

Tesis de Posgrado

Acción de serinoproteasas leucocitarias aisladas de leucemias agudas sobre antitrombina III humana purificada

Sassetti, Beatriz

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sassetti, Beatriz. (1983). Acción de serinoproteasas leucocitarias aisladas de leucemias agudas sobre antitrombina III humana purificada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1797_Sassetti.pdf

Cita tipo Chicago:

Sassetti, Beatriz. "Acción de serinoproteasas leucocitarias aisladas de leucemias agudas sobre antitrombina III humana purificada". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1797_Sassetti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1797

Ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCION DE SERINOPROTEASAS LEUCOCITARIAS
AISLADAS DE LEUCEMIAS AGUDAS SOBRE
ANTITROMBINA III HUMANA PURIFICADA

BEATRIZ SASSETTI

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1983 -

1797

Ej. 2

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Miguel Castagnino, Consejero de Estudios, por su confianza y estímulo constantes que me brindaron la posibilidad de realizar este trabajo.

A la Dra. Lucía Clelia Kordich de Drlje, Directora de esta Tesis, por ser fundamentalmente mi amiga y una maestra generosa que en todo momento supo regalarme su valioso apoyo científico y crítico con afecto y gentileza.

A mis compañeras de laboratorio Lic. Olga Lago de Rajcovich, Lic. Gabriela Elena Bergonzelli de Herrera y Lic. Margarita Kupfermenc, por su ayuda constante y por su amistad.

A todos mis amigos y compañeros de la Cátedra de Análisis Biológicos y a las numerosas personas amigas que de una u otra manera han colaborado para el logro de esta tarea.

Finalmente, muy especialmente a mi madre, quien supo apoyarme en todo momento con su gran afecto y amistad, sin los cuales hubiese sido muy difícil recorrer este camino.

ABREVIATURAS

α_1 -AQ	α_1 -antiquimotripsina.
α_1 -AT	: α_1 -antitripsina.
α_2 -M	: α_2 -macroglobulina.
AMPc	: adenosina monofosfato cíclico.
Anti-X _a	: antifactor X activado.
ATIII	antitrombina III.
ATIIIb	antitrombina III biológica.
ATIIIi	antitrombina III inmunológica.
ATIIIib	: antitrombina III inmunológica bidimensional.
C.I.D.	coagulación intravascular diseminada.
Cof.Hep.:	cofactor de la heparina.
C ₁ (q,r,s)	: complemento, factor 1.
C ₃	: complemento, factor 3.
C ₅	: complemento, factor 5.
C ₃ PA	proactivador de C ₃ .
DFP	diisopropilfluorofosfato.
E.P.	elastasa pancreática.
I	factor I, Fibrinógeno.
II	factor II, Protrombina.
IIa	factor II activado, trombina.
V	factor V, lábil.
VII	factor VII, proconvertina.
VIIa	factor VII activado.
VIII	factor VIII, globulina antihemofílica.
VIIIIRAg	: factor VIII relacionado al antígeno.
IX	factor IX, P.T.C.
IXa	factor IX activado.
X	factor X, Stuart Power.
Xa	factor X activado.
XI	factor XI, P.T.A.
XIa	factor XI activado.

XII	factor XII, Hageman.
XIIa	factor XII activado.
XII _f	factor XII fragmento.
XIII	factor XIII, estabilizante de la fibrina.
XIIIa	factor XIII activado.
GMPC	guanosina monofosfato cíclico.
HETE	ác.12-L-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenóico.
IgA	inmunoglobulina A.
IgE	inmunoglobulina E.
IgG	inmunoglobulina G.
IRG	índice de recambio granulocítico.
L.A.	leucemia aguda.
LAG	leucemia aguda granulocítica.
LAL	leucemia aguda linfoblástica.
LAM	leucemia aguda mieloblástica.
LAMMo	leucemia aguda mielomonocítica.
LAMo	leucemia aguda monocítica.
LAP	leucemia aguda promielocítica.
LMC	leucemia mieloide crónica.
LN	leucocitos normales.
M.O.	médula ósea.
NBT	nitroazul de tetrazolio.
O ⁻	anión superóxido.
PDF	productos de degradación de la fibrina.
PG	prostaglandinas.
PI	punto isoeléctrico.
PLGb	plasminógeno biológico.
PLGi	plasminógeno inmunológico.
PM	peso molecular.
PMN	polimorfonucleares, leucocitos neutrófilos.
P.N.	plasma humano normal.
RGC	reserva de granulocitos circulante.

RGM	reserva de granulocitos marginal.
S	septicemia, sepsis.
SDS	docecil sulfato de sodio.
S.F.	solución fisiológica, NaCl 0.154 M.
TQ	tiempo de Protrombina de Quick.
TT	tiempo de trombina.
TTPC	tiempo de tromboplastina parcial con caolín.
TX	tromboxanos.
\bar{X}	valor promedio.

INDICE

INTRODUCCION

I. <u>LEUCOCITOS GRANULOCITOS</u>	1
1. Esquema de producción y características.....	1
2. Diferenciaciones funcionales secuenciales de los granulocitos humanos.....	3
3. Estructura y composición de los gránulos de los PMN.....	5
4. Biología celular de los PMN. Función. Mecanismos de acción.....	12
4.1 Respuesta del PMN a materiales extraños.....	14
A) Quemotaxis.....	14
B) Receptores para opsoninas.....	17
4.2 Respuestas precoces en la estimulación del PMN..	18
A) Interacción receptor-ligando.....	18
B) Metabolismo oxidativo.....	19
C) Interacción de especies oxigenadas con α_1 -AT..	19
D) Flujo de iones.....	22
E) Cambios en los niveles de los nucleótidos cí- clicos.....	23
F) Agregación.....	24
4.3 Estructuras citoesqueléticas.....	25
4.4 Degranulación.....	27
A) Estimulación no fagocítica del metabolismo o- xidativo del PMN.....	29
B) Relación entre la degranulación y el aumento del metabolismo oxidativo en el PMN.....	30
4.5 Liberación de PG y TX.....	32
4.6 Mecanismo bactericida.....	34
Extrusión de enzimas de gránulos de PMN en inju- ria tisular.....	34
A) Muerte celular.....	35

B) Perforación hacia adentro.....	35
C) Regurgitación durante la alimentación.....	35
D) Endocitosis reversa o fagocitosis frustrada...	36
II: <u>BIOQUIMICA DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS</u>	38
1. Inhibidores naturales (fisiológicos) de proteasas neutras leucocitarias (serinoproteasas).....	42
2. Inhibidores sintéticos de serinoproteasas.....	45
III. <u>ROL GENERAL DE LAS PROTEASAS NEUTRAS LEUCOCITA-</u> <u>RIAS EN LOS PROCESOS INFLAMATORIOS</u>	49
1. Acción sobre el sistema de Quininas.....	49
2. Acción sobre el Complemento.....	49
3. Estimulación de linfocitos ("in vitro").....	50
4. Via fibrinolítica leucocitaria.....	50
5. Rol patogénico de las proteasas granulocíticas en algunos estados de enfermedad.....	53
A) Artritis.....	54
B) Enfisema pulmonar.....	54
C) Degradación de inmunoglobulinas y formación de amiloide.....	55
6. Activación de la coagulación sanguínea.....	55
7. Enzimas leucocitarias y L.A.....	59
IV. <u>ANTITROMBINA III</u>	71
<u>OBJETIVOS</u>	87
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	88
Obtención de la muestra.....	88
Tiempo de Protrombina de Quick.....	88
Tiempo de tromboplastina parcial con caolín.....	88
Tiempo de Trombina.....	89

Dosaje de Fibrinógeno.....	89
Dosaje de Factor II.....	89
Dosaje de Factor V.....	89
Dosaje de Factor VII-X.....	90
Dosaje de Factor VIII.....	90
Dosaje de Factor IX.....	90
Dosaje de Factor XI.....	91
Dosaje de Factor XII.....	91
Dosaje de Factor XIII.....	91
Dosaje de Plasminógeno.....	92
Extracto salino fenolado de cerebro humano (tromboplastina).....	92
Cefalina.....	93
Tiempo de plasma recalcificado.....	94
Placas de Fibrina.....	94
Productos de degradación de la Fibrina (PDF).....	94
Lisado de leucocitos.....	95
Determinación de proteínas.....	96
Determinación de proteínas por IDR.....	96
ATIII por inmunoelectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado.....	97
ATIII actividad por sistema TT.....	98
Cofactor de la Heparina (ATIII).....	99
Dosaje de calicreínas plasmáticas.....	100
Dosaje de mucopolisacáridos ácidos.....	102
Obtención de α -trombina a partir de plasma humano.....	102
Purificación de Fibrinógeno a partir de plasma humano.....	104
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	105
Filtración del lisado de leucocitos por Sephadex G-200.....	106
Cromatografía de intercambio iónico (catiónico).....	106
Filtración por Sephadex G-150.....	107

Incubados de plasma normal con α -Manosidasa.....	108
Incubados de ATIII con α -Manosidasa.....	108
Determinación de ácido siálico.....	109
Actividad de esterases (TAME).....	110
Obtención de ATIII a partir de plasma humano.....	111
Preparación de ATIII.....	112
Purificación de Protrombina humana.....	114
<u>REACTIVOS</u>	116
<u>RESULTADOS</u>	119
I. Acción de E.P. sobre los sistemas plasmáticos de coagulación y fibrinólisis.....	119
II. Acción de los lisados leucocitarios crudos sobre los sistemas de coagulación y fibrinólisis.....	119
III. Acción de enzimas aisladas de lisados leucocita- rios, por cromatografía, sobre los factores de coa- gulación y la ATIII.....	124
IV. Acción inhibitoria de la aprotinina (Trasylol) so- bre los lisados leucocitarios.....	134
V. Acción de enzimas leucocitarias sobre calicreínas.	143
VI. Acción de α -Manosidasa sobre el sistema de coa- gulación y la ATIII.....	143
VII. Acción de enzimas leucocitarias sobre la ATIII..	143
VIII. Purificación de ATIII a partir de plasma normal. Interacción con enzimas leucocitarias.....	155
IX. Acción sobre el Fibrinógeno humano purificado....	171
X. Acción sobre la Protrombina humana purificada....	171
<u>DISCUSION</u>	176
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	191

INTRODUCCION

I. LEUCOCITOS GRANULOCITOS.

1. ESQUEMA DE PRODUCCION Y CARACTERISTICAS.

La secuencia morfológica de maduración de los granulocitos humanos es la siguiente: (Wintrobe M., 1969)

Médula Osea (M.O.)	Blastos	{ Mieloblasto Promielocito Mielocito inmaduro Mielocito maduro
Sangre Periférica (S.P.)		{ Metamielocito (algunos) Granulocito maduro, diferenciado en: Neutrófilo, Eosinófilo y Basófilo.

Los granulocitos maduros neutrófilos o polimorfonucleares (PMN), son normalmente los más numerosos y los que nos interesan específicamente en este trabajo.

Origen del neutrófilo, distribución y destino en animales normales:

Los neutrófilos entran al pool mitótico, en la M.O., que es un pool conceptual, más que un espacio físico en la misma. Cuando maduran, migran hacia un pool medular de reserva de neutrófilos relativamente maduros que son fácilmente liberables a la circulación.

Los neutrófilos migran hacia la circulación, regularmente en condiciones normales, para reemplazar aquellos que viven en ella, o irregularmente como respuesta a infecciones.

Estas funciones de la M.O. pueden estar bajo control humoral en ciertas circunstancias. Los macrófagos alveolares producen un factor "estimulante de colonias" que estimula a las células de la M.O. a proliferar "in vitro". El egreso de los neutrófilos de la M.O. puede ser estimulado por el componente C_{3e} del complemento y por otros factores, producidos por macrófagos pulmonares-leucocitos.

Los neutrófilos entran a la sangre periférica y son inmediatamente distribuidos entre el pool marginal y el pool circulante. Juntos, componen el pool total de los neutrófilos sanguíneos.

Se ha demostrado que uno de los mayores pool marginales de neutrófilos está en el pulmón. (Cohen A.B., Rossi M., 1983).

Después de entrar a la circulación, los granulocitos tienen una vida media promedio de 3 a 7 horas, dependiendo de la especie estudiada..

La cinética del granulocito estudiada con ^{32}P ($DF^{32}P$) permite calcular las dos "reservas" de granulocitos en la sangre: marginal (RGM) y circulante (RGC). La magnitud de ambas es diferente: RGC: 31×10^7 células/kg de peso corporal. (rango = 11-46); RGM: 39×10^7 células/kg de peso corporal. (rango = 0-85).

La reserva total está calculada como : 70×10^7 células/kg de peso corporal. (rango = 14-160).

Los granulocitos que cruzan la barrera endotelial entre la sangre circulante y los tejidos no reingresan a la circulación o por lo menos no lo hacen en un número importante.

La cantidad de granulocitos que circulan por día a través de la sangre, o índice de recambio granulocítico (IRG) es: 163×10^7 células/kg de peso corporal.

Cuando la cinética se mantiene constante, el IRG equivale al índice de producción de granulocitos maduros en la

M.O. El tiempo de recambio de las reservas mitóticas, de maduración y de depósito en la M.O., sería aproximadamente 159-274 horas (6.6-11.4 días). La sobrevivencia de los granulocitos, calculada en la etapa del mielocito hasta el momento en que los neutrófilos sanguíneos maduros entran en los tejidos, se estima inferior a 6.5-11.0 días.

En pacientes con leucocitosis neutrófila, los granulocitos salen de la circulación con una frecuencia exponencial simple y una vida media de 6 a 19 horas contra la normal de 6.7 horas. Las células de enfermos con Leucemia mieloiide crónica (LMC) desaparecen de la sangre más lentamente: de 26 a 89 horas.

2. DIFERENCIACIONES FUNCIONALES SECUENCIALES DE LOS GRANULOCITOS HUMANOS.

La secuencia de maduración de los granulocitos ha sido definida tradicionalmente por la morfología observada al microscopio óptico bajo tinciones diferenciales. El microscopio electrónico ha refinado esta técnica, aportando datos estructurales antes invisibles.

Más recientemente, los métodos inmunológicos han caracterizado la aparición secuencial de marcadores de superficie en el desarrollo y maduración del neutrófilo. Estos estudios se llevaron a cabo mediante el uso de células leucémicas como pruebas experimentales. (Glasser L., 1983). Se observaron los procesos de fagocitosis, actividad bactericida, locomoción al azar y quimotaxis. Estas propiedades funcionales se correlacionaron con los receptores Fc y el test de reducción del colorante azulnitro de tetrazolio (NBT, función de la respiración celular) por las células estimuladas.

Las células leucémicas han sido empleadas en varias

oportunidades para ensayos funcionales por la facilidad de obtener un gran número de leucocitos con un pequeño volumen de sangre.

La fagocitosis es la función mejor expresada del granulocito leucémico inmaduro. Los blastos leucémicos muestran un espectro de acción fagocitaria menor que los blastos normales. En varios casos, su grado de actividad fagocitaria compite con el del PMN normal. La diferencia en la actividad funcional entre un blasto normal y leucémico está explicada por la asincronía citoplasmática, hecho que es útil para estudiar la secuencia de propiedades funcionales.

La acción bactericida es adquirida después de la fagocitosis. Los neutrófilos utilizan varios mecanismos para matar microbios, uno de ellos es dependiente del oxígeno. La muerte del *Staphilococcus aureus* requiere mieloperoxidasa, un halogenuro y la generación de superóxido y peróxido de hidrógeno. Aunque la mieloperoxidasa está presente en células leucémicas inmaduras, la actividad bactericida está deprimida y se correlaciona con la actividad de reducción del NBT. En el cultivo, varios estratos de células leucémicas muestran fagocitosis pero son incapaces de generar la actividad respiratoria, luego la prueba de reducción del NBT es útil como parámetro de evaluación de la actividad bactericida oxidasa dependiente.

Otros estudios mostraron que a medida que el granulocito madura, la célula se vuelve más deformable, se adhiere a ciertas superficies, exhibe formación de pseudópodos activos, motilidad rápida y fagocitosis ávida. Actualmente se piensa que esas funciones son adquiridas consecutivamente más que en conjunto y definen la secuencia temporal de la maduración funcional. Sin embargo, la adquisición de esas funciones durante la maduración no es paralela a la secuencia biológica de los hechos que se producen en el neutrófi-

lo maduro por los mecanismos de defensa contra el huésped.

Durante la inflamación, el neutrófilo puede primero buscar, luego ingerir y finalmente destruir a los microorganismos. La fagocitosis es una función primitiva expresada tempranamente en la diferenciación y la quimotaxis representa una etapa terminal de diferenciación funcional. Se postula que la secuencia de diferenciación funcional es: Fagocitosis----►muerte microbiana---►locomoción al azar---►quimotaxis.

La serie de eventos descrita para el neutrófilo no es única. Los monocitos humanos parecen tener una historia de desarrollo semejante. (Prydz H., et al., 1978).

3. ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LOS GRANULOS DE LOS PMN.

Hace varios años que se estudia a los leucocitos humanos desde el punto de vista de la actividad proteolítica a pH neutro, de las enzimas ubicadas en sus gránulos. (Opie E.L., 1905).

Los gránulos de los neutrófilos contienen una gran variedad de agentes que participan en la digestión de los microorganismos invasores; durante la ingestión y degranulación, esos agentes también se liberan extracelularmente. El rol fisiológico de esos constituyentes granulares está relacionado con la destrucción de los microorganismos. La injuria extracelular que ocurre a veces, puede representar una falla de la función protectora del importante sistema inhibidor de proteasas.

En las etapas subsiguientes de la maduración de los PMN humanos, se forman dos tipos diferentes de gránulos citoplasmáticos. Los gránulos azurófilos se forman en los promielocitos. Se identifican por su contenido en peroxidasas más que por su ultraestructura, la cual no es uniforme. La tin-

ción para peroxidasas muestra que en el promielocito, el retículo endoplasmático participa en la síntesis de esta enzima característica, que es detectable en todos los gránulos formados. La citoquímica sugiere además que los gránulos azurófilos, contienen también hidrolasas lisosomales. Los gránulos específicos se forman en los mielocitos; son peroxidasa negativos, como lo son el sistema del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, en esta etapa de maduración del PMN. La composición bioquímica de los gránulos azurófilos y específicos de los PMN humanos se resume en la Tabla 1.

Los gránulos azurófilos contienen elementos bactericidas y varias enzimas digestivas que actúan a pH ácidos y neutros. La presencia de hidrolasas lisosomales es una característica de esas organelas. Sin embargo, se ha subrayado la importancia de las serinoproteasas neutras como constituyentes mayores de los gránulos azurófilos en comparación con las mieloperoxidasas y las lisozimas.

En contraste con los azurófilos, los gránulos específicos no están totalmente caracterizados aún. Sus constituyentes conocidos son lisozima, lactoferrina, metaloproteasas, que actúan sobre colágeno, y una proteína que se une a la vitamina B₁₂.

Se propone la existencia de dos subpoblaciones de gránulos azurófilos ya que pueden producirse diferentes composiciones bioquímicas a distintos tiempos en la etapa del promielocito.

Con respecto a la destrucción tisular observada en las reacciones inflamatorias, las sustancias granulares más importantes son las proteasas.

Hay cuatro proteasas de lisosomas de PMN bien definidas, no son las únicas actividades proteásicas, pero probablemente representan al ataque lisosomal sobre las estructuras

CONSTITUYENTE	GRANULOS AZUROFILOS	GRAN.ESPECIFICOS
Hidrolasas Acidas	β -glicerofosfatasa N-acetil- β -glucosaminidasa β -glucuronidasa α -manosidasa Catepsina D Catepsina B α -fucosidasa α -galactosidasa β -galactosidasa α -glucosidasa N-acetil- β -galactosaminidasa etc.	NINGUNA
Proteasas Neutras	Elastasa Catepsina G Proteasa 3	Colagenasa Metaloproteasa colagenoproteo- lítica (2)
Enzimas Microbicidas	Mieloperoxidasa Lisozima	Lisozima
Otras	Proteínas catiónicas Dextranasa α -amilasa Fosfatasa ácida Aminopeptidasa Laminaranasa	Lactoferrina Proteína unida a vitamina B ₁₂

TABLA 1: Constituyentes enzimáticos de gránulos azurófilos y específicos.

(Baggiolini M.et al.,1978; Smolen J.E.,et al.,1978).

extracelulares. Son:

1-. Colagenasa: esta metaloenzima, localizada en los gránulos específicos, tiene un peso molecular de 70.000 a 76.000 Dalton; rompe al colágeno nativo solubilizado en fragmentos TC^a y TC^b, pero no puede hidrolizar las fibrillas de colágeno sin la participación de una proteasa neutra adicional. Prefiere el colágeno tipo I que predomina en huesos y tendones.

Esta enzima neutra es inhibida, así como otras metaloproteasas, por EDTA, cisteína y α_2 -Macroglobulina (α_2 -M) y α_1 -Antitripsina (α_1 -AT) séricas. No es inhibida por la fracción citosólica de PMN. La enzima puede hidrolizar uniones peptídicas diferentes de las del colágeno, ya que la inhibición de la actividad de colagenasa por α_2 -M puede ser efectuada sólo después que el inhibidor actúa como sustrato para la colagenasa, y se produce la ruptura proteolítica como parte del mecanismo de formación del complejo enzima-inhibidor.

