).

Se han preparado dos receptores recombinantes para el FMLP, el FMLP-R26 y el FMLP-R98, que representan dos variantes de este receptor. Ambos están constituidos por 350 aminoácidos (PM 38420D) y difieren entre sí en los aminoácidos situados en las posiciones 101 y 346. También existen algunas diferencias significativas en las regiones 5' y 3' (82).

El primer asa extracelular que contiene el extremo N-terminal del R-FMLP exhibe una fuerte unión con el ligando si se compara con otras regiones extracelulares. Los residuos Arg 84 y Lys 85 juegan un papel fundamental en esta unión (83).

La señal del R-FMLP es enviada a una proteína G . Es el extremo citoplásmico del R-FMLP el que se acopla a la proteína G y transmite la señal (84,85). Algunos autores han sugerido que el segundo asa intracelular y el extremo carboxilo son importantes para el acoplamiento del R-FMLP con la proteína G, y que el tercer asa intracelular tiene menor importancia para ese fenómeno (86). No obstante, no todos los autores están de acuerdo en este último aspecto (87).

Los R-FMLP de los neutrófilos también pueden interaccionar con el citoesqueleto formando complejos. La formación de complejos actina-R-FMLP puede jugar un papel en la activación inducida por quimiotáxis (88 - 90).

La revisión de la literatura en relación con las características del receptor muestra grandes discordancias, en especial en lo referente al número y a la constante de disociación, desde 2000 a 56000 receptores por célula y 0.0034 a 210 nM, respectivamente (91-96). La técnica de aislamiento de los neutrófilos y la temperatura pueden ser factores que de una forma inadvertida podrían activar los neutrófilos. Así, al aumentar la temperatura de 4°C a 37°C el

número de receptores aumenta 2,5 veces y ello se correlaciona con un aumento en la generación de O₂⁻ (91).

Aunque algunos autores han encontrado un estado único de afinidad bajo diferentes condiciones de temperatura (91), otros sugieren que existen dos clases de receptores independientes con estados de alta y baja afinidad (K_d 1nM y 20-40nM, respectivamente) (92 - 96).

Las diferencias de afinidad no parecen ser debidas a receptores diferentes intrínsecamente sino más bien a interacciones entre el receptor y la proteína G reguladora. Por ello, el pretratamiento de los neutrófilos o membranas de células HL-60 con análogos hidrolizables del GTP (por ejemplo, GppNHp o GTPγS) reduce el número de receptores de alta afinidad y, al mismo tiempo, parte de los receptores de alta afinidad son convertidos a estados de baja afinidad (93).

Diferentes drogas pueden inhibir la cadena de explosión respiratoria al actuar como antagonistas de los receptores del FMLP. Entre éstas se encuentran las pirazonas, los contrastes radiológicos y las ciclosporinas (97 - 100).

PROTEÍNA G

La vía de activación celular de los ligandos quimiotácticos parece afectar la interacción del complejo ligando-receptor con la llamada proteína G (101). Las diferencias del receptor específico en la afinidad con la proteína G produce grados diferentes del intercambio en los nucleótidos de guanina y por ello puede contribuir a las diferencias en la respuesta funcional (102). En los neutrófilos no estimulados, una importante cantidad de proteína G está almacenada en los gránulos específicos, coincidiendo con la activación de los neutrófilos, esta reserva se transfiere a la membrana plasmática durante la degranulación celular (71).

El complejo receptor-proteína G activa las fosfolipasas (PL) C, D y A2. Se han presentado numerosas evidencias que demuestran que la PLC está acoplada al receptor a través de una proteína G, G_p (103). El mecanismo por el cual la estimulación determina la activación de la PLD y de la PLA2 no está aún firmemente establecido. Existen dos posibilidades que no son mutuamente excluyentes. Una vía directa por la que la PLA2 y la PLD se activarían mediante una proteína G, o bien una indirecta con la participación del Ca⁺⁺ y la PKC, segundos mensajeros derivados de la hidrólisis del fosfatidil inositol mediante la PLC.

Aunque las proteínas G son intermediarias entre el receptor

y el efector durante la señal transmembrana, su papel no está estrictamente confinado a la membrana, ya que también pueden actuar a niveles más posteriores (104).

Hay dos clases de proteínas G con actividad intrínseca GTPasa que intervienen en la activación de los neutrófilos:

- Los grandes heterotrimeros que están constituidos por las subunidades α (39-52 KDa), β (35-36 KDa) y γ (7-10 KDa).

- Las pequeñas proteínas G monoméricas o superfamilia Ras, que por tener muy débil actividad GTPasas ($< 0.01 \text{ min}^{-1}$), requieren su asociación con otra proteína que active la GTPasa (GAP) para su óptima actividad (105).

Proteínas G heterotriméricas

Están constituidas por tres subunidades: α , β , γ . En la subunidad α es donde se encuentra la actividad catalítica de la GTPasa ($3-10 \text{ min}^{-1}$) y es la que interacciona con el receptor. Se han identificado varias subunidades α diferentes, lo que sugiere que los receptores se acoplan a subunidades α específicas del ligando. La señal puede ser transmitida desde un receptor a múltiples proteínas G y/o desde una proteína G a múltiples moléculas efectoras. Así, el mismo receptor podría mandar señales diferentes dependiendo del tipo de subunidad $G\alpha$ disponible. Alternativamente, las diferencias en la amplitud y duración de la respuesta del neutrófilo a distintos agonistas quimiotácticos se podría explicar por el acoplamiento de la misma proteína G a

dominios citoplásmicos distintos estructuralmente de los receptores ligados (76).

La principal subunidad α de la proteína G corresponde a la $G_{i2\alpha}$ que pertenece a la subfamilia de proteínas G que inhiben la adenilciclase. Otra proteína G que expresan los neutrófilos es la proteína $G_{i3\alpha}$. Ambas son los principales sustratos de la toxina pertussis (106,107). Se ha identificado a la proteína $G_{i2\alpha}$ como la proteína G asociada al receptor de péptidos formilados, así como a los receptores del C5a y del leucotrieno B4 (108).

El papel de las subunidades β y γ está menos caracterizado. El complejo $\beta\gamma$ puede activar la isoenzima β_2 de la PLC. Hay dos subunidades β : β_1 (36 KDa) y β_2 (35 KDa) que tienen entre sí una elevada homología (90%) de secuencia. Existen, al menos, tres subunidades γ diferentes (76). Estas forman un complejo firme con las subunidades β que solamente puede ser disociado por denaturación. Este complejo se une firmemente con la membrana plasmática a través de interacciones hidrofóbicas (109).

En los neutrófilos inactivos, la proteína trimérica con las uniones GDP en la subunidad α están localizados en la membrana plasmática. La estimulación con agonistas quimiotácticos induce un cambio conformacional del receptor que promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α . La subunidad α con las uniones GTP se separa del complejo $\beta\gamma$ y quedan así preparados para interactuar con las moléculas efectoras que participan en la

respuesta funcional. A través de su actividad intrínseca GTPasa, la $G\alpha$ hidroliza las uniones GTP, que pasan a GDP, se disocia de la molécula efectora y se reasocia con el complejo $\beta\gamma$. El complejo $\alpha\beta\gamma$ reformado está ya listo para entrar en un nuevo ciclo de la señal dependiente del agonista. Si la disociación GTP- $G\alpha$ del receptor es suficientemente rápida, el mismo complejo agonista-receptor puede inducir el intercambio GDP-GTP de varias subunidades α , produciendo una amplificación de la señal (76).

La toxina de la *Bordetella Pertussis* puede inhibir la proteína $G_i2\alpha$ al producir una ADP-ribosilación de una cisteína localizada a 4 residuos del extremo C-terminal, produciendo una alteración en la conformación del eje α y el desacoplamiento de la subunidad α del receptor (110 - 112).

Los neutrófilos también poseen proteínas G que estimulan la adenilciclasa (G_s). Son proteínas de 45 KDa y 52 KDa que inhibirían la producción de superóxido, a través del AMPc intracelular y la activación de la protein-cinasa-A (PKA) (113). Así, los agentes que producen un aumento de AMPc (PGE₂, xantinas, teofilina) o simulan este mediador (dibutiril AMPc) inhiben la activación de los neutrófilos por agonistas (114,115). Sin embargo, algunos autores han sugerido que la unión ligando-receptor-proteína G_s inhibiría la función de los neutrófilos tras disminuir la actividad de la proteína G necesaria para la unión del receptor-ligando (116,117). Incluso se ha sugerido una amplificación masiva de la señal inhibidora. En los neutrófilos humanos existen

aproximadamente 500 receptores beta adrenérgicos que son capaces de inhibir completamente la producción de anión superóxido generado tras el estímulo de al menos 50.000 receptores de FMLP. Esta vía sería amplificada por el número de proteínas G asociadas al receptor (700 Gs / Receptor beta adrenérgico frente a 200 Gn / Receptor de FMLP) y por el número de fosfatos liberados desde la proteína G activada en presencia del ligando (100 / minuto / Receptor beta adrenérgico frente a 1 / minuto / Receptor de FMLP) (118).

Las proteínas Gs son sustratos de la toxina del *Vibrio Cholera* a través de una ADP-ribosilación. Al tratar a los neutrófilos en reposo con esta toxina se produce la ribosilación de una proteína de 40 KDa. Cuando los neutrófilos son estimulados con un agonista, la toxina del *V.Cholera* también ribosila la Gi2 α , aunque en un lugar diferente al que hace la toxina *B. Pertussis*, y atenúa la actividad GTPasa. La ribosilación producida por la toxina *V.Cholera* es más intensa si se pretrata a las células con la toxina *B. Pertussis* o con bajas concentraciones de GTP γ S. Ambos tratamientos desplazan la subunidad Gi2 α del receptor y la hacen más accesible a los efectos ribosiltransferasa de la toxina *V.Cholera*. Es de destacar que las membranas aisladas parecen unir el agonista FMLP con más afinidad cuando son reconstituidas con Gi2 α modificada por la toxina *V.Cholera* que cuando los son con la subunidad α no tratada, sugiriendo que el receptor se acopla más eficazmente a la proteína modificada por el cambio conformacional en su extremo carboxilo. Dado que la actividad GTPasa de la Gi2 α está atenuado bajo estas condiciones, la proteína modificada parece ser una señal

más eficaz entre receptores y efectores (119).

Proteínas G monoméricas

Son proteínas de bajo peso molecular, que pertenecen a la superfamilia ras. Existen al menos 25 tipos distintos que se han agrupado en familias: Ras (ras, ra1, rap), Rho (rho, rac, G22k, G25k), y Rab (rab1A, rab1B).

A este tipo de proteínas pertenecen algunas que se fijan a nucleótidos de guanina de 21, 24, y 26 KDa y a los receptores del agonista FMLP y que se disocian en presencia de $GTP\gamma S$. Tras el intercambio GTP-GDP, estas proteínas se reasocian con el receptor, lo que sugiere que pueden estar involucradas en la señal (76).

La proteína Rap1A es un miembro de la familia Ras (120,121) que se ha localizado en la membrana, junto a un componente de la NADPH oxidasa, el citocromo b558. Tanto la proteína Rap 1A como la proteína Rap 2A están en los gránulos específicos y se transfieren a la membrana plasmática durante la exocitosis. El papel de las proteínas Rap no está muy claro. Sin embargo, al menos in vitro, la fosforilación de las proteínas Rap por la PKA inhibe la unión de las proteínas Rap 1A al citocromo b558 y esto podría explicar el conocido efecto inhibitor del AMPc sobre la cadena de explosión respiratoria (122).

Las proteínas Rho parecen intervenir, además de la cadena respiratoria, en la adhesión de los leucocitos (123). Las proteínas Rac 1 y Rac 2 pertenecen a la subfamilia Rho, y son sustratos para la ADP-ribosilación inducida por la toxina del *Clostridium Botulinum* C3. Estas últimas proteínas son componentes de la NADPH oxidasa (124). Así, el factor soluble de la NADPH oxidasa, el σ_1 , consiste en realidad en una proteína Rac 1 (22 KDa) y una proteína de 24 Kda que se ha intentado identificar como el inhibidor de la disociación-GDP, el rhoGDI. La proteína Rac 1 y el factor rhoGDI están estrechamente asociados, ya que el factor rhoGDI es el responsable de regular la actividad de la proteína Rac1 al inhibir el intercambio de nucleótidos (125). Sin embargo, los neutrófilos que expresan las proteínas Rac 2 no parecen expresar proteínas Rho como la proteína rhoGDI, funcionando realmente como reguladores de las proteínas Rac. Además, las proteínas Rho son necesarias para la actividad de la PLD (126).

Características bioquímicas de las proteínas G

La interacción entre el complejo agonista-receptor y la proteína G es dependiente del GTP y del calcio (127 - 129).

Los análogos del GTP provocan la activación de la proteína G con una potencia que es característica de cada uno de ellos (130):



En contraste, el ATP no es necesario ni suficiente para activar la oxidasa. Sin embargo, si la reacción con GDP y/o GMP se contamina con ATP (pero no con su hidrolizable) puede indirectamente favorecer la activación de la oxidasa por medio de enzimas endógenos que catalizan la conversión ATP-dependiente de GMP y GDP a GTP (128).

En ausencia de nucleótidos de guanina, la disociación del receptor-FMLP es sensible al magnesio. En presencia de estos nucleótidos esa disociación del receptor es sensible al sodio y potasio.

La adición de calcio a concentraciones mayores de 10 μM suprime el impacto de los nucleótidos de guanina. El efecto del calcio no es bloqueado por el magnesio (100).

Los nucleótidos de purina y pirimidina "per se" no estimulan la NADPH-oxidasa pero potencian la formación del superóxido (x5) tras dosis subóptimas de FMLP. Parece ser que actúan a nivel de receptores específicos de nucleótidos. Estos receptores están acoplados también a proteínas G. Como los nucleótidos son liberados de las células bajo condiciones fisiológicas y patológicas, ellos pueden jugar un papel en la activación de los neutrófilos comportándose como mensajeros de la señal intracelular (131).

El flúor también parece estimular la proteína G. La

producción de O_2^- en neutrófilos estimulados con flúor es antagonizada por el $GDP\beta S$, es dependiente de magnesio, pero es insensible al tratamiento con la toxina pertusis. Estas características son compatibles con la idea de que el flúor activa una proteína G, probablemente la G_p , tras interactuar sobre los lugares de unión de nucleótidos a la subunidad α de la proteína G. Además, la producción de O_2^- por los neutrófilos estimulados con flúor es bloqueada por la estaurosporina y el H-7, lo que indica que esta vía procede de la activación de la PKC (132).

A concentraciones de 20 mM de FNa, el flúor activa proteínas reguladoras de los nucleótidos de guanina. La capacidad del flúor para simular ciertos efectos de hormonas y otros agonistas celulares, incluyendo la movilización del calcio y la activación de fosfolipasas específicas de inositol, tanto en células intactas como en extractos celulares, proporciona un fuerte apoyo a la idea de que el flúor es un activador específico de la proteína G que regula la actividad de una PLC (133).

FOSFOLIPASAS

La hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana por las fosfolipasas representa el primer paso en la formación de una variedad de lípidos bioactivos. Así, los lípidos de la membrana nativa juegan un papel decisivo, dada la capacidad de las fosfolipasas para hidrolizarlos (104). Tres tipos de fosfolipasas

han sido involucradas a diferentes niveles de la activación de los neutrófilos: la fosfolipasa A2 (PLA2), fosfolipasa C (PLC), y la fosfolipasa D (PLD).

Los principales sustratos para la fosfolipasa C (PLC) y la fosfo-inositol-3 cinasa (PI-3cinasa) son los inositoles contenidos en los fosfolípidos. La composición de los inositoles en muchas células, incluyendo los neutrófilos humanos, muestra un modelo donde la posición sn-1 normalmente contiene ácido esteárico (C18) y la posición sn-2 contiene ácido araquidónico (C 20:4) (134). Dos cinasas son responsables de la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) para generar PI(4,5)P2, la fosfolipasa C y la PI-3cinasa. Los fosfolípidos del inositol únicamente representan el 5-8% del total de los fosfolípidos. En contraste, la fosfatidilcolina (PC), el sustrato para la fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A2 (PLA2), representa el 40% del total de fosfolípidos de las membranas celulares(135). La posición sn-1 de la PC puede ser bien acil o alquil, mientras que la posición sn-2 es invariablemente acil. En los neutrófilos, la forma alquil-PC-(1-0-alkil-PC) supone más del 40% del total de PC, el 60% restante corresponde al diacil-PC (136). Ambos son sustratos para PLD y PLA2.

Fosfolipasa C (PLC)

El principal(es) sustrato(s) de la PLC es el inositol contenido en los fosfolípidos. Preferentemente hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdInsP2), pero también actúa sobre el fosfatidil inositol-4-monofosfato (PI). Su actuación sobre el PtdInsP2 produce diacilglicerol e inositol-trifosfato (InsP3). El

primero permanece en las membranas y activa directamente la PKC, un estimulante de la NADPH oxidasa. El inositol-trifosfato es liberado al citosol y se une a receptores específicos presentes en las organelas que acumulan el calcio intracelular y que están localizadas en la vecindad de la membrana plasmática. La unión del InsP₃ induce la liberación de calcio de esos almacenes y origina un aumento característico de la concentración de calcio intracelular (137).

Parece ser que la activación de la PLC en preparaciones de membranas solamente representa una pequeña fracción de la respuesta que se observaría en células permeabilizadas (138). El porcentaje de lípidos de inositol hidrolizados en células permeabilizadas es 10 veces mayor que en preparaciones de membranas.

La mayoría de la actividad de la PLC se encuentra localizada en el citosol y un pequeño porcentaje en la membrana.

Existen al menos tres familias de PLC: PLC γ (150KDa), PLC β (148KDa) y PLC δ (85KDa). Probablemente existan otras dos familias: α y ϵ . Dentro de cada familia hay varios subtipos.

La activación de la PLC por agonistas quimiotácticos está mediada por proteínas G y requiere de la presencia de calcio (104,139,140).

El GTP γ S parece ser un estimulador efectivo de la PLC de la membrana (103). Se ha demostrado que la PLC es activada por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica, y no por la subunidad Gi2 α (141). En 1984, se identificó una PLC en las membranas celulares que era activada por niveles milimolares de calcio. Los polifosfoinositoles endógenos servirían de sustrato y al añadir 500 μ M de calcio, el 40-60% de los polifosfoinositoles preformados serían hidrolizados a diacilglicerol y a los correspondientes fosfatos de inositol (142). Dado que los niveles de calcio en las células en reposo es normalmente de 100 nM y que este nivel es inefectivo para estimular la actividad de la PLC, esta preparación sirve como testigo para controlar estas vías.

La fosfolipasa C es inhibida por diferentes productos químicos, entre ellos el U-73122 (que también inhibe el aumento del calcio intracelular), el inositol trifosfato y el diacilglicerol (143).

La PLC específica del fosfatidilinositol no es la única enzima que genera diacilglicerol en las células estimuladas. También se forman considerables cantidades de diacilglicerol tras la hidrólisis de la fosfatidilcolina con intervención de la PLD. Sin embargo, esta fosfolipasa se activa más lentamente que la enzima específica del fosfatidilinositol, la cual produce el aumento inicial de diacilglicerol que determina la activación de la PKC.

Fosfolipasa D (PLD)

Existe actividad de la fosfolipasa D tanto en la membrana como en el citosol, pero la mayor actividad se detecta en este último. Actúa sobre la fosfatidilcolina para producir ácido fosfatídico que más tarde es degradado a diacilglicerol por una hidrolasa del ácido fosfatídico. Como ya se señaló más arriba, el diacilglicerol estimula la PKC y ésta, a su vez, la NADPH oxidasa.

La generación directa de diacilglicerol desde PtdInsP2 (vía PLC) es un paso precoz y transitorio, mientras que el diacilglicerol que procede de la fosfatidilcolina a través de la PLD es lento pero prolongado (144).

La actividad de esta enzima depende del calcio, por lo que es estimulada por el iónforo A-23187 en presencia de calcio en el medio. Este efecto es bloqueado por el EGTA, el cual produce una deplección rápida de calcio de las células. La estimulación de los neutrófilos con FMLP, en ausencia de calcio extracelular, produce una activación parcial de la PLD, mientras que en las células deplecionadas de calcio no se observa este efecto. Estos resultados indican que el calcio intracelular es suficiente para la activación de la enzima, pero la actividad máxima depende del influjo de calcio (76).

No se conoce el mecanismo exacto que regula la estimulación de la PLD en células intactas, pero podría tratarse de un efecto mediado por la

proteína G (145), o bien por la vía de la PKC (146) y el calcio.

Existen diferentes evidencias que llevan a la conclusión de que la activación de la PLD está involucrada en la cadena de explosión respiratoria:

1) Estudios metabólicos realizados con precursores de la fosfatidilcolina marcados radiactivamente demuestran que la generación de diacilglicerol vía PLD aparece tras varios estímulos, incluido el FMLP (147).

2) En presencia de alcoholes, la activación de la PLD por el FMLP produce fosfatidil alcoholes a través de un mecanismo de transfosfatidilación específica, y éste se correlaciona con una disminución de la generación de ácido fosfatídico (148). Estudios en los que se añade propanolol, un inhibidor de la hidrolasa del ácido fosfatídico, en células estimuladas con FMLP y citocalasina b o fluoruro de sodio, se produce una inhibición de la producción de anión superóxido y una acumulación de ácido fosfatídico (149). Dado que el etanol produce cambios en la cantidad de ácido fosfatídico, el fosfatidiletanol acumulado en los alcohólicos pudiera alterar la función de los neutrófilos (150).

3) Los niveles de ácido fosfatídico en neutrófilos activados con diferentes estímulos, se correlacionan con la liberación de anión superóxido (151).

La PLD activada es un sistema que requiere la presencia combinada del citosol y la membrana (126,152,153). Entre los factores de membrana se incluyen proteínas G monoméricas de la familia Rho (145).

Fosfolipasa A2 (PLA2)

Durante la activación de los neutrófilos se produce un aumento de ácido araquidónico producido por la fosfolipasa A2 (PLA2) (154). El ácido araquidónico es necesario también para la activación de la NADPH oxidasa.

En los neutrófilos, la PLA2 hidroliza fosfolípidos y 1-alkilfosfolípidos, generando dos moléculas precursoras, el ácido araquidónico y el 1-O-alkil-sn-glicero-3-fosforilcolina (lyso-PAF). Mientras el ácido araquidónico es oxidado por las cicloxigenasas o lipoxigenasas hacia prostanoides y leukotrienos, respectivamente, el lyso-PAF es acilado por una acetil-CoA-transferasa hacia 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, el PAF. El leukotrieno B4 y el PAF son, no sólo productos de los neutrófilos, sino también estimulantes de los neutrófilos por vía de receptores dependientes de la proteína G. A bajas concentraciones, el PAF, y en menos extensión, el LTB4 también preparan a los neutrófilos para potenciar la cadena de explosión respiratoria inducida por péptidos quimiotácticos. Las prostaglandinas E2 e I2, en contraste, atenúan la respuesta a agonistas quimiotácticos, presumiblemente al elevar los niveles de AMPc intracelular.

Se desconoce el mecanismo por el que se activa la PLA2. Existen evidencias que indican que la PLA2 es activada por vía de los receptores y con la intervención de la proteína G y no como consecuencia de los productos de

degradación de la PLC (104,155). También ha sido publicada la activación de la PLA2 por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica (156). No obstante, desconocemos si el heterodímero $\beta\gamma$ actúa directamente o lo hace a través de la inactivación de inhibidores.

En los neutrófilos, la PLA2 existe en dos formas: la primera es una ácida localizada en los gránulos azurófilos, mientras que la segunda corresponde a la membrana plasmática. La actividad de esta última se incrementa durante la activación de los neutrófilos (157,158). Además, algunos autores han detectado actividad PLA2 en el citosol de los neutrófilos (159 - 161).

En los neutrófilos existen dos tipos de PLA2:

- a) una de alto peso molecular, 85 Kda, o tipo I que es específica del ácido araquidónico; y
- b) otra de menor peso molecular, 14 KDa, o tipo II que se localiza en los gránulos (162,163).

El principal almacén de ácido araquidónico en las células son los ésteres de glicerofosfolípidos en la posición sn-2. La PLA2 directamente libera ácido araquidónico desde la posición sn-2 de los fosfolípidos. En los neutrófilos, el pool predominante de araquidonato endógeno está repartido entre la fosfatidiletanolamina (60%), la fosfatidilcolina (18%) y el fosfatidilinositol (18%). No obstante, esta distribución varía si se utiliza ácido araquidónico exógeno

marcado radiactivamente (164).

Para que la PLA2 llegue a acceder a su sustrato, es necesario que pueda desplazarse desde el citosol a la membrana plasmática. Este desplazamiento depende de las concentraciones de calcio (165) ya que requiere que estas oscilen entre 300 nM y 10 μ M de calcio (166). En presencia de FMLP, se libera ácido araquidónico siempre que el calcio esté presente a concentraciones de 10 μ M. En presencia de FMLP y de GTP γ S, la liberación de ácido araquidónico se produce si el calcio está presente a 1 μ M.

El ácido araquidónico parece jugar un papel en la exocitosis, así como también en la activación y mantenimiento de la actividad NADPH oxidasa. Aunque no se conoce la localización precisa de su acción (167), se ha sugerido que estimula la PKC α por un mecanismo de retroalimentación positivo que es dependiente del calcio (76). Algunos autores han observado que la inhibición de la PLA2 no impide la fosforilación de la proteína p47, por lo que el mecanismo de acción de la PLA2 sería posterior a la PKC (168). También se ha postulado que el ácido araquidónico ejercería efectos directos sobre la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica (169).

