

Efecto de los corticosteroides, de la quinacrina y del L-652,731 sobre la agregación experimental de los polimorfonucleares inducida por el complemento y FAP*

A. Romero, M. A. Muniain**, R. Mata, F. Pozuelo, J. J. Pérez, M. C. Rodríguez y M. D. Rodríguez

Cátedra de Patología y Clínica Médicas I
Hospital Clínico Universitario Virgen Macarena, 8.ª planta
41009 Sevilla (España)

(Recibido el 20 de mayo de 1988)

A. ROMERO, M.A. MUNIAIN, R. MATA, F. POZUELO, J.J. PEREZ, M.C. RODRIGUEZ and M.D. RODRIGUEZ. *Effect of Corticosteroids, Quinacrine and L-652,731 on Experimental Aggregation of Polymorphonuclear Induced by the Complement and FAP*. Rev. esp. Fisiol., 44 (4), 407-412, 1988.

The effects of 6-methylprednisolone sodium succinate, quinacrine and the synthetic anti-PAF compound L-652.731 were studied on the PAF and complement induced aggregation of rabbit polymorphonuclear leukocytes *in vivo*. High doses (100-250 mg/kg) of corticosteroid were able to abrogate PAF and complement induced aggregation. Quinacrine (1.25 mg/kg), and L-652.731, partially precluded complement-depending aggregation. The L-652.731 dose employed was just enough to prevent PAF induced aggregation. These results suggest that in those pathological conditions in which polymorphonuclear aggregation occurs, factors other than those derived from plasmatic complement system activation, and labouring jointly with it, may be involved.

Key words: Polymorphonuclear leukocytes, Aggregation, Plasmatic complement, Platelet activating factor.

La agregación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) es un hecho común a algunas situaciones patológicas, como el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), la pancreatitis, el cho-

que endotóxico y los traumatismos graves. Desde que se comprobó que la activación de la fracción 5a del complemento (C5a) induce agregación de los PMN tanto *in vivo* (3, 9, 15) como *in vitro* (4, 5, 10, 16), se ha sugerido que la activación del complemento provoca la agregación de los PMN y el subsiguiente secuestro de tales agregados por el lecho capilar pulmonar (6, 8). Parece también probable que la ac-

* Trabajo realizado mediante subvención de la Junta de Andalucía 07/ECB/MOM.

** A quien debe ser dirigida la correspondencia.

tivación del complemento sea responsable del síndrome de «salida de bomba», que ocurre en pacientes sometidos a circulación extracorpórea (12), y de la neutropenia transitoria que aparece en la hemodíalisis (3, 8). En estas dos últimas circunstancias, la activación del complemento es debida a las membranas de los sistemas de oxigenación y de diálisis, respectivamente. Algunos estudios experimentales, por otra parte, han demostrado una generación simultánea de factor activador de las plaquetas (FAP, 1-alquil, 2-acetil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) en reacciones biológicas mediadas por C5a y en situaciones en las que se produce éste (2), incluyendo la agregación de PMN (13, 14). Esto, y el hecho de que el FAP muestre acciones biológicas que ofrecen un paralelismo con las que provoca el C5a, han hecho pensar a algunos autores que el FAP puede ser un mediador común implicado en varias reacciones que inducen agregación de PMN (1). En otro sentido, los corticosteroides, compuestos capaces de inhibir la agregación de PMN *in vivo* e *in vitro* (10, 12, 15) estimulan la síntesis de un inhibidor de la enzima fosfolipasa A₂ (7), necesaria para la producción de FAP, ácido araquidónico y otros ácidos grasos no saturados a partir de fosfolípidos; lo que podría explicar su efecto antiagregante.

Este trabajo es un estudio preliminar en el que se trata de comprobar los efectos de los corticosteroides, de la quinacrina (inhibidora de la fosfolipasa A₂) y del L-652.731 (inhibidor del FAP) sobre la agregación de PMN inducida por complemento y FAP.

Material y Métodos

Preparación de los plasmas. — El plasma de 10 ml de sangre de conejos albinos de Nueva Zelanda, obtenida por punción de la arteria central de la oreja y anticoagulada con 1 U/ml de heparina, se diluyó al

20 % con solución salina fisiológica estéril, y se incubó, durante 30 min a 37 °C, con 0,5 mg/ml de Zymosan. Tras centrifugar para extraer las partículas de Zymosan, el plasma activado (PAZ) se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Otros plasmas fueron sometidos a una incubación adicional con 6 ó 12 mg/ml de succinato sódico de 6-metilprednisolona (SSMP) antes (PCZ) o después (PAZ+C) de la incubación con Zymosan.