2-. Elastasa: es una proteína catiónica; junto con la colagenasa, constituye el 5% del peso seco del PMN y fue la primera de las proteasas en ser caracterizada. Se encuentra en los gránulos azurófilos en los neutrófilos maduros. Las divisiones mitóticas cesan después de la etapa del mielocito y la maduración posterior de la célula es acompañada por la disminución en el número de las organelas celulares esenciales para la síntesis de proteínas. La cromatina nuclear se vuelve gruesa y cerrada, el nucleolo desaparece y hay una gran reducción de ribosomas libres y de retículo endoplasmático rugoso. Esto sugiere que la elastasa del neutrófilo maduro se sintetiza durante las etapas tempranas de la granulopoesis. (Louky S.A., Mc Carren J., 1983).

Sin embargo, más del 60% de los neutrófilos maduros aislados de sangre periférica retienen la capacidad de sin-

tetizar RNA y otras proteínas, y se supone que el neutrófilo circulante es capaz de producir la síntesis de elastasa.

La enzima tiene un peso molecular cercano a 34.000 Dalton. (Baugh R.J., et al., 1976).

Hidroliza los sustratos típicos de la elastasa pancreática y una variedad de preparaciones de elastina de tendones, pulmón, membrana basal, etc.

Tiene una amplia especificidad de sustrato: puede atacar colágeno insoluble, actuando en conjunto con la colagenasa específica. Las paredes celulares bacterianas y los proteoglicanos de cartílago pueden ser digeridos por elastasa purificada. La enzima provoca lesiones vasculares cuando se inyecta "in vivo" y digiere arterias elásticas "in vitro".

Es inhibida efectivamente por α_1 -AT y α_2 -M y el citosol de PMN contiene un potente inhibidor de la misma. La elastasa es inhibida también por algunos compuestos de clorometil cetona.

Ambas, colagenasa y elastasa son secretadas en los medios de incubación de PMN expuestos a complejos inmunes.

3-. Catepsina G; es una proteasa neutra semejante a la quimotripsina, de peso molecular de 32.000 Dalton y es inmunológicamente diferente de la elastasa de PMN. (Feinstein G., et al., 1975).

Su especificidad de sustrato es similar a la de la quimotripsina pancreática; sin embargo hidroliza rápidamente sustratos artificiales de elastasa. Puede ser inhibida por α_1 -AT y citosol de PMN. Hidroliza los proteoglicanos de los cartílagos y ataca al colágeno insoluble. Se encuentra en los gránulos azurófilos.

4-. Catepsina D: esta actividad enzimática está presente en los lisosomas y ha sido parcialmente purificada en los PMN. Su localización en los PMN no ha sido definida aún.

(Gránulos azurófilos vs gránulos específicos).

Esta enzima actúa a un pH óptimo de 3.0 a 3.5 contra la hemoglobina desnaturalizada, y a pH 5.0 contra los proteoglucanos del cartílago.

Tiene un peso molecular de 42.000 Dalton en leucocitos y otros tejidos.

La utilización de un anticuerpo monoespecífico permitió su localización citoquímica en los lisosomas de restos celulares y también en los espacios extracelulares luego de su secreción. Sin embargo su rol extracelular no está bien definido. Su mayor acción es la degradación intracelular de proteínas autólogas y heterólogas. Puede romper los leucoquininógenos que están presentes en exudados inflamatorios y generar leucoquinas farmacológicamente activas.

En conclusión, las proteasas de PMN son capaces de degradar los dos mayores componentes del cartílago de la articulación: colágeno y proteoglucanos.

El primer componente es hidrolizado por colagenasa, el último por Catepsina D y ambos por elastasa y Catepsina G.

Las proteasas neutras pueden también contribuir a las reacciones inflamatorias por generación de factores quimotácticos de C_5 y liberación de materiales semejantes a quininas de quininógenos plasmáticos.

De estas cuatro enzimas, la elastasa es probablemente la mayor responsable del daño tisular, porque tiene una amplia especificidad de sustrato y por su abundancia en los PMN humanos. (Starkey P.M., et al., 1976).

La elastasa de los neutrófilos ha sido también purificada de extractos de fracciones de gránulos citoplasmáticos de células humanas de LMC. Se supone que está compuesta por tres isoenzimas que se diferencian en su contenido en amidas o hidratos de carbono. La composición de aminoácidos es virtualmente idéntica para las tres isoenzimas que también

muestran identidad inmunológica. (Olsson I., et al., 1978).

Por otro lado, la enzima leucocitaria símil a quimotripsina muestra las siguientes características en su acción microbicida: pH óptimo neutro, estable al calor, fuerza iónica óptima baja, inhibe el consumo de oxígeno, la síntesis de proteínas, DNA, RNA, etc. También posee un efecto citotóxico sobre los tumores celulares de los mamíferos. Este efecto es resistente al calor, depende de la fuerza iónica y es inhibido por heparín sulfato.

A pesar de la considerable atención que se ha prestado al rol de las proteasas neutras leucocitarias, las funciones fisiológicas de las mismas dentro del leucocito, no son completamente conocidas.

La elastasa y catepsina G tienen actividades bactericidas y esta propiedad de la elastasa es inhibida por los compuestos de clorometil cetona: AAACK y AAPACK (N-acetil-L-alanil-L-alanil-L-alanina clorometil cetona y N-acetil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-alanina clorometil cetona).

El cuadro histológico de la mayoría de las injurias tisulares inducidas inmunológicamente, es la acumulación de PMN en el sitio de la reacción. Se sabe que estas células juegan un rol activo en la mediación de los hechos que ocurren en el foco de la inflamación.

Los leucocitos pueden liberar sustancias capaces de dañar los tejidos adyacentes. La vasculitis del fenómeno de Arthus, fue la primera lesión producida experimentalmente que depende de estas células. La remoción específica de PMN por tratamiento con mostaza nitrogenada o sueros heterólogos antineutrófilos, inhiben esa reacción en varias especies. Microscópicamente, no hay evidencia de injuria vascular en animales libres de PMN, aún cuando pueden demostrarse fácilmente depósitos de antígeno, anticuerpo y complemento.

De forma similar, la arteritis necrotizante experimen-

tal en conejos, la proteinuria asociada con nefritis nefrotóxica aguda en ratas y conejos y la artritis producida en conejos por una reacción de Arthus pasiva intraarticular reversa, podrían ser prevenidas en animales libres de PMN.

En el último sistema es posible reconstituir la lesión sinovial en conejos libres de PMN, por inyección intraarticular de suspensiones purificadas de PMN intactos.

Parecería que los PMN juegan un rol importante en la mediación de la injuria tisular inducida inmunológicamente. El centro de este rol son las sustancias inflamatorias contenidas dentro de esas células, particularmente aquellas contenidas en los gránulos citoplasmáticos o lisosomas. Ellas no producen destrucción del cartílago por sí mismas, pero pueden interactuar con los componentes del complemento y el sistema de quininas, o bien son directamente inflamatorias (proteínas catiónicas). La acción de las enzimas lisosomales en la secuencia de la injuria tisular en la artritis reumatoidea se puede observar en la Figura 1.

4. BIOLOGIA CELULAR DE LOS PMN.FUNCION.MECANISMOS DE ACCION.

Cuando los PMN maduros encuentran una partícula ingerible, la superficie de la membrana celular se invagina y repliega.

La partícula unida a la membrana, ahora llamada fagosoma o vesícula fagocitaria, es introducida en el citoplasma celular. La cantidad de partículas fagocitadas está limitada por la disponibilidad de la membrana superficial.

Las células que no han sido expuestas a partículas tienen formas irregulares y emiten pseudópodos. Luego de la fagocitosis, las células se redondean y tienen menor cantidad de membrana plasmática disponible.

La digestión de partículas encerradas, se inicia por

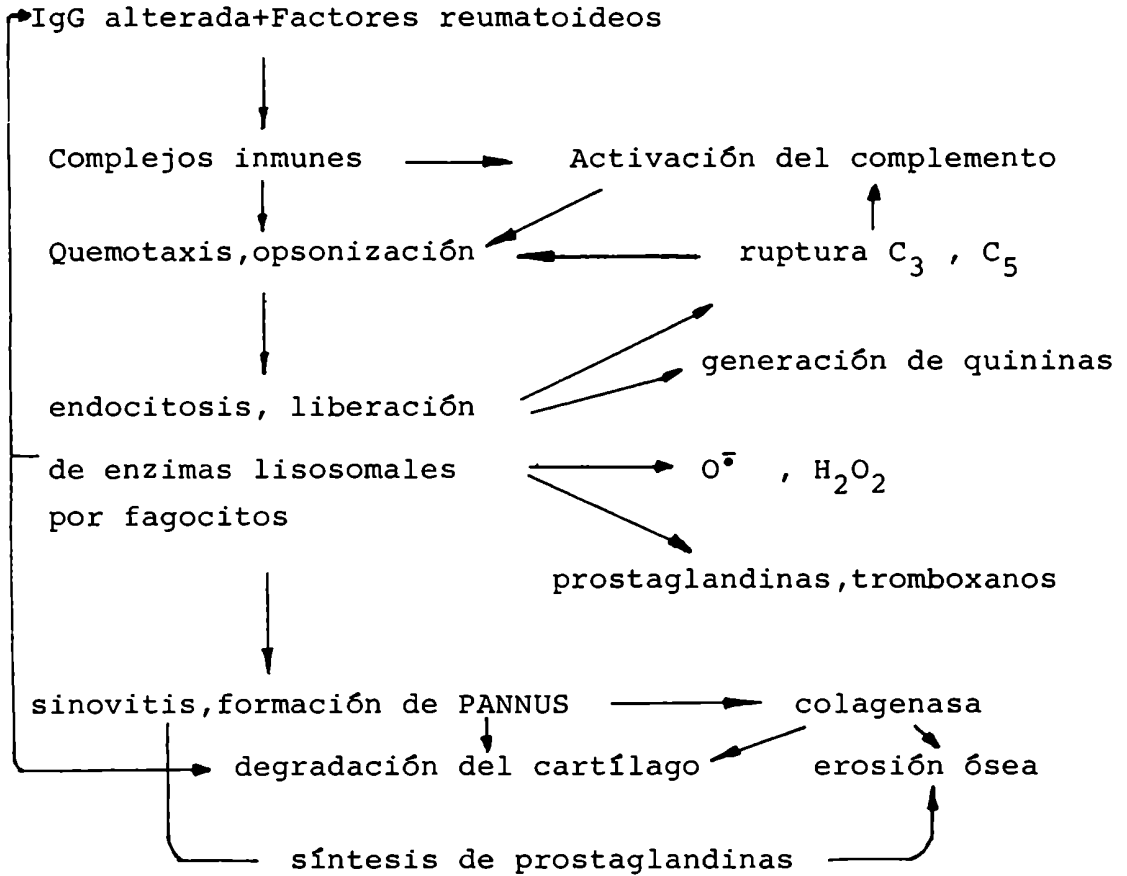


FIGURA 1: ROL DE ENZIMAS LISOSOMALES EN LA PATOGENESIS DE LA ARTRITIS REUMATOIDEA. Secuencia de injuria tisular. (Smolen J.E., et al., 1978).

la fusión de las membranas de los gránulos con la membrana del fagosoma. Los lisosomas descargan luego su contenido dentro del fagosoma, proceso llamado degranulación y la vesícula es ahora un "fagolisosoma". La degranulación de lisosomas específicos, parece ocurrir antes de la de los gránulos azurófilos.

El rol primario del PMN es bactericida y sólo una pequeña cantidad del material lisosomal se libera durante el proceso de fagocitosis. Sin embargo, en condiciones patológicas, la liberación masiva del contenido granular (por una variedad de mecanismos) puede promover la injuria tisular y exacerbar las condiciones inflamatorias existentes.

4.1 RESPUESTA DEL PMN A MATERIALES EXTRAÑOS.

A) QUEMOTAXIS.

La importancia de las células fagocíticas en la defensa contra las infecciones, ha sido aceptada desde hace 100 años. Los leucocitos pueden moverse de un sitio hacia otro a velocidades y en direcciones variables.

La quemoquinesis implica la velocidad de motilidad en respuesta a los estímulos químicos, proceso llamado quemotaxis. Los procesos requieren la transducción de la información en una serie de respuestas celulares que resultan de la migración dirigida. Los leucocitos más susceptibles de quemotaxis son los neutrófilos que llegan primeros al lugar de la inflamación. Figura 2.

La quemotaxis ha sido observada también en los monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos transformados.

La atracción de los PMN por los factores quemotácticos, juega un rol crítico en las respuestas normales y patológicas de esas células.

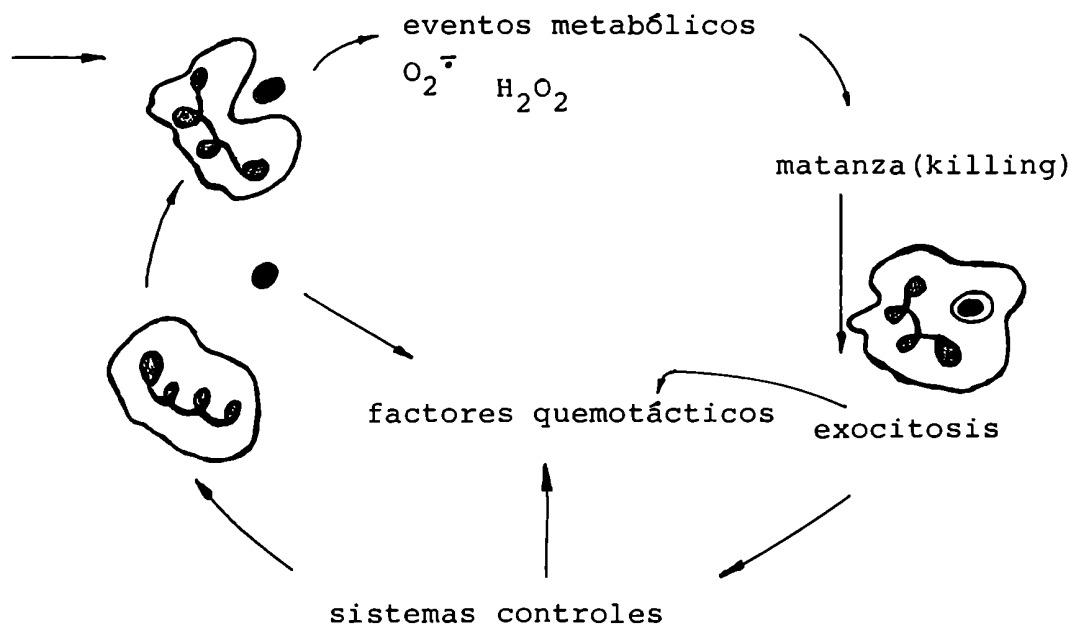
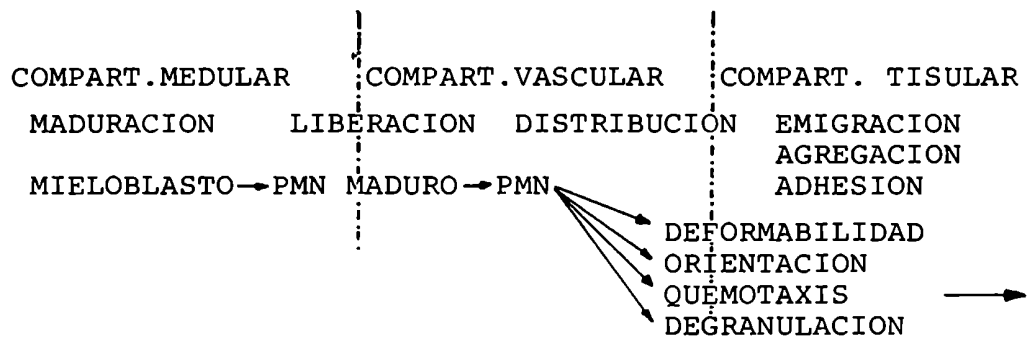


FIGURA 2: Vía de llegada del neutrófilo al lugar de la inflamación.
 (Gallin J.T., 1981).

Los factores quemoatácticos más importantes son generados por activación del complemento sérico. La ruptura proteolítica del factor C_5 del complemento produce factor C_{5a} y especialmente C_{5a} -des-Arg, fuertemente quemoatácticos.

Este proceso puede ser iniciado por un gran número de mecanismos, los más importantes de los cuales son: a) conversión directa de C_5 por proteasas elaboradas por bacterias, tejidos dañados o degranulación de neutrófilos; b) activación de la vía clásica del sistema complemento por unión de anticuerpos específicos al antígeno o por la presencia de complejos inmunes, como se han hallado en los fluidos sinoviales inflamatorios y c) activación de la vía alternativa (properdina) del complemento por microorganismos, endotoxinas o estructuras poliméricas. El complejo $\overline{C_{567}}$ producido al final en la secuencia del complemento, puede ser también quemoatáctico.

Además de los factores C_{5a} y C_{5a} -des-Arg., otros son liberados directamente por algunos microbios y por los PMN fagocitantes.

Las linfoquinas (liberadas por los linfocitos que responden a los antígenos), fibrinopéptidos, productos de degradación de la fibrina, calicreínas y activador del plasminógeno (todos producidos directa o indirectamente por el mecanismo de coagulación), y los leucotrienes y prostaglandina E_1 , también atraen a los neutrófilos.

Sin embargo, la importancia relativa de cada uno de estos factores en la inducción de la quemoataxis no está clara aún. Se ha postulado que los PMN responden a gradientes de factores quemoatácticos dirigiéndose hacia la fuente de la sustancia atrayente.

La motilidad es inhibida por agentes que interfieren la producción de ATP, que afectan la estructura citoesquelética (colchicina y citochalasin B) o que incrementan los ni-

veles intracelulares de AMP_c.

B) RECEPTORES PARA OPSONINAS.

La fagocitosis por PMN está fuertemente influenciada por ciertas características de las partículas extrañas. La ingestión depende de las propiedades de la superficie de la partícula; las variaciones en hidrofobicidad y carga superficial pueden influenciar la velocidad de ingestión.

Cambios superficiales sutiles son responsables de la habilidad de ciertas bacterias para escapar a la ingestión por los PMN que son atraídos por ellas.

El trabajo del granulocito está facilitado por el sistema huésped de inmunidad humoral.

Las partículas que han sido expuestas al suero fresco son atrapadas más facilmente que las no tratadas, un proceso llamado opsonización. Un compuesto opsónico del suero es el anticuerpo de clase IgG (en particular las subclases IgG₁ e IgG₃). La porción Fab de la molécula de anticuerpo (la cual se une a sitios específicos sobre la partícula) y la región Fc, que interactúan con la membrana del PMN, deben estar ambas intactas, (Smolen J.E., et al., 1978) para la opsonización.

Como las moléculas de IgG son resistentes al calor, la actividad opsónica mediada por inmunoglobulinas se denomina: estable al calor.

El complemento sérico también tiene poder opsónico, que es característicamente lábil al calor. El C_{3b}, el factor más activo, es generado por ruptura proteolítica del C₃ por cualquiera de las vías de activación. El C_{3b} puede ser formado también por acción directa de proteasas como plasmina o tripsina. Este se pega por uniones firmes hidrofóbicas a las partículas extrañas que son subsiguientemente removidas por una enzima proteolítica (inactivador de C_{3b}) que se en-

cuentra en el suero normal.

4.2 RESPUESTAS PRECOCES EN LA ESTIMULACION DEL PMN.

A) INTERACCIONES RECEPTOR-LIGANDO.

La etapa inicial en la estimulación del PMN, puede involucrar una perturbación de la membrana plasmática.

Las perturbaciones de la membrana pueden ser producidas por interacciones directas de los estímulos con la misma o indirectamente por interacciones ligando-receptor. Una perturbación posible de la membrana, es un cambio en la fluidez de la misma. Las moléculas de IgG agregadas que contienen secuencias hidrofóbicas en sus porciones Fc, se unen directamente a los lisosomas. La unión de esos agregados a la doble capa lipídica de las membranas de los PMN, más que interacciones clásicas de receptor-ligando, podrían ser el medio por el cual se desencadenan las últimas respuestas, tales como la liberación de enzimas lisosomales. La IgG nativa, que no estimula la secreción del PMN, no causa aumento de la movilidad de la membrana.

Los cambios en la fluidez parecen deberse a las alteraciones en la composición lipídica de la membrana; el mayor grado de saturación de ácidos grasos hallado en fagosomas aislados de membranas, sugiere la existencia de un proceso que enriquecería a la membrana en ácidos grasos no saturados. Los cambios en el potencial de membrana que ocurren en los PMN estimulados, se producen en menos de 5 segundos.

Se estudió la variación en el contenido del calcio unido a la membrana en varios sistemas celulares. Los complejos del calcio con sustancias fluorescentes se pueden diferenciar de los de magnesio por sus propiedades espectrales. Se observa una pérdida de la fluorescencia cuando los PMN son expuestos a C_{5a}-des-Arg. que es independiente de la presencia o

ausencia de calcio extracelular. Este proceso se acompaña de un corrimiento espectral, indicando la formación del complejo de magnesio: el calcio ha sido liberado, aparentemente, al medio intracelular.

B) METABOLISMO OXIDATIVO.

El PMN estimulado consume más oxígeno molecular. Este es reducido por una oxidasa dependiente de NADH o NADPH produciendo: anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 , radicales oxhidrilos y oxígeno singulete.