La actividad de la PLA2 es necesaria para estimular la actividad de la oxidasa. Estudios con inhibidores de la PLA2 reducen la liberación de ácido araquidónico, y la producción de anión superóxido, aunque persiste la

fosforilación de proteínas citosólicas (p47) y la traslación de los factores citosólicos (p47, p67) a la membrana (168).

CALCIO

En los primeros estudios se observó que los neutrófilos depleccionados de calcio eran incapaces de producir superóxido en respuesta al FMLP, pero esta alteración se recupera si eran repleccionados con calcio extracelular (170).

Diferentes ensayos utilizando un indicador fluorescente, el quin 2, han demostrado que los agonistas elevan el calcio libre citosólico en dos fases:

1) La primera es rápida, inmediata, a los 30 segundos que siguen al estímulo, independiente del calcio extracelular y, por ello, atribuida a la movilización del calcio desde los almacenes intracelulares, y siempre precede al comienzo de la cadena de explosión respiratoria (171)

2) La segunda elevación depende del calcio extracelular (172).

Ello indica que el calcio citosólico estaría implicado en la transmisión de señal a la cadena de explosión respiratoria y que el tiempo que transcurrió antes de aumentar el calcio citosólico refleja el tiempo requerido para

la generación de concentraciones efectivas de InsP3.

Pero el aumento del calcio intracelular no es estrictamente esencial para la producción de superóxido (173). No existen dudas de que en algunas circunstancias, además de la vía clásica calcio-dependiente, existe otra paralela que es independiente del calcio y, probablemente también, de la PKC.

El aumento del calcio intracelular es originado por la entrada desde el medio extracelular y por la liberación del calcio almacenado en los calciosomas (174). Estos últimos son unas vesículas de 50-250 nm de diámetro caracterizadas por la presencia de la proteína ligadora de calcio y por la capacidad de liberar calcio en respuesta al InsP3. El mecanismo por el cual el calcio atraviesa la membrana plasmática es controvertido. Parece ser que cuando el calcio intracelular es movilizado de los calciosomas, se produce un flujo de calcio a través de la membrana (171,175).

Otros autores han propuesto que los canales del calcio son activados bien directamente por el complejo receptor / ligando o bien por un mecanismo diferente a los cambios en el calcio citosólico (176). Además, parece ser que el contenido de calcio de los neutrófilos está controlado por un transportador Na/Ca.

FOSFATIDIL-INOSITOL-3-CINASA

Además de la estimulación de las tres fosfolipasas, el FMLP también estimula la fosforilación del inositol contenido en los lípidos, fosfatidil inositol (PI), PI-4P y PI (4,5)P₂ en la posición 3 hidroxil del anillo del inositol para formar PI-3P, PI (3,4)P₂, y PI (3,4,5)P₃. El enzima responsable de esta fosforilación es la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI-3-cinasa). Aunque no está claro, se ha sugerido que su diana celular es el PI (4,5)P₂.

La PI-3-cinasa parece ser un complejo heterodimérico que contiene una proteína de 85 KDa y otra de 110 KDa. La subunidad de 85 KDa no tiene actividad enzimática detectable, pero puede ser una subunidad reguladora responsable de la unión a tirosin-cinasas, mientras que la proteína p110 probablemente sea el elemento catalítico (134)

PROTEIN-CINASAS

La fosforilación de las proteínas es un mecanismo esencial en la transmisión de señal intracelular. Tras la introducción selectiva de grupos de fosfato en la serina, treonina o residuos de tirosina, las proteínas se alteran, producen cambios en su actividad enzimática, en sus propiedades y, en consecuencia, en modificaciones en la señal intracelular. Las protein-cinasas pueden ser subdivididas en dos clases según cual sean sus aminoácidos diana:

serina o treonina, o bien tirosina.

Fosforilación de serina / treonina

La PKC es la enzima mejor conocida que actúa sobre residuos de serina o treonina, catalizando su fosforilación.

Es bien conocido que la oxidasa de los neutrófilos está probablemente activada por al menos dos vías diferentes. Una de ellas es dependiente de la PKC (177). La idea de una vía dependiente de la PKC viene apoyada principalmente por dos experimentos:

- 1) Estudios de incorporación de ^{32}P Pi a proteínas de los neutrófilos, en los que se ha encontrado una correlación entre el nivel de actividad de la oxidasa y el grado de fosforilación de proteínas, incluyendo una proteína citosólica de 47KDa (identificada más tarde como un componente de la oxidasa activada y referida como p47).
- 2) El 4- β -phorbol12-myristate-13-acetate (PMA) activa tanto la PKC como la cadena de explosión respiratoria. Una interpretación racional es que el PMA y otros ésteres de forbol, simulan los efectos del diacilglicerol, un activador fisiológico de la PKC que se une a la PKC con alta afinidad (Kd 8nM) y con una relación estequiométrica 1:1 (178).

La PKC se comporta como una cinasa dependiente de calcio y de fosfolípidos, que es activada por el diacilglicerol o por los ésteres de forbol.

La PKC existe como una familia de múltiples isoenzimas. Además de las formas de calcio dependientes (α , β , γ), también se han identificado varias formas que actúan de forma independiente del calcio (δ , ϵ , ζ). Estas isoenzimas muestran especificidad tisular y distribución subcelular. Los neutrófilos humanos contienen las isoformas α , β , con predominio de la primera (179,180).

Las protein-quinasas que se asocian con la membrana plasmática están en una posición favorable para fosforilar moléculas efectoras unidas a la membrana. En los neutrófilos estimulados, la PKC se traslada desde el citosol a la membrana plasmática. Este proceso es dependiente del calcio y reversible. No se sabe si la cinasa es realmente citosólica o está más bien localizada en el espacio periplasmático sin conexión con la membrana. El isoenzima más abundante en el citoplasma parece ser la PKC- β , la cual, en contraste con la isoenzima α , se traslada desde el citosol a la membrana plasmática en presencia de calcio (76).

Parece existir otra PKC, denominada n-PKC, que no se traslada a la membrana, pesa 76 KDa, es dependiente de la fosfatidilserina y del diacilglicerol, pero independiente del calcio. Los ácidos grasos acil-CoA de cadena larga inhibirían esta enzima. Majumdar et al (179) hipotetizan que esta inhibición pudiera jugar un papel regulador en la función de los neutrófilos, pues su activación con péptidos formilados produce un incremento de estos ácidos grasos.

Si bien la β -PKC fosforiliza a la p47, implicada en la generación de superóxido, la α -PKC fosforiliza a numerosas proteínas citosólicas no dependientes del calcio, que incluyen la p66.

La PKC también fosforiliza la proteína MARCKS, que regula el acoplamiento reversible de los filamentos de actina a la membrana plasmática (181).

La PKC puede ser inhibida por diferentes sustancias : compuestos del oro (182), la lidocaina (183), los antimaláricos (184), el K-252a y la estaurosporina (185).

Fosforilación de la tirosina

La cadena de explosión respiratoria se acompaña de la fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina (186). Las proteínas que contienen fosfotirosina constituyen en los neutrófilos menos del 1% del total de fosfoproteínas. La fosforilación de la tirosina parece estar mediada por una proteína G sensible a toxina pertusis (187). Es dependiente del magnesio y del ATP. Es inhibida de forma dosis-dependiente por el erbstatin, inhibiendo la producción de superóxido inducida por el FMLP (188,189) pero sin efecto sobre la cadena de explosión respiratoria inducida por el ionóforo del calcio, A23187 o por los ésteres de forbol (PMA) (188).

En contraste, al añadir a los neutrófilos electropermeabilizados vanadato, un inhibidor de la fosfatasa de la tirosina, se produce una acumulación de proteínas tirosina-fosforiladas y un aumento en el consumo de oxígeno (190).

Las principales proteínas con tirosina que son fosforiladas por esta enzima son p41, p54, p66, p104 y p116.

Se acepta que los receptores acoplados a la proteína G estimulan la fosforilación de la tirosina, bien por la activación de una tirosin cinasa o bien por la inhibición de fosfatasas de tirosina, pues ambas opciones potencialmente determinan la acumulación de proteínas tirosina-fosforiladas. La fosforilación de tirosina puede ser parcialmente inhibida por toxina pertusis y, dado que el GTP γ S también es capaz de inducir la fosforilación de tirosina en neutrófilos permeabilizados (191,192), es probable que la fosforilación de la tirosina sea secundaria a la activación de la PLC.

Otra modificación de proteínas dependiente de la cadena de explosión respiratoria es la adición reversible de un residuo de tirosina a proteínas (tirosinólación). En los neutrófilos humanos activados por el FMLP, se produce una estimulación específica de la tirosinólación de tubulina que es inhibida por la toxina pertusis (193).

NADPH-OXIDASA

La oxidasa de la cadena respiratoria es una corta cadena de transporte de electrones unida a la membrana que reduce el oxígeno extracelular a anión superóxido y oxida el NADPH citosólico generado por el shunt de las hexosas monofosfato, el cual actúa como donante de los electrones para la reacción redox. El anión superóxido es inestable y la dismutasa lo convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno y oxígeno.

En los neutrófilos en reposo, la NADPH oxidasa está inactiva y sus componentes (de membrana y citosólicos), separados. Pero cuando las células son estimuladas por agonistas, se ensambla rápidamente y se activa en la membrana citoplásmica (194 - 196).

Los componentes de la membrana plasmática están constituidos por el citocromo b558, de bajo potencial, y compuesto de dos subunidades, de 22KDa y 91KDa, y una posible flavoproteína relacionada con el transporte de electrones entre NADPH y el citocromo b558 (194,197).

El citocromo b558 fue el primer componente identificado de la oxidasa. Es una proteína integral de la membrana y consiste en una subunidad α de 22 KDa (p22-phox) y una subunidad β de 91 KDa (gp91-phox) (198). Se ha propuesto que el grupo heme está vinculado a la subunidad pequeña, la cual contiene una región con una secuencia similar a las zonas de unión del grupo heme de otras

hemoproteínas. Las mediciones espectroscópicas sugieren que el citocromo b558 contiene más de un grupo heme unido a ambas subunidades. Algunos sugieren la existencia de dos modalidades de heme. La conexión funcional de dos hemes a una flavina asegura el transpaso de parejas de electrones desde la NADPH y la posterior transferencia al heme(s) del citocromo b558. La flavina aparentemente sería el paso limitante en la transferencia de electrones (76).

Quinn et al (199 - 201) han demostrado la existencia de una proteína G de bajo peso molecular que se localiza junto y con el citocromo b558 en la membrana de los gránulos específicos y que parece corresponder a la proteína G monomérica Rap 1A. La asociación de la proteína Rap 1A con el citocromo b558 puede estar regulada por la PKA, dado que la fosforilación previene la unión de dicha proteína con el citocromo b558.

Entre los componentes citosólicos se conocen, una proteína de 67 KDa, una proteína de 47 KDa y, probablemente, una proteína de 40KDa, todas ellas fosforiladas (denominadas p67-phox, p47-phox, y p40-phox respectivamente), y proteínas G monoméricas de la familia Rac (rac 1, rac 2) (202 - 204). Estos componentes se trasladan a la membrana plasmática, formando una NADPH oxidasa generadora de O₂- activo (205). Algunos estudios consideran que el traslado de estas proteínas desde el citosol a la membrana está en función de la intensidad del estímulo y del tiempo y temperatura en la exposición (206).

Los componentes citosólicos interaccionan entre sí. Así, la

proteína p40-phox interacciona fuertemente con la proteína p67-phox y de forma más débil con la proteína p47-phox (207,208). El traslado desde el citosol a la membrana de la proteína rac 1 requiere de la proteína p67-phox, mientras que la proteína rac2 parece requerir de la proteína p47-phox (209). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas p47 y p67 contienen regiones homólogas con la SH3 o dominante A de la familia src de las tirosin-cinasas, una región que se encuentra en una variedad de proteínas que interaccionan con el citoesqueleto. Nauseef et al (210) han observado que la fosforilación de la p47, dependiente de la PKC, se correlaciona con la asociación de la proteína p47-phox al citoesqueleto y la traslación de las proteínas p47-phox y p67-phox a la membrana con el ensamblaje de la oxidasa. Smith et al (211) proponen que en los leucocitos la NADPH-oxidasa tiene dos zonas catalíticamente funcionales de unión, una de afinidad relativamente baja en la gp91-phox, y otra de mayor afinidad en la p67-phox.

Además, cada uno de los componentes citoplásmicos tiene una función determinada. La proteína p67-phox sola puede facilitar el flujo de electrones desde la NADPH al centro de la flavina de la NADPH oxidasa en ausencia de p47-phox, produciendo su reducción , mientras que la presencia de la proteína p47-phox se requiere para transferir ordenadamente los electrones más allá del centro de la flavina al heme en el citocromo y de ahí al oxígeno (212).

Algunos estudios han demostrado que el magnesio, pero no el

calcio, es absolutamente requerido para la generación de equivalentes reducidos por la NADPH oxidasa. Aparentemente el magnesio se requiere para unir las proteínas citosólicas a la membrana plasmática en el complejo funcional de la NADPH oxidasa (213).

Uhlinger et al (214) han caracterizado un sistema NADPH oxidasa "semi-recombinante" que comprende componentes de la membrana plasmática y proteínas recombinantes p47-phox y p67-phox. Estos mismos autores, en un estudio posterior han mostrado que la traslación de p47-phox fue estimulada por ácido araquidónico pero no por GTP γ S, dependiente del citocromo en aproximadamente un 50% e independiente de la proteína p67-phox. En cambio, el ácido araquidónico estimuló la traslación de la proteína p67-phox, que requiere del citocromo y de la proteína p47-phox y se incrementa con GTP γ S. Las proteínas p47-phox y p67-phox que se ensamblan con el citocromo b558 lo hacen en una relación estequiométrica de 1:1:1 (215).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.- Determinar si existe algún defecto en la función postfagocítica de los leucocitos polimorfonucleares de pacientes con cirrosis hepática.

2.- En caso de hallar algún defecto, determinar el nivel en la vía de activación celular donde se sitúa.

3.- Conocer si existe alguna relación entre el hipotético defecto en la función postfagocítica y las características de la cirrosis hepática: etiología, grado funcional, parámetros bioquímicos, episodios previos de infección del líquido ascítico, ascitis, hipertensión portal, sangrado digestivo, etc.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES Y METODOS

I.- PACIENTES

Se ha estudiado la función postfagocítica de los neutrófilos en 74 pacientes con cirrosis hepática y en un grupo control de 34 individuos sanos.

Los controles eran 20 varones y 14 mujeres de entre 29 y 79 años y edad media de $60 \pm 11,6$ años.

Los pacientes cirróticos eran 48 varones y 26 mujeres con edades comprendidas entre los 39 y 76 años, siendo la edad media de $59,6 \pm 10$ años.

El diagnóstico de cirrosis hepática se realizó en todos los casos por datos clínicos, analíticos y de imagen (gammagrafía, ecografía, tomografía computarizada, endoscopia, radiología), y se confirmó histológicamente en 38 pacientes. En los 36 casos restantes no se practicó biopsia hepática por existir afectación severa de la coagulación.

En todos los pacientes cirróticos se estudió la etiología de la cirrosis, el grado funcional hepático, los parámetros analíticos hepáticos, y los antecedentes o existencia de complicaciones de su cirrosis: ascitis, infección del

líquido ascítico, hemorragia digestiva por hipertensión portal, encefalopatía.

La etiología de la cirrosis se estableció sobre la base de los hábitos tóxicos de los pacientes (alcohol, consumo de fármacos hepatotóxicos, adicción a drogas intravenosas,...), la serología de los virus hepatotropos (B, C, D), el estudio de autoinmunidad (anticuerpos antinucleares, antimitocondriales, antimúsculo liso, antimicrosomales de hígado y riñón), el estudio metabólico (hierro, ferritina, cobre, ceruloplasmina, y alfa-1-antitripsina en sangre, y cobre y porfirinas en orina de 24 horas), y la existencia de enfermedades biliares o patología venosa (insuficiencia cardiaca, enfermedad veno-oclusiva, Síndrome de Budd-Chiari).

La etiología de la cirrosis estaba relacionada con el alcohol en 34 casos (45,9%), alcohol y VHC en 18 (24,3%), VHC en 13 casos (17,6%), VHB en 5 (6,8%), autoinmune en 1 caso (1,3%), y no se determinó en 3 casos (4%). (Fig 2).

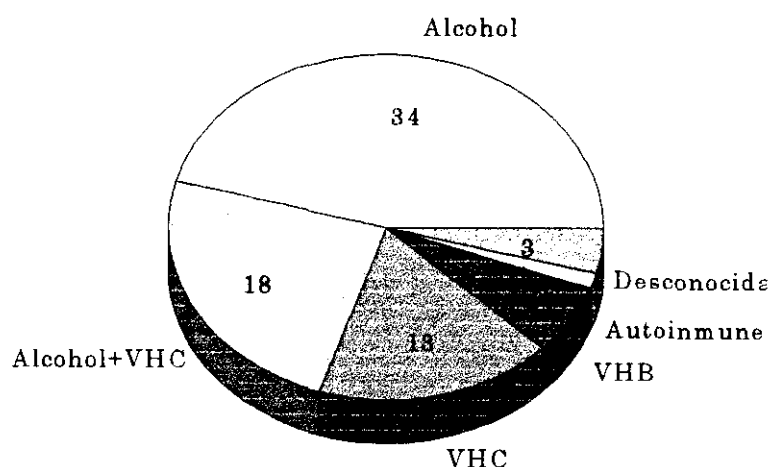


Figura 2. Etiología de la cirrosis en los 74 pacientes estudiados

El grado funcional hepático se estableció de acuerdo con la clasificación de Child-Pugh (216,217), que valora 5 parámetros (albúmina, actividad de protrombina, bilirrubina, ascitis y encefalopatía) y los puntúa con 1, 2, o 3 puntos según la siguiente tabla:

Parámetros	Puntuación		
	1	2	3
Albúmina (mg/dl)	>3,5	3-3,5	<3
Actividad Protrombina	>50%	30-50%	<30%
Bilirrubina	<2	2-3	>3
Ascitis	No	Fácil control	Difícil control
Encefalopatía	No	Estadio I-II	Estadio III-IV

Posteriormente, según la puntuación global, la clasificación de Child-Pugh distingue 3 grados funcionales: el grado A está formado por los pacientes con 5 y 6 puntos; el grado B por los pacientes con 7, 8, o 9 puntos; y el grado C por los pacientes con 10 a 15 puntos. En el cálculo del grado funcional, los estadios de la encefalopatía hepática se definieron según el sistema de Parsons-Smith (218):

Estadio I: confusión leve, euforia o depresión, disminución de la atención, lentitud para practicar tareas mentales, irritabilidad, trastorno del patrón del sueño.

Estadio II: somnolencia, letargia, gran reducción de la capacidad para practicar tareas mentales, alteraciones evidentes de la personalidad, comportamiento inapropiado, desorientación intermitente (habitualmente en el tiempo).

Estadio III: somnoliento, pero se le puede despertar, incapaz de practicar tareas mentales, desorientación con respecto al tiempo y/o al lugar, marcada confusión, amnesia, algunas crisis de agresividad, habla presente, pero incomprensible.

Estadio IV: coma.

Respecto a la función hepatocelular, 20 pacientes (27%) tenían un grado funcional A de la clasificación de Child-Pugh, 20 (27%) un grado B, y 34 (45,9%) un grado funcional C (Fig 3).

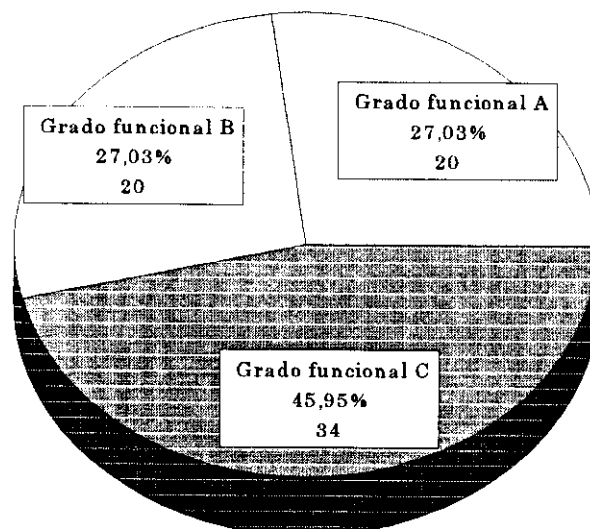


Figura 3. Grado de la función hepatocelular de los 74 enfermos con cirrosis hepática

Los parámetros analíticos hepáticos estudiados en los 74 enfermos cirróticos fueron: transaminasas (GOT, GPT), GGT, fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total (BT), albúmina, y actividad de protrombina. Sus resultados aparecen reflejados en la tabla 1.

TABLA 1

Parámetro	Media	Rango	Desv. Típica
GOT (UI/l)	93,55	19-232	42,7
GPT (UI/l)	86,9	35-675	47,65
GGT (UI/l)	64,08	11-248	39,97
FA (UI/l)	137,43	74-428	63,46
B T (mg/dl)	2,47	0,5-13	1,71
Alb (g/dl)	3,08	2-4,7	0,65
Activ. Prot(%)	62,11	29-100	17,27

En cuanto a las complicaciones de la cirrosis hepática, se consideró que existía una infección espontánea del líquido ascítico en los casos que cumplían los criterios de peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascítis neutrocítica, y bacteriascítis (219). Así, el diagnóstico de PBE se basó en un recuento de leucocitos polimorfonucleares mayor o igual a $250 / \text{mm}^3$ y la positividad del cultivo del líquido ascítico; ascítis neutrocítica cuando el recuento de polimorfonucleares en líquido ascítico era mayor o igual a $500 / \text{mm}^3$ pero el cultivo era negativo; y bacteriascítis cuando el cultivo era positivo con un recuento de polimorfonucleares menor de $250 / \text{mm}^3$.

El diagnóstico de hemorragia digestiva por hipertensión portal fue realizado cuando la hemorragia era debida a varices esofagogástricas o gastropatía hipertensiva. La hemorragia por varices se estableció con certeza cuando en la endoscopia se visualizó la hemorragia activa (en chorro o en rezumado) de alguna variz o cuando en su superficie existían estigmas de hemostasia reciente (coágulo adherido o coagulo de fibrina de color blanco). También se consideró que las varices eran la causa de la hemorragia cuando, en presencia de sangre reciente en la cavidad gástrica, eran las únicas lesiones potencialmente sangrantes detectadas en la endoscopia. La hemorragia fue atribuida a la gastropatía de la hipertensión portal cuando en la gastroscopia la mucosa gástrica aparecía hiperémica y con numerosas manchas rojas redondas con hemorragia aguda (220).

De los 74 pacientes con cirrosis hepática, 66 (89,2%) habían presentado durante su evolución alguna complicación derivada de su enfermedad hepática. De ellos, 42 pacientes (56,8%) habían sufrido algún episodio de hemorragia digestiva alta originada por la hipertensión portal (varices esofagogástricas y/o gastropatía hipertensiva). Por ello, gran parte de estos pacientes estaban sometidos a programa de escleroterapia de varices. Respecto a la ascitis, 21 pacientes (28,4%) no habían presentado esta complicación, 45 (60,8%) en algún momento de su evolución acumularon líquido ascítico pero de fácil manejo médico con restricción hidrosalina con/sin diuréticos. Ocho pacientes (10,8%) presentaban una ascitis de difícil manejo, siendo incluso necesarias paracentesis evacuadoras periódicas para su control. Catorce pacientes (18,9%) habían sufrido episodios

previos de infección del líquido ascítico con criterios de peritonitis bacteriana espontánea (PBE), ascitis neutrocítica, o bacteriascitis (fig 4).

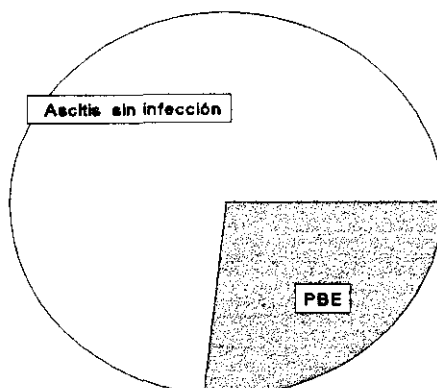


Figura 4. Antecedentes de infección del líquido ascítico en los pacientes estudiados.

En cuanto a la encefalopatía hepática, 49 pacientes (66,2%) nunca habían presentado esta complicación, 23 (31,1%) en alguna ocasión presentaron encefalopatía grado I o II, y 2 pacientes (2,7%) habían desarrollado encefalopatía grado III-IV. Muchos enfermos habían desarrollado varias complicaciones (Fig 5).

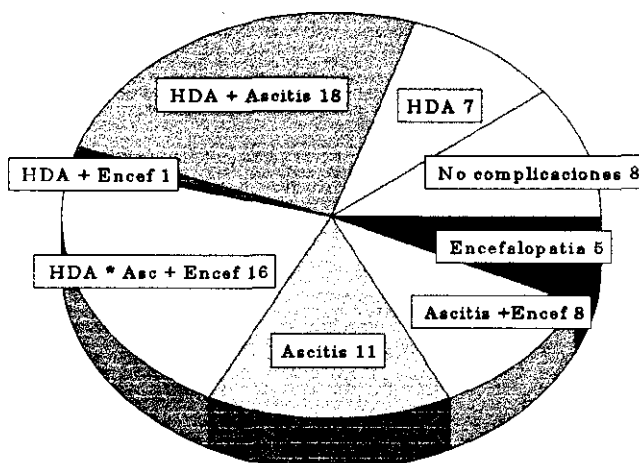


Figura 5. Complicaciones desarrolladas por los pacientes con cirrosis hepática estudiados.