Perfusión de PAZ, PCZ, PAZ+C y FAP. — Los plasmas tratados se administraron, de forma autóloga, a conejos adultos de 2,5 a 3 kg de peso, anestesiados por la inyección i.v. de 0,5 ml/kg de droperidol (2,5 mg/ml) y citrato de fentanilo (0,05 mg/ml). Los plasmas fueron perfundidos a través de la vena safena a una velocidad de 1 ml/min durante un periodo de 10 min. Antes de la perfusión y durante su transcurso, a tiempos determinados, se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena marginal de la oreja. Muestras adicionales se obtuvieron a los 5 y 15 min de finalizar la inyección de los plasmas. En 20 µl de sangre tratada en fresco con 100 µl de líquido de Türk, y teñida con 80 µl de Azul de Toluidina al 1 % se realizó un recuento de leucocitos totales y de PMN. La cifra de PMN se expresó como porcentaje de la cifra basal antes de realizar la infusión.

A otros conejos de las mismas características se les administró una dosis de 75 ng/kg de FAP sintético (β-acetil-γ-o-hexadecil, L-α-fosfatidilcolina), utilizando como vehículo solución salina fisiológica suplementada con albúmina bovina al 0,25 %. La inyección de FAP se hizo a través de un catéter situado en la aorta, y en forma de bolo durante 15 s. Las muestras de sangre (1 ml) se obtuvieron antes de la inyección de FAP y a tiempos determinados tras ella. La sangre fue anticoagulada con citrato sódico 3,2 % y 20 µl de cada muestra fueron tratados de la forma descrita para recuento celular. La

dosis de FAP utilizada fue la mínima dosis capaz de provocar la agregación máxima.

Tratamiento farmacológico. — En los experimentos en los que se utilizaron corticosteroides, se administraron 100 ó 250 mg/kg de SSMP en forma de bolo i.v., 5 min antes de comenzar la infusión de PAZ y 30 s antes de iniciar la de FAP. La quinacrina se utilizó a dosis de 1,25 mg/kg, i.v. una hora antes de la administración de PAZ. El inhibidor del FAP L-652731 se administró 15 min antes de la perfusión de PAZ o FAP; a dosis de 160 μ l de una solución 100 mM del compuesto en DMSO-H₂O.

Reactivos. — El Zymosan A, el FAP, la Quinacrina y la albúmina bovina fueron de Sigma. El SSMP es comercializado en España por Upjohn como Solu-Modérin®. La mezcla anestésica de droperidol/fentanilo es Thalamonal® (Latino). El inhibidor del FAP L-652.731 fue proporcionado por el Dr. Chabala, de Laboratorios Merck, Sharp & Dome, Department of Membrane and Arthritis Research, Rahway, New Jersey (U.S.A.), y por el Dr. Sánchez-Crespo, del Servicio de Nefrología de la Clínica de la Concepción, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Resultados

La infusión continua de PAZ provocó en los conejos una rápida desaparición de los PMN de la circulación periférica (fig. 1). La neutropenia se desarrolló sobre todo durante los 2 primeros minutos de la perfusión y se mantuvo mientras duró ésta. La finalización de la perfusión se siguió de una recuperación de las cifras de PMN hasta superar la inicial en un 40 %. El tratamiento con 250 mg/kg de SSMP, antes de la administración de PAZ, impidió la neutropenia y dosis de 100 mg/kg la retrasaron, pero no la inhibieron (figura 1).

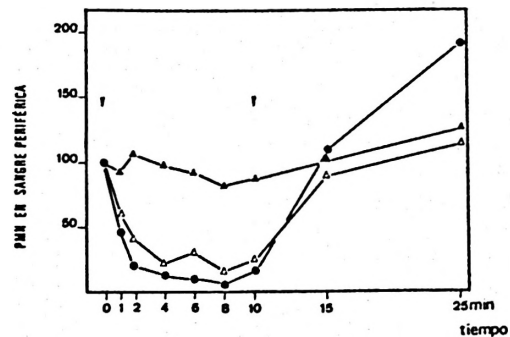


Fig. 1. Efecto del tratamiento previo del conejo con dos dosis de SSMP sobre la neutropenia inducida por el PAZ.

