

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

074825

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

LOCOMOCION DE LEUCOCITOS EN
PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

TESIS QUE PRESENTA LA QUIM. ELISA VEGA AVILA, PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL.

MEXICO, D. F., ABRIL 1984

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LA DIVISION
DE INMUNOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE
INVESTIGACION CIENTIFICA DEL CMN DEL
I.M.S.S., BAJO LA DIRECCION DE:

074825

DR. ROBERTO KRETSCHMER S. TUTOR
JEFE DE LA DIV. INMUNOLOGIA

M. en C. MARTHA LOPEZ OSUNA ASESOR
DIV. INMUNOLOGIA

DR. RUBEN DARIO MARTINEZ ASESOR
DEPTO. CIENCIAS DE LA SALUD,
UAM - I

RESUMEN.

Las condiciones clínicas que cursan con trastornos en la movilidad leucocitaria se asocian a un aumento en la susceptibilidad a las infecciones. Los síndromes cromosomopáticos en los que se ha descrito quimiotaxis defectuosa son: Síndrome de Down, síndrome de Edwards y síndrome de Cri-du-chat. En el síndrome de Turner se han descrito fenómenos autoinmunes con niveles elevados de anticuerpos antitiroideos, anticuerpos --- anti-ovario y disminución en los niveles séricos de IgG e IgM, disminución en el número de linfocitos T y débil respuesta de estas células a la concanavalina A. Con el fin de complementar el perfil inmunológico en estos pacientes se decidió evaluar la migración espontánea, la quimiotaxis y la quimiocinesis de mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) en un grupo de 13 pacientes con síndrome de Turner (cariotipo 45, X) cuyas edades fluctuaron entre los 8 y los 18 años usando como testigos 10 niñas de edades comparables. Los MN y PMN se obtuvieron mediante la técnica de Boyum, y los 3 tipos de migración celular se evaluaron en cámaras de Boyden utilizando como quimioattractantes suero activado con zimósán (SAZ). No se encontró diferencia en la migración espontánea, la quimiotaxis y la quimiocinesis de MN al comparar los pacientes con síndrome de Turner con los testigos sanos. Tampoco se encontró diferencia en la migración espontánea y la quimiocinesis de PMN de pacientes con síndrome de Turner y sus testigos sanos. En cambio, se encontró una diferencia significativa -- ($p < 0.002$) en la quimiotaxis de PMN de pacientes con síndrome de Turner -- comparándola con la de los testigos sanos. Nuestros resultados sugieren

que el defecto quimiotáctico en PMN es de tipo celular y confirman por otra parte que la quimiotaxis, la quimioquinesis y la movilidad espontánea, pueden operar independientemente el uno del otro.

TABLA DE ABREVIATURAS

MN	Células mononucleares
PMN	Células polimorfonucleares
SAZ	Suero activado con zimosán
C5	Glicoproteína que se origina en la activación del complemento
C5a	Glicoproteína que se genera por la ruptura del quinto componente del complemento.
C5a des Arg	C5a que carece del carboxilo terminal
C567	Macromolécula que se genera por la interacción de los productos del complemento, C5, C6 y C7
5-HETE	Acido 5-S-hidroxy-6,8,11,14-eicosatetraenóico
11-HETE	Acido 11-S-hidroxy-5,8,10,14-eicosatetraenóico
12-HETE	Acido 12-L-hidroxy-5,8,10,14-eicosatetraenóico
5-12-di-HETE	Acido 5-S-12-R-dihidroxy-6,8,10,14-eicosatetraenóico
LDCF	Factor quimiotáctico derivado de linfocitos
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
A 23187	Ionóforo que transporta calcio
ATP	Adenosin-5'-trifosfato
AMPc	Adenosin-3',5'-monofosfato cíclico
GMPc	Guanosin-3',5'-monofosfato cíclico
SSF	Solución salina fosfatos
IgE	Inmunoglobulina E
IgA	Inmunoglobulina A
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxy-3-nonil) adenina

I N D I C E

	Pág.
I. Introducción	1
II. Métodos para evaluar la locomoción leucocitaria	5
III. Quimioattractantes	6
IV. Traducción de la señal quimiotáctica	12
V. Fase efectora	23
VI. Desórdenes clínicos asociados con locomoción defectuosa	27
VII. Síndrome de Turner	28
VIII. Material y métodos	31
IX. Resultados	39
X. Discusión	47
XI. Conclusión	54
XII. Bibliografía	55

LOCOMOCION DE LEUCOCITOS EN PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

I. INTRODUCCION

La quimiotaxis se define como la capacidad de las células vivas para moverse a lo largo de un gradiente de sustancias atractantes o repelentes (1). Una gran variedad de células son capaces de esta respuesta, incluyendo bacterias, leucocitos, fibroblastos, células tumorales y células neuronales (2).

La quimiotaxis se puede caracterizar en tres fases (3). En la primera fase interacciona el attractante (o repelente) con el receptor de la célula; la segunda fase, de traducción, se transmite la señal química del receptor al aparato locomotor; y la última fase, efectora, se activan los elementos motiles y direccionales para responder con una migración vectorial.

Se ha sugerido que los elementos contráctiles, actina y miosina se encuentran involucrados en la locomoción (4) en tanto que los microtúbulos participan en la orientación celular (5).

La migración de las células expuestas al attractante se acompaña de una variedad de eventos mediados por el receptor. Estos incluyen cambio en el potencial de membrana,

incremento en el flujo de cationes, liberación de enzimas lisosomales, producción de oxígeno activo e incremento en la quimioluminiscencia (6) . De esta manera, la célula parece predestinada para ejercer la función de defensa del huésped; primero detectando la señal química de organismos invasores, como bacterias, luego migrando al área infectada y finalmente ingiriendo y destruyendo los microorganismos patógenos (7) .

Los defectos en la locomoción de los leucocitos se han clasificado en celulares y humorales. Los defectos celulares pueden ser de origen genético, como los que afectan el ensamble de microtúbulos y polimerización de actina . También pueden ser adquiridos como en el caso de la diabetes mellitus. Los defectos humorales pueden causar una respuesta quimiotáctica anormal, a través de diferentes mecanismos que pueden comprender factores quimiotácticos e inhibidores producidos por los leucocitos , y condiciones en donde existan deficiencias de sustratos para la generación de factores quimiotácticos (8) .

Los síndromes cromosomopáticos en los que se ha evaluado la locomoción de los leucocitos y en los que se ha encontrado deficiente la respuesta quimiotáctica son : Síndrome de Down (9, 10) , síndrome de Edwards y síndrome de Cri-du-Chat (11) . Al mismo tiempo, se ha descrito quimiotaxis normal en neutrófilos de pacientes con diferentes lesiones cro-

mosómicas (12).

Los pacientes con síndrome de Down, síndrome de Edwards y síndrome de Cri-du-chat, se caracterizan por presentar infecciones frecuentes de gravedad variable (13), es evidente que la identificación de otras cromosopatías que se acompañen de defectos en la locomoción celular sería de interés en este campo ya que proveería modelos espontáneos (experimentos de la naturaleza) cuyo ulterior estudio detallado podría arrojar conocimientos conceptuales normales.

En el síndrome de Turner se ha demostrado un incremento de fenómenos autoinmunes y niveles elevados de anticuerpos antitiroideos (14, 15). Estos pacientes presentan además anticuerpos anti-ovario (15, 16), niveles de IgG e IgM más bajos que en mujeres normales (15, 17), y defectos en la inmunidad celular como son disminución en el número de linfocitos T y débil respuesta de los mismos a Concanavalina A (15).

A pesar de que los pacientes con síndrome de Turner presentan un perfil inmunológico incompleto (15), no parecen sufrir de enfermedades infecciosas recurrentes (13). La locomoción celular no ha sido estudiada en pacientes con síndrome de Turner, por lo que en el presente trabajo se decidió evaluar la locomoción de células mononucleares (MN), y polimorfonucleares (PMN), en cámaras de Boyden (18),

utilizando como quimioattractante suero activado con simosán (SAZ) (19), comparándola con la respuesta de testigos sanos con edades similares a la de los pacientes.

II. METODOS PARA EVALUAR LA LOCOMOCION

La primera descripción de quimiotaxis se hizo en células procarióticas (la principal diferencia entre células procarióticas y células eucarióticas es que las procarióticas no tienen envoltura nuclear) en 1884 por Pfeffer (20), pero fue en este siglo , en las década de los 60 que los estudios de locomoción celular se incrementaron al introducir Boyden su técnica de cámara quimiotáctica , la cual emplea una cámara con dos compartimentos separados por un filtro de poros lo suficientemente grandes como para que las células lo atraviesen (18) .

Con este método , el movimiento celular puede ser medido de varias maneras . Se pueden contar microscópicamente el número de células que atraviesan el filtro ó membrana Millipore (21) . Alternativamente se puede usar el método del frente de avance celular , donde se mide la distancia que migran las células dentro del filtro usando un micrómetro (22) . El tiempo que se consume al contar células ha sido reducido usando células marcadas con radioactividad (Cr⁵¹, Tc⁹⁹) , que requiere el uso del sistema del doble filtro (23, 24) .

La técnica de quimiotaxis bajo agarosa (25) es más económica ya que no requiere de cámaras y filtros especiales , además de usar menor cantidad de células , y consumir menos tiempo para evaluar las respuestas . Este método sin

embargo, es menos sensible que el método de Boyden (18).

El término locomoción engloba a la migración espontánea, quimiocinesis y quimiotaxis siendo importante establecer la diferencia entre ellos (26).

- La migración espontánea es la motilidad que ocurre en la ausencia de cualquier estímulo químico -

- La quimiocinesis (migración espontánea incrementada) es estimulada químicamente pero la motilidad celular no es vectorial y se presenta en ausencia de un gradiente de concentración del agente químico -

- La quimiotaxis es la migración celular dirigida a lo largo de un gradiente de concentración del agente químico.

III. QUIMIOATRACTANTES

Las substancias que inducen la quimiotaxis son llamados factores quimiotácticos, agentes quimiotácticos o quimioattractantes. Los attractantes incluyen proteínas, péptidos y material lipóide (2).

La siguiente lista clasifica los factores quimiotácticos de acuerdo a su origen (27, 28). Solamente los attractantes que han sido bien caracterizados, se discutirán detalladamente, aunque otros pueden ser igualmente importantes.

1. AGENTES EXOGENOS

- a. Factores quimiotácticos bacterianos
- b. Formil-metionil-péptidos (sintéticos)
- c. Caseína
- d. Lecitinas
- e. Proteínas desnaturalizadas

2. AGENTES ENDOGENOS

a. HUMORALES

- 1. Productos del complemento C5a, C5a des Arg, C567
- 2. Kalicreína
- 3. Productos de la ruptura de la fibrina y fibrinógeno

b. CELULARES

- 1. PMN : Factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por cristales de urato. Factor quimiotáctico de eosinófilos (ECF). Productos metabólicos de la lipooxigenación del ácido araquidónico (HETE s), ej. 5 HETE, 11 HETE, 9 HETE, 5,12-di- HETE.
- 2. Linfocitos : Linfocinas (LDCF).
- 3. Células cebadas : Factor quimiotáctico para eosinófilos de - - anafilaxis (ECFA). Histamina (Factor quimiotáctico para eosinófilos).
- 4. Plaquetas : 12 HETE
- 5. Tejido conectivo : Péptidos a partir de colágenos (fibroblastos).

A. FORMILMETIONIL PEPTIDOS

1. ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD

Las bacterias tales como E. coli secretan un material en el cultivo de crecimiento que es un potente leucoattractante. El análisis del material producido en el cultivo mostró ser un péptido, con un peso molecular entre 500 y 1500 daltons estable a 100°C por 10 minutos, con el grupo amino terminal bloqueado y aniónico a pH neutro. En el análisis de aminoácidos del material péptidico se encontraron glicina, alanina, sérina, ácido glutámico y ácido aspártico (29).

Después de identificar las características químicas del quimioattractante producido por la E. coli, Schiffman et al decidieron probar a los formilmetionil péptidos como quimioattractantes para los dos tipos de leucocitos (neutrófilos y macrófagos), que normalmente participan en la resistencia del huésped hacia las infecciones. Esto los indujo a proponer que las sustancias producidas por las bacterias podrían ser reconocidas por los leucocitos y que migrarían hacia ellos (30). Se sabe que las células procarióticas inician la síntesis de sus proteínas por formilmetionil-tRNA, mientras que las células eucarióticas inician el proceso a partir de metionil-tRNA (31).

Es concebible que en poblaciones bacterianas en multiplicación (como ocurre en focos infecciosos) bajos niveles de señales del péptido sean detectadas por el leucocito como primera señal quimiotáctica (2).

2. RECEPTORES PARA QUIMIOATRACTANTES FORMILMETILADOS

El péptido sintético formil-norleucil-leucil-fenilalanina-norleucil-tirosil-lisina (f-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys) es un potente quimioattractante con una afinidad por el receptor de neutrófilos 10 veces mayor que el formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-Met-Leu-Phe) y con 120,000 sitios por neutrófilo (32) . Este péptido se une específicamente a la membrana plasmática de neutrófilos humanos , rápidamente se agrega y se interioriza (33) . En extractos de E.coli se demostró que la norleucina puede reemplazar a la metionina como aminoácido que inicia la síntesis de proteína y es capaz de competir con la metionina en la formación enzimática de S-adenosilmetionina (2) .