Se excluyeron del estudio los pacientes que asociaban a la cirrosis hepática un hepatocarcinoma. Ninguno de los pacientes había presentado, en los 15 días previos, síntomas o signos de infección, insuficiencia renal, hemorragia digestiva, o diabetes mellitus. En los pacientes que habían sufrido sangrado digestivo previo por varices esofágicas y que estaban en programa de escleroterapia, la última sesión de esclerosis fue realizada al menos 1 mes antes de la extracción de sangre. Ninguno de los individuos estudiados había recibido en los últimos 3 meses medicamentos que pudieran interferir con la función de los neutrófilos (esteroides, benzodiacepinas, anti-H2).

Después de ser informados, todos los sujetos incluidos en el estudio dieron su consentimiento para participar en el mismo.

II. MÉTODOS

A. AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS

En todos los individuos estudiados, tras un periodo de reposo y ayuno de al menos 6 horas, se extrajeron 20 ml de sangre venosa. Los neutrófilos se aislaron a partir de esta sangre fresca, utilizando CPD (citrato fosfato dextrano) como anticoagulante, tal como describe Boyum (221) pero con una ligera modificación del método (222). Los eritrocitos se sedimentaron a temperatura ambiente con dextrano al 6% (peso/volumen P/V) en 0,15 M de cloruro sódico hasta una concentración final de dextrano del 1,3% (P/V). El sobrenadante rico en leucocitos se recogió y centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 5 ml de tampón fosfato salino sin calcio ni magnesio (PBS, Flow Lab U.K.) y se depositó sobre un volumen igual de Lymphoprep (sodium metrizoate 9,6% w/v), Ficoll 5,6% (w/v; Nycomed AS, Pharma, Torshov, Norway), centrifugándose a continuación a 1970 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sedimento obtenido fue resuspendido en 2 ml de PBS para proceder a la lisis de los eritrocitos contaminantes. Para ello se añadieron 6 ml de agua destilada preenfriada, se esperó 15 a 20 segundos y después se añadieron 2 ml de ClNa 3,6% (P/V) para restablecer la isotonicidad. La solución se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar la hemoglobina. Este paso de lisis/lavado se repitió tantas veces como fuera preciso hasta obtener una suspensión de neutrófilos libre de eritrocitos. La preparación final contenía más de un 95% de neutrófilos viables. La viabilidad celular se evaluó de forma

rutinaria antes y después de cada experimento por el ensayo de exclusión de azul tripán al 0,1% (p/v). Los neutrófilos fueron contabilizados en una cámara de New Baber, e inmediatamente fueron utilizados en los distintos ensayos.

B. NÚMERO Y TIPO DE EXPERIMENTOS (TABLA 2)

En un total de 163 experimentos realizados en 74 pacientes y 74 experimentos realizados en 34 controles se ha estudiado la producción de anión superóxido en neutrófilos tras ser estimulados con distintas sustancias: Formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), zimosan opsonizado, factor de necrosis tumoral alfa (TNF), fluoruro sódico (FNa), fluoruro de aluminio (FAI), el éster de forbol PMA, y el ionóforo del calcio A23187. Cada una de estas sustancias actúa a un nivel diferente en la vía de activación de la oxidasa (Fig 6).

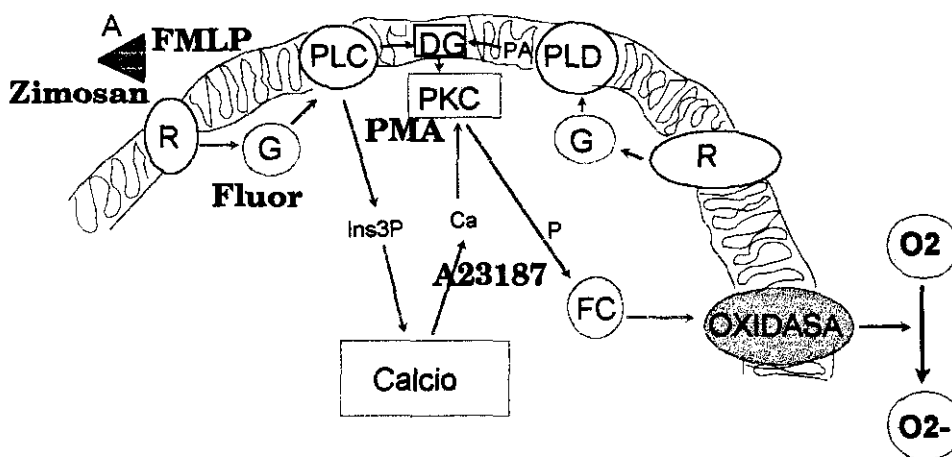


Figura 6. Vías de activación de la oxidasa en los neutrófilos

A: Agonista R: Receptor G: Proteína G PLC: Fosfolipasa C
 DG: Diacilglicerol PKC: Protein-cinasa-C PA: Ac Fosfatídico
 PLD: Fosfolipasa D Ins3P: Inositol-trifosfato P: Fosforilación
 FC: factores citosólicos

Así, en 42 pacientes cirróticos y en 19 controles los neutrófilos se estimularon con FMLP, que actúa a nivel de receptor; el zimosan opsonizado, otra sustancia que actúa a nivel de su receptor específico localizado en la membrana del neutrófilo, se empleó en otros 9 pacientes con cirrosis y en otros 4 controles. Además, del grupo inicial (pacientes y controles estimulados con FMLP), en cinco pacientes con cirrosis hepática y en dos controles se emplearon como estímulos TNF, FMLP, y se realizó una preincubación previa de los neutrófilos con TNF antes de ser estimulados con FMLP.

Del grupo estimulado con FMLP, en 20 cirróticos y 8 controles se utilizó también el FNa, que estimula la proteína G, y en 15 de estos pacientes y en 6 de los controles, se compararon los resultados de la estimulación con FNa y con los del FAl.

En los 22 cirróticos y 11 controles restantes del grupo estimulado con FMLP se empleó el estímulo con PMA, que estimula la proteína-kinasa-C. En 17 cirróticos y en 9 controles de estos sujetos, la estimulación se realizó simultáneamente con el FMLP y el PMA.

En un grupo distinto de 23 cirróticos y 11 controles, los neutrófilos fueron estimulados con el ionóforo de calcio, A23187, que actúa a nivel de los canales del calcio.

TABLA 2.

Estímulo	Cirrosis	Controles
FMLP	42	19
Zimosan opsonizado	9	4
TNF	5	2
FMLP + TNF	5	2
FNa	20	8
FAI	15	6
FMLP + FNa	5	2
A23187	23	11
PMA	22	11
FMLP + PMA	17	9

C. PREPARACIÓN Y OPSONIZACIÓN DEL ZIMOSAN

El zimosan se preparó siguiendo el método descrito por Bonney et al (223). Las partículas de zimosan se suspendieron en PBS (20 mg de zimosan por ml de PBS) y se hirvieron a 100°C durante 2 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y el sedimento final se resuspendió en PBS a una concentración de 20 mg/ml, almacenándose congelado a -20° C.

La opsonización del zimosan se obtuvo al añadir 1 ml de suero fresco por 10 mg de zimosan, incubarlo durante 20 minutos a 37° C en baño maría, para posteriormente centrifugarlo a 2800 rpm durante 10 minutos, resuspenderlo en ClNa 0,9% y lavarlo 4 veces con ClNa.

D. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DEL ANIÓN SUPEROXIDO

La liberación del anión superóxido (O_2^-) se midió por la reducción inhibida por superóxido dismutasa (SOD) del ferricitocromo c en un ensayo discontinuo (224).

Todos los ensayos o experimentos fueron realizados por duplicado. Las células se resuspendieron en tampon Hepes-Glucosa (150mM ClNa, 1,2mM Cl2Mg, 1,3mM Cl2Ca, 5,5mM glucosa, 10mM Hepes, a un pH de 7,5) a una concentración de 1×10^6 células por ml. Se añadió citocromo c a una concentración de 900 μ g/ml. Las células se preincubaron durante 5 minutos a 37°C con citocalasina b (5 μ g/ml). Añadiéndose entonces los diferentes estímulos, cada uno de los cuales, como hemos ya visto, actúa por distintas vías en la activación de la oxidasa:

- PMA (ester de forbol, que estimula la protein-kinasa-C) a dosis de 1 μ g/ml.
- FMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina, que actúa a nivel de receptor) a dosis de 10^{-7} M.
- Zimosan opsonizado a dosis de 1 mg/ml
- FNa a dosis de 20 mM.
- FAI formado al mezclar FNa 5 mM y ClAl 10 μ M
- El ionóforo de calcio A23187 a dosis de 10 μ M.
- TNF a dosis de 1 ng/ml (10 U/ ml)

Tras añadir los estímulos, se incubaron durante 15 minutos a 37°C en un baño con agitación constante. La reacción se paró colocando los tubos sobre hielo. Después se centrifugaron los tubos a 1600 rpm a 4°C durante 15 minutos y se recogieron los sobrenadantes que se leyeron en un espectrofotómetro a 550nm. Se hicieron controles en paralelo con SOD (10µg/ml) para asegurar que la reducción del citocromo c reducido fue debida únicamente al O₂⁻ generado durante la estimulación celular.

La formación de O₂⁻ se expresó en nmoles de citocromo c reducido durante 15 minutos y por millón de células (nmoles citocromo c / 15min / millón de células).

E. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de origen analítico. El dextrano, FNa, ClAl, PMA, FMLP, ionóforo de calcio A23187, zimosan, y citocalasina b, procedían de Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). El PMA, FMLP, ionóforo del calcio A23187, y citocalasina b fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para conseguir unas concentraciones de 1mg / 500µl, 10⁻³ M, 10mM y 10mg/ml, respectivamente.

El citocromo c, TNF-α y SOD se obtuvieron de Boehringer-Mannheim (Barcelona, España).

Todos los reactivos fueron etiquetados y almacenados a -20°C hasta su utilización.

MÉTODO ESTADÍSTICO

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

De las variables cuantitativas se ha consignado el tamaño (n), la media (x), la desviación típica (d) y los valores mínimo y máximo. De los caracteres cualitativos se ha reflejado la frecuencia absoluta y el porcentaje.

2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Se han realizado diferentes comparaciones intergrupos. Para ello se utilizó la t de Student o el análisis de la varianza (ANOVA). Si la diferencia era significativa se aplicó la prueba de Newman-Keuls. Entre las variables numéricas, se buscaron los coeficientes de correlación que salían significativos. Se ha considerado significativa la $p < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. ESTIMULACIÓN A NIVEL DE RECEPTOR

A. RESPUESTA A LOS ESTÍMULOS UTILIZADOS

Inicialmente pretendimos conocer si los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática son capaces de responder a estímulos produciendo radicales superóxidos esenciales para su función. Para ello, estudiamos por duplicado 42 pacientes cirróticos y 19 controles. Tras su aislamiento los neutrófilos fueron estimulados con **FMLP** (N-formil-metionil-fenilalanina, producto derivado de la síntesis proteica bacteriana) a dosis de 10^{-7} M. Esta sustancia actúa a nivel de un receptor específico localizado en la membrana de los neutrófilos. Hallamos que la producción de anión superóxido, expresada en nanomoles de citocromo c reducido durante 15 minutos y por millón de células, estaba descendida en los pacientes con cirrosis hepática en relación con los controles ($15 \pm 8,4$ frente a 25 ± 7 nmoles citocromo c reducido / 15 min / millón células, respectivamente) (Fig 7). Siendo la producción media de superóxido en los cirróticos de $58,8 \pm 25,3\%$ (rango: 14,8 - 100%), respecto a los controles en cada uno de los experimentos. Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre ambos grupos. De los 42 pacientes estudiados, solamente en 4 (9,52%) la respuesta fue normal .

Para descartar que la disminución de la respuesta al FMLP fuera originada por un defecto específico a este estímulo, estudiamos la respuesta de

los neutrófilos a otro estímulo diferente que actúa a través de la vía agonista-receptor. Para ello utilizamos el **zimosan osonizado** a dosis de 1 mg/ ml previamente preparado como se indica en material y métodos. La producción media de anión superóxido en respuesta a este estímulo fue en los pacientes cirróticos de $5,8 \pm 5,8$ nmoles de citocromo c reducido /15 minutos / millón de células, mientras que en los controles fue de $8,9 \pm 6,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células (Fig 7). Ello suponía que en los cirróticos la respuesta fue el $54,4 \pm 5,5\%$ de lo que ocurría en los controles. A pesar de ello, estas diferencias no alcanzaron significación estadística.

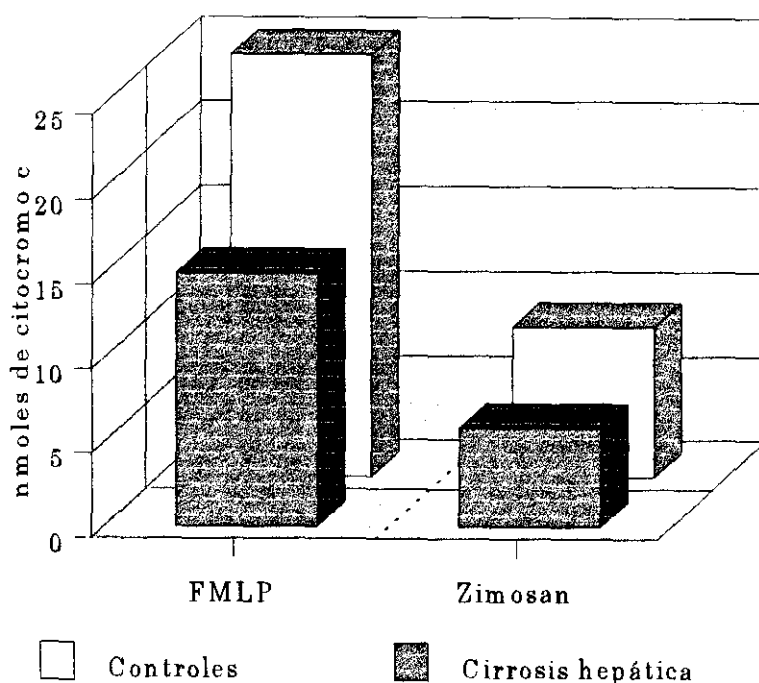


Fig 7. Producción de superóxido por los neutrófilos (nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células), al estimular a nivel de receptor con FMLP o zimosan.

Con el mismo fin estimulamos también los neutrófilos con el **factor de necrosis tumoral alfa (TNF)**. Esta citoquina eleva la respuesta celular a otros estímulos, tras aumentar la afinidad de estos a sus receptores. Por ello podríamos esperar, que la preincubación de los neutrófilos con TNF aumente de forma llamativa la respuesta de estas células al FMLP, que actúa, como hemos visto, vía receptor. Este estudio demostró que 1 ng/ ml (10 U/ml) de TNF-alfa no ejerce ningún efecto sobre la producción de superóxido en los neutrófilos, tanto de los controles como de los pacientes con cirrosis hepática. Sin embargo, cuando los neutrófilos fueron preincubados durante 30 minutos con TNF, la respuesta al FMLP aumentó en los controles ($18 \pm 8,2$ vs $26,6 \pm 13$ nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células con FMLP y FMLP previa preincubación con TNF, respectivamente) pero no en los neutrófilos de los pacientes cirróticos ($13,4 \pm 7,1$ vs $12,9 \pm 2,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células, respectivamente). (Fig 8). Estos resultados sugieren que la débil respuesta de los neutrófilos de los cirróticos a los estímulos que actúan a nivel de la membrana y de receptores no se debe a un defecto en la interacción de esos estimulantes con sus respectivos receptores.

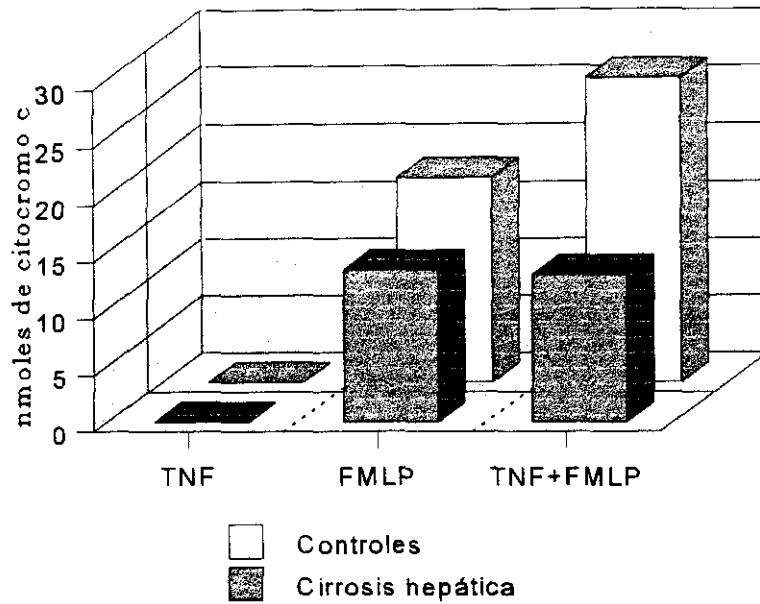


Fig 8. Producción de anión superóxido por los neutrófilos (nmol de citocromo c reducido /15 minutos / millón de células), después de su estimulación con TNF y/o FMLP.

B. CORRELACIÓN CLÍNICA.

Puesto que los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática presentaban una alteración en la capacidad de producción de anión superóxido ante los estímulos que actúan a través de su receptor, se estudió si esta alteración guardaba alguna relación con las características de la cirrosis hepática (Tablas 3 y 4).

TABLA 3. Características de los pacientes cirróticos estimulados con FMLP.

- Edad : $60 \pm 9,9$ años	
- Sexo: 28 varones y 14 mujeres	
- Etiología de la cirrosis:	
alcohol.....	22 pacientes
alcohol y VHC.....	9 pacientes
Virus C.....	7 pacientes
VHB.....	2 pacientes
criptogénica.....	1 paciente
autoinmune.....	1 paciente
- Insuficiencia hepática:	
grado A.....	5 pacientes
grado B.....	10 pacientes
y grado C.....	27 pacientes
- Ascitis: No.....	2 pacientes
Ascitis de fácil manejo.....	34 pacientes
Ascitis de difícil manejo.....	6 pacientes
- Encefalopatía: No.....	20 pacientes
Sí.....	22 pacientes
- Antecedentes de infección del líquido ascítico:	9 pacientes
- Antecedentes de hemorragia digestiva por hipertensión portal:	32 pacientes
- Parámetros bioquímicos:	
GOT $87,9 \pm 42$ U/l	
GPT $78,6 \pm 48,2$ U/l	
GGT $64 \pm 47,4$ U/l	
FA $147,2 \pm 79,1$ U/l	
BT $2,9 \pm 2$ mg/dl	
Albúmina $2,9 \pm 0,6$ g/dl	
Actividad de protrombina $58,8 \pm 19\%$	

TABLA 4. Características de los pacientes cirróticos estimulados con zimosan

- Edad: 58,9 ±6,2	
- Sexo: 4 varones y 5 mujeres	
- Etiología de la cirrosis: alcohol y VHC.....	5 pacientes
VHC.....	3 pacientes
VHB.....	1 paciente
- Insuficiencia hepática: grado A.....	5 pacientes
grado B.....	3 pacientes
y grado C.....	1 paciente
- Ascitis: No.....	6 pacientes
ascitis de fácil manejo.....	2 pacientes
y ascitis de difícil control.....	1 paciente
- Encefalopatía: No.....	8 pacientes
Sí.....	1 paciente
- Antecedentes de infección del líquido ascítico.....	1 paciente
- Antecedentes de hemorragia digestiva por hipertensión portal: 3 pacientes	
- Parámetros bioquímicos: GOT 75,5±28,1 U/l	
GPT 92,1±37,2 U/l	
GGT 58,4±26,8 U/l	
FA 134,3±25,8 U/l	
BT 1,6±0,7 mg/dl	
Albúmina 3,6±0,3 g/dl	
Actividad de protrombina 67,9±9,4%	

El estudio de la producción de superóxido por los neutrófilos en respuesta al FMLP no se correlacionó estadísticamente con el grado de insuficiencia hepatocelular de los pacientes con cirrosis hepática. En efecto, esta producción estuvo reducida significativamente en todos los cirróticos con independencia de su grado de insuficiencia hepatocelular. Mientras que el estímulo de los neutrófilos de controles con FMLP se traduce en una producción de superóxido de 25 ± 7 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, los de cirróticos en estadio A producen $12,5 \pm 8,7$ ($49,4 \pm 28,1\%$ respecto a los controles) nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células; los de cirróticos B con $12,3 \pm 3,2$ ($60,3 \pm 19,7\%$) nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células y los de cirróticos C $16,1 \pm 9$ ($60,1 \pm 26,3\%$) nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células. Las diferencias halladas entre los distintos grados funcionales, no eran estadísticamente significativas (Fig 9).

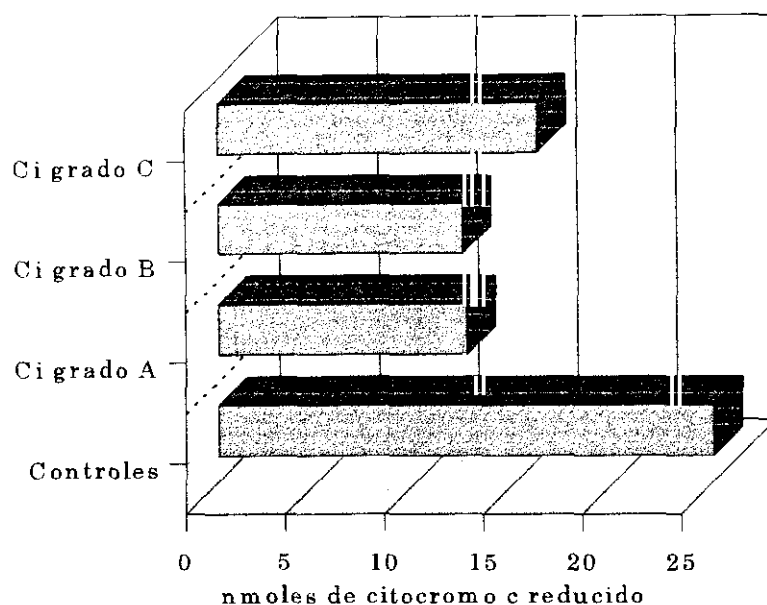


Fig 9. Producción de superóxido (nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) por los neutrófilos estimulados con FMLP, en individuos sanos controles y pacientes con cirrosis hepática, en diferentes grados de insuficiencia hepática (Ci: cirrosis hepática).

Sin embargo, la respuesta de los neutrófilos al zimosan opsonizado se deterioró progresivamente a medida que procedían de cirróticos con peor función hepática. En los cirróticos de grado A, la producción de superóxido no se diferenciaba de la hallada en los controles (controles: 8,9 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células; grado A: 8,7±5,8 (66,8±23,5%) nmoles de citocromo c reducido/ 15 minutos / millón de células). En los del grado B 2,1 ± 3,2 (41,3±42%) nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células; y en el de grado C 1,03 (20%). Aunque tomando en consideración el valor absoluto de la producción de superóxido en cada uno de los

experimentos no observamos diferencias significativas, al comparar el porcentaje de respuesta de cada paciente respecto a los controles sí encontramos diferencias que alcanzaron significación estadística ($p < 0,05$).

Analizando cada uno de los parámetros que constituyen la clasificación de Child-Pugh observamos los siguientes datos:

- Ascitis: Cuando los neutrófilos fueron estimulados con FMLP la producción de superóxido en los pacientes con ascitis fue de $14,8 \pm 8,1$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($59,2 \pm 24,5\%$), mientras que en aquellos que no presentaban esta complicación fue de $13,9 \pm 9,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($52 \pm 37,2\%$). Estas diferencias no eran significativas. Cuando se empleó el zimosan opsonizado como estímulo los resultados fueron diferentes. La producción de anión superóxido fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los pacientes que aún no habían desarrollado ascitis (10 ± 9 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($72,3 \pm 27,1\%$)), que en los que sí la presentaban ($0,6 \pm 0,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($14,7 \pm 9,2\%$)).

- Encefalopatía: En los pacientes con antecedentes de encefalopatía, la producción de anión superóxido tras el FMLP ($14 \pm 7,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($58,2 \pm 25,4\%$)) fue ligeramente más baja que en los cirróticos sin esos antecedentes ($15,5 \pm 8,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($59,5 \pm 25,2\%$)), pero esas diferencias tampoco alcanzaron la significación estadística.

Las diferencias fueron más claras cuando se utilizó zimosan como estímulo de los neutrófilos, sin embargo, el bajo número de pacientes estudiados que habían tenido encefalopatía impiden asegurar que exista una relación entre la encefalopatía y la baja respuesta de los neutrófilos al zimosan. Así, en ausencia de encefalopatía la producción de superóxido fue de $7,5 \pm 8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($57,2 \pm 34$ %) en los pacientes sin encefalopatía, y en el único con encefalopatía de 1,03 nmoles.de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células (20%).

- Albúmina, bilirrubina y actividad de protrombina: No se observó ninguna correlación significativa entre los niveles de estos parámetros y la producción de superóxido tras el estímulo con FMLP, siendo los coeficientes de correlación: -0,18, -0,03, y -0,01, respectivamente. Tampoco observamos correlaciones significativas cuando empleamos el zimosan como estimulante, aunque fueron positivas para la albúmina y la actividad de protrombina (0,48 y 0,14, respectivamente) y negativo para la bilirrubina (-0,25).