Las flechas indican el comienzo y el final de la perfusión de 10 ml de PAZ a una velocidad de 1 ml/min. Sin tratamiento previo (●); 100 mg/kg de SSMP (Δ); 250 mg/kg de SSMP (▲). En ésta y en las otras figuras, las gráficas representan los resultados de ensayos típicos, que fueron repetidos no menos de 10 veces. Los valores se han calculado como porcentaje de la cifra inicial de PMN.

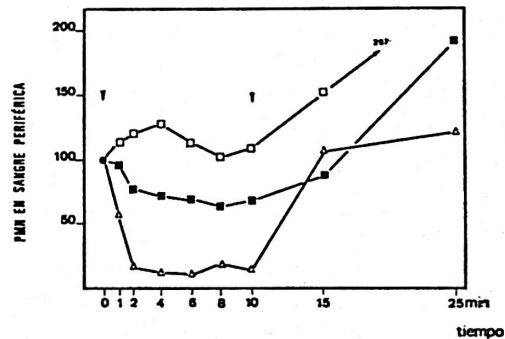


Fig. 2. Efecto de la incubación de los plasmas con SSMP, antes y después de la activación con Zymosan.

PCZ, con SSMP 6 mg/ml (■) y 12 mg/ml (□); PAZ+C, con 12 mg/ml de SSMP (Δ).

El tratamiento de los plasmas con SSMP antes de ser incubados con el Zymosan impidió de forma dosis-dependiente la neutropenia; 6 mg/ml la redujeron en un 60 %, mientras que 12 mg/ml la impidieron en su totalidad y determinaron una intensa neutrofilia al finalizar la perfusión. Por el contrario, el tratamiento del plasma

con posterioridad a su incubación con Zymosan no tuvo efecto alguno sobre la neutropenia (fig. 2).

El tratamiento de los animales con dosis máximas de quinacrina (1,25 mg/kg) una hora antes de la perfusión del PAZ determinó una reducción aproximadamente del 30 % en la neutropenia (fig. 3), reducción que fue similar a la producida por el tratamiento previo, 15 min antes, con el inhibidor del FAP L-652.731 (fig. 3).

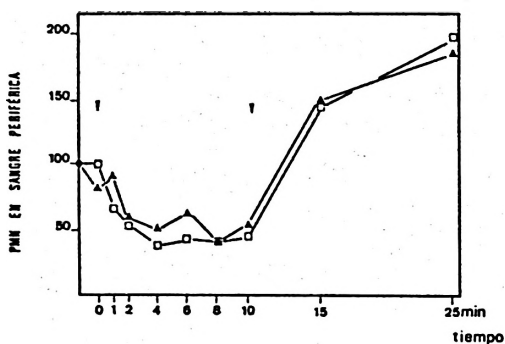


Fig. 3. Efecto del tratamiento previo de los conejos con quinacrina y L-652.731 sobre la neutropenia inducida por PAZ.

Quinacrina, 1,25 mg/kg (□); L-652.731, 160 µl 100 mM/kg (▲).

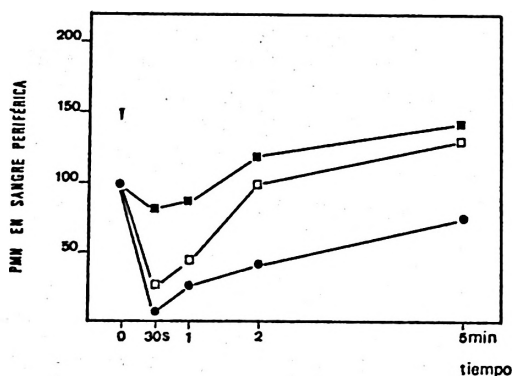


Fig. 4. Efecto del tratamiento previo del conejo con dos dosis de SSMP sobre la neutropenia inducida por el FAP.

La flecha indica el momento de la inyección de 75 ng/kg de FAP. Sin tratamiento previo (●); SSMP, 100 mg/kg (□); SSMP, 250 mg/kg (■).

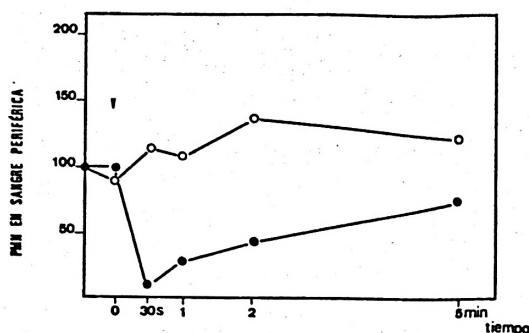


Fig. 5. Efecto del tratamiento previo del conejo con L-652.731 sobre la neutropenia inducida por el FAP.