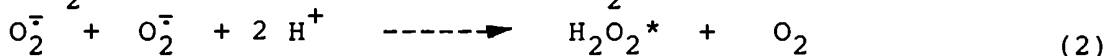
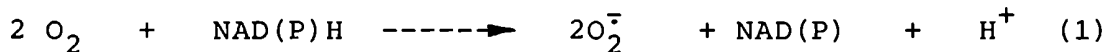
Estos productos se involucran en las propiedades tóxicas de los fagocitos. Las enzimas que potencian (peroxidasa) o limitan (catalasa, superóxido dismutasa) la toxicidad de esos agentes, contribuyen a la complejidad del sistema antimicrobiano dependiente del oxígeno de los fagocitos.

Estos sistemas tóxicos son inactivos cuando el fagocito está en reposo pero funcionan cuando se necesitan y se dirigen hacia la destrucción de microorganismos invasores y de otras células extrañas.

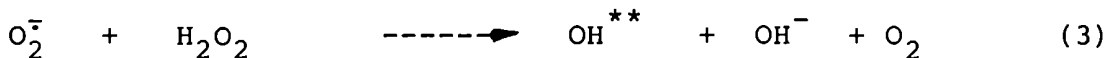
Ocasionalmente los sistemas tóxicos están dirigidos contra células huéspedes normales y por este camino contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Figuras 3 y 4.

C) INTERACCION DE ESPECIES OXIGENADAS CON α_1 -AT.

La α_1 -AT es un inhibidor potente de acción "in situ" contra la elastasa y la catepsina G de los neutrófilos.



(u oxígeno singulete?)*



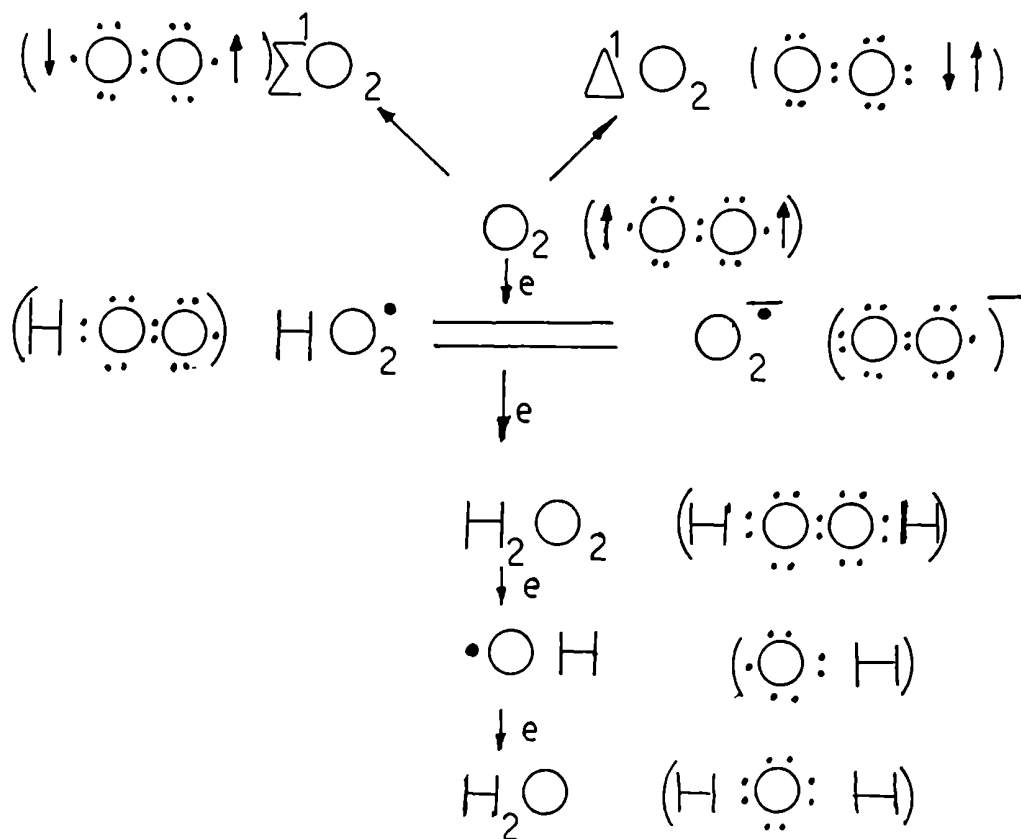


FIGURA 3: Reducción y excitación del oxígeno.

e= electrón

O_2^- = anión superóxido

$\text{HO}_2 \cdot$ = radical perhidróxido

H_2O_2 = peróxido de hidrógeno

$\cdot\text{OH}$ = radical oxhidrilo

$^1 \text{O}_2$ = oxígeno singulete

Delta oxígeno singulete: los electrones apareados ocupan el mismo orbital.

Sigma oxígeno singulete: los electrones de spin opuesto ocupan diferentes orbitales.

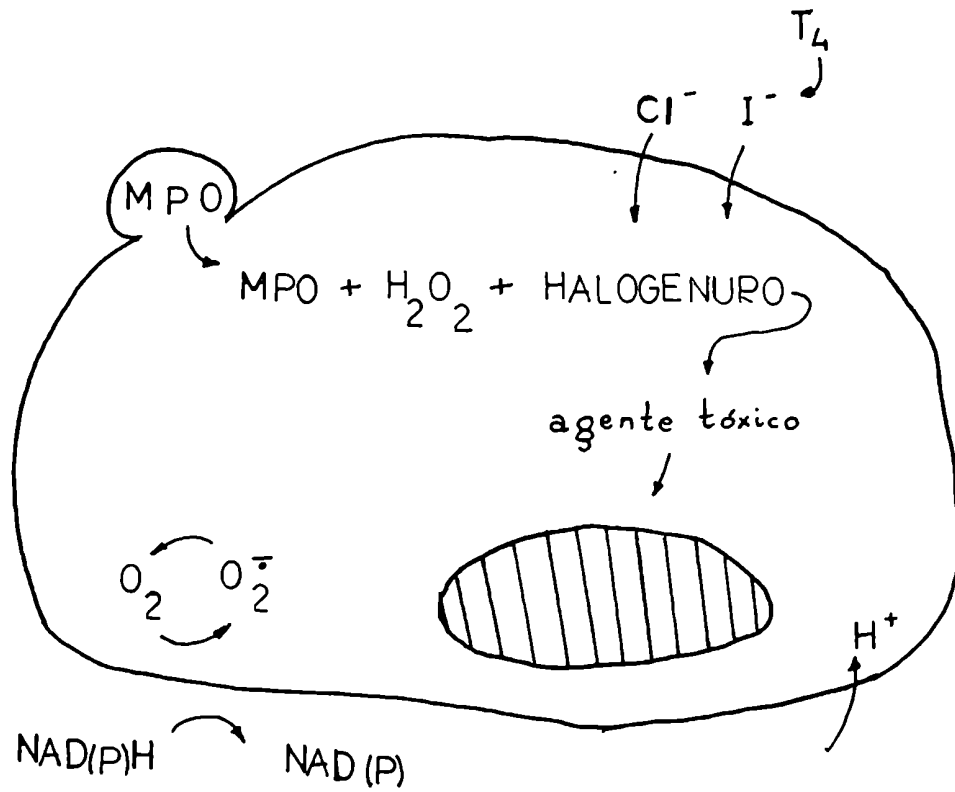


FIGURA 4: Sistema antimicrobiano en neutrófilos normales.

T_4 = Tiroxina.

M P O = Mieloperoxidasa.

(u oxígeno singulete?) **

El incremento del consumo de oxígeno puede producir la activación del NAD(P)H unido a la membrana.

El radical superóxido formado en (1) puede reaccionar directamente o puede generar especies oxigenadas más poderosas (*) o radicales libres de oxígeno (**) por las reacciones (2) y (3).

Teóricamente, estas especies de oxígeno activadas y radicales libres de oxígeno podrían inactivar la α_1 -AT dentro de la vacuola fagocítica; sin embargo se ha demostrado mediante el uso de fibronectina ^{125}I que los oxidantes liberados de las células estimuladas no protegen a la elastasa liberada de las mismas de la acción inhibitoria de la α_1 -AT. (Janoff A., et al., 1983; Campbell E.J., et al., 1982; Cohen A. B., et al., 1982; Klebanoff S.J., 1980).

Los PMN fagocitantes generan H_2O_2 , y el 60 a 70 % del O_2^- formado se localiza en la membrana plasmática, donde también se encuentra la enzima NADPH oxidasa.

D) FLUJOS DE IONES.

La composición iónica del medio extracelular es crítica en la estimulación del PMN. El ionóforo cálcico A 23187 es suficiente para causar la liberación de enzimas lisosomales y generación de O_2^- , luego es probable un rol crítico para el calcio intracelular y puede ser que los flujos de este catión sirvan de base a los procesos de estimulación. (Agregación, liberación).

Los iones magnesio y calcio, ambos, son requeridos para la fagocitosis, concentraciones de 1 a 2 mM son óptimas y concentraciones mayores son inhibitorias. Se requieren menores concentraciones de calcio y magnesio para la ingesta de partículas opsonizadas que para la de partículas no opsonizadas. También ambos, magnesio y calcio son requeridos para

la quimotaxis. La degranulación medida en sistemas fagocíticos o exocíticos es calcio dependiente, el magnesio es menos importante. La secreción de lisozimas se potencia en presencia de iones fosfato o A 23187.

Los requerimientos de cationes monovalentes para la estimulación del PMN son variables.

Ni la ausencia de K^+ ni el reemplazo de Na^+ por colina⁺ inhiben la fagocitosis de partículas de aceite de parafina en emulsión. El reemplazo de Na^+ extracelular por colina⁺ o glucosa produce la disminución de la actividad quimotáctica pero aumenta la quimotaxis en los PMN de conejo.

El rol de los cationes monovalentes no se ha estudiado extensamente en los PMN humanos. La remoción del Na^+ del medio (con reemplazo por colina⁺ o K^+) produce disminución en la liberación de las enzimas lisosomales, generación de O_2^- y cambios de los potenciales de membrana.

El flujo de aniones permanece aún sin aclarar.

En resumen, la estimulación de los PMN produce influjos rápidos de ambos Na^+ y Ca^{++} , un eflujo de K^+ relativamente menor y un eflujo de Ca^{++} , aumentado.

Ya que el influjo de Na^+ puede obtenerse en ausencia de Ca^{++} y por lo tanto, en ausencia de degranulación, tal vez el Ca^{++} y no el Na^+ es el catión crucial en el acoplamiento estímulo-secreción. El eflujo de K^+ que podría aumentar la hiperpolarización de membrana, no sería crucial en el mecanismo de acoplamiento y podría tener una respuesta retardada a las elevaciones intracelulares de Ca^{++} .

E) CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS.

A pesar del hecho de que el AMP_c (y los agentes que elevan sus niveles intracelulares) disminuye y el GMP_c exógeno (y los agentes que elevan sus niveles intracelulares)

aumenta la degranulación y otras respuestas de los PMN estimulados, se han descrito raramente cambios en los niveles de los nucleótidos cíclicos celulares endógenos, resultantes de la estimulación.

Los PMN expuestos a partículas de Zymosan tienen niveles de GMP_c elevados. El mayor incremento de GMP_c se halló con A 23187.

La cinética del aumento de GMP_c es paralela a la acumulación del Ca^{++} y a la liberación de enzimas lisosomales, en respuesta a los factores quemoatácticos. La exposición de los PMN humanos a las partículas de látex provoca el aumento del AMP_c , que es rápido y breve. Los niveles basales de AMP_c se recuperan dentro de 1 a 2 minutos y se hace difícil la observación del aumento de los mismos. El incremento breve del AMP_c podría tener un rol de regulación en el metabolismo del glucógeno.

F) AGREGACION.

Los PMN expuestos a estímulos solubles forman agregados celulares. Esta reacción puede estar involucrada en la leucostasis y la leucopenia resultante de la activación del complemento o la infusión de péptidos quemoatácticos en la sangre de animales.

Depende de los niveles de Ca^{++} y Mg^{++} y puede ser modulada por agentes exógenos como las prostaglandinas. La agregación llega al máximo dentro de los dos minutos y luego decrece.

Osea que a través del uso de técnicas adecuadas, se puede observar la secuencia del acoplamiento estímulo-respuesta para los PMN.

Después de unos segundos de la estimulación de la membrana, se producen los cambios de potencial de membrana acompañados de influjos aumentados del Na^+ y Ca^{++} , movilización

del Ca^{++} unido a la membrana y cambios no definidos en la fluidez y viscosidad de la membrana. Después de 20 a 60 segundos comienzan la degranulación y el metabolismo oxidativo. Los procesos bioquímicos y fisiológicos responsables del período de latencia (lag) observado para la secreción enzimática, el consumo de O_2 , la generación de O_2^- y producción de H_2O_2 son desconocidos. Los cambios en los niveles de AMP_c que ocurren después de los eventos inmediatos pero antes de los procesos de secreción, podrían estar localizados en una armadura temporal para servir en un rol posterior; sin embargo las evidencias sugieren que el AMP_c no es el segundo mensajero en la secuencia de secreción.

4.3 ESTRUCTURAS CITOESQUELETICAS.

Los microfilamentos y los microtúbulos, estructuras citoesqueléticas del PMN, están involucradas en los procesos celulares de motilidad, adhesión e ingestión.

Estas estructuras también median la transferencia de información entre la membrana plasmática y el interior celular.

Los microtúbulos son fibras de 24 nm de diámetro, son polímeros cilíndricos de tubulina, una proteína de 55.000 Dalton de peso molecular. Se orientan estratégicamente como estructuras de motilidad (semejantes a flagelos). En otras células, sirven como soporte esquelético para los microfilamentos y otros sistemas contráctiles.

El conjunto de los microtúbulos puede ser controlado experimentalmente por una variedad de caminos "in vitro" e "in vivo".

La presencia de iones calcio promueve la disolución de la tubulina polimerizada. Los agentes que elevan los niveles intracelulares de GMP_c , tales como Forbol-miristato-acetato y carbamil colina, favorecen la agregación de tubulina,

mientras que materiales como prostaglandina E_1 e isoproterenol que elevan los niveles de AMP_c , promocionan la desagregación.

El estado redox celular también regula la polimerización de tubulina.

El equilibrio polímero/dímero normal de la tubulina en los microtúbulos puede ser congelado por concentraciones molares de sacarosa o glicerol.

La disolución reversible de los microtúbulos puede ser obtenida con concentraciones micromolares de los alcaloides colchicina y vinblastina.

Los microtúbulos de los PMN son de particular importancia. El número de esas estructuras aumenta cuando las células son expuestas a varios estímulos superficiales, incluyendo el factor quemoatáctico C_{5a} .

La colchicina puede inhibir la ingestión de partículas, quemoataxis, migración, adhesión a superficies y degranulación, hechos que sugieren que los microtúbulos son importantes en todos estos procesos.

Los microfilamentos son más pequeños que los microtúbulos, tienen 6 nm de diámetro y constituyen el sistema contráctil del PMN. Se han identificado como polímeros de actina y están ubicados en las áreas celulares involucradas en la adhesión e ingestión de partículas.

Hay una fuerte semejanza entre el sistema contráctil del PMN y el músculo esquelético.

Se han aislado de los neutrófilos: actina, miosina (con actividad de ATPasa Mg^{++} activada por actina), proteína unida a la actina y un cofactor que hace que la actina active a la ATPasa mencionada.

El sistema de los microfilamentos puede ser inhibido por interferencia en la producción de energía metabólica (ATP).

Un efecto de inhibición más específico puede ser reali-

zado por citochalasina B (poderoso inhibidor de la migración y la fagocitosis), sugiriendo que los microfilamentos juegan un rol vital en esos procesos activos.

4.4 DEGRANULACION.

Bajo condiciones normales, la degranulación es un acompañamiento directo de la fagocitosis y la estrecha relación entre esos eventos sugiere mecanismos de partida comunes o similares.

Durante la degranulación, los lisosomas se funden con los fagosomas que contienen a las partículas ingeridas y luego descargan su contenido en forma concentrada en la vecindad inmediata de la unión.

Idealmente, en el medio extracelular y el citoplasma del PMN son escasos los efectos deleterios de la secreción de los gránulos enzimáticos.

En la práctica, algo del contenido lisosomal es liberado fuera de la célula durante la ingestión de la partícula, usualmente por degranulación prematura dentro de ese fagosoma que se abrió en la superficie celular (regurgitación durante la alimentación). La degranulación extracelular extensa puede ser estimulada en sistemas patológicos o experimentales. Este fenómeno de secreción está acoplado usualmente a la estimulación del metabolismo oxidativo del PMN. La degranulación y activación del metabolismo oxidativo no son procesos dependientes en el PMN humano estimulado y pueden ocurrir independientemente de la fagocitosis. Hay tres ejemplos para ello:

- 1) se ha visto experimentalmente que cuando los PMN humanos encuentran inmunocomplejos (solubles o insolubles) o inmunoglobulinas agregadas depositadas sobre superficies sólidas, tales como filtros millipore, las células se adhieren a esas

superficies y liberan selectivamente sus constituyentes lisosomales. La liberación enzimática bajo estas condiciones puede ocurrir por un proceso de "endocitosis reversa" (o fagocitosis frustrada), durante el cual la fusión de los gránulos con la membrana plasmática culmina en la descarga de los constituyentes lisosomales directamente afuera de la célula como si fuese dentro de una vacuola fagocitaria.

La fagocitosis "per se" no ocurre y no se afecta la viabilidad de las células adherentes. El proceso es básicamente uno en el cual el material previamente almacenado dentro de los lisosomas es trasladado al medio exterior como una consecuencia de la estimulación de la estimulación de la célula-superficie de la membrana.

2) El metabolito de hongos: citochalasin B interfiere con la función de los microfilamentos citoplasmáticos e inhibe el transporte a través de la membrana de los azúcares y nucleótidos en los cultivos celulares. Los PMN tratados con citochalasin B no pueden fagocitar partículas. Pueden liberar o secretar constituyentes lisosomales pero no citoplasmáticos, cuando las partículas apropiadas o el estímulo soluble contactan con su superficie. (Goldstein I.M., et al., 1979).

Estos estímulos pueden ser partículas de Zymosan tratadas con suero (opsonizadas) o IgG humana agregada por calor.

Luego la citochalasin B convierte a los PMN de células fagocitarias en células secretoras modelo, haciendo posible observar extracelularmente (después de la fusión de lisosomas con las membranas plasmáticas) los procesos que normalmente ocurren intracelularmente (fusión de lisosomas con vacuolas fagocitarias).

3) Los PMN humanos tratados con citochalasin B degranulan cuando se exponen al componente soluble de bajo peso molecular del complemento C_{5a} . Tales células responden en forma semejante a otros factores quimotácticos, por ej., componen-

tes del complemento, productos de bacterias o péptidos sintéticos. Sin embargo, otros estímulos solubles son capaces de provocar la degranulación de PMN humanos normales. Ellos incluyen el promotor tumoral (Forbol-miristato-acetato: gránulos específicos), iones calcio con o sin ionóforo A-23187 (gránulos azurófilos y específicos) y la lectina reactiva de superficie celular, concanavalina A (gránulos específicos).

La degranulación del PMN en respuesta a tales estímulos ocurre en ausencia de citochalasina B, de partículas, o adhesión a superficies, y no está asociada con alteraciones en la viabilidad celular.

A) ESTIMULACION NO FAGOCITICA DEL METABOLISMO OXIDATIVO DEL PMN.

La ingestión de una variedad de partículas por los PMN humanos está acompañada por cambios marcados en el metabolismo oxidativo. Concomitantemente se estimula el camino shunt hexosa monofosfato de oxidación de la glucosa (evolución hacia $^{14}\text{CO}_2$ de glucosa-1- ^{14}C) e iodación de proteínas (mediada por las enzimas granulares mieloperoxidasas).

El aumento de la habilidad del PMN fagocitante para reducir el colorante NBT es un reflejo del aumento de la generación de radicales de anión superóxido. Como ocurre con la degranulación, hay evidencias considerables que estos eventos metabólicos pueden ser estimulados en ausencia de fagocitosis.

La evidencia deriva de estudios semejantes a los tres experimentos previamente mencionados.

Ejemplo: los PMN humanos normales, adheridos a ciertas superficies no fagocitables, aumentan su metabolismo oxidativo, particularmente si esas superficies están cubiertas con reactantes inmunes como IgG agregada o el fragmento op-

sónico del complemento C_{3b} . Los PMN tratados con citochalasin B tienen aumento del metabolismo oxidativo cuando se exponen a estímulos apropiados.

Finalmente, los PMN humanos expuestos a ciertos estímulos solubles (en ausencia de citochalasin B o de partículas) aumentan su consumo de oxígeno, la producción del anión superóxido, la activación del shunt hexosa monofosfato y la reducción del colorante NBT.

Estos estímulos solubles incluyen reactantes inmunes tales como IgG agregada y péptidos quimotácticos derivados del complemento y compuestos como fosfolipasa C, Forbol-miristato-acetato y concanavalina A (compuestos reactivos de superficies no inmunes). Las respuestas metabólicas de los PMN a estos estímulos requiere células viables, intactas y se parece estrechamente a las observadas durante la fagocitosis.

B) RELACION ENTRE LA DEGRANULACION Y EL AUMENTO DEL METABOLISMO OXIDATIVO EN EL PMN.

La estimulación de la superficie celular de PMN humanos es suficiente, en ausencia de fagocitosis, para provocar la degranulación y la activación del metabolismo oxidativo que ordinariamente acompaña la ingestión de partículas.

Cuál es la relación entre esas dos respuestas de los PMN al estímulo?

Esos dos fenómenos son mediados 1) por señales independientes de membrana, 2) la fusión de las membranas de los gránulos con membranas plasmáticas o fagosomales no es un prerequisite para la generación de superóxido y 3) la liberación de superóxido no está unida coincidentemente a la extrusión de los constituyentes lisosomales.