En relación con la etiología de la cirrosis hepática tampoco encontramos diferencias estadísticas en la cuantía de producción de superóxido en respuesta al FMLP. En todos los grupos etiológicos esta respuesta estuvo igualmente descendida, excepto en el paciente con cirrosis autoinmune. Mientras que en los controles la producción de anión superóxido fue de $24,97 \pm 7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, en los alcohólicos estaba descendida al $55,5 \pm 24,6$ %, siendo la producción media de superóxido de $13,6 \pm$

6,5 nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células. En los pacientes con cirrosis y serología positiva para el virus de la hepatitis C estaba descendida a $10 \pm 3,5$ nmoles citocromo c reducido / 15 min/ millón de células, ($42,1 \pm 13,5\%$). Cuando ambos factores etiológicos, alcohol y virus C, estaban presentes la respuesta estaba también disminuida , $19,2 \pm 8,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($75,9 \pm 17,9\%$). Del mismo modo respondieron los pacientes con serología positiva para el virus B o en el que el estudio etiológico fue negativo , siendo los porcentajes de respuesta respecto a los controles de $62,7 \pm 37,3\%$, y $46,7\%$, respectivamente ($18,1 \pm 13,5$ y $8,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células, respectivamente).

El mismo defecto detectamos cuando los neutrófilos fueron estimulados con zimosan, pero tampoco en este caso hallamos diferencias entre los diferentes grupos etiológicos. A pesar de ello, en los pacientes con cirrosis por VHC y etanol la respuesta fue superior que en pacientes con cirrosis por el VHC ($10,5 \pm 9,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, $72,4 \pm 32,8\%$, y $2,8 \pm 2,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, $32 \pm 30,8\%$, respectivamente).

Tampoco hubo diferencias según que existiera o no infección previa del líquido ascítico. Así, por ejemplo, tras la estimulación con FMLP la producción de superóxido en los 9 pacientes que habían presentado PBE fue de $15,6 \pm 6,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos /millón de células ($65,3 \pm 25,2\%$) frente a los $14,5 \pm 8,5$ nmoles de citocromo c reducido /15 minutos

/millón de células ($57,1 \pm 25,1\%$) producidos por los pacientes sin infecciones previas. En el grupo de pacientes estimulados con zimosan solamente uno había desarrollado infección del líquido ascítico, y el descenso en la producción de superóxido fue evidente: $1,03$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($11,5\%$).

Tampoco el antecedente o no de hemorragia digestiva por hipertensión portal se relacionó con la alteración de los neutrófilos para responder al FMLP ($16,3 \pm 14$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, $56,1 \pm 25,3\%$, frente a $16,5 \pm 8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, $67,6 \pm 23,4\%$, respectivamente). Con zimosan observamos cambios similares: $6 \pm 9,3$ ($39,3 \pm 36\%$) vs $8,4 \pm 2,3$ ($80,7 \pm 17,2\%$) nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células.

Los niveles de enzimas de colestasis (GGT y FA) tampoco demostraron correlación con la respuesta de los neutrófilos al FMLP ($0,12$ y $0,25$, respectivamente). Por el contrario, la correlación con las transaminasas (GOT y GPT) fue significativamente positiva con coeficientes de correlación de $0,41$ y $0,37$ ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) cuando consideramos los valores absolutos de la producción de superóxido, pero no cuando consideramos los porcentajes, respecto a los correspondientes controles ($0,27$ y $0,25$). Tampoco observamos correlaciones significativas cuando utilizamos el zimosan como estímulo.

II. ESTIMULACIÓN A NIVEL DE LA PROTEÍNA G

A. ESTÍMULOS UTILIZADOS.

El siguiente paso lo dedicamos a explorar la proteína G. Para ello utilizamos el fluoruro sódico (FNa) y el fluoruro de aluminio (FAl).

Cuando estimulamos los neutrófilos con FNa a dosis de 20 mM, observamos que la respuesta de los pacientes cirróticos estaba descendida en relación a la obtenida en los controles ($11,1 \pm 4,6$ frente a $22,6 \pm 7,1$ nmoles de citocromo c reducido /15 min /millón de células, respectivamente, $p < 0,001$). La producción media global de anión superóxido, en porcentaje respecto a cada control, estaba reducida al $50,8 \pm 22,5\%$, siendo la distribución por rangos de frecuencia la siguiente:

Rango de porcentaje	Número de pacientes (%)
0 - 25 %	2 (10%)
26 - 50 %	7 (35%)
51 - 75 %	7 (35%)
76 - 100 %	4 (20%)

Dado que el FNa requiere del aluminio como cofactor para la activar la función de los neutrófilos, en 15 pacientes con cirrosis hepática y 6 controles comparamos la respuesta a la estimulación con FNa a dosis de 20 mM con la que sigue a la estimulación con FAl (formado por la unión de FNa 5mM y cloruro de

aluminio (AlCl_3) a dosis de $10 \mu\text{M}$). También estos experimentos nos mostraron que la respuesta estaba disminuida en los pacientes cirróticos frente a los controles ($11,5 \pm 5,8$ vs $18,5 \pm 5,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células, respectivamente, $p < 0,05$). En porcentaje, la producción del anión superóxido estaba reducida al $61 \pm 27,8$ % en relación con los controles. En la distribución por frecuencias ningún paciente tenía una reducción tan marcada como para encontrarse entre 0 y 25%; en cambio 7 (46,7%) pacientes presentaban una reducción entre el 26 y el 50% de los controles; 3 (20%) entre el 51 y el 75% y 5 (33,3%) mayor del 76% de la producción total de superóxido respecto a los controles. Dos pacientes habían producido igual cantidad de anión superóxido que los pacientes controles en cada uno de los experimentos.

Al comparar la respuesta de este grupo de pacientes a los estímulos con FNa y FAl, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, ya que la media de producción de radical superóxido fue de $11,4 \pm 5,3$ y $11,5 \pm 5,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células, respectivamente, y los porcentajes respecto a los controles fueron de $54,5 \pm 23,5$ % y $61 \pm 27,8$ %, respectivamente (Fig 10).

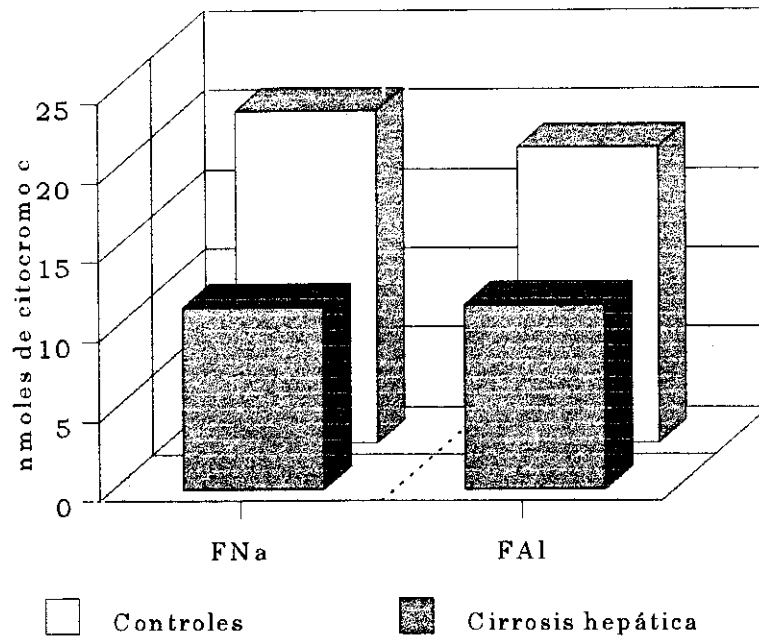


Fig 10. Producción de superóxido por los neutrófilos (nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) tras la estimulación a nivel de la proteína G con FNa y FAI.

Se trataba de pacientes en quienes se había realizado también el estímulo con FMLP. La respuesta obtenida a estos dos estímulos fue $11,1 \pm 6$ ($50,8 \pm 23,1\%$) y $11 \pm 5,3$ ($44 \pm 17,6\%$) nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, respectivamente. La respuesta a sus respectivos controles fue de $22,6 \pm 7,6$ y $25,3 \pm 7,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células tras el estímulo con FNa o FMLP, respectivamente. Estos resultados indican que la respuesta de los neutrófilos de cirróticos era igualmente anormal tras cualquiera de ambos estímulos. Además, en 5 pacientes cirróticos y en 2 controles los neutrófilos fueron estimulados simultáneamente con FMLP y FNa, sin que con ello lográramos mejorar la producción de superóxido por los

neutrófilos de cirróticos (Fig 11).

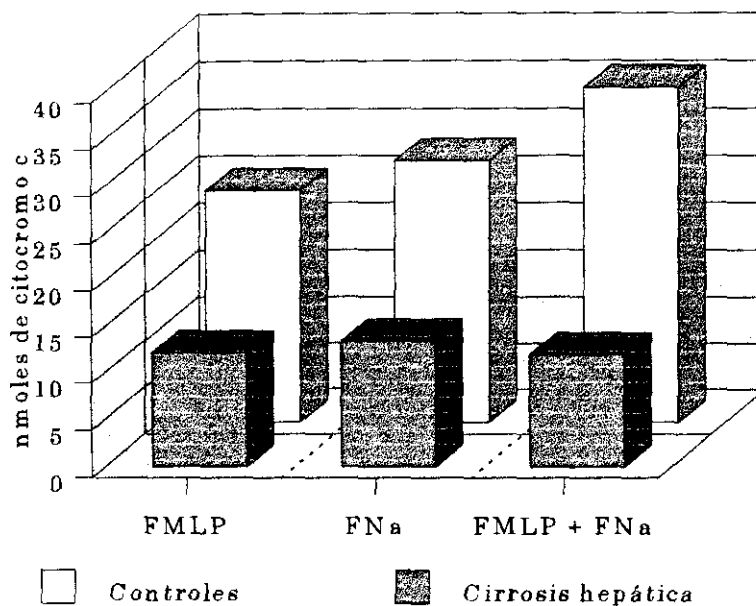


Fig 11. Comparación en la producción de superóxido (nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) al estimular a nivel de receptor y/o proteína G.

B. CORRELACIÓN CLÍNICA

Al igual que encontramos cuando los neutrófilos fueron estimulados a nivel de receptor, también hallamos una profunda alteración en la producción de superóxido al estimular los neutrófilos a nivel de la proteína G. Por ello quisimos saber si ese trastorno tenía alguna relación con las características de la cirrosis hepática. (Tablas 5 y 6).

TABLA 5. Características de los cirróticos estimulados con FNa.

- Edad:	60,5 ± 10 años
- Sexo:	13 varones y 7 mujeres
- Etiología de la cirrosis:	Alcohol..... 12 pacientes
	VHC..... 5 pacientes
	Alcohol y VHC..... 3 pacientes
- Insuficiencia hepática:	grado A..... 3 pacientes
	grado B..... 5 pacientes
	grado C..... 12 pacientes
- Ascitis:	No..... 1 paciente
	leve..... 18 pacientes
	difícil manejo..... 1 paciente
- Encefalopatía:	No..... 10 pacientes
	grado I-II..... 10 pacientes
- Antecedentes de infección del líquido ascítico.....	4 pacientes
- Antecedentes de hemorragia por hipertensión portal.....	17 pacientes
- Parámetros bioquímicos:	GOT 78,8±33,3 U/l
	GPT 74,5±38,8 U/l
	GGT 52,3±37,8 U/l
	FA 136,1±70 U/L
	BT 2,33±1 mg/dl
	Albúmina 3±0,7 g/dl
	Actividad de protrombina 60,6±14,7%

TABLA 6. Características de los pacientes cirróticos estimulados con FAI

- Edad: 60,7±10,5 años	
- Sexo: 10 varones y 5 mujeres	
- Etiología de la cirrosis: Alcohol.....	8 pacientes
VHC.....	4 pacientes
alcohol y VHC.....	3 pacientes
- Insuficiencia hepática: grado A.....	3 pacientes
grado B.....	3 pacientes
grado C.....	9 pacientes
- Ascitis: No.....	1 paciente
de fácil control.....	14 pacientes
- Encefalopatía: No.....	8 pacientes
grado I-II.....	7 pacientes
- Antecedentes de infección del líquido ascítico.....	3 pacientes
- Antecedentes de hemorragia digestiva por hipertensión portal: 13 pacientes	
- Parámetros bioquímicos: GOT 87,9±29,9 U/l	
GPT 86,2±34,5 U/l	
GGT 54,6±41,5 U/l	
FA 118,7±25,9 U/l	
BT 2,43±1,1 mg/dl	
Albúmina 3,1±0,7 g/dl	
Actividad de protrombina 63,1±15,5%	

Para determinar si este defecto en la producción de anión superóxido tras el estímulo de los neutrófilos con **FNa** estaba en relación con el grado funcional de la enfermedad hepática, realizamos comparaciones entre los diferentes grupos de cirróticos.

Mediante el análisis de la varianza y tomando en consideración el valor absoluto de la producción de anión superóxido en cada uno de los experimentos, observamos que la respuesta era menor cuanto más alta era la puntuación en la clasificación de Child-Pugh. En efecto, la producción media de anión superóxido fue de $16,9 \pm 1,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 min / millón de células en los cirróticos con grado funcional A; de $11,7 \pm 1,4$ en los que tenían un grado funcional B; y de $10,5 \pm 2$ para los que estaban en grado funcional C. A pesar de ello, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Sin embargo, al comparar el porcentaje de respuesta de cada paciente con respecto a los controles, sí pudimos encontrar diferencias, que alcanzaban la significación estadística. En los pacientes con cirrosis en grado funcional A, el porcentaje de respuesta fue el $84,3 \pm 8,7$ % de la encontrada en sus respectivos controles. En los pacientes con grado funcional B la respuesta descendió al $54,6 \pm 23,5$ % y en los pacientes con grado C el porcentaje al $40,8 \pm 16,9$ %. Al aplicar la prueba de Newman-Keuls determinamos que las diferencias eran estadísticamente significativas entre los grados A y C, y entre los grados A y B, pero no entre los grados funcionales B y C. Así pues, este análisis demuestra que existe un defecto en la función de los neutrófilos que es tanto más llamativo

cuanto más avanzado es el grado de insuficiencia funcional hepática (Fig 12).

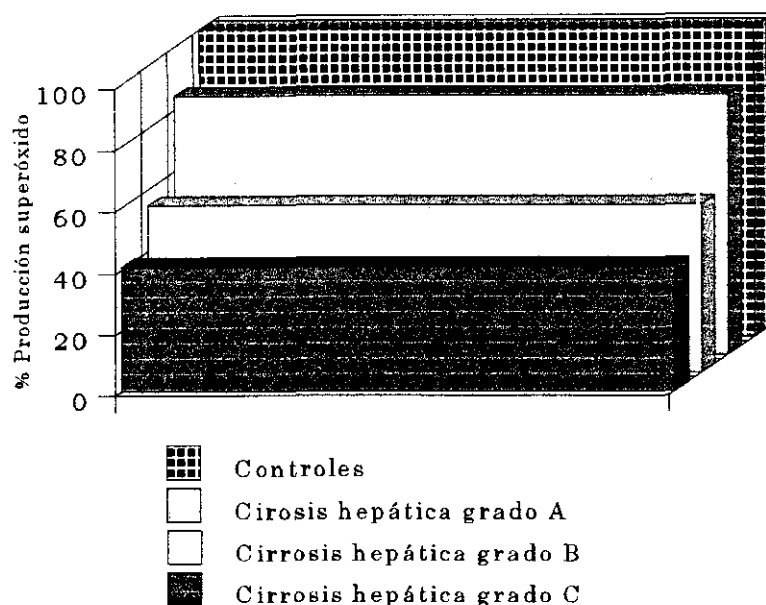


Fig 12. Producción de superóxido por los neutrófilos, estimulados con FNa en individuos sanos controles y pacientes con cirrosis hepática en diferentes grados de insuficiencia hepática.

En la valoración por separado de cada una de las variables que influyen en el grado funcional hepático hallamos los siguientes resultados:

- Ascitis: Aquellos pacientes que no habían tenido nunca ascitis presentaron una disminución en la producción de superóxido al $84,3 \pm 8,7 \%$ ($16,9 \pm 2,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células), mientras que los que presentaban esta complicación esta producción era sólo de $44,8 \pm 19,4 \%$ ($10,9 \pm 6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células). Estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

- Encefalopatía: Los pacientes con cirrosis sin antecedentes de encefalopatía respondieron con mayor producción de superóxido que aquellos otros con ese antecedente. En efecto, $59,1 \pm 25,1\%$ ($14,1 \pm 6,1$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) en el primer grupo frente a $42,5 \pm 18,6\%$ ($9,4 \pm 5,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células), en el segundo. Estas diferencias, sin embargo, no eran significativas.

- Albúmina: Observamos una correlación positiva ($p < 0.05$) entre los niveles de albúmina y la capacidad de los neutrófilos para responder a estos estímulos. El coeficiente de correlación entre ambas variables fue de 0,59 (Fig 13).

- Actividad de protrombina: También observamos que existía una correlación positiva similar ($r: 0,52$) entre la actividad de protrombina y la respuesta de los neutrófilos (Fig 14).

- Bilirrubina: Por último, la correlación entre la respuesta de los neutrófilos y las tasas de bilirrubina sérica fue negativa ($r: - 0,54$) (Fig 15).

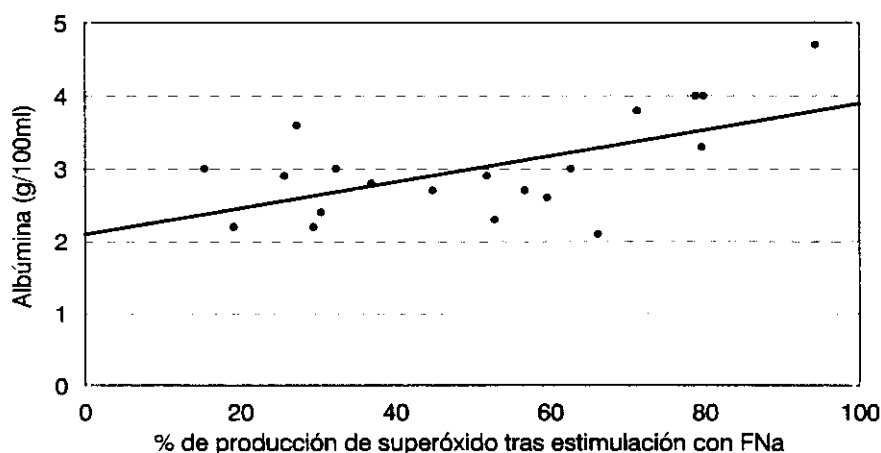


Figura 13. Correlación entre la producción de superóxido y albúmina sérica en pacientes con cirrosis hepática

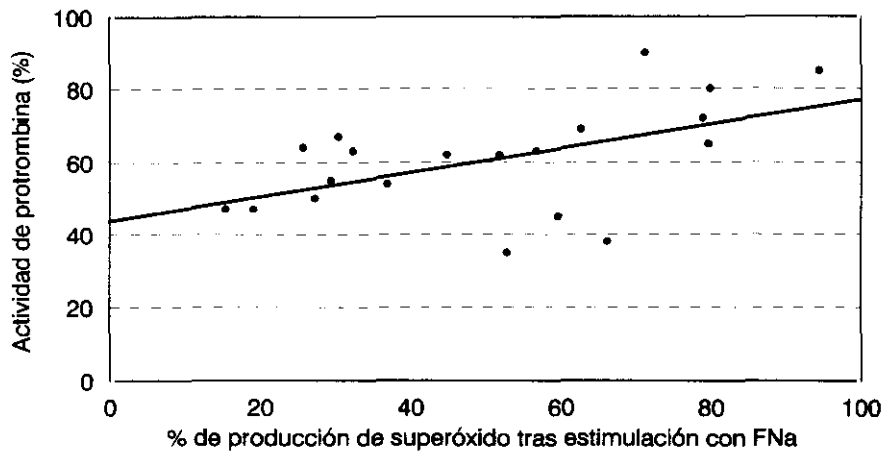


Figura 14. Correlación entre la producción de superóxido y la actividad de protrombina en pacientes con cirrosis hepática.

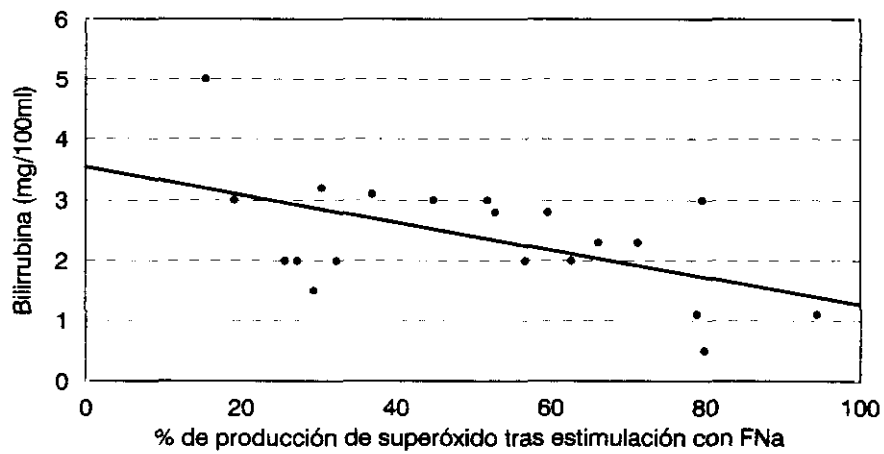


Figura 15. Correlación entre la producción de superóxido y la bilirrubina sérica en pacientes con cirrosis hepática

Al analizar otras características de la cirrosis hepática, no comprobamos que la **etiología** de la enfermedad tuviera ninguna influencia sobre la capacidad de respuesta de los neutrófilos. En los pacientes con cirrosis asociada al alcohol, la producción de anión superóxido fue tan solo de $9,8 \pm 4,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($47,7 \pm 25,1\%$ respecto a sus controles). En los pacientes con VHC positivo esta fue de $14,3 \pm 8,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($42,4 \pm 13\%$) y en los pacientes con etilismo y VHC fue de $15,6 \pm 4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($76,9 \pm 4,9\%$). No obstante, observamos que, al igual que sucedió cuando utilizábamos un estímulo que actúa a nivel de receptor (FMLP o zimosan), en los pacientes con cirrosis relacionada con alcohol y VHC la producción de superóxido fue mayor que en aquellos otros en los que la etiología era unifactorial (Fig 16).

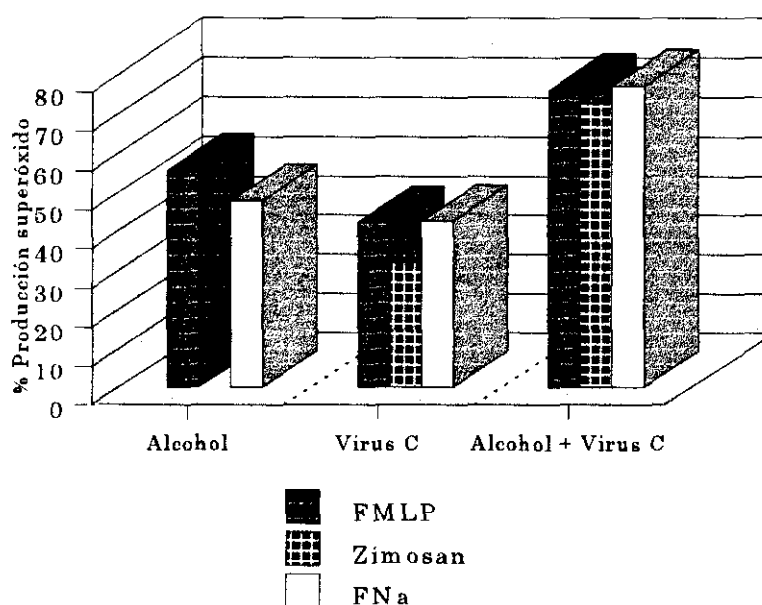


Fig 16. Producción de superóxido en pacientes con cirrosis hepática de etiología etílica y/o VHC.

Los neutrófilos de los pacientes que habían sufrido una infección del líquido ascítico (peritonitis bacteriana, ascitis neutrofílica, o bacteriascitis) mostraron una respuesta más deficitaria que aquellos que no se habían infectado. En efecto, la producción de superóxido fue en los primeros de $8,6 \pm 6,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($39,4 \pm 25,8\%$ respecto a sus controles) mientras que en los últimos fue de $12,6 \pm 5,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($53,6 \pm 22,3\%$). Sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los pacientes que habían presentado hemorragia digestiva por hipertensión portal y aquellos otros sin este antecedente. No obstante, había cierta tendencia a una menor producción de anión superóxido en los primeros [$11,3 \pm 6,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($49,1 \pm 21,9\%$ con respecto a sus controles)] que en los últimos [$14,6 \pm 4,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($60,2 \pm 32,6\%$)].

Entre los parámetros bioquímicos considerados, además de los ya expuestos, encontramos una correlación positiva significativa ($r: 0,45; p < 0,05$) sólo entre el porcentaje de respuesta de los neutrófilos y los niveles de GGT (Fig 17). Con el resto de los parámetros analizados (GOT, GPT, FA), así como con la edad y el sexo de los pacientes, no hallamos correlación significativa alguna.