En los estudios que se han realizado en células polimorfonucleares de humanos en el que se usó como quimioattractante el tripéptido marcado f-Met-Leu-Phe-H³, se encontró que existe un receptor de alta afinidad , que no se une a eritrocitos y linfocitos , con una constante de disociación de 12-14 nM a 37° C (34) .

El número de receptores que encontró Williams (34), - fué de 2000 mientras que Snyderman (3) describió 50,000 - receptores por PMN de humano. Esta discrepancia se explica por el estado metabólico en el que se encuentra la célula, como lo demuestran los estudios realizados por Fletcher - - (35), con el ionóforo A 23187, el cual estimuló la liberación de gránulos específicos, aumentó el número de receptores en neutrófilos a f-Met-Leu-Phe siendo el número máximo de 51,000 sitios por célula. Esta unión no se afectó con - cicloheximida y puromicina, indicando que la respuesta no - depende de la síntesis de proteína de novo.

B. PRODUCTOS DEL COMPLEMENTO

Los productos que se generan durante la activación en cascada del complemento incluyen algunos con actividad quimiotáctica. Shin (36) trató el C5 de cobayo con eritrocitos sensibilizados de carnero y obtuvo dos fragmentos, siendo el más pequeño (aproximadamente 15 000 daltons) el que tuvo la actividad quimiotáctica para PMN de conejo así como la actividad anafilotóxica para ileo de cobayo. Snyderman - (37) demostró que el quimioattractante más potente relacionado con el complemento, es el C5a.

El C5a, es una glicoproteína con peso molecular de 11,200 daltons, cargada negativamente a pH 7.4 con 74 ami-

noácidos y un gran contenido de cisteína, tiene actividad quimiotáctica y anafilótoxica (38).

Fernández (39) encontró que el C5a es un atractante para neutrófilos en concentración 10^{-10} - 10^{-8} M. Al removerse la arginina (aminoácido 74) del C5a con carboxipeptidasa se produce el C5a des Arg que se inactiva como anafilotoxina, quimiotáctica in vivo, pero requiere de un "factor de ayuda" para su actividad in vitro, que es proporcionado por suero no activado.

Pérez (40) aisló y purificó del suero normal de humanos, un polipéptido aniónico, termoestable, (56°C, 30 minutos) de aproximadamente 60,000 daltons que "ayuda" al C5a des Arg a ejercer actividad quimiotáctica.

Chenoweth (41) marcó el C5a con I^{125} y encontró un receptor específico sobre neutrófilos, saturable a una concentración de $3 - 7 \times 10^{-9}$ M con 1 a 3×10^5 sitios por célula. El C5a des Arg y el fragmento C5 con 69 aminoácidos (sin los últimos 5 aminoácidos) compiten por la misma unión no así el C3a.

C. ATRACTANTES PARA EOSINOFILOS

Dentro de los atractantes para eosinófilos se encuentra el ECF-A que es un factor liberado por los gránulos de las células cebadas durante las reacciones de hipersensibilidad inmediata (42).

Goetzl y Austen (42a) aislaron y caracterizarón dos tetrapéptidos, el valil-glicil-seril-glutámico (Val-Gly-Ser-Glu) y alanil-glicil-seril-glutámico (Ala-Gly-Ser-Glu) que son quimioattractantes para eosinófilos a concentraciones de 10^{-7} - 10^{-6} M. Si de estos péptidos se remueve el carboxilo terminal ó el amino terminal de los aminoácidos se inactivan los péptidos o sea el Val-Gly-Ser y el Gly-Ser-Glu son péptidos no quimiotácticos.

Otro estimulador de la quimiotáxis de eosinófilos es la histamina, (10^{-6} M) (43). Esta actividad quimiotáctica no se inhibe por los receptores antagonistas H1 ó H2 sugiriendo que la respuesta no es mediada por receptores de membrana (44).

IV. TRADUCCION DE LA SEÑAL QUIMIOTACTICA

La interacción entre el attractante y el receptor genera una señal que es trasmitida al citoesqueleto, produciendo un movimiento vectorial de la célula.

Los eventos que se considera afectan la señal de transmisión son el movimiento de los iones a través de la membrana celular (45), la interacción entre los elementos contráctiles (4), y la modulación por nucleótidos cíclicos (46), prostaglandinas (41), esteroides (47) y una variedad de inhibidores (48) y activadores (41) caracterizados incompletamente en el suero. Los eventos que ocurren -

en la degranulación específica de los neutrófilos (49) y las reacciones de metilación (50) son importantes en la quimiotaxis. La señal quimiotáctica también produce una explosión metabólica (51) la cual genera energía para el movimiento celular.

A. EVENTOS IONICOS

Cuando la quimiotaxis es medida con el método de Boyden es óptima en presencia de iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . Las células expuestas al attractante presentan cambios en el flujo de cationes monovalentes y activan una ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ que se encuentra unida a la membrana (45) y afecta las proteínas contráctiles de la célula (4).

1. CATIONES MONOVALENTES

Los experimentos realizados por Showell y Becker (52) en los que se usaron los ionóforos valinomicina (transporta K^+) y nigericina (causa un eflujo de K^+) demostraron que el K^+ externo es importante para la quimiotaxis. Con ayuda de cationes marcados se mostró que los factores quimiotácticos C5a y fMLP estimulan el flujo de Na^+ y K^+ a través de las membranas de las células fagocíti

cas (53). Naccache (54) encontró que el fMLP mejoró el -
influjo de K^+ , el que a su vez guardó una relación con el --
eflujo de Na^+ . Estos últimos eventos fuerón inhibidos por --
ouabaina, resultado que apoya la sugerencia de que los qui--
mioattractantes activan una ATPasa de la " bomba " de cationes
monovalentes. La ouabaina afecta los cationes monovalentes -
de la " bomba " de ATPasa de mamíferos (55). Estas obser-
vaciones apoyan el resultado de Becker (56) que sugiere la
presencia de una " bomba de $Na^+ - K^+$ ", en la membrana de --
neutrófilos en quimiotaxis. También se encuentra una ATPasa
que es estimulada por fMLP sobre membranas aisladas de neutró-
filos (57).

2. CATIONES DIVALENTES

Las reacciones bioquímicas que se requieren para el mo-
vimiento en las células migrantes pueden ser análogas a las-
que ocurren en el músculo esquelético (58). Así, los neu-
trófilos glicerizados sufren una contracción en presencia de
ATP y calcio (59) , y cambios en la permeabilidad de mem--
brana análogos a los que ocurren en los músculos son también
inducidos por attractantes y ionóforos que transportan Ca^{++} -
(A 23187) en neutrófilos (48) . También los attractantes
producen un aumento en la concentración de Ca^{++} intracelular
(49) , y esta penetración de Ca^{++} es aumentada dentro de -

la célula por ionóforos apropiados (60). Gallin demostró que el Ca^{++} es importante en la quimiotaxis de neutrófilos-humanos en respuesta a tres atractantes diferentes (61). Otros cationes divalentes, incluyendo Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} y Zn^{++} pueden ser substituidos por Ca^{++} . El papel del ión calcio no es claro. El trabajo de Marasco indica que el ión Mg^{++} puede ser necesario para la quimiotaxis pero no para la quimiocinesis (62).

B. PAPEL DE LA MEMBRANA

Gallin (5) encontró que al incubar neutrófilos con quimioattractantes disminuía la carga de superficie celular y que concentraciones altas de hidrocortisona inhibían tanto la quimiotaxis como el cambio en la carga de superficie. Por otra parte, la colchicina y citocalasina B, inhibidores de la quimiotaxis, no bloqueaban los cambios en la carga de superficie, de los neutrófilos, sugiriendo que estos inhibidores afectan los microtúbulos y los microfilamentos (2).

Se ha demostrado asimismo que los factores quimiotácticos C5a, fMLP y el ionóforo para calcio (A 23187) producen una depolarización inicial seguida de una hiperpolarización (63).

C. CAMBIOS EN LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS

Los nucleótidos cíclicos actúan como moduladores en la respuesta inducida por una variedad de hormonas, que interaccionan con receptores específicos. Los agentes que estimulan la formación de AMPc inhiben la quimiotaxis, mientras los agentes que estimulan la formación del GMPc mejoran la respuesta quimiotáctica (46). Estensen (64) encontró que los ésteres forbólicos, carbamilcolina e imidasol estimulan la guanilciclase y mejoran la respuesta quimiotáctica de neutrófilos a factores bacterianos. En tanto que Stephens (65) observó que los factores farmacológicos que elevan los niveles de GMPc modulan los cambios morfológicos iniciales inducidos por quimioattractantes, mientras que la teofilina, histamina e isoproterenol, agentes que estimulan la adenilciclase y elevan el AMPc, inhiben la polarización de monocitos inducida por quimioattractantes. De esta manera, las respuestas morfológicas iniciales de los monocitos a los quimioattractantes así como el movimiento dirigido parecen estar modulados por los nucleótidos cíclicos.

D. METABOLISMO DE CARBOXIMETILACION DE PROTEINAS

La esterificación de los grupos carboxilos de proteínas en las bacterias es importante para la quimiotaxis (66) .

Estas reacciones pueden también tomar parte en la leucotaxis. O'Dea (50) estudió las reacciones de metilación en la quimiotaxis de leucocitos y encontró que a niveles quimiotácticos el fMLP estimula la síntesis de una proteína carboximetilasa en neutrófilos y que la adición simultánea de fMLP y metionina -H³ a las células intactas incrementa la formación de proteína carboximetilada en tanto que la metionina -H³ no aumenta en respuesta al atractante. La carboximetilación de las proteínas no depende de la síntesis de novo de proteína ya que ésta no se inhibe con la cicloheximida. La carboximetilación de la proteína promovida por fMLP se bloquea con péptidos quimiotácticos antagonistas (6).

E. REACCIONES DE FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA

1. RECAMBIO DE FOSFOLIPIDOS

Los compuestos que incrementan el nivel intracelular de S-adenosil-homocisteína, la cual inhibe la metiltransferasa, reducen la quimiotaxis, la metilación de fosfolípidos y la formación de proteínas carboximetiladas en monocitos (67). Hirata (68) trató los neutrófilos con fMLP y observó una disminución en la transferencia del grupo metil-H³ de metionina-H³ a fosfolípidos. Los péptidos quimiotácticos no afectan el metabolismo de los fosfolípidos en la incorporación de

(metil- C^{14})-colina. La disminución en la metilación se correlaciona con la liberación rápida de ácido araquidónico, probablemente por la vía de fosfolípasa A₂ sobre fosfatidil colina. Esta reacción, así como la inhibición de la quimiotaxis se bloquea con la mepacrina, un inhibidor de la fosfolípasa A₂.

La inhibición de las reacciones de metiltransferasa en los neutrófilos bloquea la actividad de la fosfolípasa A₂ -- que estimularon los atractantes pero no afecta la estimulación de esta actividad enzimática inducida por el iónoforo - A 23187 (7).

Pike (69) incubó monocitos con inhibidores de las reacciones de transmetilación (EHNA, L-homocisteína) y encontró que se bloquea la polarización de las células y la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana inducida por tres atractantes diferentes (SAZ, LDCF, - - fMLP). Pike especuló que este efecto se debe a la activación de la fosfolípasa C.

Otros procesos en los que intervienen receptores, como la liberación de histamina en células cebadas y basófilos, - tienen propiedades similares (70). Este hallazgo sugiere - que un recambio de los fosfolípidos metilados puede tener un papel importante en la quimiotaxis de leucocitos. De esta manera, un ciclo relativamente menor en la formación de fosfolípidos, la metilación sucesiva de fosfatidiletanolamina para

producir fosfatidilcolina, parece ser más importante en ciertas funciones celulares que el ciclo mayor de síntesis de -- fosfolípidos vía citidíndifosfato-colina.

2. MODULACION DE LA FOSFOLIPASA A₂

Los glucocorticoides inducen la síntesis de una proteína inhibidora de la fosfolipasa A₂ (lipomodulina) (71, 72), mecanismo que parece estar relacionado con sus efectos anti-inflamatorios y que sugiere la participación de la fosfolipasa A₂ en quimiotaxis de leucocitos.

Hirata (73) demostró que los quimioattractantes estimulan la fosforilación de la lipomodulina, en una reacción dependiente de Ca⁺⁺, haciendo que ésta pierda su actividad inhibitoria de la fosfolipasa A₂. La adición de Ca⁺⁺ a una mezcla de fosfolipasa A₂ y lipomodulina, restituye la actividad enzimática (7). Esto sugiere que la respuesta quimiotáctica depende en parte de la interpretación que la célula le da a su inhibidor endógeno.

3. METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO

Las células de mamíferos metabolizan ácido araquidónico a través de los ciclos de ciclooxigenasa y lipooxigenasa (74). En el ciclo de la ciclooxigenasa los productos son

prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclinas y en el ciclo de la lipooxigenasa se producen una serie de ácidos eicosatetraenóicos monohidroxilados, donde algunos de ellos tienen actividad quimiotáctica (75). Estos incluyen al 5-S-hidroxy-6,8,11,14-eicosatetraenóico (5-HETE), 12-L-hidroxy-5,8,10,14-eicosatetraenóico (12-HETE) y 5-S12-R-dihidroxy-6,8,10,14-eicosatetraenóico (5-12-di-HETE) también conocido como leucotrieno B₄ (LTB₄) (76,77).

