

I. INTRODUCCIÓN

I.A. ANTECEDENTES

La infección es la causa mas importante del incremento de la morbilidad y mortalidad en las quemaduras. La combinación entre la pérdida de la barrera de la piel con el descenso de la inmunidad local y sistémica incrementa el riesgo de infección en el quemado (Kinney, 1979). La mayor incidencia de infecciones se asocia con la agranulocitosis (Johnston, 1973) anormalidades en las inmunoglobulinas (agammaglobulinemia) y/o del complemento (ausencia congénita de la fracción C3) (Boxer, 1974). Aunque es de adquisición más moderna la constatación que los neutrófilos aún circulando en número normal, pueden ser funcionalmente deficientes y por tanto causantes de una amplia clínica infecciosa. (Stossel, 1978) (Johnston, 1982).

I.A.1. LEUCOCITOS

Los leucocitos o células sanguíneas de la serie blanca son los componentes de la sangre asociados a las respuestas inflamatorias e inmune del proceso infeccioso. Fueron identificados en la sangre periférica en 1760 por William Hewson en Inglaterra (Mandell, 1991). Son unidades móviles del sistema reticuloendotelial. Se forman en parte en la médula ósea y en parte en los ganglios linfáticos. Su papel fundamental estriba en que son transportados específicamente a zonas donde hay inflamación intensa, proporcionando así una defensa rápida y enérgica contra cualquier posible agente infeccioso.

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y los monocitos (MN) normalmente sólo se producen en la médula ósea y los linfocitos (L) y las células plasmáticas (CP) se producen en diversos órganos linfógenos, incluyendo ganglios linfáticos, bazo, timo, etc. Los neutrófilos son células maduras que pueden destruir bacterias y virus en la sangre circulante. Los monocitos sanguíneos son células inmaduras con muy poca capacidad para luchar contra agentes infecciosos, pero con gran capacidad como monocito-macrófago tisular.

Los PMN neutrófilos y los macrófagos son los fagocitos "profesionales" del huésped mientras que los eosinófilos juegan un papel menor en la defensa del huésped. Los PMN neutrófilos son células sanguíneas de vida efímera y sumamente móviles que penetran rápidamente en las zonas de infección para ingerir y destruir a los microorganismos.

I.A.2. INFLAMACIÓN

La traducción del término "inflamación" proviene del Papiro de Smith escrito en Egipto en el año 1650 antes de Cristo, que a su vez deriva del original escrito 1000 años antes. En el tiempo de Hipócrates (460-380 a. de Cristo), lo que ahora conocemos como inflamación se llamaba *plegmone*, lo cual significaba "algo caliente" y Galeno lo describió 100 a. de Cristo.

La inflamación se define como una reacción del tejido conjuntivo vascular, generada por todos los agentes etiológicos conocidos, mediada por agentes químicos que cursa clínicamente con manifestaciones locales (Cohnheim, 1889) y un mayor o menor número de manifestaciones sistémicas. En esta reacción intervienen macrófagos, granulocitos y componentes hormonales como la histamina, bradikinina, prostaglandinas, leucotrienos y glucocorticoides (Beer, 1987) (Samuelsson, 1987).

I.A.3. RESPUESTA LEUCOCITARIA

La inflamación tienen lugar en dos etapas principales. La etapa "inicial o aguda temprana" es una respuesta vascular a la agresión con exudación de fluido y migración de los PMN al área dañada. La segunda "etapa tardía o de resolución" se encuentra dominada por la presencia de macrófagos y es una etapa con reparación y reemplazo del tejido dañado por tejido fibroso (Pérez, 1993). La etapa inicial es considerada una respuesta inespecífica de corta duración que se produce inmediatamente por la liberación, en el foco lesional, de los llamados "mediadores químicos", lo que se traduce en la formación de un exudado líquido y emigración de leucocitos, principalmente neutrófilos. En la etapa tardía los leucocitos PMNs sucumben en el foco inflamatorio liberando los componentes al medio extracelular y muchos de estos productos poseen capacidad para lesionar al propio organismo. Los macrófagos son las células que juegan un papel primordial en esta etapa ya que no son destruidos y amplifican el proceso inflamatorio por su participación en la respuesta inmunológica.

La inflamación crónica es de mayor duración que la aguda y se caracteriza por la coexistencia de fenómenos exudativos y reparativos, con formación de vasos y tejido conectivo.

I.B. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS LEUCOCITOS

En la sangre se encuentran seis tipos de glóbulos blancos: polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, monocitos, linfocitos y células plasmáticas. Además, hay un gran número de plaquetas que son fragmentos de un séptimo tipo celular localizado en la médula, el megacariocito. Los tres tipos de células polimorfonucleares tienen un núcleo con aspecto granuloso, por lo que se denominan granulocitos.

Los humanos producen unos $7 \times 10^3 / \text{mm}^3$ glóbulos blancos por milímetro cúbico en sangre en situación de normalidad y la media en proporción normal de los diferentes tipos de leucocitos es: neutrófilos 65%, eosinófilos 2%, basófilos 0,4%, monocitos 5% y linfocitos 30%. Son unidades móviles que están en lo que consideramos como primera línea de defensa del organismo. Se forman en parte en la médula ósea (granulocitos y monocitos y unos pocos linfocitos) y en parte en los ganglios linfáticos (linfocitos y células plasmáticas), siendo transportados después por la sangre a diferentes partes de la economía, donde ejercen sus funciones.

El papel fundamental de los leucocitos o glóbulos blancos estriba en que son transportados específicamente a zonas donde hay inflamación, proporcionando una defensa rápida y enérgica contra cualquier agente infeccioso.

Su origen en la médula osea es el siguiente:

Médula ósea

Sangre

Células Madres no diferenciadas

Células diferenciadas

Mieloblasto

Promielocito → *Mielocito eosinófilo* → *Eosinofilo*

Promielocito → *Mielocito basófilo* → *Basófilo*

Promielocito → *Mielocito neutrófilo*



Metamielocito neutrófilo → *Neutrófilo en banda y segmentado*

Tabla I. Génesis de las células sanguíneas.

I.B.1. GÉNESIS DE LOS LEUCOCITOS

La diferenciación temprana de la célula madre pluripotencial hematopoyética hacia los diferentes tipos de células se observa en la Tabla I. Los granulocitos y linfocitos se forman sólo en la médula ósea a partir de células no diferenciadas denominadas mieloblastos; los linfocitos y las células plasmáticas se producen principalmente en los diversos órganos linfoides, entre ellos, los ganglios linfáticos, el bazo, el timo, las amígdalas y varios restos linfoides de la médula ósea e intestino. Una vez formados se almacenan en la médula hasta que se precisan en el sistema circulatorio; cuando aumentan las necesidades y varios factores inducen su liberación a la circulación. Normalmente, se encuentran almacenados en la médula el triple de granulocitos que las que se hallan en sangre periférica. Esto representa una capacidad de aporte de granulocitos de unos seis días.

La maduración de las células de la serie mieloide se caracteriza por la producción de gránulos metacromáticos oscuros que aumentan en cantidad y más tarde son reemplazados por gránulos específicos. Las células que muestran afinidad por el colorante azul o básico se denominan basófilos; las que se tiñen de rojo anaranjado mediante la eosina, eosinófilos; las células granulares que no se tiñen intensamente con uno u otro de estos colorantes se denominan neutrófilos. Cuando las células adquieren movilidad, los núcleos de las células granulares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) cambian generalmente de forma, tomando aspecto multilobular y se designan como mielocitos, metamielocitos, formas en banda y segmentados.