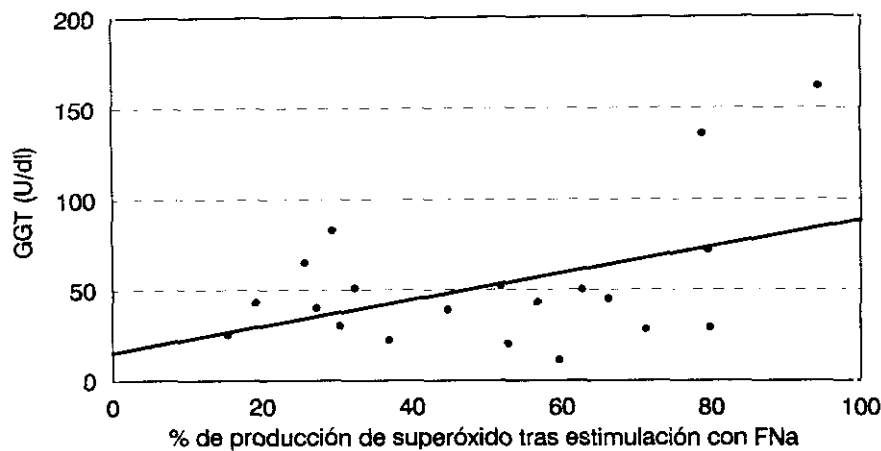


Figura 17. Correlación entre la producción de superóxido y GGT en pacientes con cirrosis hepática

Quando comparamos la respuesta de los neutrófilos al FAI entre los diferentes grupos de sujetos observamos que, al igual que sucedió al utilizar el FNa como estímulo, la producción de anión superóxido era menor cuanto mayor era el grado de insuficiencia hepatocelular existente. No obstante, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Los pacientes con grado funcional A tuvieron una producción de superóxido de 13 ± 6 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, lo que representaba el $66,1 \pm 19$ % de sus propios controles. En los pacientes con grado funcional B, esta producción fue de $12,7 \pm 8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($61,5 \pm 36,2$ %) y los del grado funcional C de $10,6 \pm 5,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($59,1 \pm 30,4$ %).

Al analizar cada uno de los componentes del grado funcional de Child-Pugh hallamos los siguientes resultados:

- En los pacientes que no habían desarrollado nunca ascitis, la producción de superóxido fue mayor [13 ± 6 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células (66,1 \pm 19 % respecto a sus controles)] que en aquellos otros que sí habían presentado ascitis [$11,1 \pm 6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células (59,7 \pm 30,2 %)], pero estas diferencias no eran significativas.
- Los pacientes que habían presentado encefalopatía porto-sistémica respondieron algo menos al estímulo con FAI que aquellos otros que no la habían desarrollado [$11,6 \pm 6,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células (66,9 \pm 30 %) vs $11,4 \pm 6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células (55,8 \pm 26,7 %)]. Sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas.
- No observamos ninguna correlación que fuera significativa entre la producción de anión superóxido y los niveles séricos de albúmina (r: 0,02) o de actividad de protrombina (r: 0,15).
- Por último, existía una correlación negativa, no significativa, entre la producción de superóxido y los niveles séricos de bilirrubina (r: -0,25).

Tampoco encontramos que la etiología de la cirrosis tuviera alguna relación con la respuesta de los neutrófilos al FAI, si bien de nuevo observamos una mayor producción de superóxido en pacientes con cirrosis alcohólica y virus C. Así, la respuesta al FAI en los pacientes con cirrosis etílica

fue de $9,9 \pm 4,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($61,6 \pm 26,1$ % respecto a sus controles), de $10,8 \pm 7,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($47,9 \pm 35$ %) en los infectados por VHC y de $16,7 \pm 6,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($76,8 \pm 21,9$ %) en los que existían ambas etiologías.

Aunque los pacientes que habían presentado hemorragia digestiva por hipertensión portal tuvieron una menor producción de anión superóxido [$10,9 \pm 5,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($57,1 \pm 27,9$ %)] que los que no presentaron esta complicación [$15,5 \pm 4,1$ nmoles; $86,2 \pm 8,8$ %)], las diferencias no fueron significativas.

Al comparar la respuesta de los neutrófilos de aquellos pacientes que habían sufrido algún episodio de infección del líquido ascítico con la de los que carecían de esa complicación, observamos que las diferencias no eran estadísticamente significativas. Así, la producción de superóxido en pacientes con episodios previos de infección fue de $12,1 \pm 5,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($74,6 \pm 36,4$ % respecto a sus controles) y en pacientes sin episodios previos de $11,4 \pm 6,1$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($57,6 \pm 26,1$ %).

Tampoco encontramos correlaciones significativas con otros parámetros bioquímicos considerados [GGT (r:0,11), FA (r:0,14), GOT (r:-0,36), GPT (r:-0,2)] ni con la edad de los pacientes (r:0,31).

III. ESTIMULACIÓN A NIVEL DE LOS CANALES DEL

CALCIO

A. RESPUESTA A LOS ESTÍMULOS UTILIZADOS

Como hemos visto hasta ahora los neutrófilos de los pacientes con cirrosis tenían una respuesta reducida cuando eran estimulados a nivel de la membrana, ya sea de los receptores o de la proteína G. Este defecto pudiera deberse bien a nivel de los primeros pasos que llevan a la activación de la oxidasa o bien en niveles más posteriores y próximos a la NADPH-oxidasa (ver figura 6). Con el fin de explorar las vías de transmisión de señal defectuosas en esos enfermos, utilizamos estímulos que no precisaran de receptores o de la proteína G para activar la oxidasa.

Inicialmente empleamos el ionóforo de calcio, A23187, a dosis de 10 μ M, el cual abre los canales del calcio permite la entrada de calcio en las células. De esta forma estudiamos 23 pacientes y 11 controles. La producción de anión superóxido por los primeros fue de $9,1 \pm 2,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células y de $9,4 \pm 2,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células en los controles (Figura 18). Estos datos suponen que la producción de superóxido fue en los pacientes cirróticos del $96,6 \pm 5,3$ % de los controles, con un rango que osciló entre el 81,7 % y el 100%. Como vemos, la respuesta de los neutrófilos al ionóforo de calcio no se diferenciaba significativamente de la normalidad.

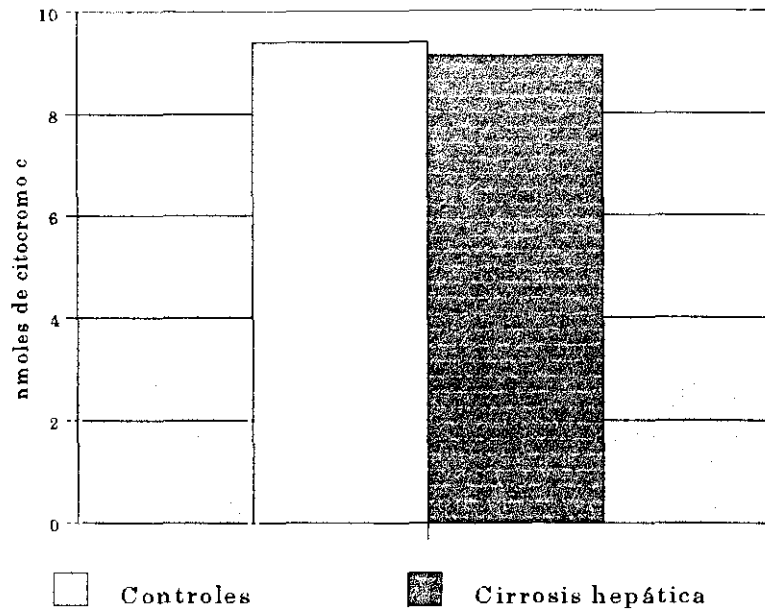


Fig 18. Producción de superóxido (nmol de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) tras su estimulación con A23187.

B. CORRELACIÓN CLÍNICA

Aunque en el grupo completo de pacientes cirróticos no observamos ninguna alteración en la respuesta al estímulo con el ionóforo de calcio, A23187, estudiamos si en estos pacientes pudiera existir alguna característica que estuviera en relación con una peor respuesta de los neutrófilos al ionóforo (Tabla 7).

TABLA 7. Características de los pacientes cirróticos estimulados con A23187.

- Edad: 59 ± 10,8 años
 - Sexo: 16 varones y 7 mujeres
 - Etiología de la cirrosis: Alcohol..... 12 pacientes
VHC..... 3 pacientes
alcohol y VHC..... 4 pacientes
VHB..... 2 pacientes
Desconocida..... 2 pacientes
 - Insuficiencia hepática: grado A..... 10 pacientes
grado B..... 7 pacientes
y grado C..... 6 pacientes
 - Ascitis: No..... 13 pacientes
ascitis de fácil control..... 8 pacientes
ascitis de difícil manejo..... 2 pacientes
 - Encefalopatía: No..... 21 pacientes
sí..... 2 pacientes
 - Antecedentes de infección del líquido ascítico..... 5 pacientes
 - Antecedentes de hemorragia digestiva por hipertensión portal: 7 pacientes
 - Parámetros bioquímicos: GOT 110,9±45,2 U/l
GPT 104,3±45,9 U/l
GGT 66,5±30,1 U/l
FA 120,7±30,4 U/l
BT 2±1 mg/dl
Albúmina 3,2±0,6 g/dl
Actividad de protrombina 66,4±15,7%
-

Al comparar entre sí la producción de anión superóxido en los tres grados de insuficiencia hepatocelular, encontramos que no existían diferencias significativas, es decir, en todos los casos era normal. En efecto, los pacientes con grado A de función hepática tuvieron una producción de superóxido de $9,1 \pm 2,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($95,1 \pm 6,3$ % respecto a los controles), los de grado B, de $9,5 \pm 2,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($97,1 \pm 5,8$ %), y los de grado C, de $8,8 \pm 1,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($98,4 \pm 2$ %). Las diferencias entre los distintos grupos no eran significativas (Fig 19).

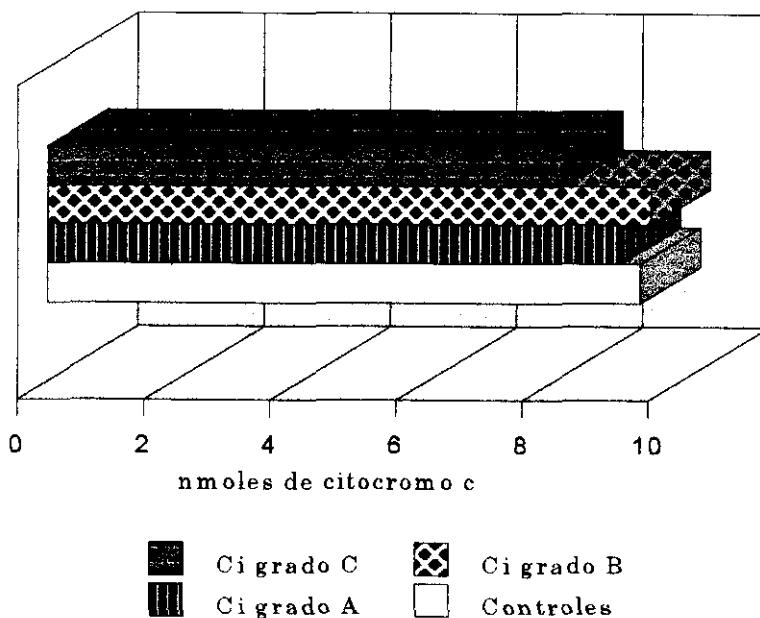


Fig 19. Producción de superóxido (nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) con A23187 en pacientes con cirrosis hepática en diferentes grados de insuficiencia hepática. Ci=cirrosis hepática.

Al valorar cada uno de los parámetros incluidos en el grado funcional hepático tampoco observamos que la respuesta al A23187 estuviera en relación con cualquiera de ellos. Así, los pacientes con ascitis tuvieron una producción de anión superóxido de $9,1 \pm 2,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($98,5 \pm 2$ % en relación con sus controles), mientras que los que no la tenían respondieron con $9,8 \pm 2,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($95,1 \pm 6,6$ %), pero esta diferencia no era significativa.

Los dos pacientes con antecedentes de encefalopatía hepática respondieron al ionóforo de forma idéntica a los controles (100%) y los que carecían de ellos ligeramente menos [$96,2 \pm 5,5$ %], ($9,6 \pm 2,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células)].

El cálculo de los coeficientes de correlación entre la respuesta de los neutrófilos al estímulo con A23187 y los niveles de albúmina ($r: 0,16$), bilirrubina total ($r: 0,06$), y actividad de protrombina ($r: -0,12$), mostró su carencia de significación estadística.

Tampoco la etiología parecía influir significativamente en la respuesta de los neutrófilos al A23187. En los pacientes con cirrosis etílica la producción de superóxido fue de $9,4 \pm 2,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($96,9 \pm 6,5$ % respecto a sus controles), en los pacientes con serología positiva para el virus C, de $10,2 \pm 1,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($98,4 \pm 2,7$ %), en los casos en los que se asociaba el alcohol y el VHC, de $10,1 \pm 2,3$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos /

millón de células ($94,2 \pm 5,2$ %), en pacientes con VHB, de $10,7 \pm 3,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($94,5 \pm 0,9$ %), y en los dos pacientes con estudio etiológico negativo $7,2 \pm 0,3$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($98,9 \pm 1,5$ %).

Tampoco observamos defectos ni diferencias significativas en pacientes que habían presentado episodios previos de infección del líquido ascítico o de hemorragia digestiva por hipertensión portal. La producción de superóxido del primero de estos grupos fue de $8,3 \pm 1,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($99,6 \pm 0,9$ %), y de $9,5 \pm 2,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($98,1 \pm 3,9$ %) en el segundo. Los pacientes que no sufrieron ninguna de estas complicaciones respondieron con producciones de $9,9 \pm 2,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($95,7 \pm 5,7$ %) y $9,5 \pm 2,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($95,9 \pm 5,8$ %), respectivamente.

Al comparar esta respuesta con la edad de los pacientes (r : 0,11), nivel de transaminasas [GOT (r : 0,23), GPT (r : 0,31)], o enzimas de colestasis [GGT (r : 0,14), FA (r : 0,32)], tampoco se hallaron coeficientes de correlación significativos.

IV. ESTIMULACIÓN A NIVEL DE LA PROTEIN CINASA C (PKC)

A. RESPUESTA A LOS ESTÍMULOS UTILIZADOS

Dado que la vía dependiente del calcio parecía funcionar correctamente en estos enfermos, el siguiente paso fue utilizar el ester de forbol, 4- β -forbol-12-mirastato-13-acetato (PMA), a unas dosis de 1 μ g/ml. Esta sustancia estimula la PKC al simular el efecto del diacilglicerol (Fig 6). Esta parte del estudio incluyó 22 pacientes cirróticos y 11 controles. Tras este estímulo, la producción de superóxido en los pacientes con cirrosis fue de 55 ± 13 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($90,5 \pm 10,8$ %; 69,7-100%) lo cual no se diferenciaba significativamente de lo hallado en los controles ($56,7 \pm 13,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) (Fig 20).

Los neutrófilos de estos pacientes también fueron estimulados con FMLP (que actúa a nivel de receptor), y su respuesta estaba significativamente reducida en relación con el grupo control ($65,9 \pm 30,2$ %). La producción de superóxido fue de $18,3 \pm 9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células en los pacientes con cirrosis hepática y de $24,7 \pm 7,2$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células en los controles ($p < 0,05$).

De este grupo de pacientes y controles, 17 cirróticos y 9 controles fueron estimulados simultáneamente con 10^{-7} M FMLP y 1 μ g/ ml PMA.

La respuesta en este caso fue similar a la observada cuando empleamos únicamente PMA. La producción de superóxido fue de $53,2 \pm 11,9$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células en los pacientes cirróticos ($91,8 \pm 13,2$ %) y de $55,6 \pm 7,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células en los controles. (Fig 20).

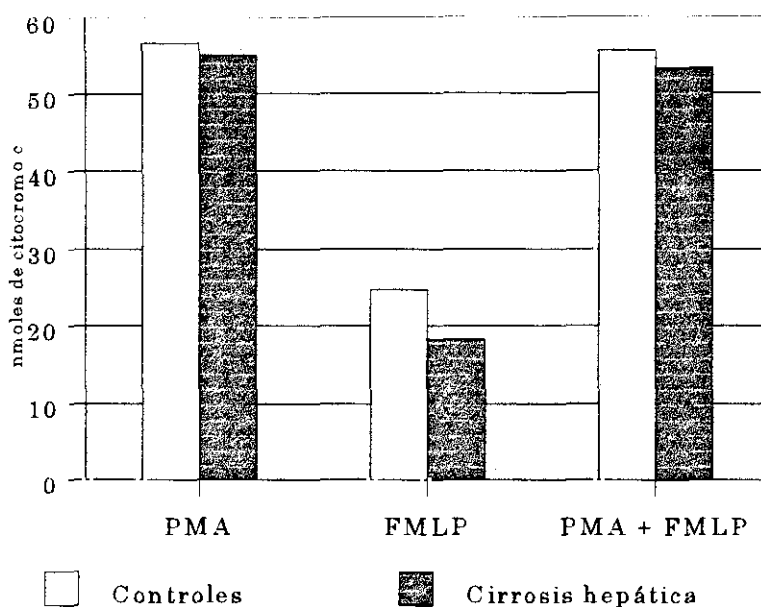


Fig 20. Producción de superóxido (nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células) por los neutrófilos tras la estimulación a nivel de PKC y/o receptor.

B. CORRELACIÓN CLÍNICA.

Se realizaron diferentes grupos en los pacientes con cirrosis hepática para averiguar si alguna característica de la hepatopatía se relacionaba con una menor producción de superóxido ante la estimulación a nivel de la PKC. En la tabla 8 se detallan las características de estos pacientes.

TABLA 8. Características de los pacientes cirróticos estimulados con PMA.

- Edad: 59,5 ± 9,9 años
 - Sexo: 15 varones y 7 mujeres
 - Etiología de la cirrosis: Alcohol..... 10 pacientes
alcohol y VHC..... 6 pacientes
VHC..... 2 pacientes
VHB..... 2 pacientes
Autoinmune..... 1 paciente
etiología desconocida..... 1 paciente
 - Insuficiencia hepática: grado A..... 2 pacientes
grado B..... 5 pacientes
grado C..... 15 pacientes
 - Ascitis: No..... 1 paciente
de fácil control..... 16 pacientes
difícil manejo..... 5 pacientes
 - Encefalopatía: No..... 10 pacientes
sí..... 12 pacientes (un paciente grado III-IV)
 - Antecedentes de infección del líquido ascítico..... 5 pacientes
 - Antecedentes de hemorragia digestiva por hipertensión portal: 15 pacientes
 - Parámetros bioquímicos: GOT 96,1±46,8 U/l
GPT 82,4±54,8 U/l
GGT 74,6±52,1 U/l
FA 157,4±85 U/l
BT 3,4±2,5 mg/dl
Albúmina 2,7±0,5 g/dl
Actividad de protrombina 57±21,9 %
-

Como era de esperar en una respuesta que era normal, el estudio de la producción de anión superóxido tras el PMA en pacientes con diferente grado de insuficiencia hepática mostró que no existían alteraciones significativas. Así, en los pacientes con grado funcional A la producción de superóxido fue de $50 \pm 22,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($82,4 \pm 16,8$ % de los controles), en los pacientes con grado funcional B, de $46,9 \pm 16,1$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($82,4 \pm 11$ %), y en los pacientes de grado funcional C, de $58,4 \pm 10,3$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($94,3 \pm 8,6$ %).

La valoración independiente de cada una de las variables utilizadas para determinar la función hepática mostró los siguientes resultados:

- Ascitis: la producción de anión superóxido en los pacientes sin ascitis fue de $50 \pm 22,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($82,4 \pm 16,8$ %) y en los pacientes con ascitis de $55,5 \pm 12,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($91,3 \pm 10,4$ %). Estas diferencias no fueron significativas. Tampoco había diferencias entre los pacientes con ascitis de fácil control ($57,2 \pm 12,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células; $91,3 \pm 10,4$ %) y los que su ascitis era difícilmente controlada ($50,6 \pm 14,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células; $82,4 \pm 12,3$ %).

- Encefalopatía: la existencia o no de encefalopatía no influyó significativamente en la producción de superóxido en los pacientes con cirrosis: $60,4 \pm 9,5$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($97,9 \pm 4,2$ %) y $48,6 \pm 14,4$

nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($81,6 \pm 9,6$ %), respectivamente.

- Bilirrubina: no hallamos ninguna correlación significativa entre la producción de superóxido y los niveles de bilirrubina ($r: 0,14$).

- Actividad de protrombina: existía una correlación negativa no significativa entre la producción de anión superóxido y la actividad de protrombina ($r: - 0,27$).

- Albúmina: hallamos también una correlación negativa entre la respuesta a PMA y los niveles de albúmina ($r: - 0,48, p < 0,05$).

Tampoco hallamos diferencias que fueran significativas en la producción de anión superóxido por los neutrófilos de los diferentes grupos etiológicos. En efecto, en las cirrosis alcohólicas fue de $57,4 \pm 14,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($93,1 \pm 10,2$ %). En los de etiología viral C, de $60,7 \pm 11,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($84,6 \pm 18,2$ %). Cuando coincidían el alcohol y el VHC, de $54,8 \pm 10,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($96,9 \pm 2,8$ %). Si la causa de la enfermedad fue una infección por el VHB, de $47,3 \pm 18,8$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($78 \pm 10,6$ %). En el paciente con cirrosis autoinmune, $53,3$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($76,2$ %). Por último, en un paciente con cirrosis de etiología desconocida fue de $37,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($77,9\%$ del control).

Tampoco hallamos diferencias según que hubiera existido o no infección previa del líquido ascítico. Así, en los pacientes que habían presentado esta complicación, la producción de superóxido fue de $56,4 \pm 18,6$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($90,7 \pm 13$ %), y en los que no la habían tenido, de $54,6 \pm 11,7$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($90,5 \pm 10,6$ %).

En los pacientes con antecedentes de hemorragia digestiva por hipertensión portal la respuesta de los neutrófilos al PMA no fue significativamente distinta de la hallada en los pacientes sin este antecedente: $55,2 \pm 15$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($92 \pm 10,1$ %), y $54,7 \pm 8,3$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células ($87,3 \pm 12,5$ %), respectivamente.

No se observó correlación significativa entre la respuesta de los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática y la edad de estos (r: 0,21), sus niveles de transaminasas [GOT (r: 0,03), GPT (r: 0,03)], o de los enzimas de colestasis [GGT (r: 0,11), FA (r: 0,1)].

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las infecciones constituyen una complicación frecuente y grave de la cirrosis hepática, contribuyendo a la elevada morbi-mortalidad de los pacientes con esta patología (4,9,10).

En los sujetos cirróticos se han observado diferentes alteraciones en los mecanismos de defensa contra las infecciones, entre las que destacan: los trastornos de la barrera intestinal, las anomalías de la actividad del sistema monocítico-macrofágico, las alteraciones de la inmunidad humoral y celular y las disfunciones de los neutrófilos (11,12).

En relación con esto último, algunos estudios (64) han sugerido que en el suero de los cirróticos existirían sustancias que alterarían la función de los neutrófilos. Sin embargo, otros trabajos (65) defienden que el defecto radica en las propias células, ya que está alterada la quimiotaxis, la fagocitosis y, secundariamente, su capacidad para destruir las bacterias ingeridas.

Cuando los neutrófilos fagocitan las bacterias o entran en contacto con un algún estimulante químico se produce su degranulación y sufren

una serie de cambios coordinados que constituyen la cadena de explosión respiratoria, durante la cual, y a través del complejo enzimático de la NADPH-oxidasa, se transforma el oxígeno molecular en anión superóxido (71). La cadena de explosión respiratoria genera también peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un producto derivado de la dismutación del anión superóxido. Este, en presencia de cloro y de la mieloperoxidasa de los gránulos de los neutrófilos, forma hipocloritos, los cuales participan en la génesis de cloraminas, y finalmente en la destrucción bacteriana (71).

Existen pocos estudios publicados sobre las alteraciones de los mecanismos microbicidas de los neutrófilos en los pacientes con cirrosis hepática. Además, los escasos estudios existentes son heterogéneos e incompletos. Así, algunos estudios se refieren únicamente a pacientes etílicos (65), y las alteraciones detectadas fueron atribuidas al alcohol. En otros trabajos, aunque se estudian cirrosis de distintas etiologías, el número de pacientes incluidos era muy pequeño (225), o existieron otros factores que, además de la cirrosis hepática podrían alterar la respuesta de los neutrófilos (226,227). Con las reservas impuestas por las limitaciones de esos estudios, de ellos se pueden extraer dos conclusiones. La primera implica a los metabolitos del oxígeno como responsables, al menos en parte, de la función defectuosa de los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática. La segunda, rechaza que este defecto esté mediado por inhibidores séricos de la función leucocitaria.

Se pueden emplear dos métodos para medir la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. El primero mide la producción de anión superóxido liberado de las células a través de la reducción del ferricitocromo c (65). El segundo utiliza la quimioluminiscencia, dependiente bien de un análogo luciferin, Cypridina, o bien del luminol, para medir en un caso la producción de peróxido de hidrógeno, o en el otro el complejo formado por la unión de peróxido de hidrógeno, mieloperoxidasa y cloro, respectivamente (227). Ambos métodos pueden realizarse con muestras de sangre completa o con preparaciones de neutrófilos aislados. Nosotros empleamos el método de la reducción del citocromo c, ya que éste mide la producción de superóxido de oxígeno sin la intervención de otros productos de la degranulación de los leucocitos neutrófilos. Además, utilizamos preparaciones de neutrófilos aislados de muestras de sangre periférica con el fin de descartar otros factores presentes en la sangre pudieran interferir en la función de los neutrófilos. Por dicho motivo, el presente estudio analiza la función intrínseca de los neutrófilos.

Está bien establecido que la capacidad de los diferentes estímulos para inducir la liberación de superóxido, depende de la naturaleza del agonista utilizado, la cantidad o dosis de estimulantes, duración del estímulo, y del estado de los neutrófilos previo al estímulo (71).