Los experimentos de Goetzl (76) y Stenson (78) demuestran que el 5-12-di-HETE, 5-HETE y 12-HETE son potentes leucoattractantes. El 5-12-di-HETE (LTB₄) libera cantidades significativas de β -glucoronidasa y lisozimas de los neutrófilos aunque en menor proporción que la inducida por C5a y fMLP en los mismos (76). El ionóforo para Ca⁺⁺, A 23187, que induce degranulación en los neutrófilos, también activa el metabolismo del ácido araquidónico en neutrófilos, produciendo 5-HETE. Estos dos eventos se bloquean con un inhibidor del metabolismo del ácido araquidónico (78).

Los quimioattractantes estimulan una incorporación rápida y transitoria del araquidónato marcado dentro de la fracción proteica de neutrófilos (79). Esto se inhibió bloqueando el ciclo de la lipooxigenasa. Este resultado sugiere que un derivado del araquidónato se usa para formar un componente membranar que interviene en la respuesta quimiotáctica. Los metabolitos del araquidónato producidos por el ciclo de

la lipooxigenasa tienen 2 funciones en la quimiotaxis: pueden ser liberados de la célula y actuar como quimioattractantes o pueden ayudar procesando una señal en la membrana.

F. POSIBLES REACCIONES EN EL PROCESAMIENTO DE LA SEÑAL QUI-MIOTACTICA.

La primera fase (interacción del quimioattractante con el receptor de la célula) y la segunda fase (traducción de la señal quimiotáctica del receptor al aparato locomotor) - se pueden resumir de acuerdo a Schiffman (7) en la figura 1, la cual ilustra las reacciones en la membrana involucradas en la quimiotaxis. La etapa 1, es la interacción del atractante con el receptor la cual genera una señal que conduce a la liberación de Ca^{++} unido. El Ca^{++} libre activa a la fosfolípa sa A_2 , etapa 2, la cual produce ácido araquidónico libre. Esta reacción puede ser inhibida por agentes como la mepacrina. El sustrato de la fosfolípasa A_2 , la fosfatidilcolina es generado por reacciones de metiltransferasa, etapa a, las cuales pueden ser inhibidas por agentes que causen una subida de S-adenosilhomocisteína. En la etapa 3, el ácido araquidónico -- liberado es convertido en HETE. Los HETEs parecen tener dos - funciones: fuera de la célula pueden actuar como quimioatrac tantes de otras células y amplificar la quimiotaxis, y sobre la membrana, etapa 4, pueden incrementar la permeabilidad del Ca^{++} . Este influjo de Ca^{++} puede mejorar la reacción de fosfo lípasa A_2 , y puede tomar parte en la interacción con el cito esqueleto.

El incremento de Ca^{++} (etapa 1 y 4) pueden tener - - otro papel: la inactivación, vía fosforilación dependiente de Ca^{++} , de inhibidores endógenos que actúan sobre la fosfolípasa A_2 .

F. POSIBLES REACCIONES EN EL PROCESAMIENTO DE LA SEÑAL QUIMIOTACTICA.

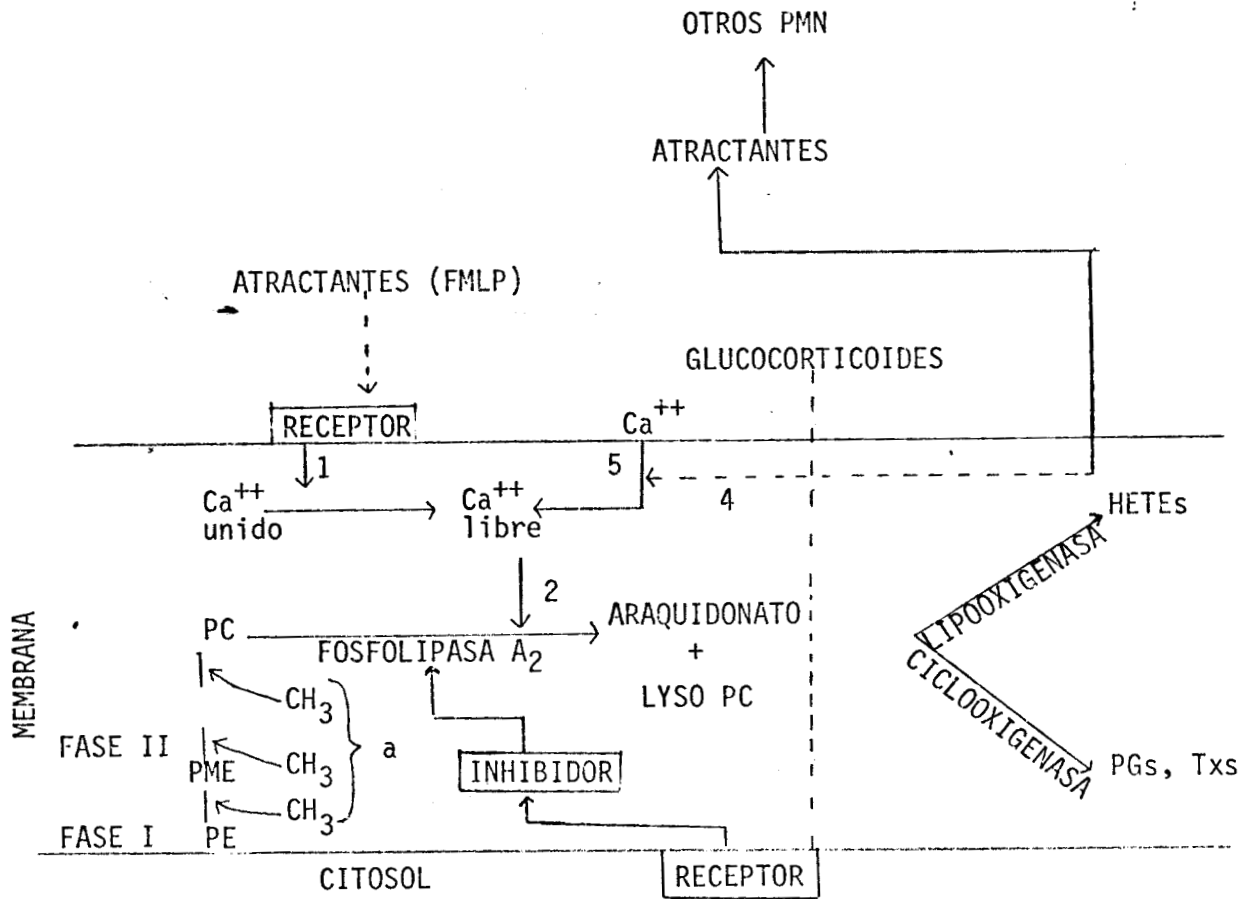


Fig. I. Eventos moleculares en la membrana del leucocito que ocurren en la quimiotaxis. Fosfatidiletanolamina PE, fosfatidilmonometiletanolamina PME, fosfatidilcolina PC, ácido hidroxí-eicosatetraenóico HETEs, prostaglandina PGs, tromboxanos TxS, metilos CH₃, Formil-Met-Leu-Phe FMLP y polimorfonucleares PMN.

V. FASE EFECTORA

Los quimioattractantes inducen en los leucocitos (PMN, MN) cambios morfológicos iniciales de topología orientada, como una elongación polarizada de la célula con el desarrollo de un lamelipodio (seudópodo) anterior ancho y un urópodo delgado con arborescencias terminales posteriores ---- (80).

Malech (81), analizó los elementos del citoesqueleto en neutrófilos estimulados por el quimioattractante, y -- usó la técnica de quimiotaxis frustada en cámaras de Boyden con filtro millipore con tamaño de poro de 0.45 μm que solo permite la penetración inicial de seudópodos pero impide su migración. La evaluación por microscopía electrónica de estos estudios reveló un arreglo complejo de la actina de los microfilamentos exactamente debajo de la membrana plasmática y estos cambios se observaron en un número mayor en seudópodos y urópodos. El núcleo se localizó en la posición caudal del leucocito y de esta manera está separado del frente de avance de los seudópodos por el volumen de gránulos y organelos en el citoplasma. Los centriolos, dentro del pliegue nuclear, sirven como el origen de los microtúbulos que se extienden hacia los polos ricos en filamentos pero no penetran en ellos. La polarización de las células expuestas al quimioattractante no se inhibe por citocalasina B, un agente que

bloquea el rearreglo de la actina en los filamentos. La cito_{calasina} B en concentración alta anula la aglutinación de los microfilamentos en los pseudópodos de los PMN, que da por resultado retracción del pseudópodo, pero no la pérdida de la orientación. En cambio la colchicina a concentraciones altas inhibe el ensamble de los microtúbulos y afecta la distribución del núcleo y centriolos pero no afecta la formación de pseudópodos. (2).

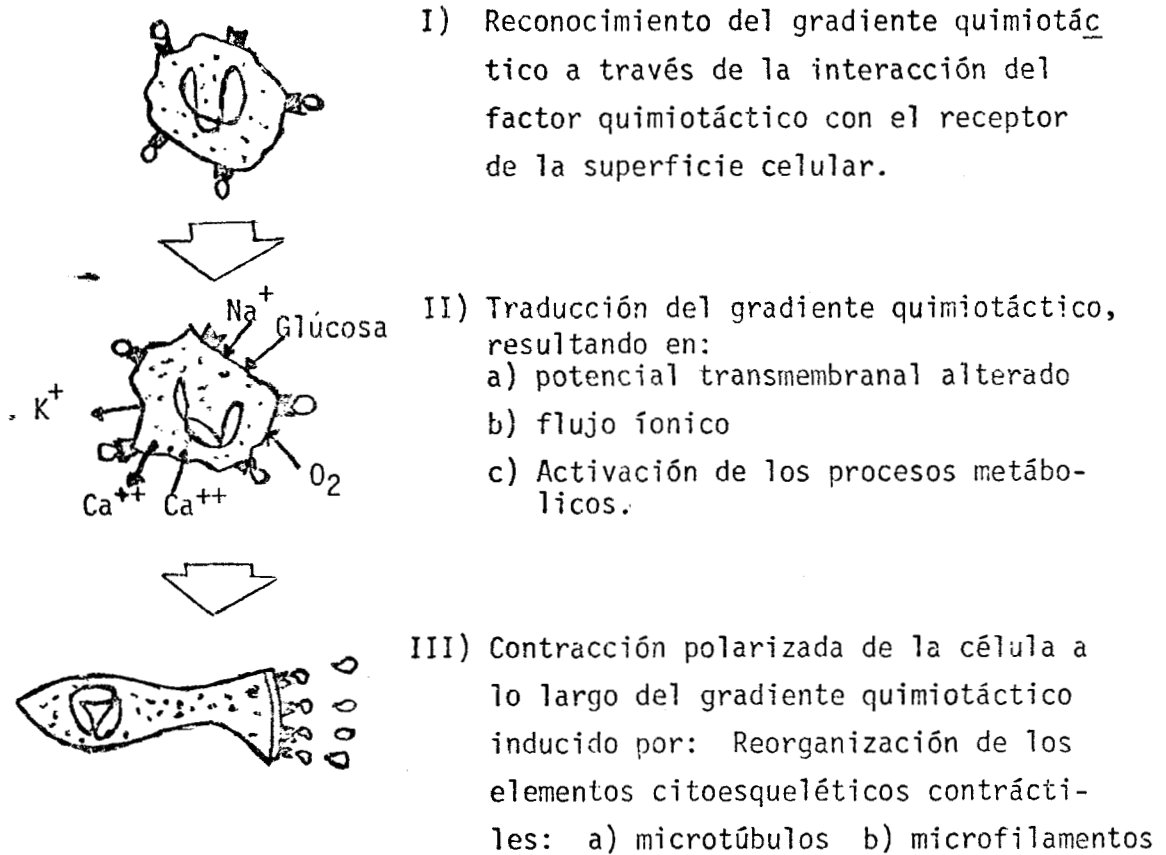
En los leucocitos polarizados se encontró que los poros y vesículas se distribuyen exclusivamente en los urópodos -- mientras que en la célula sin estimular se encuentran en todo el leucocito. El volumen de la superficie celular del leucocito estimulado aumenta por pliegues y surcos de la membrana plasmática (82).

Stendahl (83), diseñó un modelo para estudiar los -- eventos contractiles (actina y miosina) en la quimiotaxis in vitro del leucocito. En este, la actina polimerizada interacciona con la miosina y estimula una ATPasa dependiente de Mg^{++} en la miosina. Un número de cofactores parecen estar involucrados, siendo uno de ellos una proteína unida a la -- actina, con la cual se entrelaza, formando una red de gel. - La reacción de ATPasa se estimula durante la formación del - gel produciendo contracción. Otro factor, la proteína gelsolina, en presencia de Ca^{++} , rompe el entrecruzamiento favoreciendo la formación a sol.

Los sulfhidrilos libres y Ca^{++} parecen tener un papel en el ensamble (84) pero no se conoce la reacción química que transmite la señal a estos elementos del citoesqueleto.