I.B.1.1 CÉLULAS PROGENITORAS

La primera población de células progenitoras es el mieloblasto, contienen moderada cantidad de citoplasma no granuloso y de color azulado. Este da lugar a la formación del promielocito que forma gránulos netamente visibles. y que después da lugar al megacariocito.

Inicialmente los gránulos se tiñen predominantemente en azul o azul morado. Los núcleos son redondos y relativamente grandes pudiéndose distinguir los nucléolos. El promielocito se convierte en mielocito cuando los gránulos se diferencian de modo que se pueden clasificar en basófilos, eosinófilos o neutrófilos.

A continuación se muestran las células progenitoras vistas al microscopio electrónico (Rozman,1990) (Zucker-Franklin, 1981). Las imágenes que se muestran de microscopia óptica han sido cedidas por la Unidad de Citología del Servicio de Hematología del Hospital General Vall'd Hebron.

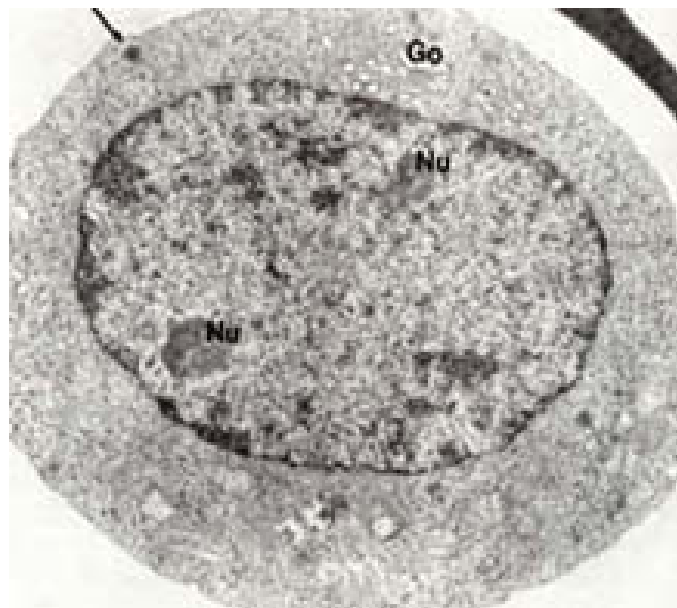


Fig.1. Células progenitoras. Mieloblasto. Microscopio electrónico.

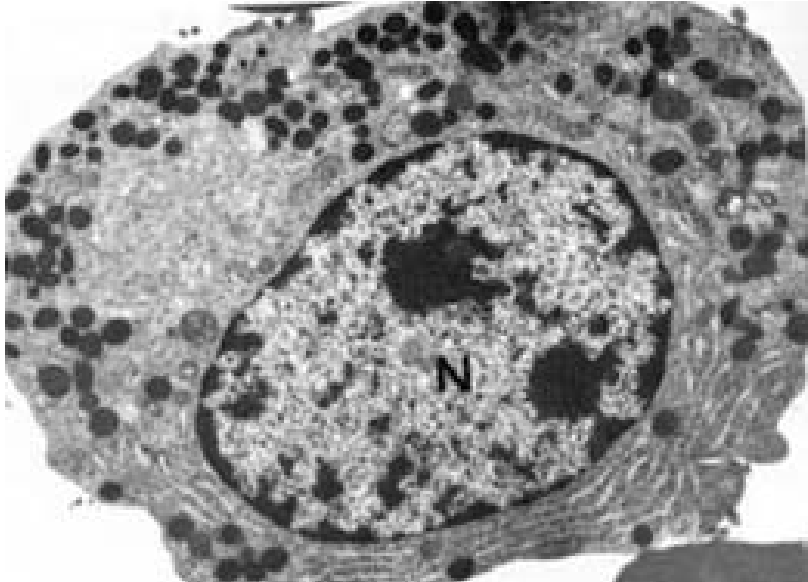


Fig.2. Promielocito. Microscopio electrónico.

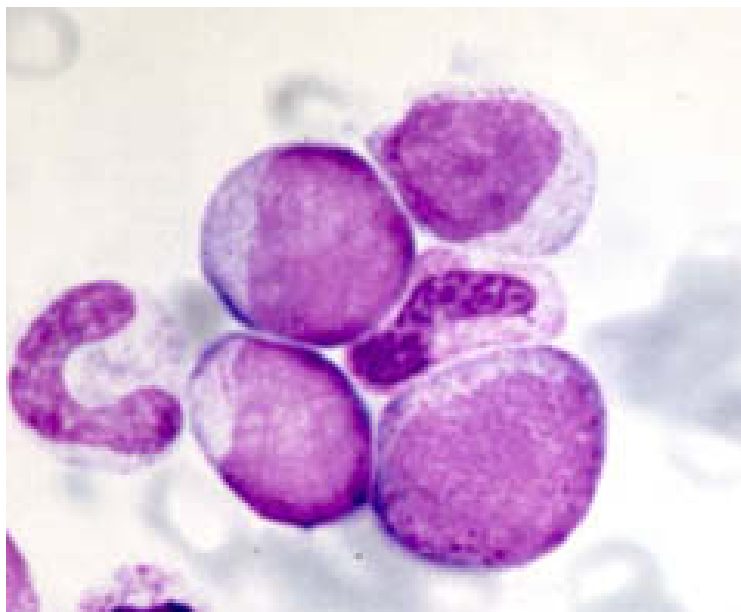


Fig.3. Mieloblasto y Promielocito. Microscopio óptico.

MIELOCITO NEUTRÓFILO

Estas células forman la segunda población con la aparición de gránulos específicos o secundarios donde el primer signo de diferenciación consiste en la aparición de una pequeña "isla" relativamente pálida de vagos gránulos rojizos adyacente al núcleo. Los mielocitos neutrófilos suelen ser más pequeños que los promielocitos y tienen relativamente más citoplasma.

Los núcleos son redondos, ovalados o achatados por un lado. Los gruesos filamentos de cromatina se tiñen irregularmente. Los nucléolos no se distinguen claramente.



Fig.4. Mielocito. Microscopio electrónico.