El reconocimiento y la fagocitosis de las partículas por

los PMN están mediados en gran parte por receptores ubicados sobre la superficie celular para un fragmento opsónico de C_3 (C_{3b}) y para las regiones Fc de algunas moléculas de IgG que llevan a un cambio conformacional como un resultado de combinación con el antígeno o como resultado de agregación por calentamiento.

En el caso de C_{5a} , esos reconocimientos, por mecanismos intracelulares desconocidos, terminan en la quimiotaxis y la extrusión granular de los PMN.

Los resultados experimentales sugieren que además de provocar fagocitosis, migración directa y degranulación, las interacciones entre reactantes inmunes y sus receptores sobre la superficie celular pueden generar señales que afectan el metabolismo de los PMN. La estimulación de la superficie celular de los PMN humanos no es un fenómeno de "todo o nada" y ciertas funciones vitales de esas células (por ej. degranulación e incremento del metabolismo oxidativo) pueden ser mediadas o moduladas independientemente por inmunoglobulinas y complemento. Los mecanismos mediante los cuales se produce la unión de ligandos específicos (IgG, C_{3b}) a los PMN y se estimula la fusión de la membrana (degranulación) y aumenta el metabolismo oxidativo, son desconocidos.

La similitud de acción entre los ligandos que median las alteraciones funcionales de los PMN y aquellas mediadas por agentes reactivos no específicos de membrana como Forbol-miristato-acetato, fosfolipasa C, digitonina y concanavalina A sugieren que la perturbación de la membrana puede ser un medio por el cual se inicia o modula la función de los PMN.

Tales perturbaciones a nivel de la superficie de la membrana de los PMN puede provocar asociaciones o disociaciones de subunidades de proteínas de membrana, tendientes a la activación de ectoenzimas o a interacciones con proteínas estructurales subplasmáticas (ej., actina, tubulina).

Estas enzimas y proteínas estructurales pueden luego iniciar o regular la motilidad celular, el apresamiento de partículas, la actividad metabólica y la traslocación de las organelas intracelulares.

Además, la perturbación de la membrana, puede llevar a la fusión (degranulación) para provocar la formación de estructuras micelares inestables que tienden a fundirse una con otra en segmentos de doble capa. La presencia de hidrocortisona (en concentración mayor de 0.5 M%) dentro de la doble capa lisosomal previene las perturbaciones de regiones polares y no polares provocadas por las inmunoglobulinas. Otros agentes que interactúan con biomembranas, tales como los anestésicos locales, tienen efectos similares a los corticoesteroides adrenales. Si la perturbación de la membrana pudiera de hecho iniciar o modular la función del PMN, luego los receptores celulares de superficie para ligandos reactivos de membrana como IgG, C_{3a} y C_{5a} podrían dotar al PMN con las características discriminatorias que ellos poseen.

Por lo tanto, los receptores de la membrana de PMN para complemento e inmunoglobulinas no sólo pueden jugar un rol en la motilidad directa y en el reconocimiento de partículas a ser ingeridas, sino que también pueden lanzar señales que inician la fusión de membrana (degranulación) y los eventos metabólicos que acompañan la fagocitosis y que son esenciales para la acción microbicida.

4.5 LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS.

Los neutrófilos fagocitantes liberan prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) que son potentes mediadores de la inflamación.

Los estudios de estas sustancias se han realizado usualmente con plaquetas agregadas, ya que las liberan en abundan-

cia, y más recientemente se han observado en los PMN.

La activación metabólica que acompaña la fagocitosis produce abundancia de especies oxigenadas reactivas.

Dependiendo del sistema estudiado, uno o más de esos materiales (o simplemente el oxígeno molecular) reacciona con los ácidos grasos no saturados de C_{20} , ácido araquidónico o eicosatrienónico a través de la enzima ciclooxigenasa.

Esta enzima se inhibe por drogas antiinflamatorias no esteroides como indometacina y aspirina. Los endoperóxidos así formados, llamados series PGG y PGH sirven como intermediarios en la formación de otras prostaglandinas y tromboxanos. La PGH_2 puede ser convertida por isomerasas a PGE_2 , PGE_1 y $PGF_{2\alpha}$, la primera es un importante mediador de la inflamación.

Ambos PGH_2 y PGG_2 pueden ser convertidos en tromboxano A_2 (TXA_2). La síntesis de PG está limitada por el sustrato , la producción aumenta cuando se suministran largas cadenas de ácidos grasos libres.

La regulación de la síntesis de PG y TX es realizada por enzimas tales como sintetetasas o fosfolipasas, que controlan la disponibilidad del sustrato.

El TXA_2 es inestable y se convierte rápidamente en su forma inactiva TXB_2 . "In vivo" las PG son rápidamente degradadas por enzimas, luego su vida media es corta y son más efectivas cerca del lugar de su producción. El TXB_2 y la PGE_1 son quemoatácticos para neutrófilos. El HETE, derivado oxhidrilado del ácido araquidónico, se produce en las plaquetas por la vía de la lipooxigenasa y también es un agente quemoatáctico para PMN.

El TXA_2 agrega las plaquetas y es un poderoso vasoconstrictor; la PGE_1 inhibe ciertos aspectos de la inflamación aumentando los niveles intracelulares de AMP_c , esto podría, entre otros factores, disminuir la degranulación extracelular de

los neutrófilos.

4.6 MECANISMO BACTERICIDA.

Un factor que contribuye al medio bactericida del fagocitoma es que su pH interno es bajo, alrededor de 3.5 a 4.0. Esto no es bactericida "per se" pero es óptimo para la actividad de hidrolasas ácidas liberadas de gránulos azurófilos y promueve la reducción de superóxido a peróxido de hidrógeno.

Como ya se mencionó, la degranulación expone a las partículas capturadas a una variedad de enzimas digestivas (incluyendo proteasas y glucosidasas) así como a agentes bacteriostáticos tales como lisozima, lactoferrina y proteínas catiónicas.

La activación respiratoria que acompaña a la fagocitosis consume oxígeno y disminuye los niveles del anión superóxido, el oxígeno singlete, radicales oxhidrilos y peróxido de hidrógeno. Todos estos materiales son altamente reactivos y consecuentemente bactericidas en algún grado. El peróxido de hidrógeno es particularmente importante, en conjunto con iones halogenuros y mieloperoxidasas, constituye un muy potente sistema asesino (killer).

Los cloruros o ioduros pueden halogenar las bacterias por este sistema, pero no está claro si la halogenación "per se" u otro intermediario reactivo es responsable de la actividad bactericida.

Quizás alguna combinación de los procesos mencionados es la responsable de la destrucción de los microbios "in vivo".

EXTRUSION DE ENZIMAS DE GRANULOS DE PMN EN INJURIA TISULAR.

Teniendo evidencias que los leucocitos PMN y sus proteasas lisosomales tienen el potencial para proveer una injuria

tisular inmune significativa, los mecanismos mediante los cuales, las proteasas y otros constituyentes lisosomales son extrudados de las células y tienen acceso a sus sustratos específicos son los que se postulan a continuación y que han sido recientemente delineados.

A) MUERTE CELULAR

Un mecanismo es simplemente muerte celular. Cuando el PMN es expuesto a una variedad de toxinas (ej. Fosfolipasas de venenos de víboras o materiales que pueden hallarse en algunas formas sépticas de artritis), la injuria a la membrana plasmática es una consecuencia temprana y todo el material celular se libera de la célula dañada incluyendo el de los lisosomas. Los detergentes biológicos actúan de esta manera causando la lisis primaria de la membrana celular y solo subsiguientemente, se rompen los lisosomas.

Bajo estas circunstancias, las enzimas citoplasmáticas, K^+ y otros constituyentes celulares, en adición a las hidrolasas lisosomales, hallan su camino dentro del tejido adyacente.

B) PERFORACION HACIA ADENTRO.

Bajo ciertas circunstancias, los materiales acceden al interior del sistema de vacuolas celulares y causan la ruptura hacia adentro de las membranas lisosomales y se liberan las enzimas y otros constituyentes. Sustancias cristalinas como los uratos monosódicos y la sílice actúan de esta manera. Esta forma de liberación enzimática es el promotor primario de la inflamación en la gota.

C) REGURGITACION DURANTE LA ALIMENTACION.

Después de la ingestión de complejos inmunes solu-

bles, como los del líquido sinovial durante la artritis reumatoidea, u otras partículas, se forma un fagosoma que se funde en sus bordes internos con lisosomas primarios. Ya sea por una fusión incompleta de la membrana vacuolar o por la persistencia de canales endocíticos, se produce la regurgitación de hidrolasas lisosomales y los materiales inflamatorios se liberan dentro de los tejidos adyacentes sin asociación de muerte celular fagocítica o liberación de enzimas citoplasmáticas.

Este es un camino común de injuria tisular en varias enfermedades.

D) ENDOCITOSIS REVERSA O FAGOCITOSIS FRUSTRADA.

El material previamente almacenado dentro de los lisosomas es liberado al medio exterior. Las células que encuentran complejos inmunes solubles o insolubles, o inmunoglobulinas agregadas depositadas sobre superficies sólidas, tales como filtros millipore o membranas de colágeno, se adhieren a esas superficies y selectivamente liberan sus constituyentes lisosomales.

Bajo estas circunstancias, la liberación enzimática ocurre por un proceso de endocitosis reversa durante el cual se funden los gránulos con la membrana plasmática y descargan sus enzimas directamente fuera de la célula como si lo hicieran dentro de la vacuola fagocítica. No se produce la fagocitosis "per se" y no se altera la viabilidad de las células adherentes.

Este camino es común en nefritis y lupus eritematoso sistémico. En este proceso parece que están involucrados ambos tipos de gránulos de PMN.

El control farmacológico de la liberación enzimática en los PMN se detalla en la Tabla 2, y sugiere una relación en-

AGENTES QUE INHIBEN LA
LIBERACION

A M P _c
Teofilina
P G E ₁
Toxina cólera
Agonistas β -adrenérgicos
Colchicina
Vinblastina
Corticoesteroides adre-
nales

AGENTES QUE AUMENTAN LA
LIBERACION

G M P _c
agonistas colinérgicos
Forbol-miristato-acetato
Oxido de deuterio
Iones calcio con/sin ionófo-
ro

TABLA 2 :
CONTROL FARMACOLOGICO DE LA LIBERACION ENZIMATICA EN
LOS NEUTROFILOS.

tre nucleótidos cíclicos, microtúbulos y liberación enzimática de PMN, hecho que aún se encuentra en estudio.

II. BIOQUIMICA DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS.

Desde comienzos del siglo, se conoce que los leucocitos humanos contienen actividad proteolítica óptima a un pH neutro. (Ohlsson K., 1978).

El interés general de los investigadores por las enzimas leucocitarias se produjo tratando de resolver el daño pulmonar observado en las deficiencias plasmáticas de α_1 -AT y en otras enfermedades.

El material de partida para el estudio de las mismas debe ser rico en células. Generalmente se utilizan leucoféresis de pacientes con LMC. El material contiene aproximadamente 99% de neutrófilos sin el usual 15% de linfocitos. Los granulocitos se homogenizan, se obtiene la fracción granular por centrifugación diferencial del homogenato, se extraen en medio ácido, luego se cromatografían y purifican.

La collagenasa no se separa totalmente de la elastasa (se obtiene pura por cromatografía de afinidad sobre colágeno-sepharosa 4B).

Las dos collagenasas de neutrófilos humanos tienen un contenido de aminoácidos idéntico excepto por pequeñas variaciones en el contenido de glicina, histidina y arginina. El peso molecular es de 76000 Dalton y por electroforesis en SDS se revelan, en condiciones reducidas y desnaturalizadas, dos componentes de peso molecular 42000 y 33000 respectivamente sugiriendo que ambas enzimas contienen dos subunidades. Por ultracentrifugación las dos collagenasas tienen S_{20W}° 4.5 S.

Las tres elastasas reaccionan como proteínas homogéneas mostrando S_{20W}° 2.6 S y PM 32000. La electroforesis de elastasas reducidas y desnaturalizadas da un PM en el rango 33000-36000. La composición de aminoácidos es la misma excepto por

ligeras variaciones en el contenido de arginina.

Las elastasas son glucoproteínas y su contenido en hidratos de carbono (% de peso seco) es:

	Manosa	Galactosa	N-acetilglucosamina
Elastasa I	2.5	0.9	3.2
Elastasa II	2.9	1.0	4.4
Elastasa III	1.4	0.5	1.3

Hay variaciones entre los distintos laboratorios y algunos autores sólo encuentran el tipo I de elastasa leucocitaria. (Taylor J.C., et al., 1975).

Hidrólisis de sustratos sintéticos por elastasas, diferentes valores de K_M :

Elastasas	K_M (mM)	
	BOC-Ala-ONp *	Suc-Ala ₃ NHHP
Pancreática, porcina	0.30	1.15
Granulocítica, humana	0.35	1.25

pH óptimo 8.5-8.0

* (Visser L., et al., 1972)

La elastasa pancreática y extractos crudos leucocitarios provocan o causan enfisema pulmonar en animales. La elastasa leucocitaria es capaz de producir enfisema en hamster, pero a diferencia de la pancreática, el enfisema es moderado aún en dosis suficientes para producir hemorragia intensa y alta mortalidad. Esto puede depender de la discrepancia entre las diferentes especies y de la actividad de la producción de inhibidores de bajo PM, "in situ".

Como el tejido conectivo de los pulmones contiene tres tipos generales de proteínas estructurales (colágeno, elastina y glucoproteínas estructurales) la fuente lógica de enzimas capaces de atacarlas es el PMN y también los macrófagos

alveolares. Ambos pueden ser fácilmente secuestrados en el tejido pulmonar. Los macrófagos alveolares pueden secretar proteasas neutras que podrían causar daño tisular, pero no ha sido establecido que eso pueda ocurrir "in vivo".

Tampoco se sabe si la cantidad de enzimas producidas es capaz de sobrepasar la capacidad inhibitoria de las antiproteasas de pulmón y de plasma de modo de producir daño tisular. El candidato más importante es el PMN, cuyos gránulos contienen elastasa, colagenasa y catepsina G. Estas enzimas constituyen la mayor proporción del contenido granular protéico y pueden digerir fácilmente colágeno (colagenasa y elastasa), elastina (elastasa), componentes microfibrilares (elastasa y catepsina G) y proteoglucanos (elastasa y catepsina G). Además tienen funciones bactericidas que ya se han mencionado.

El control de la actividad enzimática de las proteasas leucocitarias estaría en gran parte regulado por la acción de inhibidores de proteasas plasmáticos, sin embargo, el aislamiento de un inhibidor de proteasas de lavados bronquiales, indica la posibilidad de otras proteínas reguladoras.

Los inhibidores que actúan sobre las proteasas leucocitarias son: α_2 -M, α_1 -AT y α_1 -antiquimotripsina (α_1 -AQ). La primera proteína inhibe las tres enzimas del PMN mientras que la α_1 -AT inhibe elastasa y catepsina G y la α_1 -AQ, catepsina G. Sus características diferenciales son:

	elastasa	catepsina G
Peso molecular	29000-31000	23000-24000
$E_{280nm}^{1\%}$	9.85	6.64
Volúmen específico parcial	0.718	0.721
% carbohidratos	21.2	trazas
amino terminal	Ileu	Ileu

La secuencia comparativa de aminoácidos terminales es:

(Travis J., et al., 1978):

Elastasa leucocitaria	Ileu Val Gli Gli Treo Leu Ala
Catepsina G leucocitaria	Ileu Ile Gli Gli Glu Glu Gli
Elastasa pancreática	Val Val Gli Gli Treo Glu Ala
Quimotripsina pancreática (cadena B)	Ile Val Asn Gli Glu Ala Ala

Por su alto PM y baja concentración plasmática, es dudoso que la α_2 -M juegue el papel más importante en el control del daño tisular, además de su inhabilidad para penetrar la membrana plasmática. La α_2 -M acepta la transferencia de las proteasas desde los complejos con α_1 -AT o con α_1 -AQ. Los complejos α_2 -M-proteasas son luego rápidamente fagocitados en el hígado.

La α_1 -AT forma complejos con todas las serinoproteasas y esos complejos son estables al SDS. El tratamiento de esos complejos con nucleófilos tales como la benzamidina, produce la ruptura de los mismos y se genera una forma modificada del inhibidor (α_1 -AT'). Esta proteína ya no inhibe y tiene una secuencia diferente de residuos amino-terminales de la del inhibidor nativo, indicando la ruptura de la unión peptídica durante la interacción del inhibidor con la proteasa. La forma α_1 -AT' obtenida de los complejos con elastasa, catepsina G, tripsina, quimotripsina, trombina y plasmina tiene en todos los casos la misma secuencia amino terminal. Es probable que una unión Lis-Treo sea la que se rompe en estos casos.

α_1 -AT (nativa) Glu Asp Pro Glu Gli Asp Ala Ala Ala Gln Lis
Treo Asp Treo Arg His His Asp.

α_1 -AT' Treo Ile Pro Pro Glu Val Lis Fala Asn Lis Pro
(post-complejo) Fala Lis Fala Leu Met Ile.

La papaína produce el mismo efecto.

La α_1 -AT forma fácilmente complejos con elastasa pero

sólo muy lentamente con catepsina G.

Las histonas, el fibrinógeno, la hemoglobina y el colágeno son hidrolizados por la catepsina G. La hidrólisis es óptima a pH levemente alcalino. La caseína o azocaseína es el sustrato más común. La catepsina G es inhibida por DFP (diisopropilfluorofosfato), PMSF (fenil metanosulfonilfluoruro), SBTI (inhibidor de tripsina de semilla de soja) y las proteínas inhibitorias plasmáticas.

1. INHIBIDORES NATURALES DE PROTEASAS NEUTRAS LEUCOCITARIAS.

Características de los complejos formados.

La α_1 -AT y la α_2 -M juntas inhiben más del 90% de la actividad proteásica plasmática. (Ohlsson K., 1978).

La α_1 -AT inhibe serinoproteasas, la α_2 -M tiene un espectro más amplio inhibiendo todo tipo de endoproteasas.

La función biológica de α_1 -AQ es desconocida. Se une a la quimotripsina "in vitro" pero no a la tripsina.

	PM	G/L	umol	sitios de combinación.
α_1 -AT	55000	1.3	23.4	1
α_1 -AQ	68000	0.3	4.4	1
α_2 -M	725000	1.8	2.4	2

Estas proteínas actúan en humanos (en %) contra las enzimas:

	α_1 -AT	α_1 -AQ	α_2 -M
colagenasa	50		50
elastasa	92		8
proteínas catiónicas (similar quimotripsina)	2	12	86

La respuesta de α_1 -AQ durante las reacciones inflamatorias agudas es mucho más rápida que la de α_1 -AT. La concen-

tración de α_1 -AQ en suero puede aumentar dos veces durante las primeras 8 horas, mientras que la α_1 -AT tarda uno o más días. La α_1 -AQ puede jugar un rol importante en la defensa de los tejidos contra un efecto difuso de las proteínas catiónicas similares a quimotripsina, las cuales son liberadas extracelularmente durante la fagocitosis.

Los complejos de α_1 -AT con colagenasa granulocítica migran como α_2 -globulinas y producen distintas líneas de precipitación. Los complejos correspondientes de α_1 -AT con elastasa granulocítica migran como inter β -globulinas en gel de agarosa.

La inmunolectroforesis cruzada de los complejos produce zonas de precipitación, en lugar de líneas, en gel de agarosa en presencia de calcio.

Una zona de precipitación similar se forma con los complejos entre proteínas catiónicas similares a quimotripsina y α_1 -AQ que migran como β_2 -globulinas en gel de agarosa, comparada con α_1 -AQ libre que tiene una movilidad electroforética levemente menor que α_1 -AT.

Los complejos de α_1 -AT con proteínas catiónicas similares a quimotripsina no pueden demostrarse fácilmente por esta técnica.

No se observan cambios en la homogeneidad electroforética de α_2 -M en inmunolectroforesis después de la formación de complejos con cualquiera de las proteasas granulocíticas. Por enfoque isoeléctrico en poliacrilamida, se pueden separar los complejos de α_2 -M de la forma libre. La α_2 -M libre tiene un PI de 5.1 mientras que los complejos tienen un PI de 6. Los complejos de α_2 -M con las proteasas leucocitarias tienen una vida media de 12 minutos en la circulación. No muestran tendencia a disociarse.

Los complejos de α_1 -AT con elastasa persisten alrededor de una hora en circulación, luego se produce su disociación

con transferencia de la elastasa liberada a la α_2 -M; en el hombre y en el perro, los complejos son tomados por el sistema reticuloendotelial, por un mecanismo semejante al de la eliminación de las proteasas pancreáticas.

Los granulocitos PMN humanos están involucrados especialmente en la fagocitosis y en el turn-over tisular. (Schiessler H., et al., 1978).

Estos son procesos fisiológicos asociados con la degradación proteolítica de organismos invasores, complejos antígeno-anticuerpo y proteínas tisulares como por ej. la elastina en la involución uterina post-parto.

La potencia del sistema proteolítico de los PMN es evidente por el alto turn-over estimado para las proteasas neutras granulocíticas. Alrededor de 1 g de elastasa y alrededor de 1 g de colagenasa se sintetizan y se neutralizan en el cuerpo humano durante un día. Esta poderosa capacidad hidrolítica enzimática de los PMN puede volverse dañina para el organismo. En varios procesos patológicos, en sepsis y en leucemias agudas, la degranulación y liberación de enzimas proteolíticas se encuentra aumentada. También puede causar alteraciones una capacidad inhibitoria reguladora disminuída.