Nath (85), encontró que los quimioattractantes estimulan en los leucocitos una adición post-translacional de - tirosina al residuo del carbono terminal de una cadena de - α -tubulina, la cual se bloquea con inhibidores que deprimen el influjo de Ca^{++} , metilación y fosfolípasa A_2 . Este pa--- trón de inhibición es similar al que se observa cuando se -- bloquea la quimiotaxis lo cual sugiere que las reacciones de tirosilación pueden preparar a la tubulina para el ensamble apropiado dentro de los microtúbulos durante la respuesta de movimiento.

La figura II representa un esquema propuesto por Snyderman (3) en donde se observan las 3 fases que caracterizan la quimiotaxis de leucocitos.



Factor quimiotáctico ◊

Receptor para el factor quimiotáctico ◻

Fig. II. Eventos metabólicos en la quimiotaxis de leucocitos.

VI. DESORDENES CLINICOS ASOCIADOS CON LOCOMOCION DEFECTUOSA

Los defectos en la locomoción de leucocitos se asocian con una variedad de desórdenes clínicos. Estos desórdenes pueden ser clasificados como de origen humoral y celular - - (86, 27). Los defectos celulares pueden ser de origen genético, como los que afectan el ensamble de microtúbulos y polimerización de actina (8). Los defectos humorales pueden causar respuesta quimiotáctica anormal, a través de diferentes mecanismos que pueden comprender factores quimiotácticos e inhibidores producidos por los leucocitos (87, 88) y condiciones en donde existan deficiencias de sustratos para la generación de factores quimiotácticos (89).

En algunas cromosomopatías se ha encontrado movilidad leucocitaria anormal. Khan (9) demostró una disminución de la quimiotaxis pero la migración espontánea de neutrófilos - estaba normal en pacientes con síndrome de Down (trisomía - 21), y Barroeta (10) observó quimiotaxis defectuosa de mononucleares con migración espontánea y quimiocinesis normales en pacientes con el mismo síndrome. Por otra parte Seger - - (11) demostró disminución en la quimiotaxis de neutrófilos en un niño con síndrome de Edwards (trisomía 18), y en dos pacientes con síndrome de Cri-du-chat (deleción distal de uno de los brazos cortos del cromosoma 5).

También en anomalías cromosómicas que ocurren en médula ósea ha sido demostrada quimiotaxis defectuosa, por Singh (90) en un paciente con células tetraploides y por Ruutu (91) en 5 pacientes con monosomía 7. Todas estas entidades cromosomopáticas presentan infecciones de gravedad variable (13,90,91).

VII. SINDROME DE TURNER

A. CARIOTIPO Y FRECUENCIA

La verdadera frecuencia del síndrome de Turner sólo puede establecerse a través del estudio cromosómico en un número suficientemente grande de individuos que procedan de dos tipos de poblaciones, abortos y recién nacidos consecutivos.

Alrededor del 50 % de los abortos espontáneos que ocurren dentro del primer trimestre de embarazo se asocian con alguna anomalía cromosómica demostrable (92), el 20 % de estos abortos cromosómicos anormales tienen complemento 45,X.

En México (93) el estudio cromosómico efectuado en 5125 recién nacidos mostró una frecuencia del síndrome de Turner de 1 en 2500 niñas. En el síndrome de Turner el complemento cromosómico más frecuente es el 45,X el cual se en

cuentra en un 50 % en estas pacientes; en el 25 % se observa algún mosaico con una línea celular 45,X y sin rearrreglos estructurales de los genomas, entre los cuales es más frecuente el mosaico 45,X / 46,XX; el resto de los casos presentan rearrreglos estructurales del X. La más frecuente de las anomalías estructurales del cromosoma X es el isocromosoma del brazo largo y le sigue en frecuencia la "delección" o pérdida del brazo corto (13).

B. ORIGEN CITOLÓGICO DEL COMPLEMENTO 45, X

• Del estudio de un número importante de familias estudiadas se ha deducido que alrededor del 70 % de individuos 45,X resultan de la pérdida del cromosoma sexual paterno - - (94). La monosomía X (45,X) puede originarse durante la ovogénesis, en la espermatogénesis o después de la fertilización (13). Algunos individuos 45, X derivan de una pérdida del cromosoma X materno pero se desconoce si la anomalía se produjo durante la gametogénesis o durante la embriogénesis (93).

C. CORRELACION DEL FENOTIPO CON EL CARIOTIPO

Los pacientes con el síndrome de Turner presentan talla corta, disgenia gonadal, ausencia de caracteres sexuales

secundarios , el 50 % presentan Pterygium colli (cuello alado) (13, 93) .

D. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Es evidente que la identificación de otras cromosomopatías que se acompañan de defectos en la locomoción celular sería de interés en este campo ya que proveería modelos espontáneos (experimentos de la naturaleza) cuyo ulterior estudio detallado podría arrojar conocimientos conceptuales normales.

A pesar de que los pacientes con síndrome de Turner presentan un perfil inmunológico incompleto (15, 16, 17) , no parecen sufrir de enfermedades infecciosas recurrentes (13). La locomoción celular no ha sido estudiada en estos pacientes por lo que en el presente trabajo se decidió evaluar la locomoción de células mononucleares (MN), y polimorfonucleares (PMN) , en cámaras de Boyden (18) , utilizando como quimioattractante suero activado con zimosán (SAZ) (19) , -- comparándola con la respuesta de testigos sanos con edades similares a la de los pacientes.

VIII. MATERIAL Y METODOS

074825

A. MATERIAL

1. Azul tripano (Matheson Coleman and Bell, Ohio, USA)
2. Albúmina humana al 25% (Hyland, Travenol, México)
3. Cámaras modificadas de Boyden (Neuroprobe, Inc. Bethesda, Maryland, USA)
4. Dextrán (Sigma. Chem. Co., St. Louis, MO., USA)
5. Estreptomicina (Lakeside, México)
6. Ficoll (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO., USA)
7. Filtros de nitrocelulosa con poros de 8 μm (Sartorius, Serv. Equipos y Materiales, S. A. México)
8. Filtros de policarbonato con poros de 3 y 5 μm (Neuroprobe, Inc. Bethesda, Maryland, USA)
9. Hematoxilina, eosina y Wright (Laboratorio de Preparación de Reactivos del I.M.S.S.)
10. Heparina sódica (Ricker 3M, México)
11. Hypaque (Winthrop Lab. México)
12. Penicilina sódica cristalina (Lakeside, México)
13. Sales para solución salina fosfatos y medio de Gey (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO., USA)
14. Safranina O (Dade de México, S.A., México)
15. Solventes orgánicos (Sigma de México)
16. Suero humano AB Rh⁺ (Banco Central de Sangre, C.M.N., I.M.S.S.)

17. Zimosán (Sigma Chem. Co. St. Louis MO., USA)
18. Baño de agua a temperatura constante (J. M. Ortiz, México)
19. Centrífuga refrigerada automática (Damon. IEC División,
Needaham Heights, MA, USA)
20. Incubadora (Lab. Line Instruments, Melrose Park. ILL., USA)
21. Microscopio óptico (Zeiss, Alemania)
22. Potenciómetro (Corning, Medfield MA., USA)
23. Pipetas de blancos (Propper Manufacturing Co., Long Island
City, NY., USA)
24. Tubos de plástico esteriles y desechables (Falcon Plastics.
Oxnar, Calif., USA)

B . METODOS

1. SUJETOS DE ESTUDIO

El grupo experimental estuvo formado por 13 pacientes con síndrome de Turner con edades comprendidas entre los 8 y 18 años y cariotipo 45,X, libres de leucemia, procesos infecciosos y sin ingestión de medicamentos en los 8 días previos a la obtención de la muestra. Todas ellas procedieron de la División de Investigación en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del I.M.S.S.

El grupo testigo lo constituyeron 10 niñas clínicamente sanas, con edades comparables a las del grupo experimental, candidatas a cirugía ortopédica menor, sin antecedentes de problemas infecciosos recurrentes y sin ingestión de medicamentos en los 8 días antes de la toma de la muestra. Este grupo testigo fue proporcionado por el Servicio de Análisis Clínicos del mismo Hospital, donde la toma de la muestra se hizo en la misma punción que para los análisis preoperatorios. En todos los casos estudiados se obtuvo por escrito, de los padres o del paciente (18 años) el consentimiento informado para la obtención de la muestra.

2. OBTENCION DE CELULAS

Las células mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) se obtuvieron mediante la técnica de Boyum (95), con modificaciones mínimas, a partir de 5 ml de sangre venosa heparinizada (10 - 20 U.I. de heparina sódica por ml de sangre). La muestra se diluyó 1:2 con solución salina fosfatos, 0.15 M, pH 7.2 (SSF) y se depositó sobre una solución de Ficoll-Hypaque (2.4 volúmenes de Ficoll al 9% y un volumen de Hypaque al 33.9%, densidad 1.077), en tubos de plástico estériles Falcon de 16X125 mm. Los tubos se centrifugaron a 400 X g durante 10 minutos a 20°C. Las células MN se recuperaron de la interfase, se lavaron 3 veces con SSF por centrifugación a 400 X g durante 10 minutos y finalmente se resuspendieron en medio de Gey (96) suplementado con 2% de albúmina sérica humana, 0.1% de dextrosa, 1 U.I. de penicilina por ml de solución y 1 µg de estreptomocina por ml de medio (Gey A) para obtener una concentración de 1.6×10^6 MN/ml.

La determinación del porcentaje de monocitos en la suspensión de MN se hizo mediante la evaluación en frotis de la actividad peroxidasa leucocitaria, se tomó como positiva la reacción, cuando el citoplasma se tiñe de azul, siendo los linfocitos negativos para esta reacción (97).

Los leucocitos PMN se obtuvieron a partir del botón celular, después de removida la interfase y el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular en 3 ml de una solución que contenía dextrán 3%, dextrosa 3% en solución salina al 0.85%. La mezcla se dejó sedimentar por 45 minutos a temperatura ambiente, se recuperaron los PMN a partir del sobrenadante por centrifugación a 180 X g durante 5 minutos. Después de eliminar los eritrocitos por choque hipotónico durante 10 segundos en 7.5 ml de agua destilada se restituye la isotonicidad con 2.5 ml de NaCl al 3.5%, se lavaron las células con SSF por centrifugación a 180 X g durante 5 minutos (98) y se resuspendieron en Gey A a una concentración celular de 1.6×10^6 PMN / ml.

La concentración de PMN en la suspensión celular se determinó en frotis mediante la tinción de Wright (99).

La cantidad total de MN y PMN se obtuvo por conteo en hemocitómetro (96). Para obtener la viabilidad celular se usó azul tripano (1 parte de azul tripano al 1.0% con 10 partes de NaCl al 0.85%), se tomaron como células viables las que excluyeron colorante (96). La viabilidad celular fue de $98 \pm 2 \%$ en ambos casos.

3. OBTENCION DEL FACTOR QUIMIOTACTICO

La generación del factor quimiotáctico sérico C5a se hizo activando por la vía alterna el complemento con el zimosa_n (100). Este se obtuvo el mismo día del estudio, para lo cual se descongelaron 2 alicuotas de 5 ml de una mezcla de suero AB Rh⁺, las que se conservaban en congelación a -70°C. A una se agregó zimosa_n a una concentración de 5 mg/ml de suero. Se incubó primero a 37°C durante 60 minutos con agitación frecuente y después a 56°C durante 30 minutos para detener la reacción. Finalmente se centrifugó la mezcla a 400 X g durante 10 minutos para eliminar el exceso de zimosa_n y obtener el suero activado. Esta muestra se denominó " suero activado con zimosa_n " (SAZ). El suero no activado o " suero testigo " (ST) se obtuvo siguiendo el mismo proceso, pero calentando el suero a 56°C durante 30 minutos, antes de la adición del zimosa_n (19).

4. ENSAYO DE LA MIGRACION DE MN Y PMN

La quimiotaxis se midió en cámaras de Boyden (18) utilizando la variante del doble filtro (21). El filtro superior de policarbonato de 15 µm de grosor, se usó con un tamaño de poro de 5 µm para MN y de 3 µm para PMN. El filtro inferior de nitrato de celulosa con 150 µm de grosor y un tama-

ño de poro tortuoso de 8 μm (que impide el progreso de las células) que actúa como atrapador de las células. Con el objeto de cuantificar la migración espontánea, la quimiocinesis y la quimiotaxis de los leucocitos de los pacientes con síndrome de Turner se estudiaron varios sistemas:

- Para estudiar la migración espontánea, se añadieron 0.5 ml de la suspensión de MN o PMN al compartimento superior de la cámara y 1.7 ml del medio de cultivo (Gey A) en el compartimento inferior -

- La quimiocinesis se estudió anulando el gradiente de -- concentración del agente quimioattractante en la cámara inferior, suspendiendo MN o PMN en ST o SAZ (1.6×10^6 células / ml). 0.5 ml de esta suspensión fueron colocados en el compartimento superior. En el compartimento inferior se añadieron 1.7 ml del mismo ST o SAZ al 20% en Gey A -

- La quimiotaxis de MN o PMN se midió colocando 0.5 ml de la suspensión de MN o PMN en el compartimento superior y en el compartimento inferior 1.7 ml de la mezcla que contenía ST o SAZ al 20% en Gey A -

Los ensayos fueron realizados por duplicado en cada individuo. Las cámaras para MN se incubaron a 37°C durante 120 minutos en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Al cabo de este tiempo se aspiró cuidadosamente el líquido de ambos compartimentos, se desensamblaron las cámaras, se removieron los filtros y se procesó el filtro inferior. Las células se fijaron duran-

te 6 minutos en etanol al 100%, se tiñeron con hematoxilina-eosina, se siguió un proceso de deshidratación con etanol al 70 y 100. %, se clarificaron con xilol y finalmente los filtros se montaron en un portaobjetos con 2 gotas de resina en la superficie superior libre y se cubrieron con un cubreobjetos - - (21). El mismo procedimiento se siguió para PMN solo que el tiempo de incubación fué de 90 minutos.