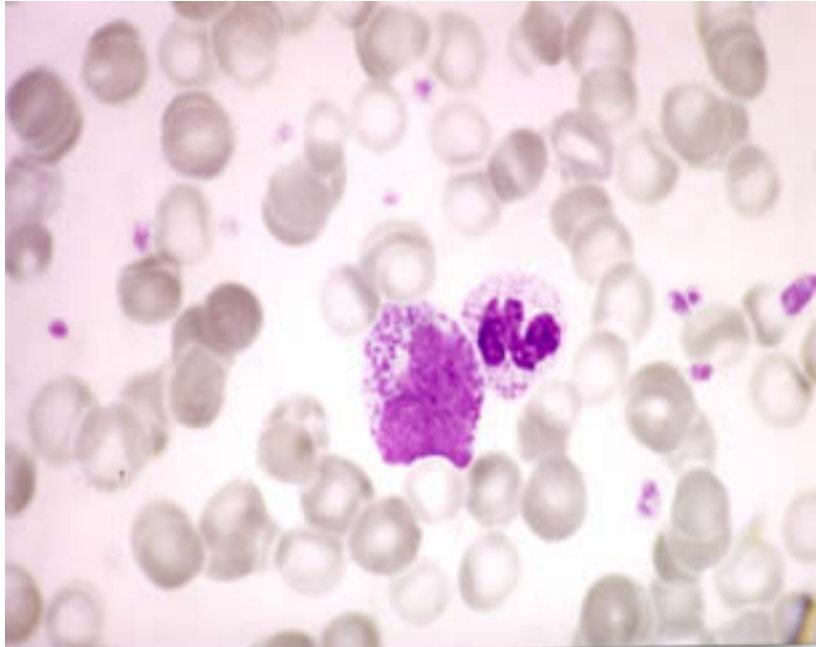


Fig.5. Mielocito. Microscopio óptico.

METAMIELOCITO NEUTRÓFILO JÓVEN

Los metamielocitos neutrófilos tienen un núcleo ligeramente hendido y pequeños gránulos azul-rosados. Estas células son algo más pequeñas que los mielocitos, su núcleo también es proporcionalmente más pequeño y la estructura de la cromatina es menos precisa. Los metamielocitos neutrófilos raramente se ven en la sangre periférica de individuos normales, pero son frecuentes en caso de hiperplasia mielocítica.

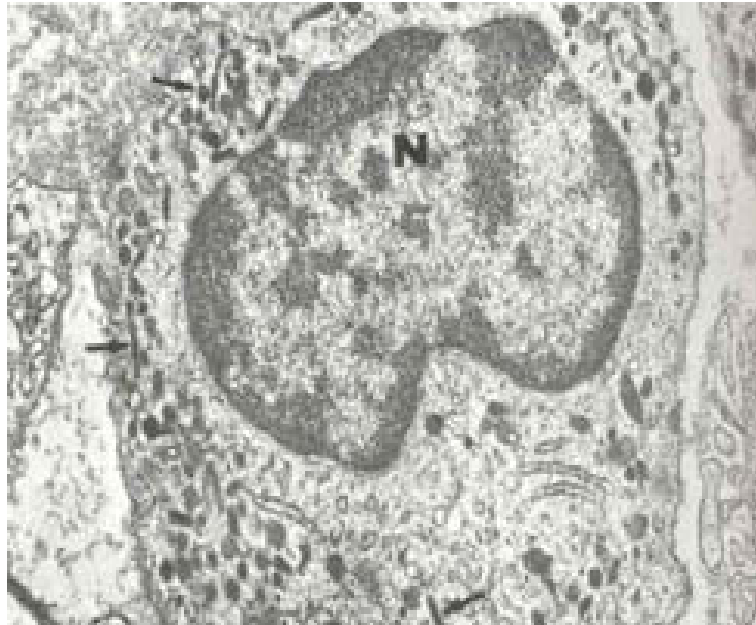


Fig.6. Metamielocito. Microscopio electrónico



Fig.7. Metamielocito. Microscopio óptico.

I.B.1.2. CÉLULAS MADURAS**NEUTRÓFILO EN BANDA (NEUTRÓFILO NO SEGMENTADO)**

Neutrófilo en cayado no filamentoso. En la medida que van madurando los metamielocitos neutrófilos la concavidad del núcleo se hace más pronunciada, hasta que el hueco ocupa más de la mitad del diámetro del hipotético núcleo redondo. Los extremos del núcleo son aproximadamente paralelos dándole al núcleo un aspecto de herradura. Los neutrófilos en banda son algo más pequeños que los metamielocitos. El núcleo presenta alteraciones degenerativas y generalmente se observa una masa oscura, picnótica en ambos polos, donde se formará el lobulo. Los gránulos de los neutrófilos en banda son pequeños, distribuidos uniformemente y presentan varios tintes rosados y azules.

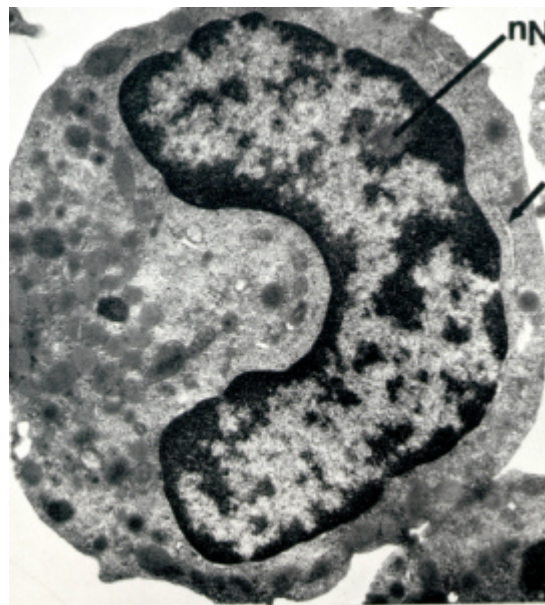


Fig.8. Neutrófilo en banda. Microscopio electrónico.

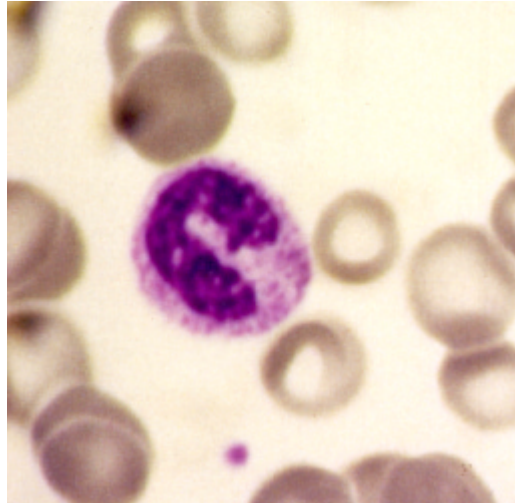


Fig.9. Neutrófilo en banda. Microscopio óptico.

NEUTRÓFILO SEGMENTADO (GRANULOCITO NEUTRÓFILO POLINUCLEAR)

Los neutrófilos representan más del 90% de los granulocitos circulantes y tienen 10-20 micras de diámetro. El núcleo de esta célula está separado en lóbulos bien definidos, unidos por el filamento. La mayoría presentan dos o tres lóbulos y de vez en cuando se observan células con cuatro o cinco lóbulos. El citoplasma presenta un tinte rosado claro. Los gránulos de diferentes tamaños están regularmente distribuidos y son de color entre rosado claro o azul negruzco.

Poseen dos tipos principales de gránulos. Los gránulos "primarios" o azurófilos, que se tiñen de azul y su número se reduce durante la mitosis. Estos gránulos son los lisosomas verdaderos que contienen hidrolasas y fosfatasas ácidas, proteasas neutras, mieloperoxidasa, proteínas catiónicas, mucopolisacaridos ácidos y muraminidasa (lisozima).

Los gránulos "secundarios" o específicos que surgen durante el estadio no mitótico del desarrollo celular y por lo tanto no sufren una reducción numérica. En el neutrófilo maduro, los gránulos específicos superan en número a los primarios y contienen lactoferrina, lisozima, proteína fijadora de vitamina B12 y citocromo b.