Sin tratamiento previo (●); L-652.731, 160 µl 100 mM/kg (○).

La inyección intraarterial de un bolo de FAP (75 ng/kg) provocó una neutropenia de más del 90 % en 30 s, de muy lenta recuperación, ya que se mantuvo por debajo del 50 % de la cifra basal al menos durante los 2 min posteriores a la inyección. El SSMP, 100 y 250 mg/kg, impidió de forma dosis-dependiente la neutropenia (fig. 4). La dosis de L-652.731 utilizada inhibió completamente la neutropenia inducida por FAP (fig. 5).

Como control interno de los ensayos, algunos animales se perfundieron con las soluciones solventes de los principios activos administrados y con SSMP. La especificidad de los resultados se comprobó tras observar que la administración de solución salina fisiológica con albúmina bovina al 0,25 %: DMSO, plasma autólogo y SSMP (250 mg/kg), en las condiciones correspondientes a los ensayos respectivos no produjeron variaciones apreciables de las cifras de PMN (resultados no mostrados).

Discusión

El método de valoración de la agregación, una aplicación del utilizado por CRADDOCK *et al.* (3), no mide directa-

mente la agregación de los PMN, ni confirma el estasis pulmonar de leucocitos mediante un estudio histológico del pulmón. Sin embargo, puede admitirse que la evaluación de la desaparición de los PMN de la circulación periférica es un buen método para comprobar la existencia de agregados circulantes de estas células. De hecho, otros autores han diseñado un método para la cuantificación clínica experimental de la leucostasis en el shock que se basa en la desaparición de PMN marcados con ^{111}In de la circulación periférica (17).

Los resultados con PCZ y PAZ+C concuerdan con los de otros estudios (15) en los que se concluye que los corticosteroides inhiben la generación de factores agregantes durante la activación del sistema del complemento plasmático. Esto se demuestra por el hecho de que la perfusión de plasmas a los que el corticosteroide se añadió tras la incubación con el Zymosan, induce neutropenia, mientras que los plasmas en los que la droga está presente antes de la incubación, no. Nuestros datos muestran que el SSMP impiden la neutropenia incluso cuando los factores agregantes ya han sido formados; sin embargo, esto sólo se observa a muy altas dosis; en nuestros experimentos se han utilizado 250 mg/kg de SSMP para abrogar completamente la neutropenia inducida por el PAZ, mientras que dosis tan altas como de 100 mg/kg retrasaron el tiempo de aparición del valor máximo de neutropenia, pero no la impedían.

Se ha usado quinacrina en un intento de inhibir la activación de la enzima fosfolipasa A_2 , enzima inicial en el metabolismo tanto del ácido araquidónico como del FAP. La elección de la dosis, ha sido aquella que no comprometió la supervivencia del animal de experimentación (11), esta dosis ha sido suficiente para inhibir la vasopermeabilidad dependiente del FAP liberado por la administración de inmunocomplejos en el ratón. La perfusión de PAZ a un animal tratado con quinacrina provocó una neutropenia menor en un

30 % a la provocada en uno no tratado. El L-652.731, utilizado a dosis que impiden por completo la máxima neutropenia inducible experimentalmente por FAP provoca una disminución de la neutropenia dependiente de PAZ similar a la obtenida con la quinacrina. Los resultados sugieren que, efectivamente, algún o algunos de los metabolitos de las vías catalizadas por la enzima fosfolipasa A_2 participan en la agregación de PMN dependiente de C5a y que el FAP es uno de ellos. Parece lícito pensar que en nuestro ensayo de perfusión de PAZ no se puede inducir, si existe, una generación de FAP en cantidad igual o mayor a la que se ha administrado en los experimentos tendientes a demostrar la actividad del FAP y de su inhibidor; por ello, pensamos que la dosis de L-652.731 administrada puede inhibir la totalidad del FAP generado durante la perfusión de PAZ. Por todo ello, el FAP no puede ser el único mediador en la agregación de PMN inducida por C5a.