Para cuantificar la migración de los MN y PMN se contaron 60 campos por filtro, 30 en cada uno de los 2 diámetros cruzados a 90° , utilizando un microscopio óptico Zeiss con objetivo 40 X y oculares 10 X. Se obtuvo el promedio de MN y PMN por campo en los dos filtros. Los resultados se expresaron como el número de células migrantes por campo (400 X) así como el índice quimiotáctico (I.Q.), o sea la relación entre el número de células que migraron en respuesta al quimioattractante, divididas por el número de células en la migración espontánea.

$$I.Q. = \frac{\bar{X} \text{ células (SAZ , ST)}}{\bar{X} \text{ células (Gey A)}}$$

5. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student para pares comparados (101) y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (102).

IX. RESULTADOS

Tabla I. Las suspensiones celulares de MN en pacientes y testigos fué de 19 % de monocitos y 81 % de linfocitos en tanto que las suspensiones de PMN presentaron una pureza de 96 % en pacientes (95% neutrófilos, 1% eosinófilos) y 94% en testigos (93% neutrófilos y 1% eosinófilos).

Tabla II. Las respuestas quimiocinética y quimiotáctica se compararon con la movilidad al azar. Esto se hizo con el propósito de evaluar la funcionalidad de estos sistemas en los leucocitos MN y PMN de pacientes con síndrome de Turner y testigos. Los leucocitos MN y PMN de pacientes y testigos mostraron quimiotaxis cuando se usó el quimioattractante SAZ ($p < 0.001$). Se observó quimiocinesis en los MN de los dos grupos estudiados ($p < 0.05$) y en los PMN de testigos ($p = 0.05$) mientras que los PMN de pacientes no mostraron quimiocinesis ($p > 0.05$).

Tabla III. La migración espontánea, la quimiocinesis y la quimiotaxis de MN de pacientes con síndrome de Turner fué comparable a la de los MN de testigos ($p > 0.1$).

Tabla IV. Se observa que no hubo diferencia en la migración espontánea y la quimiocinesis de PMN de pacientes con Síndrome de Turner al compararlos con los testigos. Se apreció una diferencia significativa ($p < 0.002$) en la quimiotaxis de PMN de pacientes con Síndrome de Turner comparándola con -

la de los testigos.

En la fig. III se presentan individualmente los índices quimiotácticos en MN y PMN de testigos y pacientes . No se observa diferencia entre los MN de testigos y pacientes ($p > 0.1$) en tanto que la diferencia - entre los PMN de pacientes y testigos es significativa ($p < 0.002$).

En la fig. IV se observan individualmente los índices quimiocinéticos en MN y PMN de testigos y pacientes y no presentaron diferencias significativas en la quimiocinesis ($p > 0.1$).

TABLA I. TIPOS DE CELULAS EN SUSPENSIONES CELULARES DE PACIENTES CON SINDROME DE TURNER Y TESTIGOS

TINCION	CELULA	PACIENTES (n=13)	TESTIGOS (n=10)
PEROXIDASA ^b	Monocitos	19 ± 4 ^a	19 ± 7
	Linfocitos	81 ± 4	81 ± 7
WRIGHT ^c	Neutrófilos	95 ± 2	93 ± 2
	Eosinófilos	1	1
	Linfocitos	4 ± 2	7 ± 3

a= $\bar{X} \% \pm 1 \text{ D.E}$

b= Leucocitos obtenidos en la suspensión de MN

c= Leucocitos obtenidos en la suspensión de PMN

074825

TABLA II. EVALUACION DE LA RESPUESTA QUIMIOTACTICA Y QUIMIOCINETICA DE MN Y PMN EN PACIENTES CON SINDROME DE TURNER Y TESTIGOS.

CELULA	GRUPO	SISTEMA	p
MN	Turner	G/G ^a vs G/SAZ ^b	<0.001
MN	Testigo	G/G vs G/SAZ	<0.001
MN	Turner	G/G vs SAZ/SAZ ^c	<0.05
MN	Testigo	G/G vs SAZ/SAZ	<0.05
PMN	Turner	G/G vs G/SAZ	<0.001
PMN	Testigo	G/G vs G/SAZ	<0.001
PMN	Turner	G/G vs SAZ/SAZ	>0.05
PMN	Testigo	G/G vs SAZ/SAZ	= 0.05

a = Migración espontánea

b = Quimiotaxis

c = Quimiocinesis

Prueba estadística: t de Student para pares comparados.

TABLA III MOVILIDAD DE MN EN PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

	G/G ^a	ST/ST ^b	SAZ/SAZ ^c	G/ST ^d	G/SAZ ^e
PACIENTES (n = 13)					
MN/campo	20 ± 7 ^f	19 ± 4	24 ± 6	25 ± 10	39 ± 13
I.Q. ^g	1.00	1.01 ± 0.22	1.27 ± 0.265	1.28 ± 0.21	2.04 ± 0.69
TESTIGOS (n = 10)					
MN/campo	15 ± 5	15 ± 6	21 ± 9	26 ± 12	40 ± 18
I.Q.	1.00	1.05 ± 0.24	1.43 ± 0.45	1.63 ± 0.5	2.56 ± 0.7
ESTADISTICA					
(p)	N.S. ^h	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

- a = Migración espontánea
- b-c = Quimioinesis
- d-e = Quimiotaxis
- f = $\bar{X} \pm 1$ D.E.
- g = Índice quimiotáctico
- h = No significativa

TABLA IV. MOVILIDAD DE PMN EN PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

	G/G ^a	ST/ST ^b	SAZ/SAZ ^c	G/ST ^d	G/SAZ ^e
PACIENTES:					
(n = 13)					
PMN/campo	34 ± 16 ^f	32 ± 14	37 ± 14	42 ± 18	57 ± 19
I.Q. ^g	1.00	0.91 ± 0.15	1.1 ± 0.21	1.24 ± 0.18	1.73 ± 0.23
TESTIGOS					
(n = 10)					
PMN/campo	34 ± 22	37 ± 23	41 ± 24	65 ± 36	93 ± 56
I.Q.	1.00	1.02 ± 0.19	1.14 ± 0.23	1.86 ± 0.41	3.03 ± 0.9
ESTADISTICA					
(p)	N.S. ^h	N.S.	N.S.	p < 0.002	p < 0.002

a = Migración espontánea

b-c = Quimiocinesis

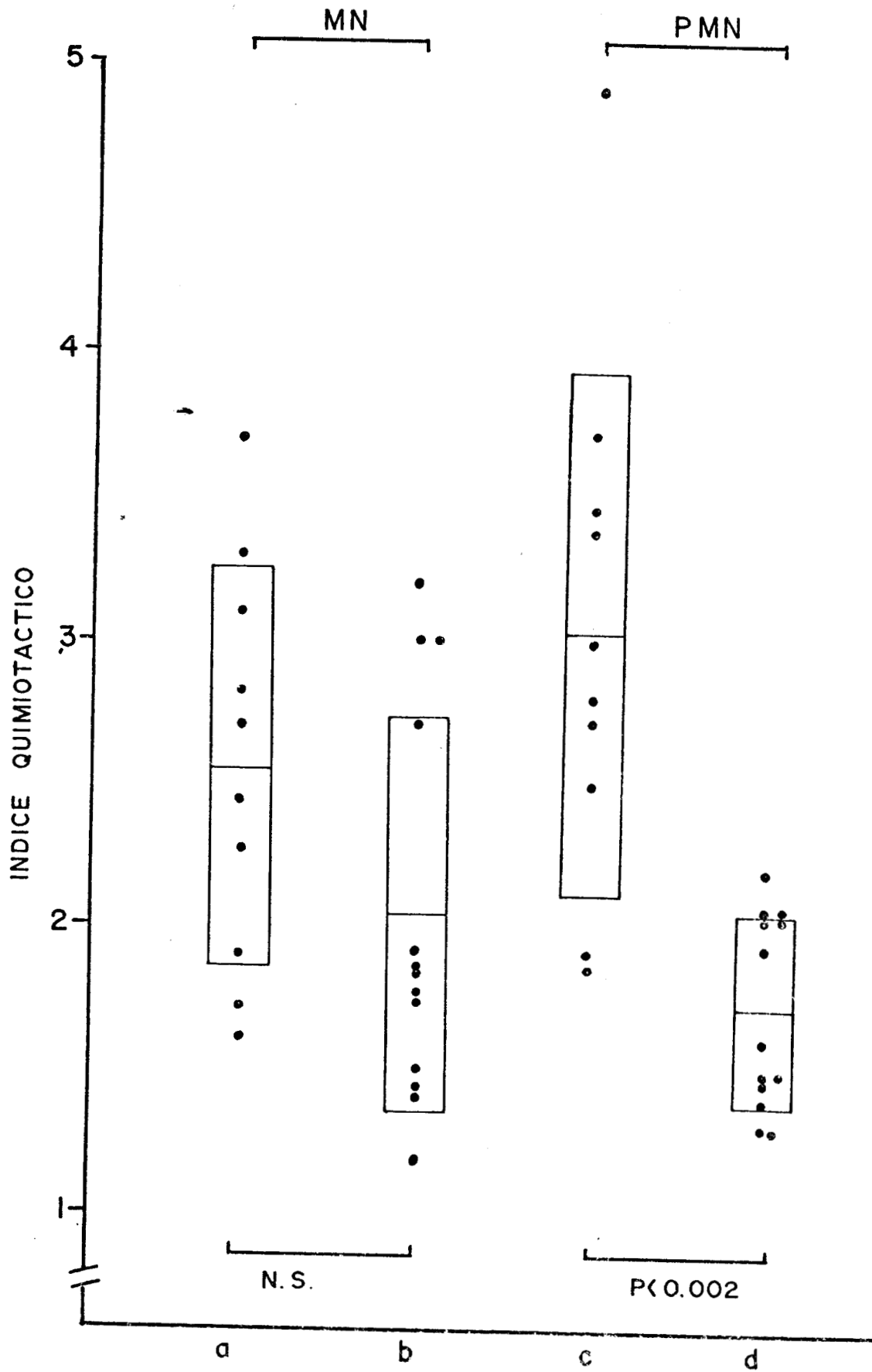
d-e = Quimiotaxis

f = $\bar{X} \pm 1$ D.E.

g = Índice quimiotáctico

h = No significativa

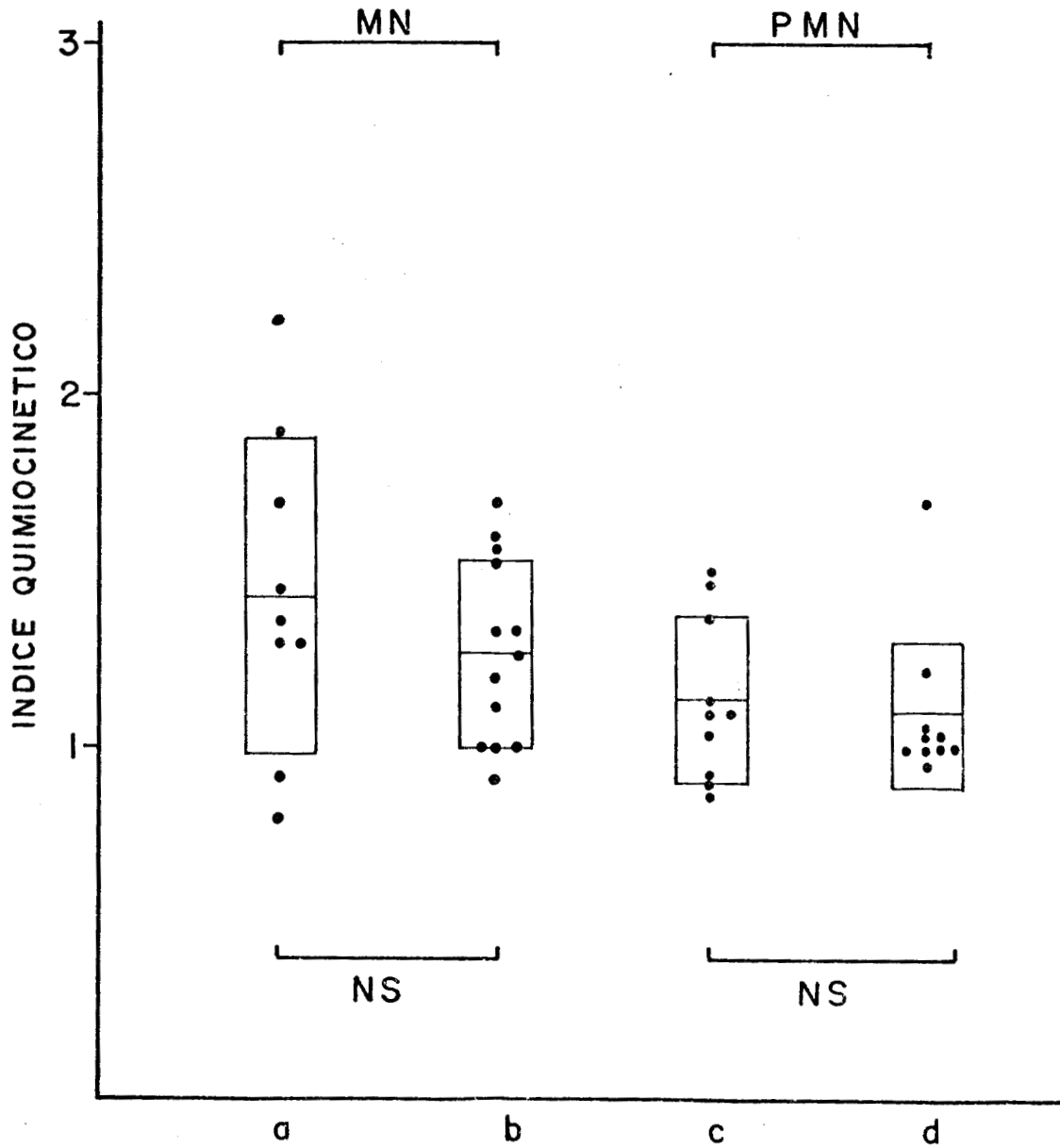
FIG. III
 QUIMIOTAXIS (G/SAZ)