Se producen en la médula a razón de 80 millones por minuto y tienen una vida media corta (4-5 días), representando alrededor del 60-70% de los leucocitos sanguíneos normales totales.

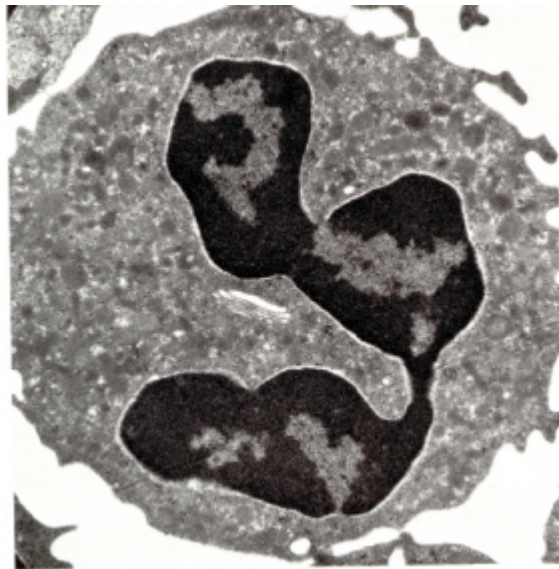


Fig.10. Neutrófilo segmentado. Microscopio electrónico.

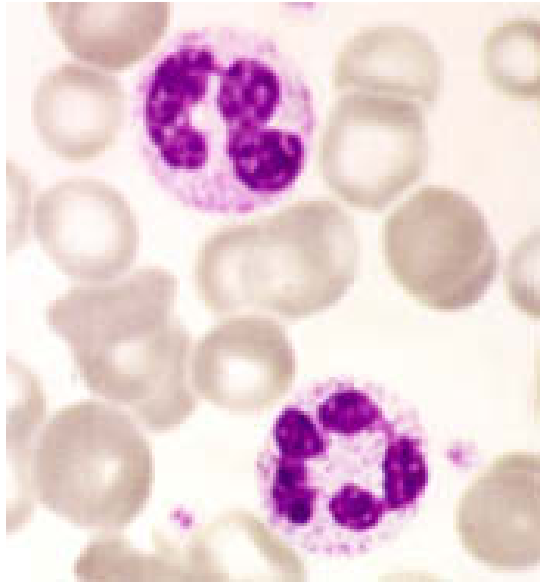


Fig.11. Neutrófilo segmentado. Microscopio óptico.

I.B.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS NEUTRÓFILOS

Una vez que salen de la médula ósea, la vida de los granulocitos normalmente es de 4-8 horas circulando en la sangre y el resto de tiempo en los tejidos. Cuando hay una infección tisular grave, este período total de vida suele reducirse a unas cuantas horas porque los granulocitos llegan rápidamente al área infectada, ingieren a los microorganismos y son destruidos durante este proceso. Durante la maduración de los granulocitos aparece la mieloperoxidasa, las hidrolasas ácidas, proteasas neutras, colagenasas y proteínas cationicas bactericidas. En contraste los lisozimas, colagenasas específicas, las proteínas de unión a vitamina B12 y lactoferrina aparecen durante la fase de desarrollo de los granulos específicos.

El desarrollo granulocítico y maduración en la médula ósea ocurre en dos fases: mitótica y no mitótica. Cada fase dura aproximadamente una semana. Los neutrófilos tienen receptores para la fracción Fc de las moléculas de IgG que aparecen con el desarrollo celular en los promielocitos. Los neutrófilos contienen los receptores para C3b y C3bi aunque sus localizaciones son distintas (O'Shea, 1985). También la presencia del mRNA de la properdina, que es un importante constituyente del sistema del complemento, se ha demostrado recientemente que se almacena en los gránulos de los neutrófilos y secreta por la estimulación con factor de necrosis tumoral (α -TNF), interleuquina-8 (IL-8) o formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) (Wirthmueller,1997).

I.C. FUNCIONES DE LOS NEUTRÓFILOS

I.C.1. MARGINACIÓN O PAVIMENTACIÓN

Los PMNs neutrófilos se desplazan a los tejidos por el movimiento ameboide y se adhieren a la pared capilar en parte por su tamaño y por la adherencia natural que poseen. Una vez que los productos de la inflamación actúan en la pared capilar, las células endoteliales se hacen especialmente adherentes para los leucocitos causando gran marginación de granulocitos al tejido inflamado.

I.C.2. DIAPÉDESIS

A continuación los neutrófilos se deslizan a través de los poros de los vasos sanguíneos (a pesar de que el poro es mucho menor que el volumen de la célula) y una parte de la célula lo atraviesa mediante la emisión de seudópodos a la vez que disuelven la membrana basal.

I.C.3. QUIMIOTAXIS

Depende básicamente de un gradiente de concentración de las sustancias quimiotácticas. Dado que esta concentración es mayor cerca de la fuente de producción de estas sustancias se produce un movimiento direccional de los leucocitos. Cuando un tejido se inflama, la quimiotaxis, los neutrófilos y macrófagos, hace que se muevan hacia el área inflamada. Este fenómeno se debe a varios factores: a) sustancias de origen directamente microbiano, como es el caso de los péptidos cortos derivados de los extremos amino-terminales de proteínas bacterianas (FMLP, es quimiotáctico para los leucocitos, que llevan receptores capaces de reconocerlo) y b) ciertos componentes microbianos como la endotoxina de bacterias gram-negativas que activan la ruta alternativa del complemento o los péptidos C3a y C5a, que son muy quimiotácticos sobre los fagocitos.

Las sustancias con capacidad quimiotáctica son: 1) las toxinas bacterianas 2) productos de degeneración de los tejidos inflamados 3) productos de reacción del "complejo del complemento" y 4) sustancias producidas durante la coagulación del plasma en el área inflamada.

I.C.4. FAGOCITOSIS

Es la función más importante de los neutrófilos que deriva del hecho de que el organismo tiene una forma específica para identificar ciertos materiales extraños. Que se produzca o no la fagocitosis dependerá de :

- 1) La superficie de la partícula, si esta es aspera aumentan las probabilidades de fagocitosis.
- 2) De las cargas eléctricas, así la mayor parte de componentes tisulares tienen cargas de superficie electronegativas. Los tejidos muertos y las partículas extrañas suelen ser electropositivas y por tanto pueden ser fagocitadas.

La fagocitosis es un proceso en dos pasos que incluye la fijación y la ingesta de la partícula fagocitada. La ingestión es un proceso activo que requiere energía proveniente de la glucólisis anaerobia, la presencia de iones calcio y magnesio.

La mayoría de las bacterias están recubiertas por opsoninas (sustancias humorales que estimulan la ingesta de los microorganismos). La inmunoglobulina G (IgG) y el complemento (C) son los principales factores opsonizantes.

Los anticuerpos estimulan la fagocitosis mediante:

- La neutralización de las moléculas antifagocíticas presentes en la superficie bacteriana.
- Unión física del microorganismo neutrófilo.
- Activación de la vía clásica del complemento y la estimulación del depósito de fragmentos opsonizantes de C3 sobre la superficie bacteriana.
- La activación del mecanismo de ingesta por la interacción de la IgG con su receptor en la membrana del neutrófilo.