Un ejemplo es la deficiencia de α_1 -AT que se correlaciona con el enfisema pulmonar.

Además de los inhibidores plasmáticos ya nombrados, recientemente se ha descrito un inhibidor (β_1 -anticolagenasa) para colagenasas humanas, sérico, tiene un PM de 40000. (Schiessler H., et al., 1978).

También se hallaron importantes inhibidores de proteasas leucocitarias en secreciones de mucus y plasma seminal humanos así como en el fluido bronquial. Estos inhibidores, para los cuales se utiliza el término "antileucoproteasas", están caracterizados por su estabilidad en soluciones ácidas y su bajo PM (11000). Las "antileucoproteasas" de plasma seminal,

mucus cervical y mucus bronquial son idénticos en sus características antienzimáticas e inmunológicas y tienen características protéicas casi iguales.

Las funciones biológicas de los antileucoproteasas pueden ser la protección de las membranas celulares y de las proteínas solubles (γ -globulina, IgA) contra la destrucción proteolítica de las proteasas leucocitarias granulocíticas, liberadas en el curso de la respuesta inflamatoria.

2. INHIBIDORES SINTÉTICOS DE SERINOPROTEASAS.

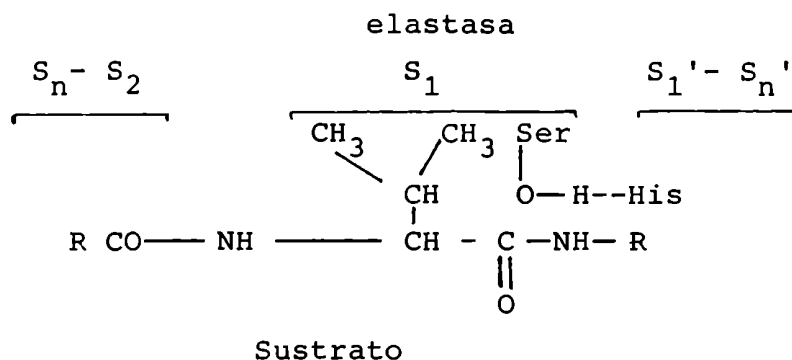
Las propiedades deseables de los inhibidores sintéticos incluyen especificidad para una o un número pequeño de proteasas, altas velocidades de reacción a una concentración razonable de inhibidor, número mínimo de reacciones con otras proteínas o moléculas biológicas y las apropiadas propiedades fisicoquímicas (solubilidad, hidrofobicidad, etc.)

Todas las serinoproteasas tienen el mismo residuo catalítico, un sistema cargado compuesto de un residuo formado por ácido aspártico, histidina y serina. La especificidad de las enzimas de la familia serinoproteasas es debida a unos pocos cambios en la secuencia de aminoácidos en las regiones de unión al sustrato, los cuales son reflejados en la geometría de esta porción de los sitios activos.

Se han efectuado numerosos estudios para la construcción de inhibidores de serinoproteasas. (Powers J.C., et al., 1978; Powers J.C., 1983).

Se considera que la elastasa leucocitaria es el agente destructor más importante. Hasta el presente, solamente una pequeña parte de la secuencia de aminoácidos de la elastasa ha sido determinada. Se elaboraron inhibidores sintéticos sobre la base de comparación con otras serinoproteasas, sus inhibidores naturales y su especificidad de sustrato.

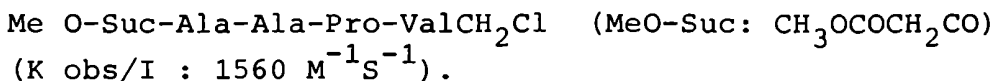
Esquema de reacción:



Unión de la valina al sitio reactivo de la elastasa leucocitaria. S_1 : sitio de reconocimiento de sustrato primario, los otros son subsitios que reconocen los residuos de aminoácidos en el sustrato. Este esquema se basa en estudios cristalográficos. (Schechter I., et al., 1967).

La primera clase de inhibidores selectivos desarrollados para elastasa leucocitaria fueron los péptidos-clorometilcetonas. Se unen irreversiblemente al sitio de unión al sustrato de la enzima y el grupo funcional clorometilcetona se coloca en posición para alquilar el sitio activo, residuo histidina. Además el OH de la serina reacciona con el grupo carbonilo del inhibidor formando un hemiacetal.

El inhibidor más efectivo de este grupo es :



elastasa

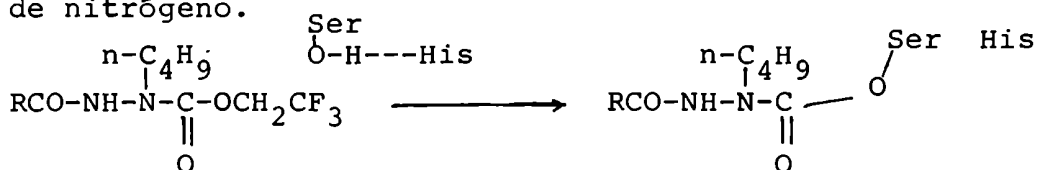


clorometilcetona

El mayor problema con el uso de estos inhibidores "in vivo", es su potencial de reaccionar en otros sitios. Una posi-

bilidad es obtener envolturas especiales, como por ej. microesferas de albúmina humana (HAM), que no son tóxicas, ni antigénicas y son biodegradables, además, por su tamaño único, son atrapadas en los capilares pulmonares después de la inyección endovenosa. Esto se ha comprobado en ratas.

Otros inhibidores son los agentes acilantes que inactivan a la enzima por acilación del sitio activo serina. Incluyen azapéptidos, donde el α -CH ha sido reemplazado por un átomo de nitrógeno.



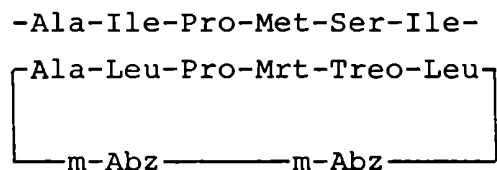
azapéptido

Ejemplo azanorleucina: Anle. Ac-Ala-Ala-Anle-OCH₂CF₃.

Los sulfonil fluoruros inhiben por reacción con el sitio activo serina formando un derivado sulfonilo: (Figura 5) su desventaja es su inestabilidad, se hidrolizan.

Análogos de α_1 -AT:

sitio reactivo de α_1 -AT
péptido cíclico análogo



m-Abz: m-aminobenzoilo.

El péptido cíclico inhibe a la elastasa leucocitaria en forma reversible ($K_I = 0.39 \text{ mM}$) y es específico ya que no inhibe a la elastasa pancreática porcina.

Otros, son los inhibidores heterocíclicos, tales como 4-quinazolininas y 4-cloroquinazolininas, N-sustituídas por ftalimidas y tioésteres del ácido N-acilantranílico, pueden ser útiles terapéuticamente.

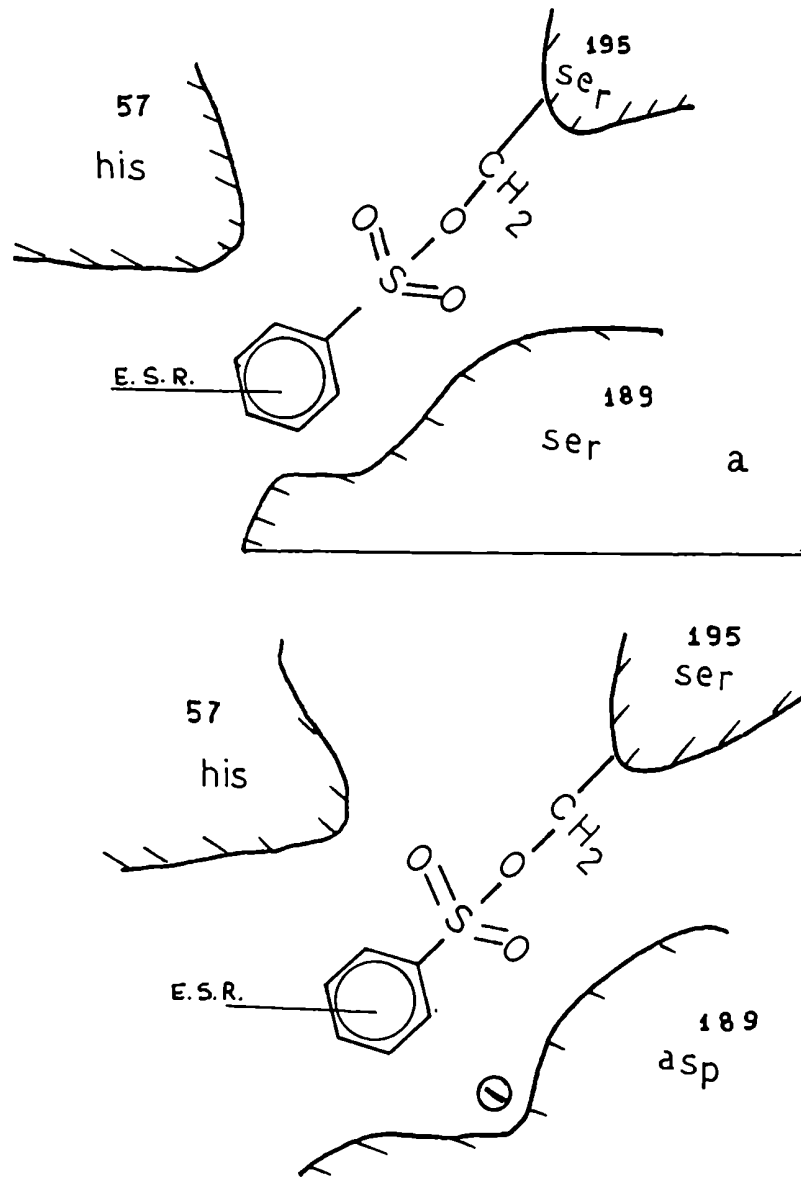


FIGURA 5: Inhibidores sintéticos de serino proteasas.
Sulfonil fluoruros: método de acción.
a: quimotripsina. b: tripsina y trombina.
E.S.R.: espectroscopía de resonancia spin-electrón.

III. ROL GENERAL DE LAS PROTEASAS NEUTRAS LEUCOCITARIAS EN LOS PROCESOS INFLAMATORIOS.

1. ACCION SOBRE EL SISTEMA DE QUININAS.

Los leucocitos neutrófilos liberan enzimas cuando interactúan con complejos antígeno-anticuerpo. Entre estas enzimas, hay una proteasa o proteasas con actividad de endopeptidasa, capaz de romper al quininógeno y liberar péptidos similares a quininas. Los lisosomas también contienen una aminopeptidasa con habilidad de convertir quininógeno a quinina y capaz de convertir quininas de mayores PM a bradiquininas. Una quininasa o enzima inactivante de quinina parece estar presente en los lisosomas y en la fracción citosólica de los neutrófilos, aunque aún no hay acuerdo sobre qué enzima es la que actúa en este sistema.

2. ACCION SOBRE EL COMPLEMENTO.

Los neutrófilos y los factores activos del sistema complemento son los dos constituyentes mayores de los procesos inflamatorios. (Smolen J.E., et al., 1981).

Los mecanismos precisos son poco conocidos, pero se ha sugerido que la actividad secuencial de esterasas sobre la superficie celular puede ser uno de ellos. El sistema complemento, está compuesto por 11 factores: C_1-C_9 con C_1 formado por $C_{1q}-C_{1r}-C_{1s}$.

La activación de la secuencia se inicia clásicamente por la unión de C_{1q} a la parte de IgG de un complejo inmune y finaliza con la lisis celular, si el proceso ha tenido lugar sobre la superficie celular.

El camino alternativo, como ya se mencionó, es la activación de C_3-C_9 , a través de la activación de properdina y pro-

activador de C_3 (C_3PA), por polímeros y endotoxinas, por ejemplo.

La cascada enzimática es semejante a la del sistema de coagulación en una secuencia de activación de enzimas-proenzimas.

Los componentes C_{3a} y C_{5a} actúan como anafilatoxinas y quemotaxinas e inducen también la liberación del contenido de los gránulos, independiente de la fagocitosis. Las proteasas leucocitarias liberadas, entre otras sustancias, actúan sobre los componentes del sistema complemento modificándolos. La acción se dirige preferentemente hacia C_3 y C_5 .

3. ESTIMULACION DE LINFOCITOS "IN VITRO"

La tripsina, quimotripsina y elastasa pancreática, estimulan los linfocitos "in vitro". (Bretz U., 1978).

Tales procesos pueden ser involucrados en la regulación de la función linfocitaria en el curso de la inflamación crónica, donde las proteasas de las células inflamatorias tienen acceso a los linfocitos. Estas pueden provenir de PMN, macrófagos activados y células invasoras de la sinovial inflamada.

La elastasa y la catepsina G de los PMN estimulan a los linfocitos B "in vitro" al igual que otras proteasas. La estimulación parece depender de su actividad enzimática y no está mediada por factores séricos o por productos de células T. El mecanismo parece ser una acción proteolítica directa sobre la superficie de los linfocitos.

4. VIA FIBRINOLITICA LEUCOCITARIA.

La activación del sistema de coagulación, culminando con la conversión del fibrinógeno a fibrina por acción de la trombina, constituye una respuesta primaria a la injuria, es-

tá asociada a diferentes mecanismos patogénicos y ha sido propuesta como evento fisiológico de equilibrio a bajo nivel. (Plow E.F., et al., 1978).

El proceso de coagulación puede estar localizado, como en una trombosis local y la fibrina depositada es estabilizada covalentemente por el factor XIII.

Alternativamente, la coagulación puede ser sistémica. En la coagulación intravascular diseminada (CID), pueden circular en la sangre formas insolubles de fibrina (oligómeros), y productos de degradación de fibronectina, una glucoproteína de alto PM de unión a superficies, moduladora de la función retículoendotelial y sensible a ruptura proteolítica por serinoproteasas. (Ehrlich M.I., et al., 1981).

La fibrinolisis representa un evento secundario a la coagulación, iniciada por un camino en común al de la coagulación, y es necesaria para el mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos. (Figura 6).

La fibrinógenolisis puede ser independiente de la coagulación sanguínea, y el fibrinógeno, más que la fibrina, es el sustrato de la degradación enzimática.

La plasmina, la forma activa del plasminógeno, puede ser generada por activadores del plasminógeno de origen humoral y celular.

Si bien este sistema, es considerado como el camino principal de la fibrinolisis y fibrinógenolisis, se han encontrado caminos alternativos, independientes del sistema del plasminógeno. (Henriksson P., et al., 1979).

La asociación íntima de los leucocitos con la fibrina depositada, produce actividad fibrinolítica que precede a la activación del plasminógeno. En el compartimiento vascular, los leucocitos están asociados a veces con trombos complejos consistentes de fibrina y plaquetas; en los espacios extravasculares, la acumulación de leucocitos en los sitios de

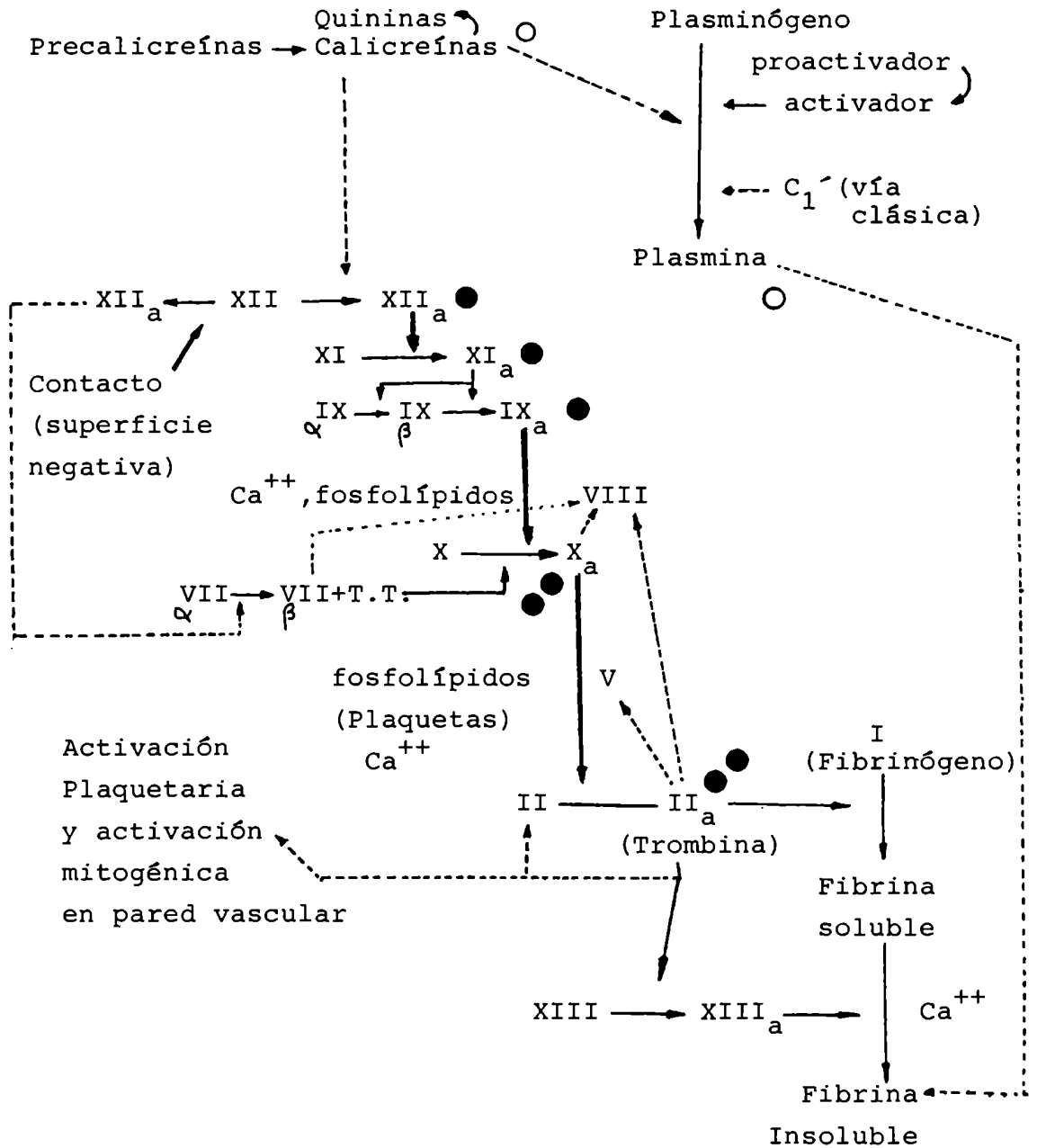


FIGURA 6: Esquema de coagulación e interrelación con otros sistemas. (calicroínas,quininas,fibrinolisis,complemento)

- Acción inhibitoria de Antitrombina III (ATIII), en la activación de la coagulación.
- Menor efecto. ● Mayor efecto.

injuria y la deposición de fibrina se encuentran frecuentemente como elementos centrales de la respuesta inflamatoria.

La actividad fibrinolítica de los leucocitos puede ser documentada como la capacidad del extracto leucocitario de inhibir la funcionalidad del fibrinógeno para formar fibrina después del agregado de trombina.

Los fragmentos del fibrinógeno/fibrina generados por las proteasas leucocitarias son diferentes estructural e inmunológicamente de los producidos por plasmina y poseen una potente actividad anticoagulante. (Bilezikian S.B., et al., 1977).

Las diferencias inmunoquímicas pueden destacar la contribución leucocitaria en ciertos estados patológicos.

Las enzimas elastasa y símil quimotripsina son las principales proteasas neutras responsables de la actividad fibrinolítica leucocitaria. La elastasa tiene especificidad por uniones peptídicas alanina y la símil quimotripsina por aminoácidos aromáticos y uniones leucina, dando la base de las diferencias de los fragmentos generados. (Plow E.F., 1980). También pueden destruir el inhibidor de plasmina (α_2 -antiplasmina) "in vitro". (Kingemann H.G., et al., 1981).

El camino fibrinolítico leucocitario "in vivo", puede ser consecuencia de la degradación intracelular de coágulos de fibrina, ingeridos por fagocitosis, o extracelular, cuando se liberan las proteasas fibrinolíticas. (Plow E.F., 1982).

Bajo ambas circunstancias, el camino fibrinolítico leucocitario puede contribuir al proceso fibrinolítico necesario para la disolución del coágulo en personas sanas y puede contribuir a los trastornos hemorrágicos hallados en varias enfermedades, también.

5. ROL PATOGENICO DE LAS PROTEASAS GRANULOCITICAS EN ALGUNOS ESTADOS DE ENFERMEDAD.

A) ARTRITIS.

La artritis reumatoidea (RA) es una enfermedad crónica en la cual la inflamación no supurativa de las articulaciones está combinada frecuentemente con manifestaciones extra-articulares. El proceso comienza dentro de las articulaciones con inflamación, edema e infiltración celular. A veces está asociada la disolución de la matriz cartilaginosa y hueso subcondrial. El mecanismo exacto no se conoce y parece que están implicadas enzimas intracelulares, algunas de ellas derivadas de leucocitos PMN, en especial enzimas colagenolíticas.

B) ENFISEMA PULMONAR.

Es uno de los tres trastornos crónicos obstructivos pulmonares en el hombre, los otros son bronquitis crónica y asma.