a y c = TESTIGOS
 b y d = PACIENTES CON SINDROME DE TURNER
 MEDIA ± DESVIACION ESTANDAR \square


FIG. IV

QUIMIOKINESIS (SAZ / SAZ)



a y c = TESTIGO

b y d = PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

MEDIA ± DESVIACION ESTANDAR 

X. DISCUSION

La interacción entre el atractante y el receptor genera una señal que es transmitida al citoesqueleto, produciendo un movimiento vectorial de la célula (3). Algunos defectos en la locomoción de los leucocitos se han asociado con una variedad de desórdenes clínicos, los que presentan como característica común infecciones recurrentes severas. Estos desórdenes pueden ser clasificados como de origen humoral y origen celular (87, 27).

DEFECTOS HUMORALES

Los defectos humorales pueden causar respuesta quimiotáctica anormal, a través de diferentes mecanismos que pueden comprender factores quimiotácticos ó inhibidores producidos por el leucocitos (88, 89) y condiciones donde existan deficiencias de sustratos para la generación de factores quimiotácticos (90).

Del suero de un paciente con infecciones recurrentes, se aisló un inhibidor de la quimiotaxis con acción sobre neutrófilos (103). En el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico se encuentra una proteína catiónica de peso molecular aproximado a 65000 daltons que inhibe a la proteína aniónica sérica que ayuda al C5a des Arg a ejercer actividad quimiotáctica (104).

En pacientes con artritis reumatoide se encuentran autoanticuerpos elevados contra la lipomodulina la cual es un agente anti-inflamatorio natural (105). Se ha demostrado quimiotaxis defectuosa de neutrófilos en pacientes que presentan niveles elevados de IgE (106) ; donde se liberan cantidades significativas de histamina la cual inhibe la liberación de enzimas lisosomales en los leucocitos, y estas enzimas participan en la respuesta inflamatoria. También la histamina eleva el nivel intracelular de AMPc y reduce la respuesta quimiotáctica (107). Se observa una asociación entre respuesta quimiotáctica defectuosa de neutrófilos, hiperinmunoglobulinemia A e infecciones recurrentes (108). Esto se atribuye a las moléculas de IgA poliméricas las que son citofílicas para los neutrófilos y suprimen la quimiotaxis (109).

DEFECTOS CELULARES

Existen enfermedades con anomalías funcionales del neutrófilo que se relacionan directa ó indirectamente a nivel de membrana o citoesqueleto en el leucocito (110).

El síndrome de Chediak-Higashi es una enfermedad autosomal recesiva rara, que en los humanos se caracteriza por albinismo oculocutáneo parcial, infecciones piógenas frecuentes, neutropenias y gránulos lisosomales gigantes en los neutrófilos. Además los pacientes presentan un defecto en la respuesta qui-

miotáctica de neutrófilos y monocitos como consecuencia de una alteración en el ensamble de los microtúbulos (111). Los leucocitos de estos pacientes también presentan un incremento intracelular de AMPc. Boxer (112) logró corregir el defecto en la quimiotaxis in vitro al añadirle ácido ascórbico a los neutrófilos, así como también corregir el defecto in vivo al administrarle al paciente grandes cantidades de ácido ascórbico. El ácido ascórbico estimula la generación de GMPc en los leucocitos (113). Los trabajos de Weissman (114) indican que el AMPc inhibe el ensamble de los microtúbulos en el leucocito mientras que el GMPc los -- promueve, dato que apoya el hallazgo de Boxer.

Gallin (115) describió el caso de una paciente con enfermedades infecciosas recurrentes en la que se mostraron defectos en la movilidad espontánea y en la quimiotaxis de células mononucleares. Estas células presentaron un defecto en la localización del centriolo y un aumento en el número de microtúbulos lo cual se asoció con un incremento del 400% en el nivel de GMPc intracelular. Desafortunadamente la paciente murió antes de que sus células se trataran con prostaglandina E (la que eleva el nivel de AMPc).

Los casos reportados por Boxer (112) y Gallin (115) demuestran una correlación entre el ensamble de los microtúbulos y los niveles de nucleótidos cíclicos.

Otro defecto, posiblemente genético, que involucra la

disfunción de microtúbulos es el síndrome de Kartagener el cual es un desorden autosómico recesivo. Caleb (116) describió el caso de un paciente con este síndrome, el cual -- presentó un defecto severo en la migración de los neutrófilos. Esto mismo fue confirmado por Malech en otros pacientes (117).

El síndrome de disfunción de la actina en los leucocitos fue descrito por Boxer (118), en un paciente que sufría infecciones recurrentes, en éste sus neutrófilos se movían - pobremente y presentaban quimiotaxis defectuosa. Los microtúbulos se encontraban disminuidos en número y aunque el contenido de actina en los neutrófilos fue normal, la polimerización in vitro de la actina se encontraba disminuida.

Desnick (119) describió el caso de una paciente con - quimiotaxis defectuosa de neutrófilos. Los leucocitos de esta paciente mostraron una deficiencia en la actividad de - α -manosidasa ácida, la que se relacionó con la acumulación de manosa en estas células. Quie y Cates (107) sugieren que - la manosa acumulada en las células de esta paciente interfieren con la función membranal del leucocito.

El síndrome del leucocito " holgazan ", se asocia con - neutropenia (aunque el contenido de estas células en médula ósea es normal), movilidad espontánea y quimiotaxis defectuosa. El defecto en la locomoción no se corrige con la adición de plasma normal fresco, ya que se trata de un defecto de tipo

celular. Se ha postulado que el defecto en la locomoción se encuentra en la membrana del neutrófilo para los receptores quimiotácticos (120).

En las cromosopatías se ha encontrado movilidad leucocitaria anormal. Khan (9) demostró una disminución en la quimiotaxis pero no en la migración espontánea de neutrófilos en pacientes con síndrome de Down (trisomía 21) y Barroeta (10) observó quimiotaxis defectuosa de mononucleares con migración espontánea y quimiocinesis normales en estos pacientes. No obstante aún no se ha definido la causa que origina este defecto.

Por otra parte Seger (11) demostró disminución en la quimiotaxis de neutrófilos en un niño con síndrome de Edwards (trisomía 18) y en dos pacientes con síndrome de Cri-du-chat (delección distal de uno de los brazos cortos del cromosoma - 5).

También en las anomalías cromosómicas que ocurren en médula ósea ha sido demostrada quimiotaxis defectuosa por Singh (90) en un paciente con células tetraploides y por Ruutu (91) en 5 pacientes con monosomía 7. En la monosomía 7 el defecto en la quimiotaxis se atribuyó a la disminución de una glicoproteína de superficie de alto peso molecular (120).

Por otra parte Nurmi (122) encuentra la respuesta quimiotáctica anormal en neutrófilos en dos generaciones de una

familia con cariotipo 46,XX del (X) (pter→22:: p11→qter). En esta familia no se manifiesta el síndrome de Turner ya -- que la deleción distal hasta p11 produce sólomente estatura corta, mientras que la deleción completa del brazo corto del cromosoma X causa fenotipo completo de síndrome de Turner, y la deleción parcial de q22 se asocia con disgénesis gonadal (123). -

En nuestros datos, la migración espontánea y la quimiocinesis de las dos estirpes celulares de pacientes con síndrome de Turner fueron similar a la de los controles, así como - la respuesta quimiotáctica de MN. En cambio los PMN de pa---cientes con síndrome de Turner mostraron disminución en la quimiotaxis al compararla con la de los testigos sanos. Los resultados sugieren que el defecto quimiotáctico en PMN es de tipo celular y confirman por otra parte que la quimiotaxis, quimiocinesis y la movilidad espontánea, pueden operar independientemente uno de otro (9, 10). Esto nos lleva a proponer -- que se puede tener un defecto en la quimiotaxis sin que se - - afecten la movilidad espontánea y la quimiocinesis, pero no es posible tener defecto en la movilidad espontánea con quimiotaxis normal.

No se conoce la naturaleza del defecto en los PMN de pa---cientes con síndrome de Turner y pueden ser atribuidos tentativamente a anomalías intrínsecas celulares descritas en otras entidades,tales como vida media corta (124), defectos enzimáti

cos (119), defectos en los microtúbulos y centriolos - - - (111, 115, 116), anormalidades en la polimerización de la actina (118), traducción inapropiada de la señal quimiotáctica a la maquinaria efectora (125).

En las reacciones de hipersensibilidad retardada, el infiltrado inflamatorio esta compuesto de macrófagos y linfocitos, en esta reacción se produce una cadena de acontecimientos en los que la actividad de un tipo de células modifica o induce la actividad de otra. El resultado de esta secuencia de cambios es beneficioso o dañino para el individuo, dependiendo de las circunstancias clínicas o experimentales (126). Sería interesante evaluar la hipersensibilidad retardada en pacientes con síndrome de Turner, ya que se ha demostrado en pacientes traumatizados una asociación entre hipersensibilidad retardada anormal, quimiotaxis defectuosa de neutrófilos y septicemia (127).

XI. CONCLUSION

Se ha sugerido que el defecto quimiotáctico en los leucocitos , disminuye la rapidez y calidad de las reacciones inflamatorias y en consecuencia disminuye las interacciones celulares en la respuesta inmune haciéndola deficiente . Además entorpece el reclutamiento de elementos inflamatorios en el brazo eferente de la respuesta inmune (inflamación) . Todo ello de llegar a un grado crítico conduce a un aumento en la susceptibilidad a infecciones .

A pesar de que los pacientes con síndrome de Turner no parecen sufrir un incremento en las infecciones , el estudio del defecto en la quimiotaxis de PMN que presentan estos pacientes podría contribuir a un mayor entendimiento de la locomoción celular en general .

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

1. Sorkin, E. Chemotaxis. Impressions and Problems. *Antibiot. Chemother.* 19:1, 1974.
2. Schiffman, E., and Gallin, J. I. Biochemistry of Phagocyte Chemotaxis. *Curr. Top. in Cell. Reg.* 15:203, 1979.
3. Snyderman, R., and Goetzl, E. Molecular and Cellular Mechanisms of Leukocyte Chemotaxis. *Science* 213: 830, 1981.
4. Stossel, T. P. The Mechanism of Leukocyte Locomotion. In "Leukocyte Chemotaxis" (Gallin, J. I., and Quie, P. G. eds) p.p.143-160. Raven Press, New York, 1978.
5. Gallin, J. I., Durocher, J. R., and Kaplan, A. P. Interaction of Leukocyte Chemotactic Factors with the Cell Surface. I. Chemotactic Factor-Induced Changes in Human Granulocyte Surface Charge. *J. Clin. Invest.* 55:967, 1975.
6. Becker, E.L. A Multifunctional Receptor on the Neutrophil for Synthetic chemotactic Oligopeptides. *J. Reticuloendothel Soc.* 26: 701, 1979.
7. Schiffman, E. Leukocyte Chemotaxis. *Ann. Rev. Physiol.* 44: 553, 1982.
8. Kretschmer, R.R., and Collado, M. L. Chemotaxis. *Infection* 8 - (Suppl. 3):299, 1980.
9. Khan, A. J., Evans, H. E., Glass, L., Shin, Y. H. and Almonte, D. Defective Neutrophil Chemotaxis in Patients with Down Syndrome. *J. Pediatr.* 87:87, 1975.