El proceso culmina en el denominado "estallido metabólico o respiratorio" en el que los fagocitos estimulados convierten el oxígeno molecular en otros radicales de oxígeno que actúan sobre la bacteria y la destruyen. Durante el proceso se produce incremento del consumo de oxígeno, radical superóxido (O_2^-), producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la estimulación del shunt de la hexósa monofosfato.

I.C.5. SISTEMA INMUNITARIO Y NEUTRÓFILOS

Los granulocitos están presentes en casi todas las formas de inflamación y son amplificadores y efectores inespecíficos siendo su acción modulada por los denominados mediadores, constituidos por elementos químicos, proteínas o enzimas. A su vez y después de iniciar la respuesta vascular, atraen hacia el área otros mediadores como son las proteínas del sistema del complemento, sustancias vaso activas (histamina y serotonina), opsoninas, prostaglandinas, leucotrienos y el factor activador de las plaquetas (Nomura, 2001).

I.C.6. ALTERACIONES FUNCIONALES DE LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS

Las primeras alteraciones descritas en la función de los neutrófilos fueron la agranulocitosis y las neutropenias.

1. La "agranulocitosis" fue descrita en 1922 por Schultz (Rudovic, 1972). recibiendo varias denominaciones: (angina agranulocítica, leucopenia idiopática maligna e hipoplasia agranulocítica). Está caracterizada por la desaparición o disminución muy intensa de los granulocitos neutrófilos de la sangre periférica. En los años siguientes se detectaron numerosos fármacos causantes de esta enfermedad: aminopirina, fenacetina, derivados de la fenilbutazona, sulfamidas, sulfonamidas, cotrimoxazol, sales de oro, clorpromacina, ácido acetilsalicílico, dipirona, tiouracilo, propiltiuracilo y antitiroideos (McCurrach, 1970) y los citostáticos (Arneborn, 1978).

En muchas granulocitosis no puede establecerse el diagnóstico etiológico denominándose "agranulocitosis aguda idiopática". Es un síndrome clínico hematológico caracterizado por la desaparición o disminución muy intensa de los granulocitos neutrófilos de la sangre periférica.

2. Las "neutropenias" son el descenso absoluto en sangre periférica de los granulocitos neutrófilos. El límite inferior normal del recuento de neutrófilos (cayados y neutrófilos) es de 1500/mm³. Es un hallazgo de laboratorio que puede ser clínicamente silencioso. Puede aparecer como dato analítico aislado sintomático de numerosos procesos extrahematológicos o hematológicos o como consecuencia de la acción de ciertas drogas o tóxicos sobre la médula. Su gravedad dependerá del tóxico causante y del tiempo de exposición.

Las neutropenias adquiridas transitorias, no medicamentosas, son las secundarias a enfermedades infecciosas víricas, bacterianas y parasitarias. Pueden aparecer neutropenias propias del hiperesplenismo, del síndrome de Felty, del alcoholismo crónico o en los pacientes sometidos a diálisis. Su evolución puede ser aguda o crónica. A su vez las alteraciones adquiridas también pueden ser agudas o crónicas.

I.D. FAGOCITOSIS

I.D.1. INTRODUCCIÓN E HISTORIA

En 1882 Metchnikoff expuso la idea de que los *fagocitos* y en particular los neutrófilos constituirían el sistema de defensa antimicrobial (Metschnikoff, 1887). Este fue el inicio de la "teoría fagocítica" y que en su esencia sigue siendo válida (Baggiolini, 1982). Estas células se han englobado bajo el término de *fagocitos* por efectuar la *fagocitosis*, fenómeno biológico por el cual engloban y destruyen diversas partículas. En 1903-1904 Wright y Douglas demostraron la importancia de los factores del suero en la fagocitosis y se denominaron "opsoninas" a estos factores.

I.D.2. ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN FAGOCÍTICA

El descenso de la función fagocítica puede obedecer a factores humorales (α -TNF, citoquinas B) que se hallan en el entorno sanguíneo que puede producir una disminución de la capacidad del suero o directamente por un defecto celular que produce una reducción de la capacidad de ingerir partículas opsonizadas. Desde el punto de vista del entorno celular se pueden producir alteraciones en el proceso de degranulación o en la peroxidación que comprometen seriamente el mecanismo del fagocito (Holmes, 1966). El descenso más marcado se encuentra en los trastornos de la peroxidación que pueden ser de origen congénito, como es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) (Berendes, 1957). En el 65% de los casos esta enfermedad está ligada al cromosoma X y en el 35% restante se hereda en forma autosómica recesiva.

I.D.3. FACTORES DE ESTIMULACIÓN DE LA FAGOCITOSIS

Se han descrito variables de diversos orígenes capaces de estimular la respuesta fagocítica y entre los factores que inciden en dicho estímulo, el más universal es el lipopolisacárido (LPS) (Morrison, 1977) (Byrne, 2002). Estos factores capaces de estimular la respuesta normal del fagocito pueden actuar a diferentes niveles por lo que hay que distinguir los que pueden modular la quimiotaxis, como es el caso del phorbol myristate acetate, ya que quimiotaxis y fagocitosis son procesos que están encadenados en el tiempo (Dallegrì, 1990).

Entre los estímulos de la fagocitosis tenemos: a) las interleuquinas, IL-1 (Dinarello, 1991) (Granowitz, 1991) y la IL-6 (Mandell, 1995), b) fragmentos de la vía del complemento (C1q, C3b, C3bi) (Miller, 1975) (Schifferli, 1986), c) la hipertermia (42°C) (Severns, 1986) y d) aminoácidos como la taurina (Bedrosian, 1991) y la arginina (Albina, 1989).

I.D.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

I.D.4.1. AISLAMIENTO DE LOS NEUTRÓFILOS

La separación de los neutrófilos debe hacerse en condiciones que preserven la normal función celular. Si bien las condiciones de esterilidad rígidas no son esenciales debe evitarse la contaminación microbiana. También es importante la temperatura sobre todo durante el proceso de la separación. Los métodos de separación se basan en la descripción original con un gradiente de densidad con Percoll (Ficoll-Hipaque) (Boyum, 1968). Inmediatamente después de la centrifugación las células deben ser resuspendidas en un medio que evite el daño celular obviando las soluciones que contengan iones calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). El paso final consiste en lisar los hematíes contaminantes y el mejor sistema es la lisis hipotónica que no causa alteraciones en la función de los neutrófilos.

I.D.4.2. MÉTODOS PARA MEDIR LA FAGOCITOSIS Y MUERTE BACTERIANA

Desde el punto de vista metodológico se han descrito métodos a) que intentan medir propiamente la fagocitosis (ingestión) (Hampton, 1999) y los métodos b) que combinan la fagocitosis y la muerte bacteriana. (Hampton, 1994).

En el primer caso (a) se puede medir a partir de la incubación con partículas inertes o con bacterias. Estos ensayos pueden hacerse del siguiente modo:

a.1) Microscopía. Consiste en contar el número de partículas ingeridas en función del tiempo. Su ventaja es que provee una vía visual directa y como tal es de gran valor para validar los resultados obtenidos con otros métodos o para contar el número de partículas ingeridas por un determinado número de fagocitos (Victor, 2002). La desventaja consiste en que carece de resolución suficiente lo que impide el conteo de partículas pequeñas dificultando el conteo de este tamaño de partícula.