A pesar de que los corticosteroides determinan la síntesis de un inhibidor de la enzima fosfolipasa A_2 , la vía por la cual impiden la agregación de PMN no está clara. De hecho, los efectos antiagregantes de estos compuestos no pueden ser explicados exclusivamente por la inhibición de esta enzima, ya que también impiden la agregación de PMN dependiente de FAP. En este sentido, el SSMP impide la agregación de PMN provocada *in vitro* por el péptido quimiotáctico N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (datos no publicados). Es improbable por lo tanto que los corticosteroides ejerzan su acción antiagregante mediante competición con receptores de membrana, ya que son capaces de impedir la agregación determinada por compuestos muy diferentes. Más bien deben interferir con los mecanismos celulares que permiten la agregación.

Es clásica la utilización de corticosteroides en situaciones patológicas que provoquen SDRA, en cuya patogenia está directamente implicada la agregación de

PMN. Esta práctica encuentra justificación escasa en los datos de este trabajo, ya que las dosis que utilizan son enormes en comparación con las que se administran en humanos. Por otra parte, es interesante valorar la posibilidad de incidir terapéuticamente sobre otro factor participante en la fisiopatología de la agregación de los PMN, en circunstancias parecidas a las del SDRA, y cuya existencia creemos demostrar en este trabajo.

Resumen

Se estudia en conejos los efectos del succinato sódico de 6-metilprednisolona, la quinacrina y el anti-FAP, L-652.731, sobre la agregación *in vivo* de los leucocitos polimorfonucleares inducida por complemento y el factor activador de las plaquetas (FAP). El corticosteroide, (100 a 250 mg/kg) inhibe la agregación dependiente tanto de complemento como de FAP. La quinacrina (1,25 mg/kg) impide parcialmente la agregación inducida por complemento, de forma parecida a como lo hizo el L-652.731, compuesto que fue administrado a dosis igual a la que impide totalmente la agregación provocada por una dosis alta de FAP. Los resultados parecen indicar que, en la fisiopatología de la agregación de los polimorfonucleares, pueden estar comprometidos factores distintos a la activación de la cadena del complemento plasmático, y que actúan en un mismo sentido.

Palabras clave: Leucocitos polimorfonucleares, Agregación, Complemento plasmático, Factor activador de las plaquetas.

Bibliografía

1. Camussi, G., Bussolino, F., Tetta, C. *et al.* *Immunology*, 48, 625-633, 1983.
2. Camussi, G., Tetta, C., Bussolino, F. *et al.* *Int. Arch. Allerg. appl. Immunol.*, 64, 25-36, 1981.
3. Craddock, P.R., Fehr, J., Brigham, K.L. *et al.* *N. Eng. J. Med.*, 296, 769-774, 1977.
4. Craddock, P.R., Hammerschmidt, D.E., Moldow C.F. *et al.* *Sem. Hematol.*, 16, 140-147, 1979.
5. Craddock, P.R., Hammerschmidt, D.E., White, J.G. *et al.* *J. Clin. Invest.*, 60, 260-264, 1977.
6. Chenoweth, D.E., Cooper, S.W., Hugli, T.E. *et al.* *N. Eng. J. Med.* 304, 497-502, 1981.
7. Flower, R.J. y Blackwell, G.: *Nature*, 278, 456-459, 1979.
8. Gómez-Fernández, P., Sanz, A., Conesa, J. *et al.* *Med. Clin.*, 82, 705-708, 1984.
9. Hammerschmidt, D.E., Harris, P.D., Wayland, H. *et al.* *Am. J. Pathol.*, 102, 146-150, 1981.
10. Hammerschmidt, D.E., White, J.G., Craddock, P.R. *et al.* *J. Clin. Invest.*, 63, 798-803, 1979.
11. Iñarrea, P., Alonso, F. y Sánchez-Crespo, M.: *Immunophar.*, 6, 7-14, 1983.
12. Jacob, H.S.: *Q. J. Med. New series* 52, 289-296, 1983.
13. McManus, L. M., Hanahan, D.J., Demopoulos, C.A. *et al.* *J. Immunol.*, 124, 2.919-2.924, 1980.
14. McManus, L.M., Pinckard, R.N., Fitzpatrick, F.A. *et al.* *Lab. Invest.*, 45, 303-307, 1981.
15. O'Flaherty, J.T., Craddock, P.R. y Jacob, H.S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154, 206-209, 1977.
16. O'Flaherty, J.T., Kreutzer, D.L. y Ward, P.A.: *J. Immunol.*, 119, 232-239, 1977.
17. Redl, H., Schalg, G. y Hammerschmidt, D.E.: *Acta Chir. Scand.*, 150, 113-117, 1984.