10. Barroeta, O., Nungaray, L., López-Osuna, M., Armendares, S., Salamanca, F., and Kretschmer, R. R. Defective Monocyte Chemotaxis in Children with Down's Syndrome. *Pediatr. Res.* 17: 292, 1983.
11. Seger, R., Wilfener, A., and Buchinger, G. Chromosome Abnormalities (Down's, Edward's and Cri-du-chat Syndromes). *Klin. Wschr.* 54:117, 1976.
12. Nurmi, T., Uhari, M., Linna, S-L., Silvennoinen Kassinen, S., Koskela, M., Kiuttu, J., and Tiilikainen, A. Immune Function in Patients with Chromosome Deletions. *Clin. Exp. Immunol.* 48:179, 1982.
13. Summitt, R. C. Cytogenetic Disorders. In "Clinical Genetics" (Jackson, L. G., and Schimke, R. N. eds.) p.p. 35-84. John Wiley and Sons, Inc. New York. 1981.
14. Fialkow, P. J. Symposium. Etiology of Chromosomal Abnormalities. Autoimmunity and Chromosomal Aberrations. *Am. J. Hum. Genet.* 18:93, 1966.
15. Mathur, S., Jerath, R. S., Mathur, R. S., Williamson, H. O., and Fudenberg, H. H. Serum Immunoglobulin Levels, Autoimmunity and Cell-Mediated Immunity in Primary Ovarian Failure. *J. Rep. Immunol.* 2:83, 1980.
16. Vallotton, M. B., and Forbes, A. P. Autoimmunity in Gonadal Dysgenesis and klinefelter's Syndrome. *Lancet* 1:648, 1967.
17. Jensen, K., Petersen, P.H., Nielsen, E. L., Dahl, G., and Nielsen, J. Serum Immunoglobulin M, G. and A Concentration Levels in Turner's Syndrome Compared with Normal Women and Men. *Hum. Genet.* 31:329, 1976.

18. Boyden, S. **The** Chemotactic Effect of Mixtures of antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Exp. Med.* 115:454, 1962.
19. Ward, P. A. **Chemotaxis** of Mononuclear Cells. *J. Exp. Med.* 128:1201, 1968.
20. Pfeffer, W. **Locomotorische** Richtungsbewegungen durch Chemische Reize. *Untersuch. Botan. Inst. Tubingen.* 363:482, 1884.
21. Snyderman, R., and Pike, M. C. Methodology for Monocyte and Macrophage **Chemotaxis**. In "Leukocyte Chemotaxis" (Gallin, J. I., and Quie, P.G. eds) p.p. 73-78, Raven Press, New York, 1978.
22. Zigmond, S. H., and Hirsch, J. G. Leukocyte Locomotion and Chemotaxis. **New** Methods for Evaluation and Demonstration of Cell Derived **Chemotactic** Factor. *J. Exp. Med.* 137:387, 1973.
23. Gallin, J. I., Clark, R. A., and Kimball, H. R. Granulocyte Chemotaxis. An Improved in Vitro Assay Employing 51-Cr-Labelled Granulocytes. *J. Immunol.* 110:233, 1973.
24. Papierniak, C. K., Bourey, R. E., Kretschmer, R. R., Gotoff, S. P., and Colombetti, L. G. Technetium-99m Labeling of Human Monocytes for **Chemotactic** Studies. *J. Nucl. Med.* 17:988, 1976.
25. Nelson, R. D., Quie, P. G., and Simmons, R. L. Chemotaxis under Agarose. A **New** and Simple Method for Measuring Chemotaxis and - Spontaneous Migration of Human Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes. *J. Immunol.* 115:1650, 1975.

26. Keller, H. U., Wilkinson, P. C., Abercrombie, M., Becker, E. L., Hirsch, J. G., Miller, M. E., Scott, R. W., and Zigmond, S. H. Letters to the Editor. A proposal for the Definition of Terms Related to Locomotion of Leukocytes and other Cells. *J. Immunol.* 118:1912, 1977.
27. Becker, E. L. Chemotaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66:97, 1980.
28. Kretschmer, R. R. Chemotaxis. In "Molecules, Cells and Parasites in Immunology" (Larralde, C., Willms, K., and Ortíz, L. eds) p.p. 91-102, Academic Press, Inc. 1978.
29. Schiffman, E., Showell, H. V., Corcoran, B. A., Ward, P. A., Smith, E., and Becker, E. L. The Isolation and Partial Characterization of Neutrophil Chemotactic Factor from *Escherichia Coli*. *J. Immunol.* 114:1831, 1975.
30. Schiffman, E., Corcoran, B. A., and Wahls, S. N-Formyl Methionyl Peptides as Chemoattractants for Leukocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72:1059, 1975.
31. Bohinski, R. C. *Bioquímica.* p.p. 610. Fondo Educativo Interamericano, 1978.
32. Niedel, J., Wilkinson, S., and Cuatrecasas, P. Receptor Mediated Uptake and Degradation of ¹²⁵I-Chemotactic Peptide. *J. Biol. Chem.* 254:10700, 1979.
33. Niedel, J. K., Kahane, I., and Cuatrecasas, P. Receptor Mediated Internalization of Fluorescent Chemotactic Peptide by Human Neutrophils. *Science* 205:1412, 1979.

34. Williams, L. T., Snyderman, R., Pike, M. C., and Lefkowitz, R. J. Specific Receptor Sites for Chemotactic Peptides of Human Polymorphonuclear Leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:1204, 1977.
35. Fletcher, M. P., Seligmann, B. E., and Gallin, J. I. Correlation of Human Neutrophil Secretion, Chemoattractant Receptor Mobilization, and Enhanced Functional Capacity. J. Immunol. 128:941, 1982.
36. Shin, H. S., Snyderman, R., Friedman, E., Mellors, A., and Mayer, M. M. Chemotactic and Anaphylatoxic Fragment Cleaved from the Fifth Component of Guinea Pig Complement. Science 162:361, 1968.
37. Snyderman, R., Phillips, J. K., and Mergenhagen, S. E. Polymorphonuclear Leukocyte Chemotactic Activity in Rabbit Serum and Guinea Pig Serum Treated with Immune Complex. Evidence for C5a as the Major Chemotactic Factor. Infect. Immun. 1:521, 1970.
38. Fernández, H. N., and Hugli, T. E. Primary Structural Analysis of the Polypeptide Portion of Human C5a Anaphylatoxin. J. Biol. Chem. 253:6955, 1978.
39. Fernández, H. N., Henson, P. M., Otani, A., and Hugli, T. E. Chemotactic Response to Human C3a and C5a Anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a Leukotaxis in vitro and under Stimulated in vivo Conditions. J. Immunol. 120:109, 1978.
40. Pérez H.D., Goldstein, I. M., Webster, R. O., and Henson, P. M. Enhancement of the Chemotactic Activity of Human C5a des Arg by an Anionic Polypeptide (Cochemotaxin) in Normal Serum and Plasma. J. Immunol. 126:800, 1981.

41. Chenoweth, D. E., and Hugli, T. E. Demonstration of Specific - C5a Receptor on Intact Human Polymorphonuclear Leukocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:3943, 1978.
42. Goetzl, E. J. Regulation of Polymorphonuclear Leukocyte Chemotactic Response By Immunological Reactions. In "Leukocyte Chemotaxis" (Gallin, J. I., and Quie, P. G. eds) p.p. 161-177. Raven Press, New York, 1978.
- 42a. Goetzl, E. J., and Austen, K. F. Purification and Synthesis of - Eosinophilotactic Tetrapeptides of Human Lung Tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:4123, 1978.
43. Clark, R. A. F., Gallin, J. I., and Kaplan, A. B. The Selective Eosinophil Chemotactic Activity of Histamine. J. Exp. Med. 142:1462, 1975.
44. Roszkowski, W., Plaut, M., and Lichtenstein, L. M. Selective - - Display of Histamine Receptors on Lymphocytes. Science 195:683, 1977.
45. Becker, E. L., Showell, H. J., Naccache, P. H. and Sha'afi, R. Enzymes in Granulocyte movement. Preliminary Evidence for The Involvement of Na⁺, K⁺, ATPase. In "Leukocyte Chemotaxis" (Gallin, J. I. and Quie, P. G. eds) p.p. 113-121. Raven Press, New York, 1978.
46. Hill, H. R. Cyclic Nucleotides as Modulators of Leukocyte Chemotaxis. In "Leukocyte Chemotaxis" (Gallin, J. I., and Quie, P. G. eds) p.p. 179-193. Raven Press, New York, 1978.

47. Ward, P. A. The Chemosuppression of Chemotaxis. *J. Exp. Med.* 124:209, 1966.
48. Maderazo, E. G., Ward, P. A., Woronick, C. L., and Quintiliani, R. Partial Characterization of a Cell-Directed Inhibitor of -- Leukotaxis in Human Serum. *J. Lab. Clin. Med.* 89:190, 1977.
49. Gallin, J. I., Wright, D. G., and Schiffmann, E. Role of Secretory Events in Modulating Human Neutrophil Chemotactic. *J. Clin. Invest.* 62:1364, 1978.
50. O'Dea, R. F., Viveros, O. H., and Axelroad, J. Rapid Stimulation of Protein Carboxymethylation in Leukocytes by a Chemotactic Peptide. *Nature* 272:462, 1978.
51. Bass, D. A., De Chatelet, L. R., and McCall, C. E. Independent Stimulation of Motility and the Oxidative Metabolic Burst of - Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Immunol.* 121:172, 1978.
52. Showell, H. E., and Becker, E. L. The Effects of External K^+ and Na^+ on the Chemotaxis of Rabbit Peritoneal Neutrophils. *J. Immunol.* 116:99, 1976.
53. Naccache, P. H., Showell, H. E., Becker, E. L., and Sha'afi, R. I. Transport of Sodium, Potassium, and Calcium across Rabbit Polymorphonuclear Leukocyte Membranes. Effect of Chemotactic Factor. *J. Cell. Biol.* 73:428, 1977.
54. Naccache, P. H., Showell, H. J., Becker, E. L., and Sha'afi, R. I. Changes in Ionic Movements across Rabbit Polymorphonuclear Leukocyte Membranes during Lysosomal Enzyme Release. Possible Ionic Basis for Lysosomal Enzyme Release. *J. Cell. Biol.* 75:635, 1977.

55. Bonting, S. L., Simon, K. A., and Hawkins, N. M. Studies on Sodium-Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase. I. Quantitative Distribution in Several Tissues of the Cat. Arch. Biochem. 95:416, 1961.
56. Ward, P. A., and Becker, E. L. Potassium Reversible Inhibition of Leukotaxis by Ouabain. Life Sci. 9:355, 1970.
57. Becker, E. L., Talley, J. V., Showell, H. J., Naccache, P. H., and Sha'afi, R. I. Activation of the Rabbit Polymorphonuclear Leukocyte Membrane " Na⁺, K⁺ " -ATPase by Chemotactic Factor. J. Cell Biol. 77:329, 1978.
58. Fukushima, K., Senda, N., Ishigami, S., Endo, Y., Ishi, H., Murakami, Y., Nishian, K., and Ueda, Y. Movement and Energy Metabolism of Leukocytes. I. Neutrophilic Leukocytes in Healthy Human Adults. Med. J. Osaka Univ. 5:231, 1954.
59. Hsu, L. S., and Becker, E. L. Volume Decrease of Glycerinated Polymorphonuclear Leukocytes Induced by ATP and Ca⁺². I. Resemblances to Actomyosin Contraction. Exp. Cell. Res. 91:469, 1975.
60. Showell, H. J., Naccache, P. H., Sha'afi, R. I., and Becker, E. L. The Effects of Extracellular K⁺, Na⁺, and Ca⁺⁺ on Lysosomal Enzyme Secretion from Polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol. 119:804, 1977.
61. Gallin, J. I., and Rosenthal, A. S. The Regulatory Role of Divalent Cation in Human Granulocyte Chemotaxis. Evidence for an Association Between Calcium Exchanges and Microtubule Assembly. J. Cell. Biol. 62:594, 1979.

62. Marasco, W. A., Becker, E. L., and Oliver, J. M. The Ionic Basis of Chemotaxis. Separate Cation Requirements for Neutrophil Orientation and Locomotion in a Gradient of Chemotactic Peptide. *Am. J. Pathol.* 98:749, 1980.
63. Gallin, E. K., and Gallin, J. I. Interaction of Chemotactic Factors with Human Macrophages. Induction of Transmembrane Potential Changes. *J. Cell. Biol.* 75:277, 1977.
64. Estensen, R. D., Hill, H. R., Quie, P. G., Nogan, H., and Golberg, N. D. Cyclic GMP and Cell Movement. *Nature* 245:458, 1973.
65. Stephens, C. G., and Snyderman, R. Cyclic Nucleotides Regulate the Morphologic Alterations Required for Chemotaxis in Monocytes. *J. Immunol.* 128:1192, 1982.
66. Springer, W. R., Koshland, D. E. Jr. Identification of a Protein Methyl-Transferase as the *cheR* Gene Product in the Bacterial Sensing System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:533, 1977.
67. Pike, M. C., Kredich, N. M., and Snyderman, R. Requirement of S-Adenosylmethionine-Mediated Methylation for Human Monocyte Chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:3928, 1978.
68. Hirata, F., Corcoran, B. A., Venkatasubramanian, K., Schiffmann, E., and Axelroad, J. Chemoattractants Stimulate Degradation of Methylated Phospholipids and Release of Arachidonic Acid in Rabbit Leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:2640, 1979.
69. Pike, M. C., and Snyderman, R. Transmethylation Reactions are Required for Initial Morphological and Biochemical Responses of Human Monocytes to Chemoattractants. *J. Immunol.* 127:1444, 1981.