Algunos autores utilizan antibióticos para combatir las bacterias extracelulares (Tabrizi, 1993) pero pueden producirse interacciones no deseables (Root, 1981).

Durante el ensayo se puede contabilizar la ingesta de partículas intracelulares o bien se pueden contabilizar las partículas ingeridas restando del total adicionado las que se observan en el sobrenadante después de un paso de centrifugación (Leijh, 1979). Con este método se intenta distinguir entre la ingesta completa de la partícula y los elementos adheridos a la célula (Hed, 1986).

a.2) Microscopía electrónica: Los trabajos inherentes a la microscopía pueden ser resueltos por el análisis con el microscopio electrónico pero habitualmente no está disponible para la rutina (Rozenberg -Arska, 1985).

a.3) NBT. El método se basa en la actividad enzimática de la oxidasa que contribuye a la generación del peróxido de hidrógeno. El azul de tetrazolio (NBT) es ligeramente amarillo en su forma reducida y cuando es oxidado por la oxidasa forma sales de formazan que son de color azul-violeta. Esta reacción tiene lugar (burst respiratory) durante la fagocitosis y consume oxígeno.

Las sales de formazan pueden identificarse por extracción química y subsecuente medición fotométrica o bien contaje citológico. Originariamente el método se usó para detectar la granulomatosis crónica que es un déficit genético de oxidasa, de la que se han descrito modificaciones tanto a nivel del test como de la denominada "actividad espontánea".

Estudios sobre la capacidad bactericida de los macrófagos peritoneales en ratas han demostrado una buena correlación de los test de función fagocítica (De la Fuente, 1985) y el NBT (Ortega E, 1992).

a.4) Uso de partículas marcadas. Estos métodos tienen un enfoque alternativo ya que la fagocitosis puede monitorizarse por la medición de la fluorescencia (Wan, 1993). Como ejemplo tenemos la citometría de flujo (Zapata-Sirvent, 1993) que permite utilizar muestras de pequeño tamaño en las que bacterias marcadas con fluoresceínas son fácilmente distinguibles de las que ya han sido fagocitadas por los neutrófilos. (van Eeden, 1999).

En el segundo caso (b) el ensayo microbiológico, las dos bacterias más utilizadas han sido el *Stafilococcus aureus* y la *Escherichia coli*. Estos ensayos pueden hacerse del siguiente modo:

b.1) Lisis de las colonias. Este ensayo se basa en la pérdida de habilidad de las bacterias para formar colonias en agar y observación de su posterior lisis.

b.2) Muerte bacteriana. La fagocitosis y la muerte bacteriana se calcula a partir del descenso de las bacterias extracelulares y en el cambio en el número de bacterias extracelulares. Ambos procesos siguen una cinética de primer orden (Hampton, 1994).

Una variante metodológica adicional (c) son los métodos que miden la variabilidad celular después de la ingestión de partículas.

c.1) Captación con timidina T³. Este es un ensayo de viabilidad celular. Se mide la viabilidad de las bacterias por su habilidad en incorporar la timidina marcada con tritio en el ADN sintetizado *de novo* (White, 1981).

c.2) Fluorescencia. También es un ensayo de viabilidad celular en el que la adición del colorante "naranja de acridine" produce fluorescencia en el núcleo que puede observarse por microscopía. (Carmichael, 1980). En la práctica es el menos usado.

I.D.4.3. TIPOS DE PARTÍCULAS

Se conocen los efectos de diferentes partículas sobre el estallido respiratorio de los PMN. En presencia de glucosa marcada con isótopos radioactivos (C^{14}) y midiendo la formación de dióxido de carbono y la captación de oxígeno (Iyer, 1961) se pudo comprobar que los mayores niveles de estimulación se obtenían con esferulas de poliestireno (látex, $\sim 1,7 \mu$), *Mycobacterium tuberculosis* y *Echerichia coli* al comparar con partículas de carbón, azufre, sulfato de bario o dióxido de manganeso.

I.E. SISTEMA DEL COMPLEMENTO

I.E.1. NOTAS HISTÓRICAS

La actividad atribuible al sistema del complemento fue descrita por primera vez entre 1888 y 1894. Estos experimentos demostraron que el suero fresco contenía un factor bactericida termolábil que se denominó *alexina*. (Roitt, 1991) (Ross, 1986).

El término “*complemento*” fue aplicado por primera vez por Paul Ehrlich para referirse al factor termolábil y *amboceptor* (anticuerpo), describiendo una actividad presente en el suero que en combinación con el anticuerpo específico producía la lisis de las bacterias (Tauber, 1992).

A continuación Jules Bordet (1895) observó que sueros frescos que contenían anticuerpos frente a determinadas bacterias perdían la capacidad de lisarlas al ser calentadas a $56^{\circ}C$. Por ello postuló la existencia de una proteína sérica termolábil que asistía o complementaba a las inmunoglobulinas ejerciendo una acción lítica (Bordet, 1987) (Laurell, 1990). En la misma época se comprobó la denominada "actividad termolábil" del suero; este fenómeno suponía que la bacteriolisis *in vitro* desaparecía con el calentamiento y la actividad era recuperada por la adición de suero fresco normal.

En 1907, Ferrata demostró que el complemento podía fraccionarse en dos componentes (por diálisis del suero contra agua acidificada) dando lugar a un precipitado o "euglobulina" y una "fracción hidrosoluble". La actividad del complemento sólo podía manifestarse en presencia de ambas fracciones denominadas C1 y C2 (Roitt, 1991).

Los componentes denominados C3, C4 y C5 fueron descritos posteriormente. En Sachs y Omorokow demostraron que el veneno de cobra inactivaba a otro componente (C3) (Vogel, 1982, 1984), mientras que Gordon descubrió otro componente que se destruía con amoníaco (C4). El orden de descubrimiento de estos componentes del complemento no se corresponde con el orden de reacción, lo que explica en parte, la falta de lógica en la nomenclatura del sistema del complemento. Un avance importante fue la purificación de la proteína plasmática beta 1c por Muller-Eberhard, en 1960, y su demostración de que correspondía a C3 (Muller-Eberhard, 1975). Seguidamente Linscott y Nishioka, así como Nelson, pudieron purificar funcionalmente los nueve componentes que participan en la secuencia de la hemólisis por la vía clásica del complemento (Roitt, 1991).

Pero la existencia de otra vía de activación del complemento, independiente del anticuerpo, fue sugerida por primera vez por Louis Pillemer y colaboradores en 1950 al identificar el sistema de la "properdina" (Brade, 1978) (Ratnoff, 1980). La existencia de la "vía alternativa" frente a la reconocida "vía clásica", no fue admitida fácilmente por otros científicos de la época.

En la década de 1980 se vio que el sistema del complemento no estaba solo formado por proteínas plasmáticas capaces de depositarse sobre la superficie de los microorganismos sino que también existían proteínas de membrana que protegían a las células del huésped contra los efectos perjudiciales de la activación del complemento (Porcel –Pérez, 1996).

La vía clásica y alternativa tienen la misión de formar una enzima, la C3-convertasa, sea como fuere capaz de escindir al componente mayoritario y más importante del complemento, C3, en dos fragmentos: C3a y C3b. A partir de este punto se inicia una fase común que lleva a la formación del "complejo de ataque a la membrana" capaz de provocar citólisis osmótica (Hosletter, 1993).