El enfisema es el cambio anatómico mayor en el pulmón, es una edematización permanente de los alvéolos y bronquiolos respiratorios acompañada por la destrucción de sus paredes.

El componente obstructivo de la enfermedad es debido al colapso prematuro de los conductos finos de aire (1-2 mm de diámetro) durante la espiración. La anomalía anatómica se deriva de la destrucción de los septos alveolares. El tejido conectivo es el componente de las paredes subalveolares, la destrucción de éstas vuelve a los finos bronquiolos entrecruzados, en tejido pulmonar enfisematoso y altamente susceptible al colapso.

La explicación más aceptada de esta enfermedad es la hipótesis de la "patogénesis por proteasas", por la cual la actividad de proteasas libres en el pulmón por encima del nivel de la actividad inhibitoria, inicia el proceso de destrucción

de este órgano. (Reilly C.F., et al., 1980). Los datos experimentales en animales parecen apoyar fuertemente esta hipótesis. Otros factores que pueden favorecer la enfermedad son: deficiencia de α_1 -AT, tabaquismo, etc.

La proteasa más efectiva en este proceso, es la elastasa leucocitaria proveniente de neutrófilos. No se excluye, sin embargo, un rol complementario para las hidrolasas neutrófilas (incluyendo otras proteasas neutras) en la patogénesis de la injuria pulmonar asociada al enfisema, ni se puede excluir un rol suplementario para las proteasas elastolíticas derivadas de otras células, como por ej. el macrófago alveolar, las plaquetas y quizás algo de elastasa pancreática circulante.

C) DEGRADACION DE INMUNOGLOBULINAS Y FORMACION DE AMILOIDE.

Fibrillas semejantes a amiloide pueden ser generadas "in vitro" por proteólisis limitada. La elastasa y quimotripsina leucocitarias pueden producir proteólisis de las cadenas livianas de las inmunoglobulinas y los fragmentos formados son variados. (Linke R.P., 1978; Solomon A., 1978).

La IgG del mieloma es rota por elastasa leucocitaria, en dos fragmentos similares, pero no idénticos, a los fragmentos Fc y Fab obtenidos por la digestión con papaína de las moléculas de IgG. (Solomon A., 1978).

6. ACTIVACION DE LA COAGULACION SANGUINEA.

Los leucocitos son el camino opcional de la iniciación de la coagulación sanguínea en las reacciones inflamatorias.

Los estudios realizados en plasma de perro por Kociba G. J., et al., 1972, "in vitro", han demostrado la producción

de material tisular semejante a tromboplastina en incubados leucocitarios. Esta actividad procoagulante parece ser mayor en células leucémicas y en fracciones de células de exudado pleural. Este material es un potente iniciador de la coagulación a través del factor VII. (Figura 6). Sin embargo, los leucocitos frescos, intactos, aislados de sangre periférica, no tienen actividad procoagulante detectable. La incubación de los mismos en plasma, suero o medios de cultivo sintéticos resulta en la producción de material procoagulante en el término de 4 horas. Este proceso, se bloquea por drogas que inhiben la síntesis protéica, y está marcadamente aumentado cuando la endotoxina (parte lipídica A) o la fitohemoaglutinina están presentes en el medio de incubación. (Prydz H., et al., 1978).

La actividad procoagulante leucocitaria desarrollada en presencia de endotoxina es capaz de producir trombosis en animales. (Zimmerman M., et al., 1977).

Se ha demostrado recientemente que la inmunoglobulina, particularmente en forma de complejos antígeno-anticuerpo solubles, es un potente estimulante de la producción de actividad procoagulante semejante a tromboplastina de los leucocitos humanos. Este efecto se observó con IgG autóloga, isóloga y heteróloga. La generación de actividad procoagulante no es debida simplemente a la liberación de material intracelular preformado durante la incubación. El material procoagulante producido "in vitro" parece estar contenido intracelularmente y unido a la superficie leucocitaria, ya que esta actividad aumenta con la incubación y no disminuye la actividad de las células intactas con el lavado; pero sí puede liberarse por congelamiento y descongelamiento antes de la incubación.

Los leucocitos estimulados por IgG pueden producir otras sustancias procoagulantes además de la símil a tromboplastina

tisular. Esto se indica por el acortamiento del tiempo de coagulación en plasmas deficientes en factor VII (necesario para la activación del sistema de coagulación a través de tromboplastina tisular). (Spurling N.W., et al., 1978).

Además, los leucocitos previamente sensibilizados por antígeno, por inyección parenteral en conejos, pueden interactuar con el sistema celular sanguíneo, induciendo reacción de liberación plaquetaria, y especialmente liberación de histamina plaquetaria. El leucocito responsable es el basófilo y el anticuerpo responsable de esta reacción es del tipo IgE (que se fija al basófilo).

La IgE induce depresión de los factores XII, XI y IX de coagulación y prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activado, disminución del número de plaquetas circulantes y del número de neutrófilos y basófilos.

También pueden inducir lisis del coágulo de fibrina a través de proteasas leucocitarias, como ya se ha indicado, y su liberación puede ser estimulada no líticamente por partículas de zymosan activadas. (Zimmerman M., et al., 1977).

Debemos reiterar, por su trascendencia, que la asociación íntima de PMN con los depósitos de fibrina en las reacciones inflamatorias y en los trombos vasculares indican un rol importante en la fibrinólisis localizada. (Matsuoka M., et al., 1969).

También las reacciones de Arthus y la hemorragia localizada de Schwartzman son dependientes de la presencia de granulocitos, así como la CID inducida por endotoxinas.

Estas reacciones no pueden producirse en animales granulocitopénicos, pero la reactividad es repuesta con PMN enteros o lisados de PMN. Este rol de los granulocitos en fibrinólisis y coagulación es atribuido a productos intrínsecos liberados a la circulación pues:

- 1- la actividad procoagulante es semejante a la de la tromboplastina tisular que induce la formación del trombo. Este proceso produce coagulación sanguínea y consumo de factores de coagulación y subsiguiente activación del sistema fibrinolítico.
- 2- El plasminógeno y su proactivador se han descrito en PMN, sin embargo esto no se ha confirmado.
- 3- La elastasa y quimotripsina leucocitarias que se liberan durante la fagocitosis frustrada en presencia de complejos antígeno-anticuerpo, componentes del complemento y endotoxinas, digieren varios factores de la coagulación incluyendo fibrinógeno.

Se ha descrito la habilidad de la elastasa y la quimotripsina leucocitarias para inactivar varios factores de coagulación purificados "in vitro". Si bien las enzimas se han utilizado en cantidades comparables, su habilidad para influenciar los factores de coagulación fue diferente. (Egbring R., et al., 1978).

Mientras que los factores VIII y XII se destruyen por ambas enzimas, la elastasa desnaturaliza fibrinógeno, factores II, V y XIII mucho más activamente que la quimotripsina. De importancia particular es el efecto de elastasa sobre la subunidad A del factor XIII (la transglutaminasa activa) y la subunidad S (la proteína transportadora). Durante el proceso de coagulación, la subunidad A se consume mientras que la concentración de la subunidad S permanece constante en el suero. El agregado de elastasa leucocitaria destruye ambas subunidades del factor XIII. (Váradi K., et al., 1980; Egbring R., et al., 1977).

Experiencias realizadas "in vitro" e "in vivo", con monos verdes, sugieren que las proteasas neutras del PMN, liberadas en presencia de endotoxinas, pueden inducir desórdenes de coagulación en pacientes con distintas enfermedades.

La endotoxemia y desórdenes de coagulación son observados frecuentemente en pacientes con leucemia aguda (LA) y en septicemia (S). (Clowes G.H.A., et al., 1983). En general los pacientes con LA tienen mayores niveles de α_1 -AT y menores niveles de α_2 -M respecto del normal. (Kordich L.C., et al., 1980). Esta diferencia se acentúa en presencia de elastasa leucocitaria.

Los desórdenes de coagulación están presentes a menudo en LA y en S; como la trombocitopenia, estos defectos son también responsables de varias complicaciones hemorrágicas.

La etiología de los defectos de coagulación en LA está en discusión abierta. Si bien se asume que la CID, debida a sustancias tromboplásticas liberadas de células leucémicas, es responsable de la coagulopatía, el espectro de los déficit de factores de coagulación, no se puede explicar por este único concepto. No ha sido probada la formación de trombina hasta ahora, y aún se discute la efectividad del tratamiento con heparina.

Estudios recientes, demuestran que la proteólisis producida por proteasas leucocitarias es responsable de la reducción en los niveles de los factores y del incremento en los niveles séricos de los productos de degradación de la fibrina (PDF) en pacientes con sepsis y LA. (Egbring R., et al., 1977; Kordich L.C., et al 1980; Sakuragawa N., et al., 1976).

Sin embargo, hay discrepancias entre los hallazgos observados "in vivo" y los reproducidos "in vitro", por lo cual aún continúan las investigaciones sobre el tema.

7. ENZIMAS LEUCOCITARIAS Y LA.

La aparición de proteasas granulocíticas en el plasma de pacientes con LA y S, puede resultar de la liberación leucocitaria bajo alguno de las condiciones previamente mencio-

nadas.

La causa desencadenante de la liberación de elastasa y otras enzimas a partir de blastos leucémicos es desconocida. En algunos casos puede deberse a la frecuente complicación séptica con subsiguiente endotoxemia observada en estos pacientes con LA. (Ohlsson K., et al., 1977).

Por otro lado, la liberación de proteasas de blastos leucémicos puede ocurrir como consecuencia de la quimioterapia aplicada. Sin embargo, se puede liberar elastasa leucocitaria en LA, aún antes de la acción de las drogas, ya que en el plasma de pacientes sin tratamiento se detecta el complejo de proteasas leucocitarias con inhibidores naturales como α_1 -AT y α_2 -M y además, se modifican los niveles plasmáticos de algunos de los factores de coagulación. (Egbring R., et al., 1977; Kordich L.C., et al., 1980).

Sin embargo, como ya se indicó, no hay un patrón único de proteólisis plasmática en estos pacientes y las modificaciones halladas dependen del tipo de LA en cuestión, siendo la leucemia aguda promielocítica (LAP) y la leucemia aguda mielomonocítica (LAMMO) las de mayores alteraciones. (Kordich L.C., et al., 1980).

En las LA descienden los niveles de algunos factores, hecho que sumado a su trombocitopenia y grado de infiltración hepática (Vainer H., et al., 1979; Weinfeld A., et al., 1975; Zuzel M., et al., 1979) hace que tengan una severa tendencia hemorrágica. (Biland L., et al., 1978). Además se puede producir la activación del sistema de coagulación, por acción de enzimas procoagulantes leucocitarias y/o trombina generada por las mismas, culminando en una CID. (Kordich L.C., 1982).

Tratando de reproducir un sistema semejante al hallado en el plasma de los pacientes, se utilizaron extractos leucocitarios "in vitro" y luego se separaron las actividades procoagulante y fibrinolítica de los mismos por filtración en

Sephadex G-200 y cromatografía de intercambio iónico.

Cuando se incubaron los extractos leucocitarios libres de eritrocitos y plaquetas, obtenidos de leucocitos normales y leucémicos por aislamiento selectivo, lavado y sonicación, se obtuvo una gran actividad procoagulante en el sistema de plasma recalificado, con acortamiento de los tiempos de coagulación del orden de 40 segundos, o mayores. Se utilizaron diferentes concentraciones protéicas y se incubaron a distintos tiempos: 10,30,60 y 90 minutos a 37°C.

Se encontró, en concordancia con otros autores, (Egbring R., et al., 1977) que los resultados dependen de la concentración de enzimas leucocitarias y se observó que con 100 ug/ml de proteínas leucocitarias hay tendencia de disminución de los niveles de factores V, VIII y XII y en cambio, activación o potenciación de los factores IX y XI. A mayor concentración la activación fue más evidente. (Tabla 3).

Los extractos leucocitarios se filtraron por Sephadex G-200 se separaron sus componentes y se utilizó el pico 1 con actividad procoagulante y sin actividad fibrinolítica ni inhibitoria, comprobadas experimentalmente, (Tabla 4). El efecto obtenido fue algo diferente al descrito anteriormente. Se observó disminución de los factores V, IX, XI y XII y aumento de factor VIII a bajas concentraciones protéicas de enzimas; a mayores concentraciones el efecto de activación aumentó. En este tipo de experimentos, no se detectó variación de los niveles de Antifactor X_a -Antitrombina III-Cofactor de la Heparina (ATIII), biológicos, observándose en cambio, variación de la ATIII por inmunoelectroforesis bidimensional (ATIII_{lib}), esto último coincide con lo hallado en los plasmas de pacientes con LA. Figuras 7, 7.1 y 7.2.

El principal inhibidor de trombina es la ATIII que inhibe el 75 % de la actividad trombínica; se necesita mayor cantidad a nivel de trombina que a nivel de X_a , pero es más afín

Concentración protéica del extracto (µg/ml de plasma)	Leucocitos normales		leucocitos LAMMO		Leucocitos LLA	
	100	400	100	400	100	400
FACTORES (%) V	15-40	40	40-80	100	40-80	100
VIII	25-40	40	100-220	25	30-50	100
IX	150-200	200	100-250	170	70-100	200
XI	100-120	250	200-400	250	100-300	100
XII	200-300	200	10-70	33	15-100	180

Cofactor de la Heparina: 50-80 %.

Placas de Fibrina sin calentar: positivas.

Placas de Fibrina calentadas: positivas.

TABLA 3; EXTRACTOS LEUCOCITARIOS CRUDOS INCUBADOS CON PLASMA HUMANO NORMAL.

(Placas de Fibrina observadas a las 24 y 48 horas).

LAMMO = Leucemia aguda mielomonocítica.

LLA = Leucemia aguda linfoblástica.

PICO 1 eluido de lisados leucocitarios filtrados en Sephadex G-200. Incubados con plasma humano normal.

Concentración protéica del eluido (µg/ml plasma)	Leucocitos normales		Leucocitos LAMMo	
	10	30	10	30
FACTORES (%) V	40-100	40-100	35-80	40-80
VIII	200-220	100	180-220	90
IX	40-100	200	40-45	100-180
XI	100-160	200	100-160	100-200
XII	25-35	100/300	20-30	25/180

Cofactor de la Heparina: 50%. Placas de Fibrina calentadas y sin calentar: negativas.

PICO 1 eluido por cromatografía de intercambio iónico (catiónico) en CM-Sephadex C-50. Incubados con plasma normal.

Concentración protéica del eluido (µg/ml plasma)	Leucocitos normales		Leucocitos LAMMo	
	1.0		1.5	
FACTORES (%) V	25-40		25-40	
VIII	200-500		150-200	
IX	200-500		200-500	
XI	240-500		100-200	
XII	250-500		200-300	

Cofactor de la heparina: 50%. Placa de fibrina sin calentar: positiva. Placa de fibrina calentada: negativa.

TABLA 4: Incubados de plasma humano normal con eluidos de lisados leucocitarios.

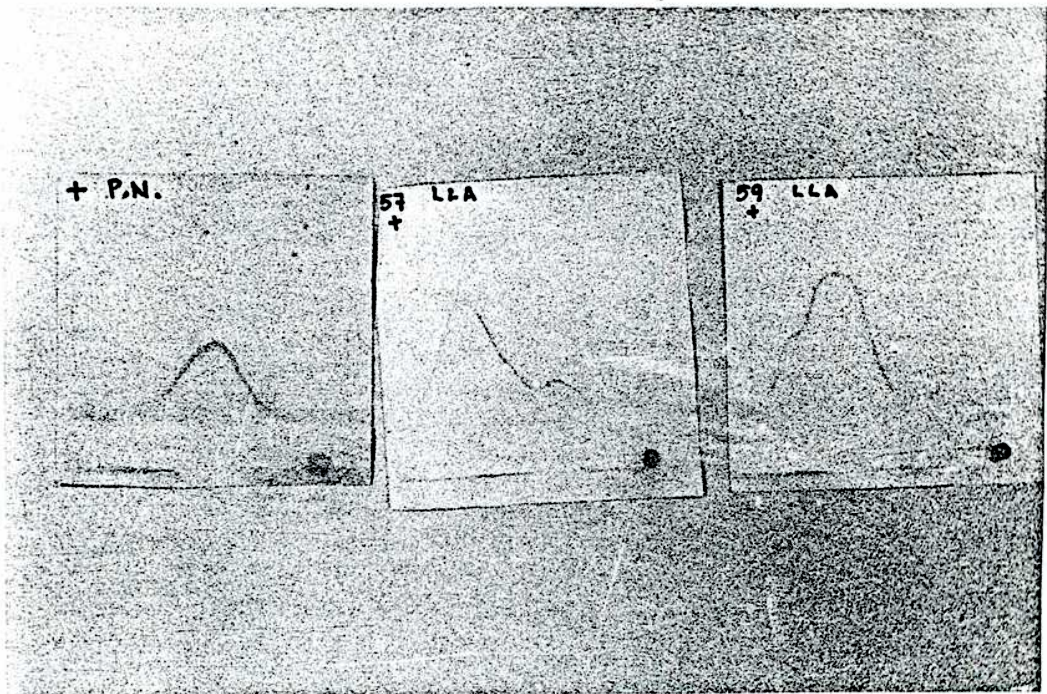


FIGURA 7 : Antitrombina III inmunológica bidimensional en acetato de celulosa en leucemias agudas sin tratamiento previo.

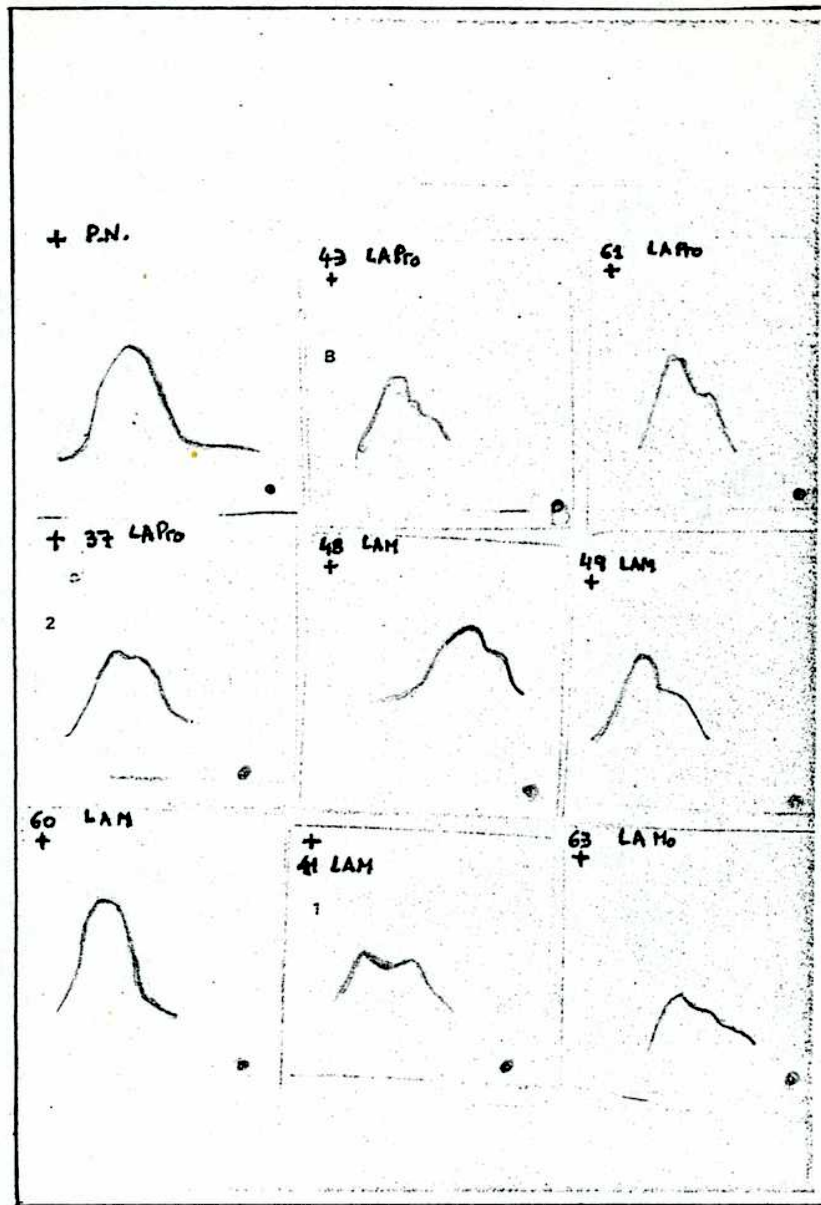


FIGURA 7.1 : Antitrombina III inmunológica bidimensional en acetato de celulosa en LA sin tratamiento previo.