70. Hirata, F., and Axelroad, J. Phospholipid Methylation and Biological Signal Transmission. *Science* 209:1082, 1980.
71. Blackwell, G. J., and Flower, R. J. Anti-Inflammatory Steroides Induce Biosynthesis of a Phospholipase A₂ Inhibitor which Prevents Prostaglandin Generation. *Nature* 278:456, 1979.
72. Hirata, F., Schiffman, E., Venkatasubramanian, K., Salomon, D., and Axelroad, J. A Phospholipase A₂ Inhibitory Protein in Rabbit Neutrophils Induced by Glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2533, 1980.
73. Hirata, F. The Regulation of Lipomodulin, a Phospholipase Inhibitory Protein, in Rabbit Neutrophils by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 256:7730 , 1981.
74. Bokoch, G. M., and Reed, P. W. Stimulation of Arachidonic Acid Metabolism in the PMN Leukocyte by an N-Formylated Peptide. *J. Biol. Chem.* 255:10223, 1980.
75. Stenson, W. F., and Parker, C. W. Metabolism of Arachidonic Acid in Ionophore - Stimulated Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 64:1457, 1979.
76. Goetzl, E. J., and Pickett, W. C. The Human PMN Leukocyte Chemotactic Activity of Complex Hydroxy-eicosatetraenoic Acids (HETEs). *J. Immunol.* 125:1789, 1980.
77. Samuelsson, B. Leukotrienes. Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science* 220:568, 1983.
78. Stenson, W. F., and Parker, C. W. Monohydroxyeicosatetraenoic Acids (HETEs) Induce Degranulation of Human Neutrophils. *J. Immunol.* 124:2100, 1980.

79. Goldman, D.W., and Goetzl, E.J. Novel Metabolites of Arachidonic Acid in Human Neutrophils. Fed. Proc. 40:1004, 1981 (Abstr.)
80. Zigmond, S. H. Ability of Polymorphonuclear Leukocytes to Orient in Gradients of Chemotactic Factors. J. Cell Biol. 75:606, 1977.
81. Malech, H. L., Root, R. K., and Gallin, J. I. Structural Analysis of Human Neutrophil Migration. Centriole, Microtubule, and Microfilament Orientation and Function During Chemotaxis. J. Cell Biol. 75:666, 1977.
82. Pfeiffer, J. R., Oliver, J. M., and Berlin, R. D. topographical Distribution of Coated Pits. Nature 286:727, 1980.
83. Stendahl, O. I., and Stossel, T. P. Actin-Binding Protein Amplifies Actomyosin Contraction, and Gelsolin Confers Calcium Control on the Direction of Contraction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:675, 1980.
84. Nath, J., and Rebhun, L. I. Effects of Caffeine and other Methylxanthines on the Development and Metabolism of Sea Urchin Eggs. Involvement of NADP^+ and Glutathione. J. Cell Biol. 68:440, 1976.
85. Nath, J., Flavin, M., and Schiffmann, E. Stimulation of Tubulin Tyrosinolation in Rabbit Leukocytes Evoked by the Chemoattractant Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. J. Cell. Biol. 91:232, 1981.
86. Ward, P. Leukotaxis and Leukotactic Disorders. A Review. Am. J. Pathol. 77:520, 1974.

87. Venge, P., and Olsson, I. Cationic Proteins of Human Granulocytes. VI. Effects on the Complement System and Mediation of Chemotactic Activity. *J. Immunol.* 115:1975, 1975.
88. Goetzl, E. J., and Austen, F. K. A Neutrophil-Immobilizing Factor Derived from Human Leukocytes. I. Generation and Partial Characterization. *J. Exp. Med.* 136:1564, 1972.
89. Alper, C. A., Abramson, N., Johnson, R. B. Jr., Jandl, H., and Rosen, F. S. Increased Susceptibility to Infection Associated with Abnormalities of Complement Mediated Functions and of the Third Component (C3) *N. Engl. J. Med.* 282:349, 1970.
90. Singh, H., Boyd, E., Hutton, M. M., Wilkinson, P. C., Peebles-Brown, D. A., and Ferguson-Smith, M. A. Chromosomal Mutation in Bone-Marrow as Cause of Acquired Granulomatous Disease and Refractory Macrocytic Anaemia. *Lancet* 1:873, 1972.
91. Ruutu, P., Ruutu, T., Voupio, P., Kosunen, T. U., and De la Chapelle, A. Defective Chemotaxis in Monosomy-7. *Nature* 265:146, 1977.
92. Carr, D. H. Chromosomes and Abortion. *Adv. Hum. Genet.* 2:201, 1971
93. Armendares, S. Síndrome de Turner. Diagnóstico y Manejo Terapéutico. Salvat México, 1979.
94. Sanger, R., Tippett, P., and Gavin, J. Xg Groups and Sex Abnormalities in People of Northern European Ancestry. *J. Med. Genet.* 8:417, 1971.

95. Böyum, A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (Suppl. 97):77, 1968.
96. Mishell, B. B., Shilgi, S. M., Herry, C., Chan, E. L., North, J., Gallily, R., Slomich, M., Miller, K., Marbrook, J., Parks, D., and Coob, A. H. Preparation of Mouse Cell Suspensions. In "Selected Methods in Cellular Immunology" (Mishell, B. B., and Shilgi, S. M. eds) p.p. 1-27. Freeman, San Francisco 1980.
97. Graham-knoll. Peroxidase Reaction. In "Laboratory Medicine Hematology" (Miale, J. B. ed) p. 1210. The C. V. Mosby Com. St. Louis, Mo., 1972.
98. Boner, A., Zeligs, B. J., and Bellanti, J. A. Chemotactic Responses of Various Differentiational Stages of Neutrophils from Human Cord and Adult Blood. *Infec. Immun.* 35:921, 1982.
99. Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., and Inwood, M. J. H. Preparations and Staining of Peripheral Blood and Bone Marrow Smears. In "Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology". 2nd. Edition, P. 643. Saunders, Philadelphia 1969.
100. Morrison, D. C., and Kline, L. F. Activation of the Classical and Properdin Pathways of Complement by Bacterial Lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol* 118:362, 1977.
101. Bhattacharyya, G. K., and Johnson, R. A. Comparing Two Treatments. In "Statistical Concepts and Methods". p.p. 286-321. John Wiley and Sons. New York. 1977.
102. Siegel, S. El Caso de Dos Muestras Independientes. En "Estadística No Paramétrica". p.p. 143-155. Editorial Trillas, México. 1983.

103. Cates, K. L., Grady, P. G., Shapira, E., and Davis, A. T. Cell-Directed Inhibition of Polymorphonuclear Leukocyte Chemotaxis in a Patient with Mucocutaneous Candidiasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65:431, 1980.
104. Pérez, H. D., Goldstein, I. M., Chernoff, D., Webster, R. O., and Henson, P. M. Chemotactic Activity of C5a des Arg. Evidence of a Requirement for an Anionic Peptide "Helper Factor" and Inhibition by a Cationic Protein in Serum from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mol. Immunol.* 17:163, 1980.
105. Hirata, F., Del Carmine, R., Nelson, C. A., Axelroad, J., Schiffman E., Warabi, A., De Blas, A. L. Niremberg, M., Manganiello, V., Vaughan, M., Kumagai, S., Green, I., Decker, J. L. and Steinberg, A. D. Presence of Autoantibody for Phospholipase inhibitory Protein, Lipomodulin, in Patients with Rheumatic Diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3190, 1981.
106. Hill, H. R., and Quie, P. G. Raised Serum-IgE Levels and Defective Neutrophil Chemotaxis in Three Children with Eczema and Recurrent Bacterial Infections. *Lancet* 1:183, 1974.
107. Quie, P. G., and Cates, L. Clinical Conditions Associated with Defective Polymorphonuclear Leukocyte Chemotaxis. *Am. J. Pathol.* 88:711, 1977.
108. Björkstén, B., and Lundmark, K. M. Recurrent Bacterial Infections in four Siblings with Neutropenia, eosinophilia, Hiperimmunoglobulinemia A, and Defective Neutrophil Chemotaxis. *J. Infect. Dis.* 133:63, 1976.
109. Van Epps, D. E., and Williams, R. C. Jr. Suppression of Leukocyte Chemotaxis by Human IgA myeloma components. *J. Exp. Med.* 144:1227, 1976.

110. Oliver, J. M. Cell Biology of Leukocyte Abnormalities-Membrane and Cytoskeletal Function in Normal and Defective Cells. A. Review. Am. J. Pathol. 93:221, 1978.
111. Gallin, J. I., Klimerman, J. A., Padgett, G. A., and Wolf, S. M. Defective Mononuclear Leukocyte Chemotaxis in the Chediak-Higashi Syndrome of Human, Mink, and Cattle. Blood 45:863, 1975.
112. Boxer, L. A., Watanabe, A. M., Rister, M., Besch, H. R. Jr., Allen, J., and Baehner, R. L. Correlation of Leukocyte Function in Chediak-Higashi Syndrome by Ascorbate. N. Engl. J. Med 295:1041, 1976.
113. Sander, J. A., Gallin, J. I., and Vaughan M. Effects of Serotonin, Carbamylcholine, and Ascorbic Acid on Leukocyte cyclic GMP and Chemotaxis. J. Cell Biol. 67:480, 1975.
114. Weissmann, G., Goldstein, I., Hoffstein, S., and Tsung, P. K. Reciprocal Effects of cAMP and cGMP on Microtubule-Dependent Release of Lysosomal Enzymes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 253:750, 1975.
115. Gallin, J. I., Malech, H. L., Wright, D. G., Whisnant, J., and Kirkpatrick, C. H. Recurrent Severe Infections in a Child with Abnormal Leukocyte Function. Possible Relationship to Increased Microtubule Assembly. Blood 51:919, 1978.
116. Caleb, M., Lecks, H., South, M. A., and Norman, M. Letter to the Editor. N. Engl. J. Med. 297:102, 1977.
117. Malech, H., Englander, L., Zakirek, B., Gallin, J. I., Root, R. K., Oliver, J., Papermaster, D., Kaliner, M., and Dolan, T. Abnormal Polymorphonuclear Neutrophil Function in Kartagener's Syndrome. Clin. Res. 27:590a, 1979.

118. Boxer, L. A., Hedley-Whyte, E. T., and Stossel, T. P. Neutrophil Actin Dysfunction and Abnormal Neutrophil Behaviour, *N. Engl. J. Med.* 291:1093, 1974.
119. Desnick, R. J., Sharp, H. L., Grabowski, G. A., Brunning, R. D., Quie, P. G., Sung, J. H., Gorlin, R. J., and Ikonne, J. U. Mannosidosis. Clinical, Morphologic, Immunologic, and Biochemical Studies. *Pediatr. Res.* 10:985, 1976.
120. Miller, M. E., Oski, F. A., and Harris, M. B. Lazy-Leukocyte Syndrome. A New Disorder of Neutrophil Function. *Lancet* 1:665, 1971.
121. Gahmberg, G., Andersson, L. C., Ruutu, P., Timonen, T. T. T., Hanninen, A., Vuopio, P., and De la Chapelle, A. Decrease of the Major High Molecular Weight Surface Glycoprotein of Human Granulocytes in Monosomy-7 Associated with Defective Chemotaxis. *Blood* 54:401, 1979.
122. Nurmi, T., Uhari, M., Linna, S-L., Herva, R., Tiilikainen, A., and Kouvalainen, K, Immunodeficiency Associated with a Deletion in the Short Arm of the X Chromosome. *Clin. Exp. Immunol.* 45:107, 1981.
123. Herva, R., Kaluzewski, B., and De la Chapelle, A. Inherited Interstitial del (Xp) with Minimal Clinical Consequences. With a Note on the Location of Genes Controlling Phenotypic Features. *Am. J. Med. Genet.* 3:43, 1979.
124. Raab, S. O., Mellam, W. J., Oski, F. A., and Bake, D. Abnormal Leukocyte Kinetics-an Explanation for Enzyme Abnormalities Observed in Trisomy 21 (Down's Syndrome). *J. Pediatr.* 69:952, 1966.

125. Gallin, J. I., Wright, D. G., Malech, H. L., Davis, J. M., Klemperer, M. S., and Kirkpatrick, C. H. Disorders of Phagocyte Chemotaxis. *Ann. Int. Med.* 92:520, 1980.
126. Cohen, S. The Role of Cell-Mediated Immunity in the Induction of Inflammatory Responses. *Am. J. Pathol.* 88:502, 1977.
127. Meakins, J. L., McLean, A. P. H., Kelly, R., Bubenik, O., Pietsch, J. B., and MacLean, L. D. Delayed Hypersensitivity and Neutrophil Chemotaxis. Effect of Trauma. *J. Trauma* 18:240, 1978.

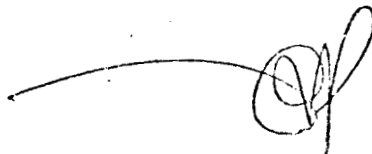
EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA DIVISION DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD
AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA, APROBO
ESTA TESIS EL 11 DE ABRIL DE 1984, EN MEXICO, D.F.



DR. ROBERTO KRETSCHMER S.



M. EN C. MARTHA LOPEZ OSUNA



DR. RUBEN DARIO MARTINEZ