La influencia de la naturaleza del estímulo sobre la producción de superóxido la apreciamos claramente al estimular los neutrófilos

de controles y cirróticos con los distintos estímulos y dosis: FMLP (10^{-7} M), zimosan opsonizado (1 mg/ml), FNa (20 mM), FAI (FNa 5 mM y Cl_3Al 10 μ M), A23187 (10 μ M), PMA (1 μ g/ ml). Aunque el tiempo de estimulación fue en todos los casos de 15 minutos, la respuesta que obtuvimos a cada estímulo y con las dosis empleadas, tanto en los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática como en los controles, fue en orden decreciente la siguiente:

PMA > FMLP > FNa > FAI > A23187 > Zimosan

Estímulo	Controles	Cirrosis
PMA	56,7 \pm 13,2	55 \pm 13 (90,5%)
FMLP	25 \pm 7	15 \pm 8,4 (59,9%)
FNa	22,6 \pm 7,1	11,1 \pm 4,6 (49%)
FAI	18,5 \pm 5,6	11,5 \pm 5,8 (62,1%)
A23187	9,4 \pm 2,8	9,1 \pm 2,8 (96,6%)
Zimosan	8,9 \pm 6,4	5,8 \pm 5,8 (65,2%)

En los estudios en los que se mide la producción de superóxido por el método de reducción del citocromo c, las concentraciones utilizadas, el tiempo de estimulación, y la totalidad de células sobre las que actúan son diferentes en cada uno de ellos. Así, Rajkovic y Williams (65), empleando como estimulantes 250 μ g de zimosan y 4nM de PMA en un volumen final de 150 μ l de HBSS, obtuvieron mayores respuestas tras el estímulo con PMA. Laffi et al (225) utilizaron también zimosan y PMA, pero a dosis de 10 mg/ml y 100 ng/ ml,

respectivamente, pero hallaron respuestas discretamente superiores con el zimosan. Además, el tiempo de estímulo y el número de células estimuladas fue diferente en cada estudio: 10 minutos y $1,25 \times 10^5$ células, en el primero y 15 minutos y un millón de células en el segundo. Así, parece que es importante no comparar el valor absoluto entre los diferentes estímulos, sino que se deben comparar las respuestas de los cirróticos a cada estímulo con los obtenidos en los controles con el mismo estímulo, las mismas dosis y las mismas condiciones experimentales. Por esta razón, cada experimento realizado en cirróticos incluía también mediciones paralelas en controles. Con ello calculamos el porcentaje de respuesta obtenida en cada paciente en relación con la hallada en sus controles, lo cual expresa, mejor que los valores absolutos, la magnitud del defecto.

En cuanto al estado de los neutrófilos previo a la estimulación, aunque no se midió la producción de superóxido en preparaciones de neutrófilos en reposo, dada la selección de los pacientes y controles (sin infecciones, o situaciones que estimulen a estas células como pueden ser determinados tratamientos o enfermedades como diabetes, hepatocarcinoma,...) hay que asumir que las anomalías detectadas preceden y no son una consecuencia de la infección.

En el presente trabajo se han utilizado diferentes estímulos que actúan a distintos niveles en la vía de activación de la NADPH-oxidasa (Fig 6). El objetivo ha sido conocer si existe algún defecto intrínseco en los mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno en los neutrófilos de pacientes con cirrosis

hepática que justifique, al menos en parte, la susceptibilidad de estos pacientes a las infecciones. Tras detectar la existencia de este defecto, el siguiente paso fue localizar el nivel donde se encuentra. Finalmente, intentamos correlacionar ese defecto con las características de la cirrosis.

Partimos del estímulo de los neutrófilos a nivel de un receptor localizado en su membrana plasmática. Para ello empleamos un agente, que puede considerarse fisiológico, ya que consiste en péptidos formilados liberados por las bacterias, el FMLP (formil-metionil-fenil-alanina). Esta sustancia actúa interaccionando con su receptor específico (R-FMLP) localizado en la membrana y en los gránulos específicos desplazados a la membrana cuando el neutrófilo es estimulado (81). Tras este estímulo observamos que la producción de anión superóxido (medida mediante la reducción de ferricitocromo c) en los pacientes cirróticos estaba significativamente reducida en relación a los controles: $15 \pm 8,4$ (59,9%) frente a 25 ± 7 nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células, $p < 0.001$. Solamente en cuatro pacientes la respuesta fue normal. Para descartar que el defecto se limitara a un receptor específico, repetimos la estimulación de los neutrófilos con zimosan opsonizado, el cual actúa a través de un receptor específico, diferente del R-FMLP. También en este caso hallamos una reducción en la producción de superóxido ($5,8 \pm 5,8$ vs $8,9 \pm 6,4$ nmoles de citocromo c reducido / 15 minutos / millón de células; 65,2%). Aunque este descenso no alcanzó significación estadística probablemente ello se debió al reducido número de pacientes estudiados. No obstante, creemos que el zimosan opsonizado no es

un estimulante idóneo para conocer si el defecto de los neutrófilos es intrínseco, ya que en el procedimiento para la opsonización del zimosan se utiliza suero. En los escasos trabajos publicados que utilizan estimulantes que actúan a través de los receptores también se refiere que la respuesta de los neutrófilos está reducida. Así, Rajkovic y Williams (65) demostraron que existía una disminución significativa ($p < 0.01$) de la producción de superóxido en los neutrófilos en el 45% de los pacientes cirróticos estimulados con zimosan opsonizado en comparación con los controles. Laffi et al (225), al comparar la respuesta de 10 pacientes cirróticos con 10 controles a este mismo estimulante, hallaron que en los pacientes era menor del 50% de los controles ($p < 0.05$). Por último Uehara y Sato (227), midiendo la quimioluminiscencia con Cypridina luciferin y luminol, tras el estímulo con FMLP, encontraron que la respuesta de los pacientes cirróticos fue del 50% y 60%, respectivamente, de la hallada en los controles ($p < 0.05$).

Por lo tanto, nuestros resultados, al igual que en los escasos existentes en la literatura, indican que existe un defecto en los mecanismos de producción de radicales microbicidas del oxígeno. Este defecto podría localizarse bien en el propio receptor o bien más allá, en cualquier punto de la vía de activación de la NADPH-oxidasa.

Para completar la valoración del comportamiento de los receptores en los neutrófilos de los cirróticos, estimulamos estas células con TNF. Esta citoquina tiene la propiedad de alterar la actividad fagocitaria de los

leucocitos polimorfonucleares. Por una parte, aumenta la resistencia a las infecciones y, por otra, interviene en los mecanismos fisiopatológicos asociados a muchas enfermedades. Sus efectos biológicos se inician cuando se une a dos tipos de receptores específicos, R55 y R75, que interaccionan entre sí y están localizados en la superficie de los neutrófilos (228). Se sabe que el TNF aumenta la respuesta al leucotrieno B4 (LTB4) (229), al factor activador de las plaquetas (PAF) (230), y al FMLP, estímulos todos ellos, que actúan a nivel de esos receptores. El TNF, cuando es utilizado como estímulo único, es un débil activador de los neutrófilos (231). Tsujimoto et al (232) demostraron que el tratamiento de los neutrófilos con TNF inducía la liberación de pequeñas cantidades de superóxido tras 30 a 120 minutos de incubación. La incubación durante tiempos más cortos con TNF no parece provocar ninguna liberación de superóxido (233). Sin embargo, la preincubación de los neutrófilos con TNF potencia la respuesta de esas células al FMLP y determina un aumento sinérgico de la producción de superóxido que es dependiente de la dosis, tiempo y temperatura (233). No se conoce el mecanismo exacto por el cual la preincubación con TNF refuerza la respuesta al FMLP pero se ha propuesto que el TNF aumentaría el número y/o la afinidad de los receptores para el FMLP (234).

Al utilizar el TNF como único estímulo durante 15 minutos (tiempo empleado con el resto de los estímulos), comprobamos que los neutrófilos tanto de los individuos controles como de los pacientes, no produjeron superóxido. Este resultado coincide con lo referido en la literatura, en la que se describe que el TNF es un débil estimulante directo de las células y que precisa al menos de

30 minutos de incubación para inducir la liberación de superóxido (232). Probablemente no obtuvimos respuestas al ser menor el tiempo de estimulación o incubación empleado. En cambio, cuando preincubamos los neutrófilos con TNF durante 30 minutos y a continuación los estimulamos con FMLP, la respuesta de los neutrófilos de controles aumentó respecto a la lograda tras el estímulo sólo con FMLP, demostrando así el efecto sinérgico del TNF con el FMLP descrito en la literatura. Sin embargo, cuando esto mismo lo hicimos en los pacientes con cirrosis hepática no observamos este efecto. Estos resultados apoyan aún más la hipótesis de que existe en los neutrófilos de los cirróticos un defecto intrínseco en su función. Puesto que el TNF actúa a nivel de receptor, y que su efecto sinérgico con el FMLP lo realiza tras aumentar el número y/o afinidad de los receptores, pasamos a explorar la función de los neutrófilos tras su estímulo a niveles más próximos a la oxidasa, prescindiendo de los receptores.

Tras la interacción del agonista con su correspondiente receptor se produce la activación de una proteína G. Por ello, el siguiente paso fue estimular esta proteína, evitando al receptor. Para ello se empleó fluoruro sódico (FNa) y fluoruro de aluminio (FAl). Estos fluoruros son potentes estimulantes de la cadena de explosión respiratoria por su acción directa sobre la proteína G, sin actuar sobre los receptores de superficie. No empleamos el GTP γ S, un conocido estimulante de la proteína G tras unirse a su subunidad α , y causar la disociación de las subunidades $\beta\gamma$ (234); porque para su utilización es preciso permeabilizar las células con el consiguiente riesgo de pérdida de enzimas

y proteínas a través de los poros producidos en la membrana celular (104). A concentraciones de 20mM , como las que hemos empleado en este trabajo, el FNa activa las proteínas reguladoras de los nucleótidos de guanina, y provoca la activación específica de la proteína G. Esta, a su vez regula la actividad de la fosfolipasa C (Gplc) y genera fosfatos de inositol (133). El motivo de utilizar ambos estímulos, FAl y FNa, fue, además, comparar ambos estímulos. Estudios iniciales parecían indicar que era preciso la presencia del aluminio como cofactor del flúor para lograr una efectiva estimulación de la proteína G. El FAl interaccionaría con el GDP unido a la subunidad alfa de la Proteína G, mimetizando el fosfato gamma del GTP y promoviendo así la activación de la Proteína G (234). Trabajos más recientes no parecen confirmar la necesidad del aluminio para lograr la activación de la Proteína G mediante el flúor (133). Los resultados obtenidos tras el estímulo con FNa o con FAl fueron muy similares tanto en controles como en pacientes, lo que parece indicar que no es preciso el aluminio como cofactor del flúor para lograr la activación de la proteína G. Además, observamos que la respuesta de los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática estaba reducida respecto a los controles, tanto al emplear FNa como FAl, y sin diferencias significativas al comparar ambos estímulos. No conocemos la existencia de trabajos previos en los que se haya estudiado la producción de superóxido por los neutrófilos de pacientes con cirrosis estimulados a nivel de la Proteína G. Es más, los pacientes que fueron estimulados simultáneamente a nivel del receptor y de la proteína G con FMLP y FNa, respectivamente, no respondieron a ninguno de estos estímulos. Ello indica que el defecto no radica

en el receptor, ya que si fuera así al estímulo de la proteína G le seguiría una respuesta normal.

Como hemos comentado más arriba, el flúor es un activador específico de la proteína G que regula la actividad de la fosfolipasa C (133). Esta enzima actúa sobre el inositol presente en los fosfolípidos de las membranas, preferentemente sobre el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PtdInsP2), produciendo diacilglicerol (DG) e inositoltrifosfato (InsP3). El primero permanece asociado a la membrana plasmática y activa directamente la protein-cinasa C (PKC), un estimulante de la NADPH-oxidasa. El InsP3 es liberado al citosol y se une a receptores específicos existentes en organelas que acumulan el calcio intracelular y están localizadas en la vecindad de la membrana plasmática. La unión del InsP3 a estos receptores induce la liberación de calcio y el aumento de la concentración de calcio intracelular (137). Este último incremento puede activar la protein cinasa dependiente del calcio y determinar la activación celular.

Puesto que el estímulo de la Proteína G no se siguió de ninguna respuesta en los pacientes cirróticos, pasamos a explorar otros niveles de la activación celular. Dado que carecemos de estímulos directos de la PLC, que no sean a través de la proteína G, empleamos otros que actúan a nivel del diacilglicerol (DG) y del inositol trifosfato (InsP3).

Con ese fin utilizamos el ionóforo de calcio A23187, que reproduce los efectos del InsP3, aumentando los niveles de calcio intracelular, y el PMA que mimetiza los del DG sobre la PKC . Además, las fosfolipasas A2 y D

son enzimas cuya actividad depende del calcio y, en ciertos casos, su actividad específica aumenta considerablemente tras el tratamiento de las células con los ionóforos de calcio.

Al emplear el ionóforo de calcio A23187, observamos que la respuesta de los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática era similar a la de los controles, con una producción media de superóxido de $96,6 \pm 5,3\%$, y que ninguno de los pacientes tuvo una producción menor del 80% respecto a los controles. Ello parece indicarnos que la vía de activación dependiente de los canales del calcio funciona correctamente en estos pacientes y sugiere que el defecto en la vía de activación de la oxidasa detectada mediante los estímulos a nivel de membrana debería localizarse a otro nivel. No hemos encontrado en la literatura revisada trabajos en los que se haya medido la producción de anión superóxido en pacientes cirróticos tras el estímulo de los neutrófilos con el ionóforo de calcio A23187. En el estudio de Laffi et al (225) se midió la producción de superóxido tras el estímulo con zimosan opsonizado y con el ester de forbol, PMA. Pero estos autores utilizaron el ionóforo de calcio A23187 como sustancia que activa en los neutrófilos la síntesis de PAF y de LTB₄, así como también la liberación de ácido araquidónico (principal producto derivado de la acción de la fosfolipasa A₂). Ellos observaron que en los pacientes cirróticos existía una disminución de la producción de PAF y LTB₄, y de la liberación de ácido araquidónico. Estos autores concluyeron que la síntesis reducida de los mediadores lipídicos pudiera estar relacionado con una baja actividad de la fosfolipasa A₂. Aunque estos datos pudieran parecer discordantes con los que

hemos obtenido en nuestro estudio con el ionóforo A23187, en realidad no lo son, ya que la activación de la fosfolipasa A2 y, por tanto, la liberación de ácido araquidónico, está determinada no solo por el calcio intracelular sino también por una vía dependiente de la proteína G (71). La falta de respuesta que nosotros obtuvimos al estimular la proteína G explica la baja actividad de la fosfolipasa A2 que Laffi et al (225) hallan tras el estímulo con zimosan o FMLP.

Como estímulo de la PKC utilizamos el ester de forbol, PMA, el cual simula el efecto de su activador fisiológico, el diacilglicerol. Este se une con gran afinidad a la PKC y la activa (178). El diacilglicerol se genera a partir del inositol bifosfato (PtdInsP2), a través de la vía de la fosfolipasa C, y a partir de la fosfatidilcolina, por la vía de la fosfolipasa D (144). Los resultados hallados al actuar sobre la PKC, estimulando con PMA, no mostraron que existieran diferencias significativas entre neutrófilos de los pacientes cirróticos y los de los controles. Es más, el rango de producción de superóxido en los cirróticos respecto a los controles osciló entre el 69,7% y el 100%. Además, este grupo de cirróticos había sido estimulado también con FMLP y la respuesta a este péptido había estado significativamente descendida respecto a los controles. Estos datos contrastan con los publicados por Rajkovic (65) y Laffi et al (225), quienes observaron una menor producción de anión superóxido en los pacientes cirróticos tanto al estimular la PKC con el PMA, como al hacerlo a nivel de un receptor. No obstante, hay que destacar que la producción de superóxido en los 40 cirróticos de la serie de Rajkovic y Williams (65) fue de 26.93 nmoles (rango 8.7 - 35.8) y

en sus controles de 30.66 nmoles (rango 26.1 - 36.4) y que solamente 16 de esos cirróticos (40%) tenían una respuesta reducida al PMA. Por lo que estos datos, con disparidad en la respuesta de los pacientes, y el pequeño número de casos (10 pacientes) valorados por Laffi et al (225) nos deben de hacer ser cautos al establecer comparaciones.

Dado que los neutrófilos respondieron correctamente al estímulo con el PMA, parece que en esos enfermos está conservada la vía de activación de la oxidasa que se inicia en la PKC. No podíamos atribuir el defecto detectado en sus neutrófilos a algún fallo en los componentes de esa vía. Además, es bien conocido que, la vía de la PKC no es la única vía de activación de la NADPH-oxidasa de los neutrófilos (71,177). Así, se sabe que la PKC produce la fosforilación de los residuos de serina y treonina y secundariamente la activación de esa oxidasa. También durante la activación celular se produce la fosforilación de la tirosina, mediante la tirosin-cinasa. Algunos trabajos han demostrado que existe un efecto sinérgico entre el estímulo con PMA y con $GTP\gamma S$ (o FMLP) lo que se atribuye a que una de las vías de estimulación por el $GTP\gamma S$ (o FMLP) se inicia con la fosforilación de la tirosina (104). La fosforilación de la tirosina también parece estar mediada por una proteína G (187,191,192), y no tiene lugar si la cadena de explosión respiratoria está inducida por el ionóforo A23187 o por los ésteres de forbol (188). Nosotros no observamos que existiera un efecto sinérgico al estimular los neutrófilos con PMA y FMLP, lo que podía atribuirse al fracaso del FMLP. Es más, todos los estímulos que habían fallado al actuar sobre los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática tenían en común su

dependencia de la Proteína G.

Al analizar en conjunto los resultados obtenidos, podemos afirmar que en los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática existe un defecto intrínseco en la función postfagocítica que se expresa por una menor producción de anión superóxido tras el estímulo con determinados estímulos. Aunque existen algunos trabajos previos que demostraron la existencia de este defecto, no se ha evaluado de forma exhaustiva el mecanismo por el que se produce. Laffi et al (225) propusieron que la endotoxemia crónica que existe en los cirróticos, como consecuencia de un defecto en el sistema monocítico-macrofágico y por las anastomosis arterio-venosas, pudiera activar permanentemente a los neutrófilos y hacerlos refractarios a estímulos posteriores. Sus propuestas se apoyan en datos obtenidos en neutrófilos de cirróticos en condiciones basales, sin someterlos a ningún estímulo. Hallan que la producción basal de superóxido era superior a la de los controles, y que tras estímulos diversos la respuesta fue menor. En contra de lo hallado por Laffi et al (225), Rajkovic y Williams (65) observan que la producción basal de superóxido por los neutrófilos de cirróticos era similar a la de los controles. Aunque nosotros no hemos cuantificado específicamente la producción basal de superóxido en neutrófilos, tras el tratamiento de los neutrófilos con TNF durante 15 minutos, tiempo insuficiente para obtener respuesta, la producción de superóxido fue nula tanto en cirróticos, como en los controles. Ello, junto con las condiciones previas de los pacientes seleccionados (sin infecciones, enfermedades y tratamientos que puedan alterar la función de

los neutrófilos) y, fundamentalmente, que la respuesta a determinados estímulos sea similar a la de los controles, nos hace dudar que el defecto detectado sea consecuencia del estímulo permanente de esas células y que, por el contrario, se trata de un defecto específico de las vías de activación neutrofílica.

Cuando utilizamos estímulos vehiculizados por la Proteína G (FMLP, zimosan, fluoruro sódico, fluoruro de aluminio) la producción de superóxido estuvo reducida de forma significativa, mientras que la respuesta a estímulos no dependientes de la Proteína G (ionóforo de calcio A23187, éster de forbol PMA) *no se diferenció de forma significativa de la que se obtuvo en los controles.* Por ello, podemos concluir, que existe un defecto en la función microbicida, oxígeno dependiente, de los neutrófilos de pacientes con cirrosis, y que este defecto muy probablemente se encuentra localizado en los mecanismos de activación de membrana, y más concretamente a nivel de la Proteína G.

Sería posible que la localización del defecto de los neutrófilos en pacientes con cirrosis hepática, a nivel de los mecanismos de activación de la membrana plasmática, tuviera relación con las propiedades fisico-químicas de ésta y que estén alteradas en los neutrófilos, al igual que parece suceder en otras células (por ejemplo, en los hepatocitos) por la enfermedad hepática. Varios estudios realizados con modelos animales (235) y con pacientes con afectación hepática (236), han revelado alteraciones en la fluidez de la membrana plasmática de los hepatocitos. Estas alteraciones podrían explicarse por un mayor contenido de colesterol y tendrían implicaciones fisiopatológicas importantes. Por

ello, se especula que puedan relacionarse con las alteraciones funcionales observadas en los pacientes con enfermedad hepática (236).

Otro de los objetivos que nos planteamos fue el de conocer si el defecto en el funcionalismo de los neutrófilos se correlacionaba con alguna característica particular de la cirrosis hepática.

En los trabajos iniciales los estudios de funcionamiento de neutrófilos se limitó a pacientes con cirrosis etílica. Este es el caso de los pacientes analizados por Rajkovic y Williams (65) que estaban relacionados con el alcohol. Solo, a partir de 1993 comenzaron a aparecer estudios en los que se incluyeron pacientes con cirrosis de distintas etiologías (225,226,227,237). En los primeros trabajos el fracaso de los neutrófilos se atribuyó al alcohol. Los mecanismos invocados incluían la toxicidad directa del alcohol sobre la médula ósea, las alteraciones que este agente produce en el metabolismo del folato y la malnutrición severa, debida a deficiencias en la dieta y malabsorción, frecuente en estos enfermos. Sachs et al (238) observaron en pacientes intoxicados de forma aguda con alcohol que descendía transitoriamente la producción de superóxido en respuesta al PMA o el FMLP, que se recuperó a los 6-10 días. Los autores sugirieron que el etanol pudiera tener como diana células más maduras que los promielocitos, posiblemente los metamielocitos.

Laffi et al (225) fueron los primeros en estudiar pacientes con

cirrosis hepática de etiología no alcohólica. Sus datos revelaron que los pacientes con cirrosis hepática no alcohólica tenían conservada la quimiotaxis, la fagocitosis y la actividad candidicida. Pero observaron que la producción de anión superóxido estaba reducida, descartando al alcohol como causa del defecto. A conclusiones similares llegaron Uehara y Sato (227) al estudiar la función microbicida, oxígeno-dependiente, de los neutrófilos de cirróticos de causa no alcohólica (virus B y virus C)

En nuestro estudio no hemos encontrado relación alguna entre la respuesta defectuosa de los neutrófilos y la etiología de la cirrosis hepática. El que el número de pacientes con cirrosis hepática relacionada con el virus de la hepatitis B, o de naturaleza autoinmune o desconocida sea pequeño, impide que podamos establecer una correcta correlación entre estas etiologías y el defecto en la producción de superóxido. Sin embargo, el número de pacientes con cirrosis hepática alcohólica, por virus de la hepatitis C, o por ambos factores etiológicos (alcohol y virus de la hepatitis C) era suficientemente alto. Por tanto los pacientes con cirrosis hepática etílica como aquellos otros de origen viral, respondieron de forma similar a los diferentes estímulos. Tan solo observamos una mayor producción de anión superóxido cuando en un mismo paciente coexistían ambos factores etiológicos. Por tanto, no confirmamos, tal como aparece reflejado en las últimas publicaciones (225, 227), una relación directa entre la reducción en la producción de superóxido y la exposición al alcohol, dado que el mismo trastorno existe en cirróticos sin este factor etiológico. Probablemente el defecto en el funcionalismo de los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática esté más en

relación con la existencia de la hepatopatía que con su etiología.

También valoramos la influencia del grado de insuficiencia hepática en la capacidad de producción de anión superóxido. En un estudio prospectivo realizado por Caly y Strauss (4) sobre la incidencia de infecciones bacterianas en pacientes con cirrosis hepática se sugirió que existía una asociación entre la severidad de la enfermedad hepática y la incidencia de infecciones. Prueba de ello era que los pacientes infectados pertenecían predominantemente al grado funcional C de la clasificación de Child-Pugh. Por esta mayor susceptibilidad a las infecciones de los pacientes con mayor severidad de la hepatopatía se ha pensado que la deficiencia en el sistema defensivo estaría presente preferentemente en este grupo de pacientes. Aunque la mayoría de los trabajos que estudian pacientes con insuficiencia hepatocelular severa, es decir, en grado funcional C de la clasificación de Child-Pugh, encuentran una reducción en la producción de superóxido, existen controversias sobre el comportamiento funcional de los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática e insuficiencia hepática leve o moderada (grados funcionales A y B de la clasificación de Child-Pugh, respectivamente). Así, por ejemplo, Laffi et al (225) encontraron que la quimiotaxis y la fagocitosis estaba conservada en los cirróticos con grado funcional B o C, aunque existía una disminución en la producción de superóxido en ambos estadios funcionales. Sin embargo, García-González et al (237) observaron que la quimiotaxis y la fagocitosis estaban disminuidas en los estadios funcionales A y B. Nosotros también hemos observado una reducción en la

producción de anión superóxido en los pacientes con función hepatocelular conservada en grado funcional A, si bien esa alteración era mucho mayor en pacientes con grados funcionales B o C. Ahora bien, si al utilizar el FMLP como estimulante no observamos diferencias en la producción de superóxido según el grado funcional de los cirróticos, cuando utilizamos los fluoruros como estimulante la producción de superóxido era progresivamente menor a medida que la función hepatocelular estaba más deteriorada. No disponemos de una explicación firme que explique por qué existe una relación clara entre el grado funcional y la reducción en la producción de anión superóxido cuando utilizamos los fluoruros como estimulantes, pero no cuando empleamos el FMLP. Es posible que ello dependa de la naturaleza del estímulo o del nivel preciso donde actúe.