En la actualidad se considera que el sistema del complemento está formado por 19 proteínas plasmáticas y por lo menos nueve proteínas de membrana. La activación del sistema produce el desencadenamiento secuencial de la acción de las diversas proteínas y en este aspecto resulta muy similar a la cascada de coagulación.

I.E.2. NOMENCLATURA

El sistema del complemento está compuesto por un grupo de veinte proteínas sericas, cuya función es modular la inflamación. En la actualidad se usa la nomenclatura recomendada por la Organización Mundial de la Salud (Good, 1977) del siguiente modo:

- Al sistema del complemento se le identifica por la letra “C” y a cada uno de los componentes se le asigna un número: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, y C9.
- Cuando un componente o grupos de componentes del complemento han adquirido actividad enzimática u otra actividad biológica, se les identifica colocando una barra sobre los componentes afectados.
- Los componentes que se enumeran después de EA+C denotan un estado de actividad, pero no necesariamente su presencia física. EA significa hematíe sensibilizado que en presencia de Ca^{2+} y ausencia de Mg^{2+} se fijan al complemento. Ejem: EAC1423 puede escribirse en forma simplificada EAC1-3.
- Cuando en una reacción algún componente del complejo intermedio pierde su actividad, se le suprime. Si C1 y C2, componentes del complejo EAC1423, se inactivaran, se escribe EAC43.
- La pérdida de una actividad definida por parte de un componente del complemento se identifica con la letra i. Ejem: C4i, C2i, C3i.
- Los fragmentos resultantes de rupturas peptídicas que aparecen durante la activación del complemento se identifican con una letra minúscula siguiendo al componente afectado. Cada proteína de la vía se escinde en dos fragmentos que se denominan a (pequeño) y b (grande). Ejemplo: C3a, C3b, C5a.

I.E.3. VIAS DEL COMPLEMENTO

El objetivo de la activación del complemento es la defensa del huésped y la regulación inmune: 1) opsonización de las bacterias 2) inflamación causada por los fragmentos que aparecen durante la activación 3) lisis de bacterias y 4) solubilización de los complejos inmunes (Porcel, 1993).

Todo esto se produce gracias a la activación enzimática secuencial de sus componentes, cuyo resultado es la formación de productos con gran actividad biológica como las fracciones que derivan de C3 (C3b), las anafilotoxinas (C3a, C5a) y el complejo terminal del complemento (C5b-9).

La vía clásica del complemento es activada por reacciones antígeno-anticuerpo. En esta vía el complemento se activa por agregados de inmunoglobulinas IgG e IgM que se unen a un antígeno, formando el complejo Ag-Ac. Si no hay agregación de estas inmunoglobulinas no se produce la fijación del complemento. Se inicia así una reacción sistémica que se denomina "cascada del complemento" la cual resulta finalmente letal para los microorganismos. (Navarrete, 1997). En esta vía no todos los componentes cumplen la misma función; C1 constituye la unidad de reconocimiento; C2, C3 y C4 las de activación mientras que C5, C6, C7, C8 y C9 forman parte del sistema de ataque a las membranas.

La vía clásica se puede activar por complejos inmunitarios dependientes de C1q o independientes de C1q. En el primer caso las proteínas que participan son: C1, C4, C2 y C3. C1 está formado por C1q, C1r y C1s.

La subunidad de reconocimiento es la C1q que se une a la inmunoglobulina del inmunocomplejo mientras que el tetrámero C1r-C1s es la subunidad catalítica para la cascada. Enzimas como la plasmina y la tripsina pueden activar directamente a C1s e iniciar así la vía.

El resumen de la vía clásica sería de funcionamiento o de activación que tras la unión de C1q a los complejos inmunes, C1r cataliza su propia activación y la de C1s, el cual escinde al C4a a partir de C4 que se une a C2 en presencia de Mg. A continuación C1s aparta a C2a de este complejo con lo que queda una C3 convertasa, C4b2b que observamos a continuación en la Fig.12.

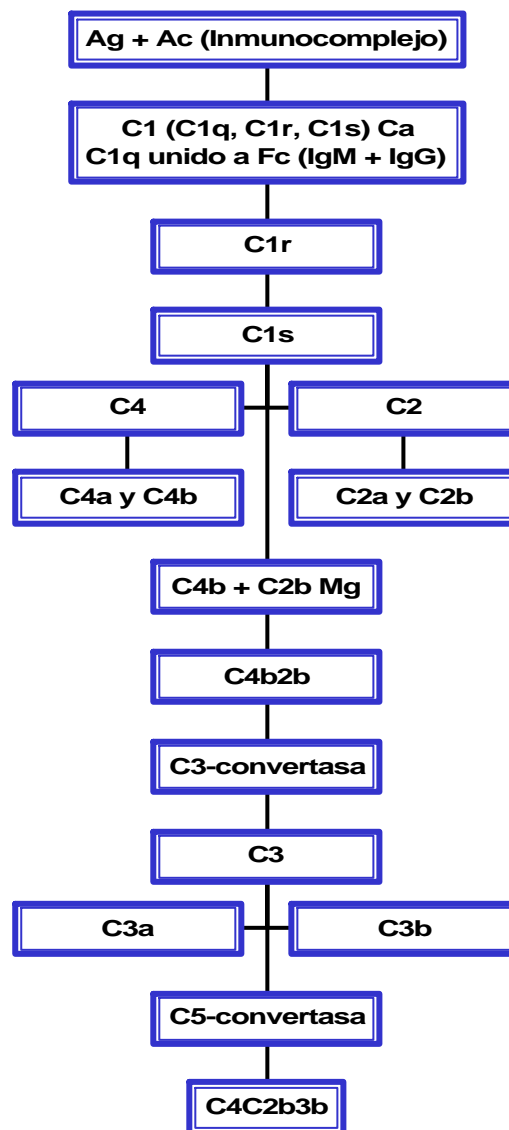


Fig.12. Resumen de la vía clásica.

La vía alternativa permite activar el sistema del complemento sin mediar la reacción antígeno-anticuerpo. Es iniciada por polisacáridos y otras estructuras poliméricas presentes en la superficie de ciertos antígenos, así como por inmunocomplejos de IgA. La vía alternativa se ensambla con la vía clásica a nivel de C3-C9, eludiendo C1, C2 y C4, continuando con la activación de C5-C9. Se considera que es una vía que no se activa pero se halla en equilibrio en situación normal. Cuando se desestabiliza y se rompe el equilibrio se desencadena la cascada del complemento.

I.E.4. FUNCIONES DE LA VÍA DEL COMPLEMENTO

Opsonización y fagocitosis. Uno de los productos de la cascada de complemento, C3b, activa poderosamente la fagocitosis, tanto neutrófilos como macrófagos, y los hace englobar en las bacterias sobre las que han adherido los complejos antígeno-anticuerpo.

Quimiotáxis. Existen receptores de C5a en las células de neutrófilos y monocitos-macrófagos; esta potente anafilotóxina las estimula y actúa como quimiotáctico atrayendolas al lugar de activación, haciendo que un gran número de estos fagocitos migren hacia la región local del agente antigénico.