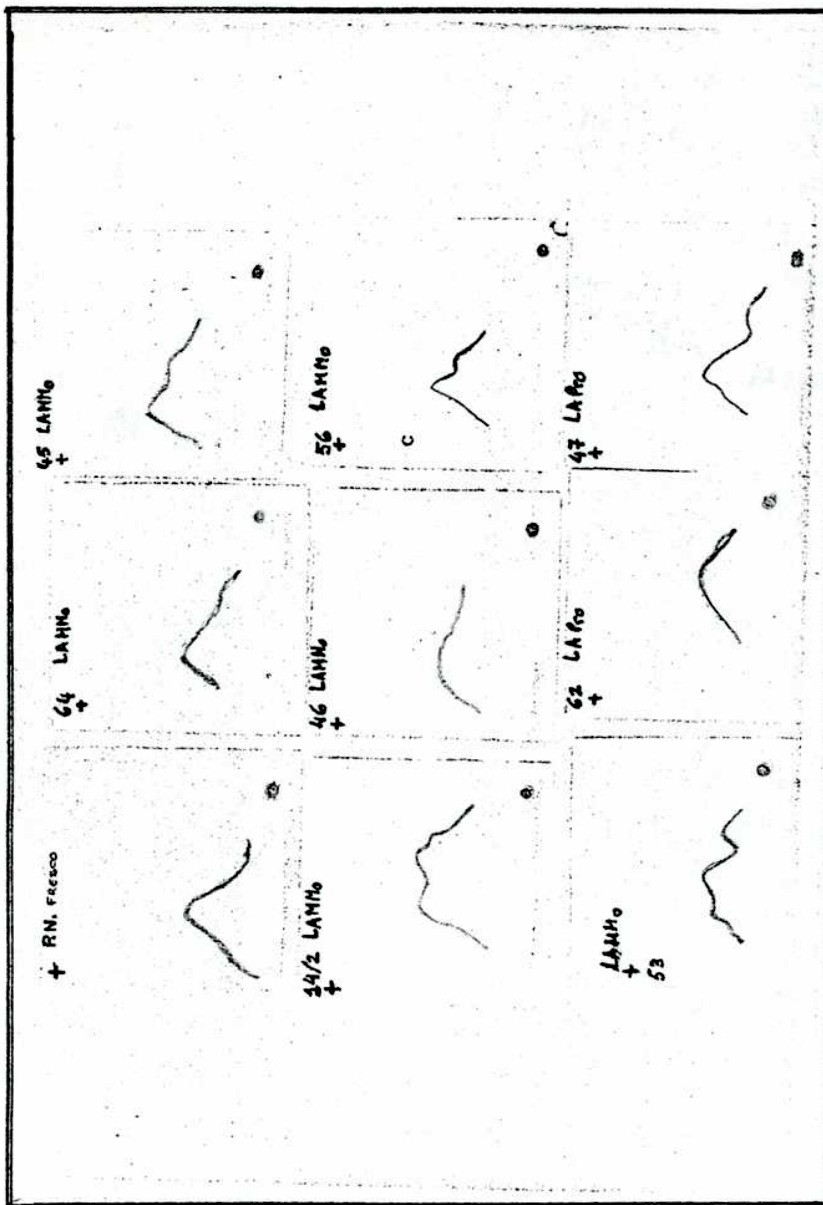


FIGURA 7.2 : Antitrombina III inmunológica bidimensional en acetato de celulosa en LA sin tratamiento previo.

con éste. La velocidad de reacción se potencia por heparina. (Biggs R., 1976).

La ATIII es fundamental en el mantenimiento del equilibrio dinámico de coagulación, ya que el déficit congénito o adquirido de la misma o una alteración en la secuencia de aminoácidos de la molécula, provoca estados trombóticos recurrentes (Egeberg O., et al., 1965; von Kaula E., et al., 1967; Marciniak A. et al., 1974; Sas G., et al., 1974; Ambruso D.R., et al., 1980; Barbui T., et al., 1981; Bounameaux H., et al., 1978) en adultos y en niños prematuros (Hathaway W.E., et al., 1978) hasta los 6 meses de vida (Witt I., et al., 1983).

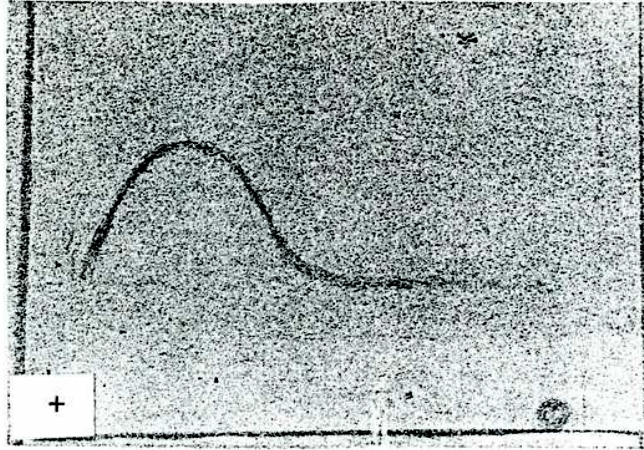
La ATIII sufre cambios en la movilidad electroforética por acción de trombina, cuando se estudia un suero por inmunoelectroforesis bidimensional con heparina en el medio (Kordich L.C., 1982; Sasseti B., et al., 1980; Sas G., et al., 1975).

Un plasma normal en el sistema anterior, muestra un pico de ATIII de mayor movilidad hacia el ánodo y a veces dos muy pequeños (cola) de $ATIII_2$ y $ATIII_3$. Cuando se procesa un suero se observa un aumento importante de $ATIII_2$ y menor de $ATIII_3$ a expensas de la disminución de $ATIII_1$ (que presenta la ATIII libre, no complejada). Figura 8. (Sas G., et al., 1975a).

Estos cambios, cuando se hallan en plasma, para algunos autores, son sinónimo de diagnóstico de CID (Rodeghiero F., et al., 1977), teoría que ha sido y es controvertida.

En LA se encontró disminución de los niveles plasmáticos de ATIII (Rasche H., 1983) y también se halló modificación de $ATIII_{ib}$, sin cuadro clínico ni parámetros de laboratorio compatibles con CID. En los incubados de plasma normal con extractos leucocitarios de baja concentración, se halló disminución de $ATIII_1$ y aumento de $ATIII_2$ y $ATIII_3$. Si bien esta alteración debe estar presente en un cuadro de CID clásica, su sola presencia no es diagnóstico de CID, pero es sin duda un

A) PLASMA HUMANO NORMAL.



B) SUERO HUMANO NORMAL.

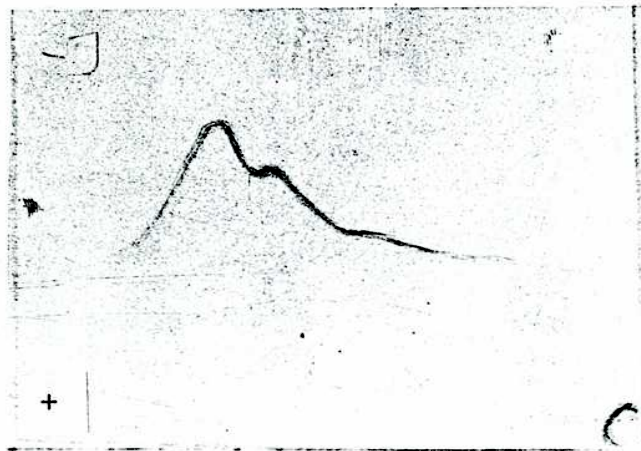


FIGURA 8: Antitrombina III inmunológica bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado. Comparación entre plasma humano normal y el suero derivado del mismo.

+ = ánodo.

hallazgo precoz en el cuadro de alteraciones que se suceden en las coagulopatías de consumo.

En las LA esta alteración fue hallada en la mayoría de los casos en pacientes sin tratamiento quimioterápico instalado (Kordich L.C., et al., 1980). Estas modificaciones, obtenidas también "in vitro" por enzimas leucocitarias, confirman lo complicado que es el diagnóstico de una coagulopatía en estos pacientes; ya que la presencia de enzimas diferentes a la trombina, pueden provocar cuadros de laboratorio semejantes a los que ella produce, o bien dar lugar a la formación de pequeñas cantidades de la misma por acción proteolítica sobre los factores de coagulación, especialmente sobre el factor X o sobre la Protrombina o factor II, (Davie E.W., et al., 1977; Wada H., et al., 1983) los dos lugares claves de la activación sanguínea del sistema de coagulación. (Figuras 6 y 9). (Lundblad R.L., et al., 1977).

Nuestra experiencia que demuestra la acción de elastasa pancreática (EP) sobre ATIII en plasma normal, permite pensar que la misma puede ser complejada con las enzimas liberadas de los leucocitos leucémicos, o digerida por las mismas, sufriendo por ambos caminos modificaciones estructurales y disminución en sus niveles plasmáticos, alterando como una consecuencia directa, el equilibrio hemostático. (Tabla 5).

Dada la importancia de esclarecer esta cuestión para adoptar una terapia secundaria a la aplicada a la enfermedad de base, más adecuada y efectiva, se hizo necesario el estudio de estas alteraciones en sistemas purificados. Para ello se procedió, en primer lugar, a la purificación de ATIII a partir de plasma humano normal y se purificaron los extractos leucocitarios de controles normales y de varios pacientes leucémicos y algunos factores de coagulación.

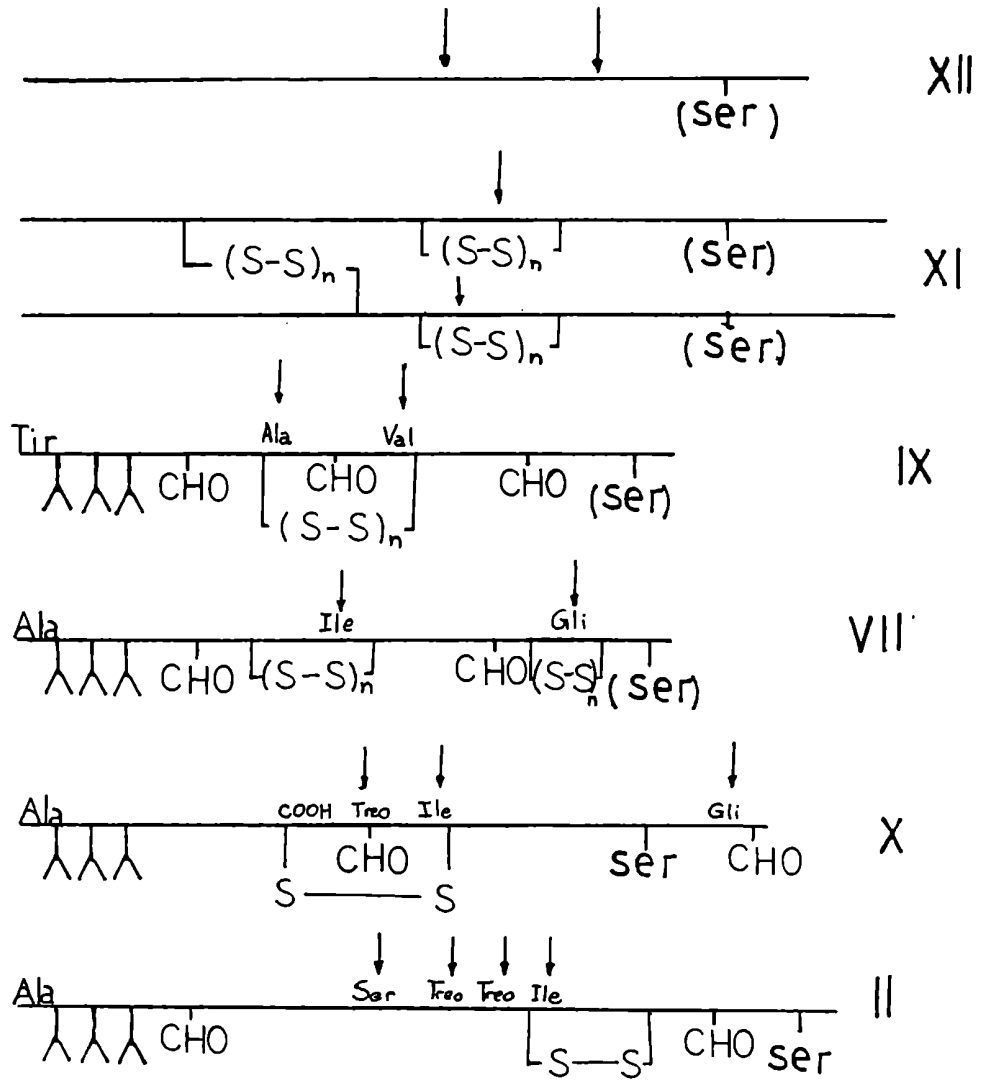


FIGURA 9: Factores de coagulación.

Sitio activo Serina.

(SER): sitio activo detectado por DFP.

Ser : sitio activo determinado por análisis secuencial.

CHO : hidratos de carbono.

λ : ácido γ-carboxiglutámico.

(Lundblad R.L., et al., 1977).

IV. ANTITROMBINA III.

Características.

La ATIII se produce en el hígado y cordón umbilical (Thaler E.,1983). La mayor concentración en el organismo se encuentra en la microvasculatura del pulmón, riñón y en las paredes de los grandes vasos. (Zimmermann R.E.,1983).

Es una α_2 -globulina plasmática, que actúa como el principal inhibidor de trombina y X_a . La ATIII-Anti- X_a -Cofactor de la Heparina es la misma proteína, se diferencia de acuerdo al medio de reacción (Abildgaard U.,1979; Seegers W.H., 1978); un μg de ATIII inhibe 15 U de X_a , capaces de producir 750 U de trombina (Yin E.T., et al.,1974). En menor grado inhibe los factores XII_a , XI_a , IX_a (Østerud T.,1976), plasmina, C_{1s} , (C_1 -esterasa) (Steinbuch M., et al.,1983), calicreínas, (Burrowes H.,1975), tripsina (Ogston D.,1976), quimotripsina y uroquinasa (Clemmensen I.,1978) y actúa como cofactor de la heparina en la terapia anticoagulante con heparina. (Rosenberg R.D., et al.,1973).

Es una glucoproteína compuesta por una sola cadena polipeptídica con residuo amino-terminal histidina (Kurachi K., et al.,1976) y un peso molecular cercano a 60000 Dalton (55000-63000). Figura 10.1. La estructura primaria de la ATIII está formada por 424 aminoácidos (Rosenberg R.D.,1983). Los tres puentes disulfuros están ubicados entre: Cís 8-Cís 128; Cís 21-Cís 95 y Cís 239-Cís 422. (Magnusson S., et al.,1983).

El contenido de hidratos de carbono en la ATIII humana varía entre 9% a 15%, tiene cuatro cadenas de hidratos de carbono (Mizuochi T., et al.,1980) unidas a cuatro grupos asparagina de la molécula en las posiciones 96,135,155 y 192.

Las cadenas de azúcares contienen glucosa, N-acetil-glucosamina, galactosa, manosa y ácido siálico, entre otros.

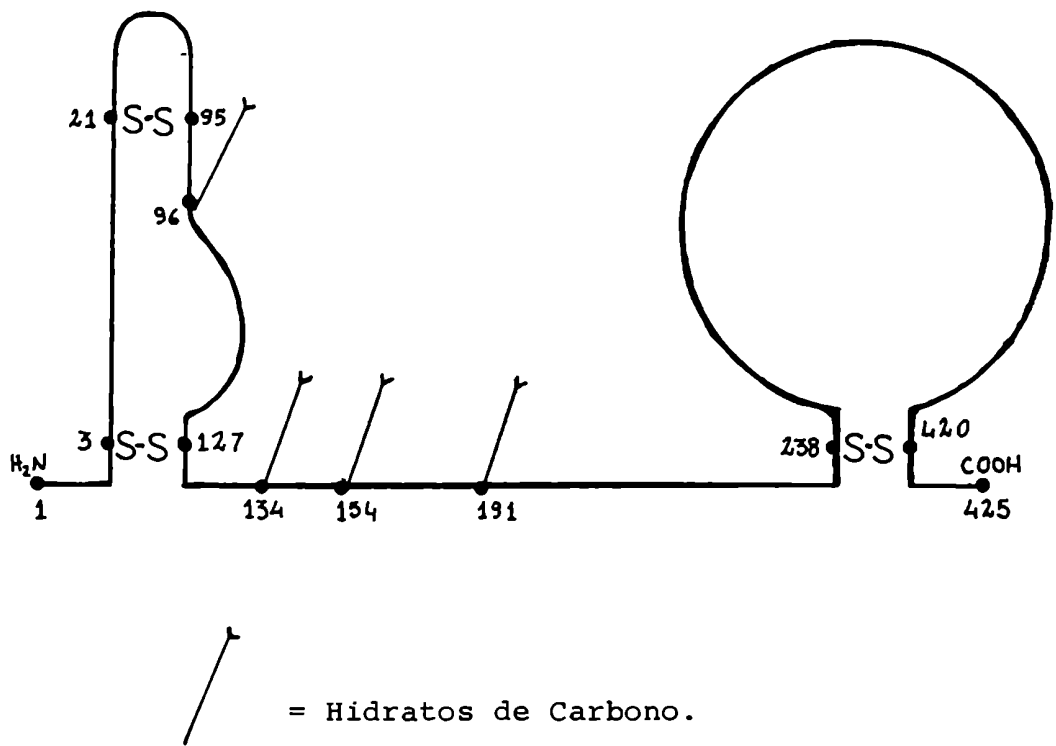


FIGURA 10.1 : ESTRUCTURA DE LA ANTITROMBINA III.

(Magnusson S., et al., 1983).

La flecha cortada indica el sitio de racción para la trombina.

De esto se deduce que la inhibición de la coagulación por acción de la heparina involucra tres componentes: heparina, alguna de las numerosas serinoproteasas de coagulación (Davie E.W., et al., 1977) y el inhibidor ATIII. Figura 10. (Rosenberg R.D., et al., 1977).

La velocidad de inactivación de serinoproteasas por ATIII es lenta en ausencia de heparina, la presencia de la misma acelera esa reacción marcadamente, (unas 1800 veces; Tollefsen D.M., et al., 1982).

La interacción con trombina produce un complejo estequiométrico, con unión covalente en el sitio activo serina de la trombina (unión éster) (Owen W.G., 1976) y la trombina cataliza el clivaje proteolítico de una unión Arg-Ser en la ATIII (Downing M.R., 1980). La inhibición de trombina por α_1 -AT y ATIII sigue una cinética de segundo orden. En sistemas purificados la ATIII es el inhibidor más efectivo de la acción procoagulante y esterásica de esta serinoproteasa. (Longas M. O., et al., 1980a; Zimmermann R.E., 1983).

El aumento de la velocidad de la reacción por heparina, implica que hay una interacción entre la heparina y una o ambas proteínas. (Longas M.O., et al., 1980; Griffith M.J., et al., 1979).

La modificación química de los grupos lisina en la ATIII elimina la actividad de cofactor de la heparina del inhibidor y producen un efecto menor en la actividad inhibitoria progresiva sobre la trombina, demostrando que al menos algunos de los residuos lisina son responsables de la unión con la heparina. (Owen W.G., 1977).

La interacción produce cambios conformacionales en las estructuras secundarias y terciarias de la ATIII y la trombina (Zimmermann R.E., 1983). Estos cambios son más profundos

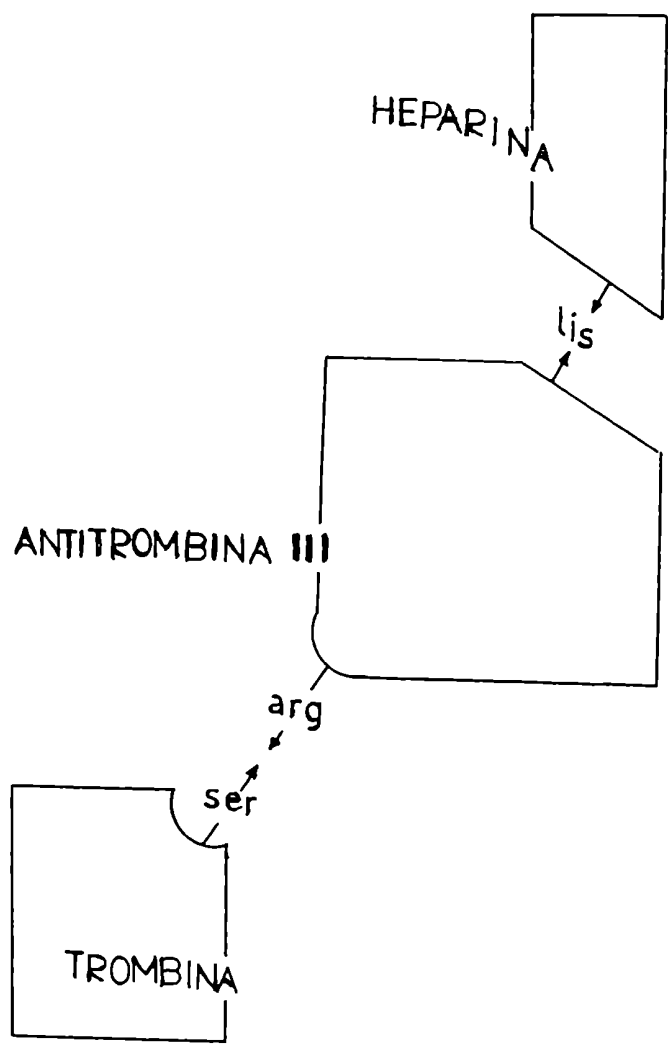


FIGURA 10: Esquema de reacción Trombina-Antitrombina III-Heparina.
(Rosemberg R.D. et al.,1977).

cuando la heparina está presente y provoca la exposición de los residuos tirosina y triptofano, los cuales normalmente están ocultos en las proteínas. Además, la heparina produce un aumento marcado en la fluorescencia del triptofano de la ATIII, crítico para su unión al inhibidor. (Nordenman B., et al.,1978; Olson S.T.,et al.,1981).