Puesto que el grado funcional depende, en parte, de las tasas séricas de albúmina, y de la bilirrubina, y de la actividad de protrombina, es razonable que observáramos una correlación entre estas variables y la respuesta de los neutrófilos al estímulo con fluoruro sódico. Ya otros autores señalaron la relación existente entre la hiperbilirrubinemia y las infecciones en los cirróticos, siendo el nivel de la bilirrubinemia directamente proporcional a la severidad de los procesos infecciosos y al daño hepático (4). Algunos autores han atribuido a la bilirrubina un efecto inhibitor del proceso de activación de la oxidasa debido a la naturaleza hidrofóbica del tetrapirrol (239).

Aunque Uehara y Sato (227) no correlacionaron específicamente los grados de Child con la capacidad de generar radicales derivados del oxígeno, también hallaron que existía una correlación negativa

entre la quimioluminiscencia y los valores de bilirrubina sérica, y positiva con los valores de albuminemia. Sin embargo, no observaron que la producción de superóxido se relacionara con los niveles séricos de las transaminasas. Nosotros sí hallamos una correlación significativa entre la respuesta al estímulo con FMLP y los niveles de GOT y GPT, pero sólo cuando consideramos los niveles absolutos de la producción de superóxido y no cuando lo que comparamos fueron los porcentajes de respuesta, por lo que dudamos que tenga valor, ya que esa correlación no se observó tras otros estímulos. Así pues, nuestros resultados, al igual que los de Uehara y Sato (227), indican que la función hepatocelular (por ejemplo, de síntesis de proteínas) y no las necrosis hepatocelulares, es lo que se relaciona con la alteración de la función microbicida, oxígeno-dependiente, de los neutrófilos.

En este estudio también hemos percibido que los pacientes que habían desarrollado ascitis o episodios previos de encefalopatía, presentaron una mayor reducción de la producción de superóxido. Si bien ello no siempre fue significativo. No hemos hallado en la literatura trabajos que se hayan ocupado de analizar específicamente estos factores en relación con la producción de anión superóxido. Pero tanto la ascitis como la encefalopatía hepática son variables incluidas en los grados de Child-Pugh, por lo que es lógico esperar que los pacientes con estas complicaciones, y por tanto con mayor puntuación en esta clasificación, presentaran un mayor deterioro de la función de sus neutrófilos.

Con los resultados obtenidos, y en concordancia con datos

reflejados en estudios previos, podemos decir que en los neutrófilos de los pacientes con cirrosis hepática existe un defecto en la producción de anión superóxido que aparece ya en aquellos con función hepatocelular conservada, pero que se acentúa a medida que se deteriora más la función hepatocelular. La actividad inflamatoria y el grado de las necrosis no parece tener ninguna relación.

También analizamos la influencia de otros factores (hipertensión portal y episodios previos de infección del líquido ascítico) en la respuesta de los neutrófilos de pacientes con cirrosis.

La hipertensión portal es una de las complicaciones más graves que puede originar de la cirrosis hepática. Los pacientes ingresados por hemorragia digestiva secundaria a hipertensión portal tienen un mayor riesgo de infecciones; son sometidos más frecuentemente a exploraciones invasivas que producen bacteriemias, pueden tener disminución del nivel de conciencia, con el consiguiente riesgo de aspiraciones, hipovolemia, aumento en la permeabilidad intestinal, etc... Incluso las infecciones pueden precipitar una recidiva hemorrágica precoz. No hemos analizado la función de los neutrófilos en el momento agudo de la hemorragia digestiva, ya que se sabe que esta situación la altera. Lo que hemos valorado es, fuera del episodio agudo, si aquellos pacientes que, en algún momento de su evolución, habían presentado una hemorragia digestiva por hipertensión portal tenían una alteración en la producción de

superóxido. Este factor no ha sido estudiado en trabajos previos. Hallamos que los neutrófilos de aquellos pacientes que habían sufrido esta complicación respondieron a la estimulación con FMLP o flúor con una menor producción de superóxido que los que no habían tenido esta complicación, aunque las diferencias no fueron significativas. Esta menor producción de anión superóxido por los neutrófilos pudiera contribuir, junto con otros factores, a la mayor frecuencia de infecciones tras las hemorragias digestivas.

También hemos estudiado la función de los neutrófilos de pacientes que habían desarrollado infecciones espontáneas del líquido ascítico. Un defecto en el funcionalismo de estos leucocitos justificaría que la susceptibilidad a las infecciones estuviera aumentada. Por ello, era de esperar que la producción de anión superóxido estuviera particularmente reducida en estos pacientes, sin embargo, no es este el resultado que obtuvimos en contra de lo esperado, la respuesta de los neutrófilos al estímulo con FMLP o FAI fue mayor en los pacientes con antecedentes de peritonitis bacteriana que en aquellos que carecían de él. Aunque nosotros hemos medido la producción de superóxido en los neutrófilos de sangre periférica, también podrían ser subsidiarios de estudio los neutrófilos del líquido ascítico, y comprobar así su funcionalismo en estas situaciones. Además, en la fisiopatología de la infección del líquido ascítico intervienen otros muchos factores, tales como las alteraciones en los mecanismos de defensa inmunológica, el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, las alteraciones en la barrera intestinal, el poder opsónico del líquido ascítico, la

disminución de la actividad del sistema monocítico-macrofágico, y las alteraciones de la inmunidad humoral inespecífica sérica y del líquido ascítico.

En resumen, demostramos que existe una disminución de la producción de anión superóxido por los neutrófilos de los enfermos con cirrosis hepática, que es independientemente de la etiología de la enfermedad, no tiene relación con los niveles de transaminasas, que aparece incluso en pacientes con función hepática conservada, pero que se acentúa a medida que se deteriora la *función hepatocelular*. Este trastorno pudiera contribuir a la *mayor incidencia de infecciones* en estos enfermos, en particular en los que presentan hemorragias digestivas por hipertensión portal. No hemos observado que el defecto sea mayor en los pacientes con antecedentes de infección del líquido ascítico, pero ello probablemente se debe a que en la aparición de esta complicación intervienen otros muchos factores.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- En los pacientes con cirrosis hepática existe una alteración en el funcionalismo de los neutrófilos, que se manifiesta por una menor producción de anión superóxido. Esta alteración no parece estar determinada por inhibidores presentes en el suero de estos pacientes sino que es intrínseca a los neutrófilos.

2.- La menor producción de anión superóxido no parece deberse a una alteración en los receptores situados en la membrana celular de los neutrófilos ya que este defecto lo reconocimos cuando las células fueron estimuladas con estímulos que utilizan receptores diferentes.

3.- Las vías de activación celular dependientes del calcio y de la PKC parecen estar indemnes ya que responden correctamente al A23187 y al PMA.

4.- La disminución en la producción de radicales superóxido se pone de manifiesto al utilizar estímulos que actúan activando la Proteína G, motivo por lo que situamos el defecto de estas células a ese nivel.

5.- El defecto funcional de los neutrófilos de los cirróticos no parece ser debido al alcohol, ya que también se detecta en las cirrosis de otras etiologías.

6.- Este defecto se relaciona con la función hepática. Se detecta cuando aún está conservada, pero empeora a medida que lo hace la función hepática. La actividad inflamatoria y necrótica no parecen influir sobre la función de los neutrófilos. Los neutrófilos de pacientes con antecedentes de hemorragia digestiva, pero no los que tienen antecedentes de peritonitis bacteriana espontánea, muestran una tendencia a tener una menor producción de anión superóxido.

RESUMEN

RESUMEN

Las infecciones constituyen una complicación frecuente y grave de la cirrosis hepática. Se han observado diferentes alteraciones en los mecanismos de defensa de los pacientes cirróticos que podrían explicar la susceptibilidad a las infecciones. Entre éstas destacan los trastornos en la barrera intestinal, las alteraciones en la actividad del sistema monocítico-macrofágico, las anomalías en la inmunidad humoral y celular y las disfunciones de los neutrófilos.

Cuando los neutrófilos ingieren bacterias o entran en contacto con un estímulo se produce su degranulación y sufren una serie de cambios coordinados que constituyen la cadena de explosión respiratoria, durante la cual, y a través del sistema enzimático de la NADPH-oxidasa, se transforma el oxígeno molecular en anión superóxido. Dos moléculas de anión superóxido interaccionan para generar H_2O_2 , el cual en presencia de cloro y mieloperoxidasa forman ácido hipocloroso. Este participa en la génesis de cloraminas, que son las que finalmente provocan la muerte bacteriana.

Existen pocos estudios publicados sobre las alteraciones de los mecanismos microbicidas de los neutrófilos en pacientes con cirrosis hepática. Nuestro trabajo ha pretendido conocer si en los pacientes con cirrosis hepática existe un defecto en el funcionalismo de los neutrófilos que los incapacite para destruir a las bacterias fagocitadas y, por lo tanto, que contribuya a aumentar la susceptibilidad a las infecciones. Además, hemos intentado localizar el nivel donde se encuentra ese defecto y, finalmente establecer si existe alguna relación

entre este defecto y alguna característica de la cirrosis.

Tras la estimulación de los neutrófilos con diferentes sustancias, nuestros resultados indican que existe un defecto intrínseco en la función postfagocítica en los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática que se expresa por una menor producción de anión superóxido. Cuando utilizamos estímulos vehiculizados por la proteína G (FMLP, zimosan, FNa, FAI) la producción de superóxido estuvo reducida de forma significativa, mientras que la respuesta a estímulos no transmitidos a través de la proteína G (ionóforo de calcio, PMA), no se diferenció de forma significativa de la que se obtuvo en los controles. Por ello, este defecto muy probablemente se encuentre localizado en los mecanismos de activación de membrana, y más concretamente a nivel de la proteína G.

También hemos observado que este defecto en la producción de anión superóxido por los neutrófilos de pacientes con cirrosis hepática es independiente de la etiología de la enfermedad, no tiene relación con los niveles de transaminasas, pero sí con el grado de insuficiencia hepática. Se reconoce en pacientes con función hepática conservada, pero se acentúa progresivamente a medida que empeora el grado de insuficiencia funcional hepática. Este trastorno pudiera contribuir a la mayor incidencia de infecciones en estos enfermos, en particular en los que presentan hemorragia digestiva por hipertensión portal. Sin embargo, no hemos observado que este defecto sea mayor en los pacientes con antecedentes de infección del líquido ascítico, quizás porque en la aparición de esta complicación intervienen otros muchos factores.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Clemente G, Barajas JM, Serrano MI, Perez de Ayala MV, Menchén P, Senent MC, Castellano D, Loaches N, Velo JL, Alcalá R. Infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* 1986; 9: 285-290.
- 2.- Rimola A, Bory F, Planas R, Xanbert A, Bruguera M, Rodés J. Infecciones bacterianas agudas en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* 1981; 4: 453-458.
- 3.- Andreu M, Barrufet P, Force L, Solá R, Verdaguer A, Panadés A, Arán R. Fiebre en el enfermo con cirrosis hepática: estudio prospectivo durante seis meses. *Medicina Clínica (Barc)* 1985; 84: 433-436.
- 4.- Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18: 353-358.
- 5.- Dixon RE. Effect of infections on hospital care. *Ann Int Med* 1978; 89: 749-753.
- 6.- Guarner C, Runyon BA. Macrophage function in cirrhosis and the risk of bacterial infection. *Hepatology* 1995; 22: 367-368
- 7.- Palazón JM, Garcia A, Gómez A. Infecciones hospitalarias en pacientes con cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* 1984; 7: 120-122.
- 8.- Bernard B, Cadranel JF, Valla D, Escolano S, Jarlier V, Opolon P. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: a prospective

study. *Gastroenterology* 1995; 108: 1828-1834.

9.- Ho H, Zuckerman MJ, Ho TK, Guerra LG, Verghese A, Casner PR. Prevalence of associated infections in community-acquired spontaneous bacterial peritonitis.

Am J Gastroenterology 1996; 91: 735-742.

10.- Runyon BA. Bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18: 271-272.

11.- Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987; 28: 623-641.

12.- Rimola A. Infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. *MTA-Medicina Interna* 1987; 5: 161-224.

13.- Blaise M, Pateron D, Trinchet JC, Levacher S, Beaugrand M, Pourriat JL. Systemic antibiotic therapy prevents bacterial infection in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1994; 20: 34-38.

14.- Lal D, Gorbach SL, Levitan R. Intestinal microflora in patients with alcoholic cirrhosis: urea-splitting bacteria and neomycin resistance. *Gastroenterology* 1972; 62: 275-279.

15.- Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatology* 1994; 21: 792-796.

16.- Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 1719-1724.

- 17.- Conn HO, Ramsby GR, Storer EH. Selective intraarterial vasopressin in the treatment of upper gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1973; 63: 634-645.
- 18.- Davis GB, Bookstein J, Hagan PL. The relative effects of selective intra-arterial and venous vasopressin infusion. *Radiology* 1976; 120: 537-538.
- 19.- Mallory A, Schaefer JW, Cohen JR, Holt SA, Norton LW. Selective intra-arterial vasopressin infusion for upper gastrointestinal tract hemorrhage. *Arch Surg* 1980; 115: 30-32.
- 20.- Runyon BA, Squier SU. Translocation of gut bacteria of cirrhotic rats to mesenteric lymph nodes may partially explain the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis (Abstract). *Hepatology* 1991; 14: 91A.
- 21.- Bjerneboe M, Prytz H. The mononuclear phagocytic functions on the liver. En: Ferguson A and McSween RMN, eds. *Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract*. Lancaster: MTP Press Ltd, 1976; 251-289.
- 22.- Biozzi C, Stiffel C. The physiopathology of the reticuloendothelial cells of the liver and spleen. En: Popper H and Schaffner F, eds. *Progress in liver diseases II*. New York: Grune & Stratton, 1965: 166-191.
- 23.- Bradfield JWB. Reticulo-endothelial blockade: a reassessment. En: Wisse E, and Knook DL, eds. *Kupffer cells and the other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/ North Holland biomedical Press, 1977: 365-372.
- 24.- Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Píera C, Rodés J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984; 4: 53-58.

- 25.- Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD. Impaired function of macrophage Fc γ receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1122-1128.
- 26.- Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, Gatta A. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 628-638.
- 27.- Yamamoto Y, Sezai S, Sakurabayashi S, Hirano M, Kamisaka K, Oka H. A study of endotoxaemia in patients with primary biliary cirrhosis. *J Int Med Res* 1994; 22: 95-99.
- 28.- Groszman RJ, Kravetz D, Parysow O. Intrahepatic arteriovenous shunting in cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1977; 73: 201-204.
- 29.- Huet PM, Goresky CA, Villeneuve JP, Marleau D. Assessment of the liver circulation in human cirrhosis. *J Clin Invest* 1982; 70: 1234-1244.
- 30.- Hassner A, Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. *BMJ* 1981; 282: 1262-1263.
- 31.- Holdstock G, Leslie B, Hill S, Tanner A, Wrigth R. Monocyte function in cirrhosis. *J Clin Pathol* 1982; 35: 972-979.
- 32.- Matsuda M, Yamanaka T, Matsuda A. Distribution of fibronectina in plasma and in liver diseases. *Clin Chim Acta* 1982; 118: 191-199.
- 33.- Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Serum bactericidal and opsonic activities in patients with non-alcoholic cirrhosis. *Q J Med* 1985; 56: 431-437.
- 34.- Naveau S, Poynard T, Abella A, Pignon JP, Poitrine A, Agostini H, Zourabichvili O, Chaput JC. Prognostic value of serum fibronectin concentration

in alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1985; 5: 819-823.

35.- Saba TM, Jaffe E. Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein): its synthesis by vascular endothelial cells and role in cardiopulmonary integrity after trauma as related to reticuloendothelial function. *Am J Med* 1980; 68: 577-594.

36.- Kaplan JE, Saba TM. Humoral deficiency and reticuloendothelial depression after traumatic shock. *Am J Physiol* 1976; 230: 7-14.

37.- Turunen U, Malkamäki M, Valtonen VV, Larinkari U, Pikkarainen P, Salaspuro MP, Mäkää PH. Endotoxin and liver disease. High titres of enterobacterial common antigen antibodies in patients with alcoholic cirrhosis. *Gut* 1981; 22: 849-853.

38.- Bercoff E, Moreau C, Pariente EA, Senant J, Bastit D, Morcamp D, Bourreille J. Les anticorps anti-bacille à Gram négatif au cours de la cirrhose alcoolique. Étude de 58 malades. *Gastroenterol Clin Biol* 1984; 8: 503-506.

39. Bjorneboe M, Prytz H, Orskov F. Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1972; 1: 58-60.

40.- Simjee AE, Hamilton-Miller JMT, Thomas HC, Brumfitt W, Sherlock S. Antibodies to *Escherichia coli* in chronic liver disease. *Gut* 1975; 16: 871-875.

41.- Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988; 8: 632-635.

42.- Mal F, Pham Huu T, Bendahou M, Trinchet JC, Garnier M, Hakim J, Beaugrand M. Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid: a study in 47 patients with cirrhosis and malignant peritonitis. *J Hepatol* 1991; 12: 45-49.

43.- Runyon BA, Morrissey RL, Hoefs JC. Opsonic activity of human ascitic fluid.

A potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1985; 5: 634-637.

44.- Runyon BA. Opsonic activity of human ascitic fluid. *Hepatology* 1986; 6: 545-546.

45.- Runyon BA. Low protein concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986; 91: 1343-1346.

46.- Hoefs JC. Increase in ascites white blood cell and protein concentrations during diuresis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1981; 1: 249-254

47.- Hoefs JC. Serum protein concentration and portal pressure determine the ascitic fluid protein concentration in patients with chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 260-273.

48.- Wyke RJ, Rajkovic IA, Williams R. Impaired opsonization by serum from patients with chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1983; 51: 91-98

49.- Runyon BA, Van-Epps DE. Diuresis of cirrhotic ascites increases its opsonic activity and may help prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1986; 6: 396-399.

50.- Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor α and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993; 104: 1492-1497.

51.- Le Moine O, Daviere J, Devaster JM, Crusiaux A, Durand F, Bernuau J, Goldman M, Benhamou JP. Interleukin-6: an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 20: 819-824.

- 52.- Berenyi MR, Straus B, Cruz D. In vitro and in vivo studies of cellular immunity in alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1974; 19: 199-205.
- 53.- Girón-González JA, Alvarez-Mon M, Menéndez-Caro JL, Manzano L, Abreu L, Yebra M, Durántez-Martínez A. T lymphocytes from alcoholic cirrhotic patients show normal interleukin-2 production but a defective proliferative response to polyclonal mitogens. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 767-773.
- 54.- Yuceyar H, Kokuludag A, Coker A, Ersoz G, Keskinoglu A, Guler A, Cavusoglu H. The serum levels of soluble interleukin-2 receptor levels in patients with obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 949-953.
- 55.- Nouri-Aria KT, Alexander GJM, Portmann BC, Hegarty JE, Eddleston ALWF, Williams R. T and B cell function in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 1986; 2: 195-207.
- 56.- O'Keefe SJ, El-Zayadi AR, Carrhaer TE, Davis M, Williams R. Malnutrition and immunoincompetence in patients with liver disease. *Lancet* 1980; 2: 615-617.
- 57.- Franco D, Belghiti J, Cortesse A, Boucquey BM, Charra M, Lacaine F, Bismuth H. Nutrition et immunité du cirrhotique alcoolique. *Gastroenterol Clin Biol* 1981; 5: 839-846.
- 58.- Franco D, Charra M, Jeambrun P, Belghiti JU, Cortesse A, Sossler C, Bismuth H. Nutrition and immunity after peritoneovenous drainage of intractable ascites in cirrhotic patients. *Am J Surg* 1983; 146: 652-657.
- 59.- Vega Robledo GB, Guinzberg AL, Ramos garcía C, Ortiz Ortiz L. Patients with hepatic cirrhosis: altered lymphocyte response to mitogens and its relation

- with plasmatic zinc, albumin and transferrin. *Arch Med Res* 1994; 25: 5-9.
- 60.- Caregaro L, Alberino F, Amodio P, Merkel C, Bolognesi M, Angeli P, Gatta A. Malnutrition in alcoholic and virus related cirrhosis. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 602-609.
- 61.- Laso FJ, Madruga JI, Lopez A, Ciudad J, Alvarez Mon M, San Miguel J, Orfao A. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 1564-1568
- 62.- Spinozzi F, Agea E, Bassotti G, Belia S, Rondoni F, Broccucci L, Solinas A, Gerli R, Bertotto A. Ethanol specific impairment of T-lymphocyte activation is caused by a transitory block in signal transduction pathways. *Gastroenterology* 1993; 105: 1490-1501.
- 63.- Maderazo EG, Ward PA, Quintilani R. Defective regulation of chemotaxis in cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 621-630.
- 64.- Wyke RJ, Yousif-Kadaru AG, Rajkovic IA, Eddleston WF, Williams R. Serum stimulatory activity and polymorphonuclear leucocyte movement in patients with fulminant hepatic failure. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 442-449.
- 65.- Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986; 6: 252-262.
- 66.- DeMeo AN, Andersen BR. Defective chemotaxis associated a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N Engl J Med* 1972; 285: 735-740.
- 67.- Root RK, Cohen MS. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 565-598.

- 68.- Vallespí T. Indicaciones y significado de los estudios citoquímicos. *Medicine* 1996; 7: 1379-1380.
- 69.- Woessner S. Trastornos funcionales granulocitarios: actitudes diagnósticas, manifestaciones clínicas y aspectos terapéuticos. *Medicine* 1996; 7:1347-1352.
- 70.- Playfair JHL. Principios de inmunidad frente a la infección. En: Brostoff J, Scadding GK, Male DK, Roitt IM, eds. *Inmunología Clínica*. Tomo II. Philadelphia: JB Lippincott, 1994: 22.1- 22.10.
- 71.- Morel F, Doussiere J, Vignais V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991; 201; 523-545.
- 72.- Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human N-formyl-peptide receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 1103-1109.
- 73.- Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 1996; 383: 86-89.
- 74.- Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6682-6686.
- 75.- Ames RS, Li Y, Sarau HM, Nuthulaganti P, Foley JJ, Ellis C, Zeng Z, Su K, Jurewicz AJ, Hertzberg RP, Bergsma DJ, Kumar C. Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 20231-20234.

- 76.- Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiological Reviews* 1993; 73: 797-821.
- 77.- Lala A, Sharma A, Sojar HT, Radel SJ, Geuco RJ, De Nardin E. Recombinant expression and partial characterization of the human formyl peptide receptor. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178: 302-306.
- 78.- Pérez HD, Elfman F, Lobo E. Removal of human polymorphonuclear leukocyte surface sialic acids inhibits reexpression (or recycling) of the formyl peptide receptors. *J Immunol* 1988; 139: 1978-1984.
- 79.- Giannini E, Boulay F. Phosphorylation, dephosphorylation, and recycling of the C5a receptor in differentiated HL 60 cells. *J Immunol* 1995; 154: 4055-4064.
- 80.- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 653-688.
- 81.- Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen L, Borregaard N. Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J* 1994; 299: 473-479.
- 82.- Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry* 1990; 29: 11123-11133.
- 83.- Radel SJ, Genco RJ, De Nardin E. Structural and functional characterization of the human formyl peptide receptor ligand-binding region. *Infect Immun* 1994; 62: 1726-1732.
- 84.- Schreiber RE, Prossnitz ER, Ye RD, Cochrane CG, Jesaitis AJ, Bokoch GM.

- Reconstitutin of recombinant N-formyl chemotactic peptide receptor with G protein. *J Leukoc Biol* 1993; 53: 470-474.
- 85.- Bommakanti RK, Klotz KN, Dratz EA, Jesaitis AJ. A carboxyl-terminal tail peptide of neutrophil chemotactic receptor disrupts its physical complex with G protein. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 572-577.
- 86.- Schreiber RE, Prossnitz ER, Ye RE, Cochrane CG, Bokoch GM. Domains of human neutrophil N-formyl-peptide receptor involved in G protein coupling. Mapping with receptor- derived peptides. *J Biol Chem* 1994; 269: 326-331.
- 87.- Prossnitz ER, Quehenberger O, Cochrane CG, Ye RD. The role of the third intracellular loop of the neutrophil N-formyl peptide receptor in G protein coupling. *Biochem J* 1993; 294: 581-587.
- 88.- Jesaitis AJ, Erickson RW, Klotz KN, Bommakanti RK, Siemsen DW. Functional molecular complexes of human N-formyl chemoattractant receptors and actin. *J Immunol* 1993; 151: 5653-5665.
- 89.- Klotz KN, Jesaitis AJ. Neutrophil chemoattractant receptors and the membrane skeleton. *Bioessays* 1994; 16: 193-198.
- 90.- Jesaitis AJ, Tolley JE, Allen RA. Receptor-cytoskeleton interactions and membrane traffic may regulate chemoattractant-induced superoxide production in human granulocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 13662-13669.
- 91.- Tennenberg SD, Zemlan FP, Solomkin JS. Characterization of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors on human neutrophils. Effects of isolation and temperature on receptor expression and functional activity. *J Immunol* 1988; 141: 3937-3944.

- 92.- Koo C, Lefkowitz RJ, Snyderman R. The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 442-449.
- 93.- Gierschik P, Steisslinger M, Sidiropoulos D, Herrman E, Jakobs KH. Dual Mg²⁺ control of formyl-peptide-receptor-G-protein interaction in HL-60 cells. Evidence that the low-agonist-affinity receptor interacts with and activates the G-protein. *Eur J Biochem* 1989; 183: 97-105.
- 94.- De Nardin E, Radel SJ, Lewis N, Genco RJ, Hammarskjold M. Identification of a gene encoding for the human formyl peptide receptor. *Biochem Int* 1992; 26: 381-387.
- 95.- Sklar LA, Bokoch GM, Button, Smolen JE. Regulation of ligand-receptor dynamics by guanine nucleotides. *J Biol Chem* 1987; 262: 135-139.
- 96.- Hoffman JF, Keil ML, Riccobene TA, Omann GM, Linderman JJ. Interconverting receptor states at 4 degrees C for the neutrophil N-formyl peptide receptor. *Biochemistry* 1996; 35: 13047-13055.
- 97.- Levesque L, Gaudreault RC, Marceau F. The interaction of 3,5-pyrazolidinedione drugs with receptor for FMLP on human neutrophil leukocytes: a study of the structure-activity relationship. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 419-425.
- 98.- Levesque L, Gaudreault RC, Marceau F. Comparison of two classes of non-peptide drugs as antagonists of neutrophil receptor for F-Met-Leu-Phe. Pyrazolons and iodinated radiographic contrasts agents. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 553-560.