Aglutinación. Los productos de complemento cambian también la superficie de los microorganismos y los hacen adherirse entre sí, lo que fomenta su aglutinación.

Activación de los mastocitos y basófilos. Los fragmentos C3a, C4a y C5a activan a mastocitos y basófilos y los hacen liberar histamina y otras diversas sustancias hacia los líquidos locales.

Lisis. Uno de los productos más importantes de la cascada del complemento es el *complejo lítico*, combinación de muchos factores del complemento que se designa con el símbolo C5b6789 que ejerce un efecto directo por rotura de las membranas celulares de las bacterias.

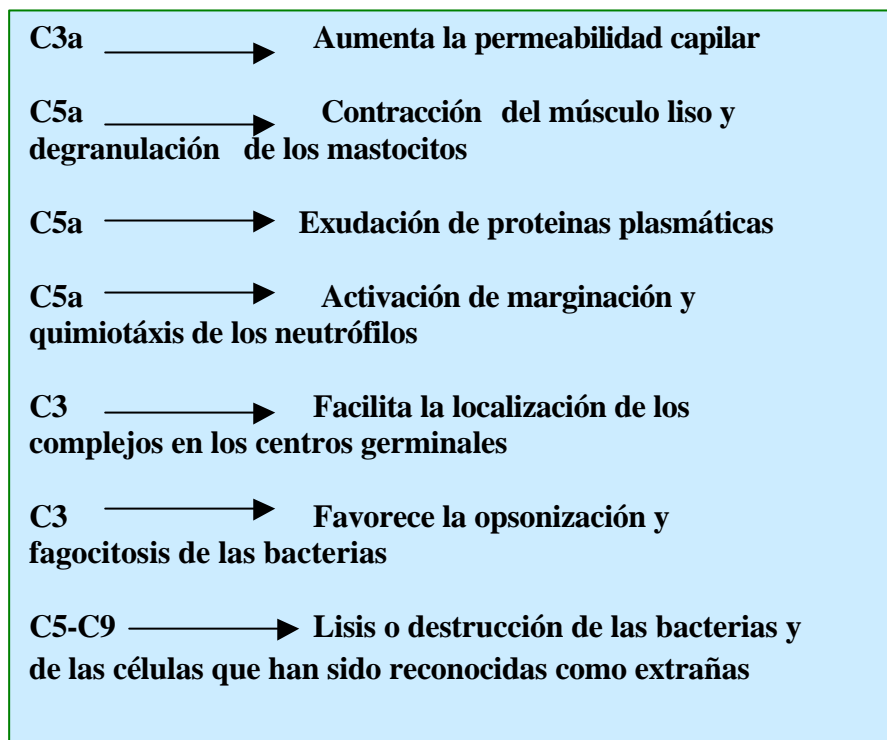


Fig.13. Resumen de acciones del complemento.

I.E.5. PAPEL DEL COMPLEMENTO EN LOS QUEMADOS

El complemento presenta una concentración en plasma de 2-3g/L de similar magnitud al fibrinógeno. De sus nueve componentes el C3 es la fracción mayor. Las proteínas del sistema del complemento (con la excepción de los componentes terminales de C6-C9) son sintetizados en los células mononucleadas por lo que los macrófagos extrahepáticos son un importante fuente local de proteínas y de complemento. Durante la activación de C3 y C5 además de la activación de la quimiotaxis y la opsonización se estimula la adherencia de los granulocitos al área de activación. La actividad total del complemento disminuye después de producirse la quemadura.

Durante las primeras seis horas existe una reducción del consumo en un 30 % del complemento. Esta reducción es paralela al descenso de fibrinógeno (Heideman, 1979). Se ha podido observar que la quemadura puede activar el sistema del complemento *in vitro* e *in vivo* tanto en animales de experimentación (Heideman, 1979) (Gelfand, 1982) como en humanos (Gelfand, 1982). Los estudios realizados en ambos casos demostraron que con quemaduras del 25% - 90% del área en ratas como en humanos se producía una activación tanto de la vía clásica como de la vía alternativa con reducciones en los títulos de C4 del 53% y de C3 en un 43% mientras que la vía alternativa podía estar reducida hasta en un 90%. Esta última depleción se asociaba con la sépsis y la neumonía. Los resultados obtenidos en ratas del 30% de superficie quemada demostraron un rápido incremento de los componentes hemolíticos del complemento (activación de C1-C9) en respuesta a la quemadura *per se* mientras que la inhibición de la vía alternativa se asociaba con la infección local y la colonización natural de bacterias. Las bacterias que podían exacerbar esta anormalidad serían el *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Candida albicans* (Bjornson, 1984). También se ha observado como los componentes del complemento C1q, C3, C4 y C5 (medidos por inmunodifusión radial) descienden sus niveles séricos después de la quemadura pero se incrementan gradualmente hasta el día 14 aunque nunca alcanzan la normalidad C1q y C3, en pacientes de un 30% de superficie corporal quemada (Sharma, 1980). En pacientes con quemaduras del 45-80% se observó una reducción de C3 durante la primera semana posteriormente se normalizó a las 3 semanas (Bjornson, 1976) Siendo la mayor reducción de C3 en los pacientes con mayor extensión de quemadura y mayor complicaciones infecciosas (Bjornson, 1981). Datos recientes en una población de 53 pacientes hasta un 45% de superficie quemada indican una activación de C3 durante 7 días post-trauma con un paralelo incremento de Ba en la vía alternativa que sugiere también una activación a este nivel (Wan, 1998).

Se observa pues resultados contradictorios difíciles de evaluar que podrían depender de los diferentes tratamientos o incluso ligados a factores sanitario-culturales.

I.E.6. RELACIÓN DEL COMPLEMENTO CON LA FAGOCITOSIS EN PACIENTES QUEMADOS

Los datos referentes a la interrelación de los componentes C3 y C4 de la vía clásica con la fagocitosis en las quemaduras severas son contradictorios. Esto es debido en parte al hecho de que en esta patología se ha descrito que existe una masiva activación de la vía alternativa (Gelfand, 1982) mientras que la inactivación de los productos de C5 mejora la migración de los macrófagos (Bianco, 1979).

Existen datos colaterales de la década de los 70 (en el lupus eritematoso) que muestran que el descenso de la quimiotáxis se correlaciona con el descenso de C4 y con las infecciones recurrentes (Alvarez, 1978). En el caso de la periodontitis persistente producida *Porphyromonas gingivalis* que evaden la respuesta inmune, se indica que las cepas muy invasivas degradan C3 de manera dosis-dependiente y que la inhibición de C3 mejora la fagocitosis (Cutler, 1993).

Otro hecho comprobado es que una función anormal de los neutrófilos se asocia a la bacteriemia en los pacientes quemados sin que exista una clara asociación entre dicha bacteriemia y los bajos niveles de C3 (Alexander, 1979). Si se sabe que la actividad opsonica del suero es dependiente de C3 (Kerr, 1983).

Estos hechos indican claramente la interconexión entre todas las vías (activación de los neutrófilos, activación de la quimiotaxis, de la fagocitosis y activación de las vías del complemento) y que si bien el primer paso de la respuesta a la quemadura es la activación del complemento, la reducción en la vía alternativa podría estar más ligada a la colonización local de la herida que a la fagocitosis (Bjornson, 1984).