- 99.- Dewald B, Thelen M, Baggiolini M. Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J Biol Chem* 1988; 263: 16179-16184.
- 100.- Wenzel-Seifert K, Grünbaum L, Seifert R. Differential inhibition of human neutrophil activation by cyclosporins A, D, and H. Cyclosporin H is a potent and effective inhibitor of formyl peptide-induced superoxide formation. *J Immunol* 1991; 147: 1940-1946.
- 101.- Koo C, Lefkowitz RJ, Snyderman R. Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1983; 72: 748-753.
- 102.- Jacobs AA, Huber JL, Ward RA, Klein JB, McLeish KR. Chemoattractant receptor-specific differences in G protein activation rates regulate effector enzyme and functional responses. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 679-686.
- 103.- Cockcroft S, Gomperts BD. Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 1985; 314: 534-536
- 104.- Cockcroft S. G-Protein-regulated phospholipases C, D and A₂- mediated signalling in neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1113: 135-160.
- 105.- Bollag G, McCormick. Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 601-632.
- 106.- Uhing RJ, Polakis PG, Snyderman R. Isolation of GTP-binding proteins from myeloid HL-60 cells. Identification of two pertussis toxin substrates. *J. Biol Chem* 1987; 262: 15575-15579.
- 107.- Goldsmith P, Rossiter K, Carter A, Simonds W, Unson CG, Vitensky R,

- Spiegel AM. Identification of the GTP-binding protein encoded by Gi3 complementary DNA. *J. Biol Chem* 1988; 263: 6476-6479.
- 108.- Offermans S, Schafer R, Hoffmann B, Bombien E, Spicher K, Hinsch KD, Schultz G, Rosenthal W. Agonist-sensitive binding of a photoreactive GTP analog to a G-protein alpha-subunit in membranes of HL-60 cells. *FEBS* 1990; 260: 14-18.
- 109.- Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 1988; 333: 129-134.
- 110.- Omann GM, Porasik-Lowes MM. Graded G-protein uncoupling by pertussis toxin treatment of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol* 1991; 146: 1303-1308.
- 111.- Bommakanti RK, Bokoch GM, Tolley JO, Schreiber RE, Siemsen DW, Klotz KN, Jesaitis AJ. Reconstitution of a physical complex between the N-formyl chemotactic peptide receptor and G protein. Inhibition by pertussis toxin-catalyzed ADP ribosylation. *J. Biol Chem* 1992; 267: 7576-7581.
- 112.- Omann GM, Harter JM, Hassan N, Mansfield PJ, Suchard SJ, Neubig RR. A threshold level of coupled G-proteins is required to transduce neutrophil responses. *J. Immunol* 1992; 149: 2172-2178.
- 113.- Lefkowitz RJ. Thrombin receptor. Variations on a theme. *Nature* 1991; 351: 353-354.
- 114.- Sottile A, Venza M, Venza I, Teti D. Prostaglandins affect the respiratory burst of human neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1995; 17:311-321
- 115.- Tyagi SR, Olson SC, Burnham DN, Lambeth JD. Cyclic AMP-elevating

agents blocks chemoattractant activation of diradylglycerol generation by inhibiting phospholipase D activation. *J Biol Chem* 1991; 166: 3498-3504.

116.- Cronstein BN, Haines KA, Kolasinski S, Reibman J. Occupancy of G α s-linked receptors uncouples chemoattractant receptors from their stimulus-transduction mechanisms in the neutrophil. *Blood* 1992; 80: 1052-1057.

117.- Burkey TH, Webster RO. Adenosine inhibits f-MLP-stimulated adherence and superoxide anion generation by human neutrophils at an early step in signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1175: 312-318.

118.- Mueller H, Weingarten R, Ransnas LA, Bokoch GM, Sklar LA. Differential amplification of antagonistic receptor pathways in neutrophils. *J Biol Chem* 1991; 266: 12939-12943.

119.- Hri T, Ohoka Y, Ui M, Katada T. Modification of the function of pertussis toxin substrate GTP-binding protein by cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1992; 267: 1020-1026.

120.- Worthen GS, Avdi N, Buhl AM, Suzuki N, Johnson GL. FMLP Activates Ras and Raf in human neutrophils potential role in activation of MAP kinase. *J. Clin Invest* 1994; 94: 815-823.

121.- Labadia ME, Bokoch GM, Huang CK. The Rap 1A protein enhances protein kinase C activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 1321-1328.

122.- Quilliam LA, Mueller H, Bohl BP, Prossnitz V, Sklar LA, Der CJ, Bokoch GM. Rap 1A is substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils. *J Immunol* 1991; 147: 1628-1635.

123.- Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-

- activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996; 271: 981-983.
- 124.- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21 rac1. *Nature* 1991; 353: 668-670.
- 125.- Dagher MC, Fuchs A, Bourmeyster N, Jouan A, Vignais PV. Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase. *Biochimie* 1995; 77: 651-660.
- 126.- Kwak JY, López I, Uhlinger DJ, Ryu SH, Lambeth JD. Rho A and cytosolic 50-KDa factor reconstitute GTP gamma S-dependent phospholipase D activity in human neutrophil. *J Biol Chem* 1995; 270: 27093-27098.
- 127.- Ishida K, Takeshige K, Takasugi S, Minakami S. GTP-dependent and independent activation of superoxide producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *FEBS* 1989; 243: 169-172.
- 128.- Paveri P, Heyworth PG, Curnutte JT. Absolute requirement for GTP in activation of human neutrophil NADPH oxidase in a cell-free system: role of ATP in regenerating GTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2494-2498.
- 129.- Park JW, Babior BM. Effects of diacylglycerol on the activation and kinetics of the respiratory burst oxidase in a cell-free system from human neutrophils: evidence that diacylglycerol may regulate nucleotide uptake by a GTP-binding protein. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 119-124.
- 130.- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Ui M, Gilman AG. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol Chem* 1984; 259: 3560-3567.
- 131.- Seifert R, Wenzel K, Eckstein F, Schultz G. Purine and pyrimidine

nucleotides potentiate activation of NADPH oxidase and degranulation by chemotactic peptides and induce aggregation of human neutrophils via G proteins. *Eur J Biochem* 1989; 181: 277-285.

132.- Hartfield PJ, Robinson JM. Fluoride mediated activation of the respiratory burst in electropermeabilized neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1050: 176-180.

133.- English D, Rizzo MT, Tricot G, Hoffman R. Involvement of guanine nucleotides in superoxide release by fluoride-treated neutrophils. Implications for a role of a guanine nucleotide regulatory protein. *J. Immunol* 1989; 143: 1685-1691.

134.- Cockcroft S, Allan D. The fatty acid composition of phosphatidylinositol, phosphatidate 1,2-diacylglycerol in stimulated human neutrophils. *Biochem J* 1984; 222: 557-559.

135.- Cockcroft S. Ca²⁺ dependent conversion of phosphatidylinositol to phosphatidate in neutrophils stimulated with fMet-Leu-Phe or ionophore A23187. *Biochim Biophys Acta* 1984; 795: 37-46.

136.- Billah MM, Eckel S, Myers RF, Siegel MI. Metabolism of platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) by human promyelocytic leukemic HL 60 cells. Stimulated expression of phospholipase A2 and acetyltransferase requires differentiation. *J Biol Chem* 1986; 261: 5824-5831.

137.- Bradford PG, Rubin RP. Quantitative changes in inositol 1,4,5-triphosphate in chemoattractant-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1986; 261: 15644-15647.

138.- Stutchfield J, Cockcroft S. Characterization of f-met-leu-phe-stimulated

phospholipase C in streptolysin-O-permeabilised cells. *Eur J Biochem* 1991; 197: 119-125.

139.- Faber A, Aviram I. Arachidonate supports hydrolysis of phosphatidylinositol by neutrophil cytosolic phospholipase C: relation to NADPH oxidase. *Biochem Int* 1991; 23: 751-758.

140.- Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 1992; 267: 12393-12396.

141.- Camps M, Hou C, Sidiropoulos D, Stock JB, Jakobs KH, Gierschik P. Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein $\beta\gamma$ subunits *Eur J Biochem* 1992; 206: 821-831.

142.- Cockcroft S, Baldwin JM, Allan D. The Ca^{2+} activated polyphosphoinositide phosphodiesterase of human and rabbit neutrophil membranes. *Biochem J* 1984; 221: 477-482.

143.- Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 688-697.

144.- Thompson NT, Tateson JE, Randall RW, Spacey GD, Bonser RW, Garland LG. The temporal relationship between phospholipase activation, diacylglycerol formation and superoxide production in the human neutrophil. *Biochem J* 1990; 271: 209-213.

145.- Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD. Neutrophil phospholipase D: inhibition by Rho-GDP dissociation inhibitor and stimulation by small GTPase

GDP dissociation stimulator. *Methods Enzymol* 1995; 256: 246-256.

146.- López I, Burns DJ, Lambeth JD. Regulation of phospholipase D by protein kinase in human neutrophils. Conventional isoforms of protein kinase C phosphorylate a phospholipase D-related component in the plasma membrane. *J Biol Chem* 1995; 270: 19465-19472.

147.- Pai JK, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemoattractant peptide-stimulated HL60 granulocytes. *J Biol Chem* 1988; 263: 12472-12477.

148.- Bonser RW, Thompson NT, Randall RW, Garland LG. Phospholipase D activation is functionally linked to superoxide generation in the human neutrophil. *Biochem J* 1989; 264: 617-620.

149.- English D, Taylor GS. Divergent effects of propranolol on neutrophil superoxide release: involvement of phosphatidic acid and diacylglycerol as second messengers. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 423-429.

150.- Lundquist C, Alling C, Aradottir S, Gustavsson L. Agonist-stimulated and basal phosphatidylethanol formation in neutrophils from alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 580-586.

151.- Korchak HM, Vosshall LB, Haines KA, Wilkenfeld C, Lundquist KF, Weissmann G. Activation of human neutrophil by calcium-mobilizing ligands II. Correlation of calcium, diacylglycerol and phosphatidic acid generation with superoxide anion generation. *J Biol Chem* 1988; 263: 11098-11105.

152.- Wang P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Existence of cytosolic phospholipase D. Identification and comparison with membrane-bound enzyme.

J Biol Chem 1992; 266: 14877-14880.

153.- Houle MG, Bourgoin S. Small GTP ase-regulated phospholipase D in granulocytes. Biochem Cell Biol 1996; 74: 459-467.

154.- Winkler JD, Sung CM, Hubbard WC, Chilton FH. Influence of arachidonic acid on indices of phospholipase A2 activity in the human neutrophil. Biochem J 1993; 291: 825-831.

155.- Cockcroft S, Nielson CP, Stutchfield J. Is phospholipase A2 activation regulated by G-proteins ? Biochem Soc Trans 1991; 19: 333-336.

156.- Axelrod J. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 and arachidonic acid release in signal transduction. Biochem Soc Trans 1990; 18: 503-508.

157.- Balsinde J, Diez E, Schüller A, Mollinedo F. Phospholipase A2 activity in resting and activated human neutrophils. Substrate specificity, pH dependence and subcellular localization. J Biol Chem 1988; 263: 1929-1936.

158.- Pouliot M, McDonald PP, Krump E, Mancini JA, McColl SR, Weech PK, Borgeat P. Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. Eur J Biochem 1996; 238: 250-258.

159.- Ramesha CS, Ives DL. Detection of arachidonoyl-selective phospholipase A2 in human neutrophil cytosol. Biochim Biophys Acta 1993; 1168: 37-44.

160.- Xing M, Wilkins PL, McConnell BK, Mattera R. Regulation of phospholipase A2 activity in undifferentiated and neutrophil-like HL 60 cells linkage, between impaired responses to agonists and absence of protein kinase

C dependent phosphorylation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269: 3117-3124

161.- Nahas N, Waterman WH, Sha 'afi RI. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) promotes phosphorylation and an increase in the activity of cytosolic phospholipase A2 in human neutrophils. *Biochem J* 1996; 313: 503-508.

162.- Marshall LA, Roshak A. Coexistence of two biochemically distinct phospholipase A2 activities in human platelet, monocyte, and neutrophil. *Biochem Cell Biol* 1993; 71: 331-339.

163.- Barnette MS, Rush J, Marshall LA, Foley JJ, Schmidt DB, Saran HM. Effects of scalaradial, a novel inhibitor of 14 KDa phospholipase A2, on human neutrophil function. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1661-1667.

164.- Chilton FH. Assays for measuring arachidonic acid release from phospholipids. *Methods Enzymol* 1991; 197: 166-183.

165.- Balsinde J, Fernández B, Diez E. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J Immunol* 1990; 144: 4298-4304.

166.- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PA2 contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 1991; 65: 1043-1051.

167.- Henderson LM, Chappell JB, Jones OTG. Superoxide generation is inhibited by phospholipase A2 inhibitors. Role for phospholipase A2 in the

activation of the NADPH oxidase. *Biochem J* 1989; 264: 249-255.

168.- Dana R, Malech HL, Levy R. The requirement for phospholipase A2 for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J* 1994; 297: 217-223.

169.- Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Weissmann G. Arachidonic acid as a second messenger. Interactions with a GTP-binding protein of human neutrophils. *J Immunol* 1991; 147: 231-236.

170.- Lew PD, Wollheim CB, Waldvogel FA, Pozzan T. Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes in intracellular calcium-buffering capacity: correlation with exocytosis and O₂- production in human neutrophils. *J Cell Biol* 1984; 99: 1212-1220.

171.- Von Tscharner V, Prod'homme B, Baggiolini M, Reuter H. Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature* 1986; 324: 369-372.

172.- Prentki M, Wollheim CB, Lew DL. Ca²⁺ Homeostasis in permeabilized human neutrophils. Characterization of Ca²⁺-sequestering pools and the action of inositol 1,4,5-triphosphate. *J Biol Chem* 1984; 259: 13777-13782.

173.- Liang SL, Woodlock TJ, Whittin JC, Lichtman MA, Segel GB. Signal transduction in N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and concanavalin A stimulated human neutrophils: superoxide production without a rise in intracellular free calcium. *J Cell Physiol* 1990; 145: 295-302.

174.- Von Tscharner V, Deranleau DA, Baggiolini M. Calcium fluxes and buffering in human neutrophils. *J Biol Chem* 1986; 261: 10163-10168.

- 175.- Davies EV, Campbell AK, Hallett MB. Ca²⁺ oscillations in neutrophils triggered by immune complexes result from Ca²⁺ influx. *Immunology* 1994; 82: 57-62.
- 176.- Nasmith PE, Grinstein S. Are Ca²⁺ channels in neutrophils activated by a rise in cytosolic free Ca²⁺ ?. *FEBS* 1987; 221: 95-100.
- 177.- Tauber A. Protein-kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood* 1987; 69: 711-720.
- 178.- Ashendel CL. The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1985; 822: 219-242.
- 179.- Majumdar S, Rossi MW, Fujiki T, Phillips WA, Din S, Queen CF, Johnston RB, Rosen OM, Corkey BE, Korchak HM. Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium and phospholipid dependent beta-protein kinase C and a phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *J Biol Chem* 1991; 266: 9285-9294.
- 180.- Pontremoli S, Melloni E, Sparatore B, Michetti M, Salomino F, Horecker BL. Isozymes of protein kinase C in human neutrophils and their modification by two endogenous proteinases. *J Biol Chem* 1990; 265: 706-712.
- 181.- Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 1991; 351: 320-322.
- 182.- Parente JE, Walsh MP, Girard PR, Kno JF, Ng DS, Wong K. Effects of gold coordination complexes on neutrophil function are mediated via inhibition of

- protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1989; 35: 26-33.
- 183.- Tomoda MK, Tsuckiya M, Ueda W, Hirakawa M, Utsumi K. Lidocaine inhibits stimulation coupled responses of neutrophils and protein kinase C activity. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1990; 22: 199-210.
- 184.- Benna J, Hakim J, Labro MT. Inhibition of human neutrophil protein kinase C activity by antimalarial drug mefloquine. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 527-532.
- 185.- Twomey B, Muid RE, Dale MM. The effect of putative protein kinase C inhibitors, K 252a and staurosporine, on the human neutrophil respiratory burst activated by both receptor stimulation and post-receptor mechanisms. *Br J Pharmacol* 1990; 100: 819-825.
- 186.- Berkow RL, Dodson RW. Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood* 1990; 75: 2445-2452.
- 187.- Gómez-Cambronero J, Huang CK, Bouak VA, Wang E, Casnellie JE, Shiraishi T, Sha'afi RI. Tyrosine phosphorylation in human neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162: 1478-1485.
- 188.- Naccache PH, Gilbert C, Caon AC, Gaudry M, Huang CK, Bonak VA, Umezawa K, McColl SR. Selective inhibition of human neutrophil functional responsiveness by erbstatin, an inhibitor of tyrosine protein kinase. *Blood* 1990; 76: 2098-2104.
- 189.- Dryden P, Duronio V, Martin L, Hudson AT, Salari H. Inhibition of human neutrophil responses by alpha-cyano-3,4-dihydroxythiocinnamamide; a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 656-664.

- 190.- Grinstein S, Furuya W, Lu DJ, Mills GB. Vanadate stimulates oxygen consumption and tyrosine phosphorylation in electropermeabilized human neutrophils. *J Biol Chem* 1990; 265: 318-327.
- 191.- Grinstein S, Furuya W. Tyrosine phosphorylation and oxygen consumption induced by G proteins in neutrophils. *Am J Physiol* 1991; 260: C1019-C1027.
- 192.- Nasmith PE, Mills GB, Grinstein S. Guanine nucleotides induce tyrosine phosphorylation and activation of the respiratory burst in neutrophils. *Biochem J* 1989; 257: 893-897.
- 193.- Nath J, Powledge A, Wright DG. Studies of signal transduction in the respiratory burst-associated stimulation of f-met-leu-phe induced tubulin tyrosinolation and phorbol 12-myristate 13-acetate- induced posttranslational incorporation of tyrosine into multiple proteins in activated neutrophils and HL cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 848-855.
- 194.- Umeki S. Mechanisms for the activation / electron transfer of neutrophil NADPH-oxidase complex and molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Ann Hematol* 1994; 68: 267-277.
- 195.- Park JW, Babior BM. The translocation of respiratory burst oxidase components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. *J Biol Chem* 1992; 267: 19901-19906.
- 196.- Wientjes FB, Segal AW, Hartwig JH. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 303-312.
- 197.- Escriou V, Laporte F, Vignais PV. Assessment of the flavoprotein nature of

- the redox core of neutrophil NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 930-935.
- 198.- Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME. Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry* 1995; 34: 16753-16757.
- 199.- Quinn MT, Curnutte JT, Parkos CA, Mullen ML, Scott PJ, Erickson RW, Jesaitis AJ. Reconstitution of defective respiratory burst activity with partially purified human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease: possible role of Rap 1A. *Blood* 1992; 79: 2438-2445.
- 200.- Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ, Linner JG. Subcellular distribution of the Rap 1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood* 1992; 79: 1563-1573.
- 201.- Quinn MT, Parkos CA, Jesaitis AJ. Purification of human neutrophil NADPH oxidase cytochrome b558 and association with Rap 1A. *Methods Enzymol* 1995; 255: 476-487.
- 202.- Umeki S. Activation factors of neutrophil NADPH oxidase complex. *Life Sci* 1994; 55: 1-13.
- 203.- Bastian NR, Hibbs JB Jr. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 131-139.
- 204.- Kanegasaki S. Superoxide generating system in leukocytes: its activation mechanism and significance. *Human Cell* 1993; 6: 245-252.
- 205.- Nauseef WM. Cytosolic oxidase factors in the NADPH-dependent oxidase of human neutrophils. *Eur J Haematol* 1993; 51: 301-308.
- 206.- Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. Two cytosolic components

- of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 1990; 85: 714-721.
- 207.- Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem J* 1996; 317: 919-924.
- 208.- Fuchs A, Dagher MC, Vignais PV. Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two hybrid system. *J Biol Chem* 1995; 270: 5695-5697.
- 209.- Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *Biochem J* 1995; 308: 991-994.
- 210.- Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem* 1991; 266: 5911-5917.
- 211.- Smith RM, Connor JA, Chen M, Babior BM. The cytosolic subunit p67 phox contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1996; 98: 977-983.
- 212.- Cross AR, Curnutte JT. The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1995; 270: 6543-6548.
- 213.- Gabler WL. Potential roles of Mg²⁺ and Ca⁺⁺ in NADPH oxidase dependent superoxide anion synthesis by human neutrophils. *Res Commun*

Chem Pathol Pharmacol 1990; 70: 213-226.

214.- Uhlinger DJ, Inge KL, Kreck ML, Tyagi SR, Neckelmann N, Lambeth JD. Reconstitution and characterization of the human neutrophil respiratory burst oxidase using recombinant p47 phox, p67 phox and plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun 1992; 186: 509-516.

215.- Uhlinger DJ, Tyagi SR, Inge KL, Lambeth JD. The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system. J Biol Chem 1993; 268: 8624-8631.

216.- Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg 1973; 60: 646-649.

217.- Christensen E, Schichting P, Fauerholdt L, Glund C, Kragh Andersen P, Juhl E, Poulsen H, Tygstrup N, and the Copenhagen Study Group for Liver Disease. Prognostic value of Child-Turcotte criteria in medically treated cirrhosis. Hepatology 1984; 4: 430-435.

218.- Parsons-Smith BG, Summerskill WHJ, Dawson AM, Sherlock S. The electroencephalograph in liver disease. Lancet 1957; 2: 867-871.

219.- Soriano G, Guarner C. Peritonitis bacteriana espontánea. En: Bruguera M, Miño G, Pons F, Moreno R, eds. Tratamiento de las enfermedades hepáticas. Madrid: NILO Industria Gráfica SA., 1997: 61-65.

220.- Planas R, Boix J. Hemorragia digestiva por hipertensión portal. Tratamiento hemostático. En: Bruguera M, Miño G, Pons F, Moreno R, eds.

Tratamiento de las enfermedades hepáticas. Madrid: NILO Industria Gráfica SA., 1997:77-84.

221.- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21: 77-89.

222.- Balsinde J, Mollinedo F. Specific activation by concanavalin A of the superoxide anion generation capacity during U937 differentiation. Biochem Biophys Res Commun 1988; 151: 802-808.

223.- Bonney RJ, Wightman PD, Davies P, Sadowski SJ, Kuehl FA Jr, Humes JL. Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages. Biochem J 1978; 176: 433-442.

224.- Zimmerman JJ, Shelhamer JH, Parrillo JE. Examination of the enzyme assay for NADPH oxidoreductase: application to polymorphonuclear leukocyte superoxide anion generation. Crit Care Med 1985; 13: 197-203.

225.- Laffi G, Carloni V, Baldi E, Rossi ME, Azzari C, Gresele P, Marra F, Gentilini P. Impaired superoxide anion, platelet-activating factor, and leukotriene B4 synthesis by neutrophils in cirrhosis. Gastroenterology 1993; 105: 170-177.

226.- Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Itoh T, Harada A, Nonami T, Nakano M, Takagi H. Decreased production of active oxygen species by neutrophils in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterol Jpn

1993; 28: 541-546.

227.- Uehara M, Sato N. Impaired ability of neutrophils to produce oxygen-derived free radicals in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994; 20: 326-330.

228.- Richter J, Gullberg U, Lantz M. TNF-Induced superoxide anion production in adherent human neutrophils involves both the p55 and p75 TNF receptor. *J Immunol* 1995; 154: 4142-4149.

229.- Li Y, Ferrante A, Poulos A, Harvey DP. Neutrophil oxygen radical generation. Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono/polysaturated fatty acids. *J Clin Invest* 1996; 97: 1605-1609.

230.- Kitchen E, Rossi AG, Condliffe AM, Haslett C, Chilvers ER. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood* 1996; 88: 4330-4337.

231.- Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; 136: 4220-4225.

232.- Tsujimoto M, Yokota S, Vilcek J, Weissmann G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 1094-1100.

233.- Berkow RL, Wang D, Larrick JW, Dodson RW, Howard TH. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 139: 3783-3791.

234.- McColl SR, Beauseigle D, Gilbert C, Naccache PH. Priming of the human

neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- α involves regulation at a post-cell surface receptor level. *J Immunol* 1990; 145: 3047-3053.

235.- Solís-Herruzo JA, De Gando M, Ferrer MP, Hernández Muñoz I, Fernández-Boya B, De La Torre MP, Muñoz-Yagüe MT. Reversal of carbon tetrachloride induced changes in microviscosity and lipid composition of liver plasma membrane by colchicine in rats. *Gut* 1993; 34: 1438-1442.

236.- Schuller A, Solís-Herruzo JA, Moscat J, Fernández-Checa JC, Municio AM. The fluidity of liver plasma patients with different types of liver injury. *Hepatology* 1986; 6: 714-717.

237.- García-González M, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105: 527-531.

238.- Sachs CW, Christensen RH, Pratt PC, Lynn WS. Neutrophil elastase activity and superoxide production are diminished in neutrophils of alcoholics. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1249-1255.

239.- Kwak JY, Takeshige K, Cheung BS, Minakami S. Bilirubin inhibits the activation of superoxide producing NADPH oxidase in a neutrophil cell free system. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1076: 369-373.