La heparina, obtenida comercialmente, es un polisacárido polisulfatado heterogéneo con una cantidad de macromoléculas cuyos PM varían entre 5000 y 30000. Es un polímero de grupos de ácidos urónicos (idurónico y glucurónico) y disacáridos de glucosamina unidos, con un grado variado de sulfatación o acetilación de grupos aminos y oxhidrilos, Figura 11. Se fracciona en heparina de alta afinidad, que representa un tercio del total, conteniendo prácticamente toda la actividad anticoagulante y heparina de baja afinidad con muy poca actividad anticoagulante (Pixley R.,et al.,1982). La heparina de alta afinidad se une fuertemente al inhibidor ATIII (Olson S.T.,et al.,1981a; Róka L.,et al.,1983).

Las características químicas y funcionales de las dos heparinas son:

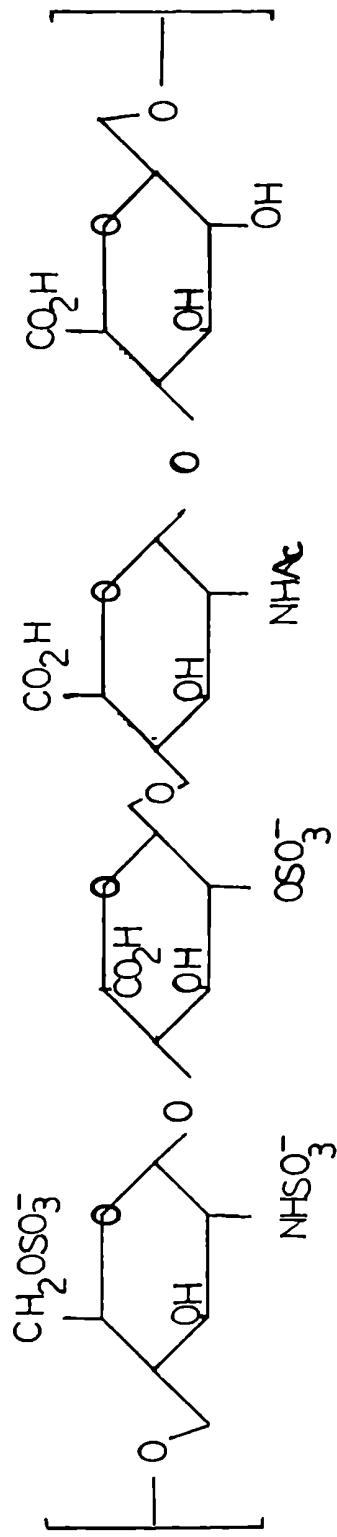
Heparina	ác.glucurónico*	sulfato/disacárido	N-sulfato/ O-sul./ Disacárido	
muy activa	30.7	2.26	0.70	1.36
casi inactiva	19.3	2.37	0.95	1.42

* el valor de ácido idurónico puede ser calculado sustrayendo el valor de ácido glucurónico de 100%.

La diferencia fundamental entre las dos heparinas se encuentra, aparentemente, en el contenido del tetrasacárido 1 β obtenido luego del clivaje de la heparina con ácido nitroso a pH 1.5, que es mucho mayor en la heparina activa.

(Rosenberg R.D.,et al.,1983).

La actividad específica de la heparina de bajo PM (menor de 10000) en sistemas purificados contra trombina, es menor que la de mayor PM (mayor que 20000) mientras que las activi-



Hexosamina Ac. idurónico Hexosamina Ac. glucurónico

FIGURA 11: Estructura de la Heparina.

dades anticoagulantes específicas de las heparinas contra el factor X_a son mucho menos dependientes de sus PM. Esto ha sido explicado por la interacción que se establece, además, entre la trombina y la heparina durante la inactivación de la trombina por el complejo heparina-ATIII; dicha interacción se halla reducida con los complejos heparina de bajo PM-ATIII. En cambio, el factor X_a no se une a la heparina y no está influenciado por la calidad de la misma. Los complejos covalentes heparina-ATIII inhiben al factor X_a con una constante de velocidad de segundo orden de $2.1 \pm 0.1 \times 10^6 M^{-1} S^{-1}$ (Ceustermans R., et al., 1982).

La cinética de la unión de heparina de alta afinidad con ATIII humana ha sido estudiada a $\mu=0.15$, pH 7.4 y 25°C, por medio de estudios fluorimétricos. La constante de velocidad de pseudo-primer orden observada varía hiperbólicamente con la concentración de heparina, con una constante de velocidad limitante de $440 \pm 90 S^{-1}$; demostrando así, que la unión a la heparina es un proceso de dos etapas que involucra un cambio conformacional en la molécula de ATIII.

La constante de disociación del complejo heparina-ATIII es $1.1-1.5 S^{-1}$ a $\mu=0.15$ y la constante de equilibrio a $\mu=0.15$ es $7.2 \pm 1.9 \times 10^{-8} M$ (Olson S.T., et al., 1981a).

Aparentemente, dentro del rango de alto PM, la habilidad de la heparina para promover la proteólisis de ATIII catalizada por trombina, permanece constante, independientemente de la longitud del polisacárido, mientras que el porcentaje de degradación varía de acuerdo a los cambios en la velocidad de inhibición de la trombina. En el rango de bajos PM, la habilidad de promover la proteólisis puede deberse a las características estructurales de la heparina independientemente del sitio de unión para la ATIII. (Marciniak E., et al., 1982).

Otros glucosaminoglucanos, particularmente dermatán y heparán sulfatos, también poseen actividad anticoagulante

(Cofrancesco E., et al., 1981), habiendo una buena correlación entre la densidad de carga de los mucopolisacáridos y su actividad.

Se han elaborado sustancias anticoagulantes semejantes a la heparina, por reacción de distintos α -aminoácidos con poliestireno clorosulfonado entrecruzado (PS-SO₂-AA); este material insoluble posee una gran actividad antitrombótica cuando se suspende en el plasma y actúa como catalizador de la reacción trombina-ATIII. La actividad es semejante a la de la heparina. Los sitios activos de los compuestos poliméricos simulan, en algunos aspectos, a los sitios activos de la heparina. (Jozefowicz M., et al., 1983).

La heparina, además de la ATIII, activa a un segundo inhibidor en plasma humano, llamado Cofactor de la Heparina II, una glucoproteína de una sola cadena de PM 65600 (Tollefsen D.M., et al., 1982) y que requiere mayor concentración de heparina que la ATIII (Friberger P., et al., 1982).

También se ha dicho que la heparina puede inhibir reversiblemente la activación de II y X aún en ausencia de ATIII. Esta acción, ha sido demostrada sólo en sistemas con los factores de coagulación purificados y con altas concentraciones de heparina (10 U/ml). En contraste, con concentraciones muy bajas de ATIII (1%) agregadas a un plasma totalmente deficiente en ATIII y en presencia de 1 U de heparina/ml, no hay activación de los factores; con lo cual se deduce que el efecto anticoagulante de la heparina, independientemente de la ATIII, en plasma normal es prácticamente despreciable. (Ofosu F.A., et al., 1981).

La heparina también acelera la reacción de inhibición entre la ATIII y el factor IX_a (Fish W.W., et al., 1982) y según algunos autores, también al factor VII purificado. (Godal H. C., et al., 1974; Østerud T., 1976).

Los complejos de ATIII y trombina humanas obtenidos en presencia de heparina tienen una depuración plasmática, en ratas, de $t_{1/2}^1 = 2$ minutos y la misma se realiza a través del hepatocito (Shifman M.A., et al., 1982).

La ATIII humana, inyectada en la rata, tiene una depuración plasmática que muestra una fase temprana rápida y una fase lineal, debido a la extensa distribución de ATIII en el compartimiento intracelular y la linfa. Este proceso, en la rata, dura $t_{1/2}^1 = 2$ a 3.5 minutos para la fase rápida.

La depuración plasmática de la ATIII humana con el sitio reactivo bloqueado, es igual al de la ATIII humana nativa y está por encima de 24 horas en el hombre (alrededor de 60 horas). Esto indica que en el estado normal, hay muy poca o ninguna activación del sistema de coagulación. (Collen D., et al., 1977).

La depuración plasmática rápida de los complejos, no está afectada por bloqueo del sistema retículo endotelial, sin embargo, hay competición cuando estos complejos están en exceso, sugiriendo un mecanismo de depuración mediado por receptores. Los determinantes neoantigénicos formados cuando la ATIII se une a la trombina formando complejos, son reconocidos y dan lugar a la captación de los mismos por los hepatocitos. Esto puede ser una señal para aumentar la síntesis de ATIII y otros factores de coagulación y dar como resultado el restablecimiento del equilibrio hemostático. (Shifman M. A., et al., 1982).

La ATIII actúa también contra la tripsina (Wong R.F., et al., 1982). La velocidad de formación del complejo es semejante a la velocidad de aparición de los productos. La tripsina activa, se disocia espontáneamente del complejo en un tiempo medio de 15 minutos. La ATIII resultante es un inhibidor modificado que ya no puede actuar contra trombina o tripsina pero retiene la habilidad de unirse a la heparina. A pesar de que la ATIII modificada es el mayor producto de la reacción

con tripsina, algo del inhibidor activo está presente en la mezcla de reacción y también parecen estar los complejos estables. La velocidad de reacción de ATIII con tripsina es acelerada por heparina y la hidroxilamina puede causar la disociación del complejo formado.

Actualmente se están utilizando concentrados de ATIII, obtenidos a partir de plasma humano normal, en la terapia antitrombótica (Vinazzer H., et al., 1983; Schramm W., et al., 1983). y en deficiencias congénitas y adquiridas del inhibidor (Fritsche H.M., et al., 1983). Los concentrados pueden almacenarse a 4°C (Hopmeier P., et al., 1983; Nienhaus K.H., et al., 1983) durante 22 días sin pérdida de ATIII inmunológica (ATIIIi) en cambio, los niveles de ATIII biológica o funcional (ATIIIb) disminuyen a las 24 horas, razón por la cual se ensayan otros métodos de conservación.

Aunque la ATIII es el inhibidor natural específico para trombina, su purificación es costosa; por esta razón en la terapia antitrombótica en animales de experimentación, se han ensayado algunos inhibidores sintéticos. (Olsson P., et al., 1983).

Uno de ellos, el inhibidor de trombina sintético N°805 (MD 805; ácido monohidrato (2R,4R)-4-metil-1-[N²-(3-metil-1,2,3,4-tetrahidro-8-quinolina-sulfonil)-L-arginil]-2-piperidinacarboxílico) (Kumada T., et al., 1981), se utilizó en animales con deficiencia de ATIII inducida artificialmente por inyección de γ -globulina anti-ATIII.

La heparina no es eficaz en estos casos para inhibir la trombosis provocada por trombina, en cambio, el inhibidor sintético MD 805 es eficaz ya que actúa directamente sobre la trombina.

Varios autores han hecho incapié en el potencial trombogénico paradójico de la heparina, encontrando que ésta, especialmente durante una terapia prolongada, reduce los niveles de ATIII circulante acelerando su consumo. (Marciniak E., et al., 1977; O'Brien J.R., et al., 1977); por otro lado, ésta es

la terapia conveniente cuando el mecanismo de coagulación está activado (CID). Por lo tanto, los compuestos sintéticos y de baja toxicidad, pueden brindar cierta ayuda a esta situación conflictiva ya que pueden obviar la presencia de heparina y ATIII cuando se requieran tratamientos prolongados.

Además de la ATIII, otros inhibidores plasmáticos como α_2 -M y α_1 -AT, también tienen acción sobre la trombina, pero en menor escala. (Róka L., et al., 1983a). La α_2 -M es el más efectivo de los dos inhibidores y el complejo formado, mantiene inalterada la actividad esterásica de la enzima (Dovining M., 1978) (Gonias S.L., et al., 1981). Su acción no se potencia por heparina. La reacción inhibitoria ocurre en dos etapas: 1) clivaje proteolítico de la unión o uniones peptídicas en la molécula de α_2 -M; 2) cambio conformacional de la molécula de α_2 -M modificada, con atrapamiento de la enzima. El complejo resultante α_2 -M-enzima no puede atacar sustratos de alto PM pero retiene su habilidad de hidrolizar pequeños sustratos como TAME o BAME.

La enzima unida a la α_2 -M en el complejo, se vuelve inaccesible para los otros inhibidores. (Dudek-Wojciechowska G., et al., 1983).

La secuencia de aminoácidos de la α_1 -AT es un 35% idéntica a la de la ATIII, esto sugiere un origen común y un mecanismo de inhibición semejante. (Magnusson S., et al., 1983).

La ATIII forma complejos con cualquiera de las formas de la trombina; la α -trombina posee la mayor actividad procoagulante y le siguen la β -trombina con menos actividad y luego la γ -trombina, sin actividad procoagulante; los tres tipos de trombina poseen actividad esterásica. (Lorand L., et al., 1977). La β -trombina y la γ -trombina pueden provenir del clivaje de la protrombina en un porcentaje mínimo respecto de la producción de α -trombina, cuando la activación del sistema de coagulación se produce por la vía clásica. Figuras 12, 13 y 14.

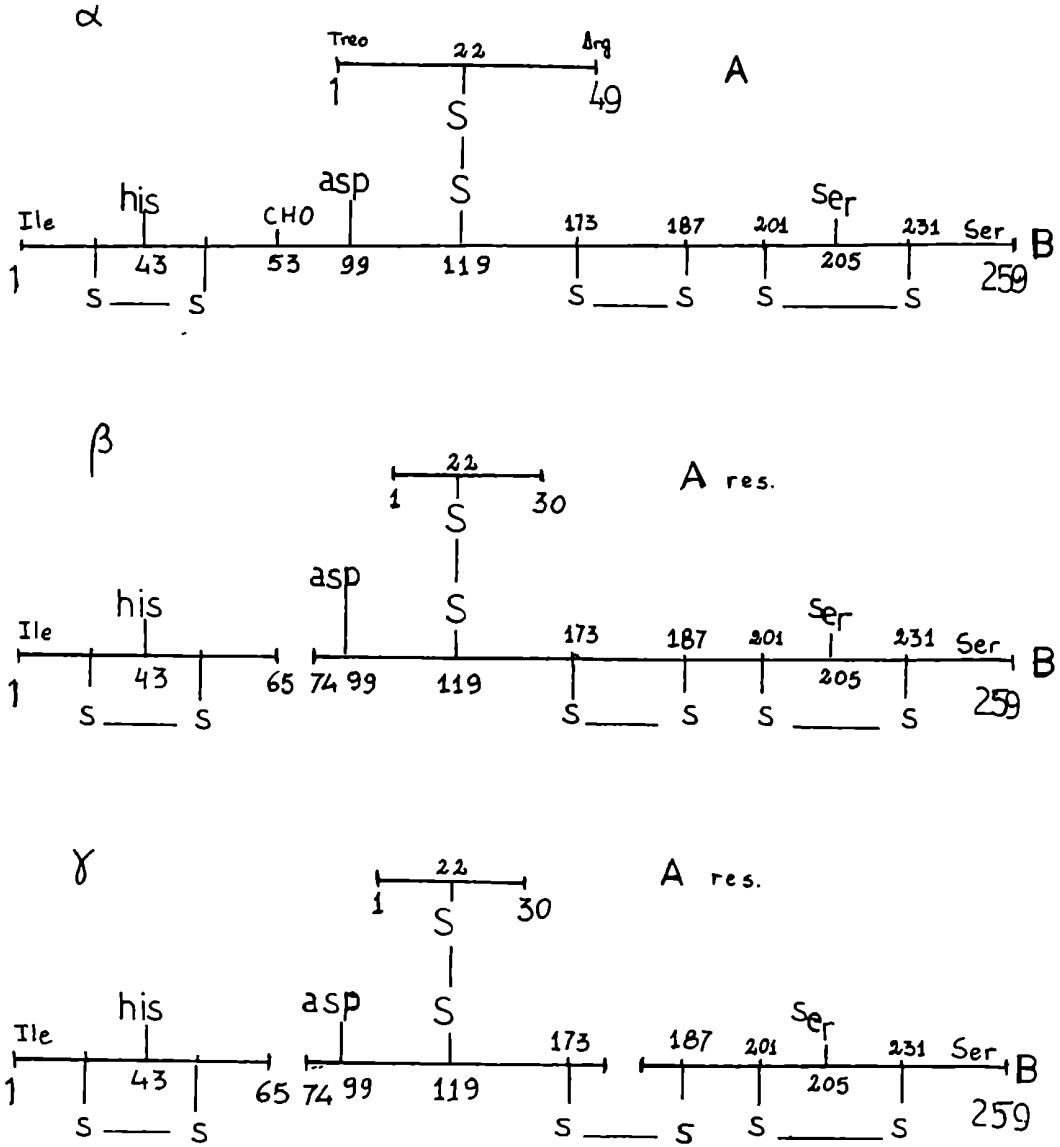


FIGURA 12: α -Trombina, β -Trombina y γ -Trombina a partir de trombina bovina.

(Kingdon H.S., et al., 1977).

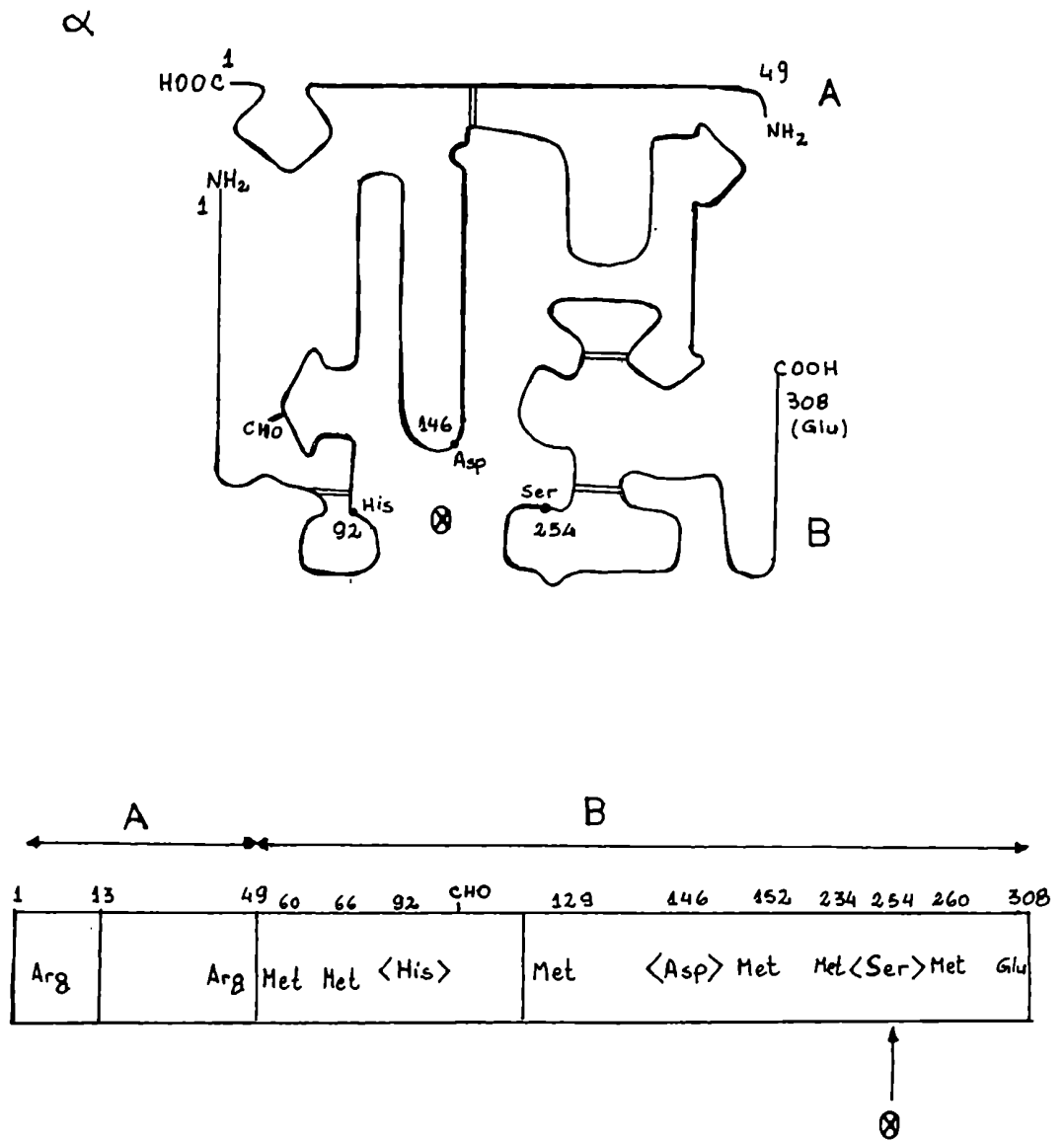


FIGURA 13: α -Trombina Humana (E C 3.4.21.5).

(Elion J., et al., 1977).

<u>Composición:</u>	α (%)	γ (%)	γ como (%) α
α -trombina	98.8	0.2	0.2
β -trombina	1.2	14.1	11.8
γ -trombina	0.0	85.7	
<u>Actividad esterásica</u>			
con p-NPGB (%) (0)	87	65	74.7
<u>Actividad coagulante</u>			
(U/mg)	3.292	1.050	0.03
<u>Sustrato cromogénico:</u>			
S-2160 (3)	1.01	0.23	
S-2238 (3)	6.62	6.40	
CBZ-Chromozym TH (1)	4.90	2.82	
Tos-Chromozym TH (2)	8.44	7.19	

(1) Pentapharm Ltd. Basle.Suiza.

(2) Boehringer Mannheim Biochemicals.Alemania.

(3) Kabi Peptide Research, Mölndal,Suecia.

(0) p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato.

FIGURA 14: Trombinas. Características diferenciales.

(Lorand L.,et al.,1977; Bang N.U.,et al.,1977).

Sustratos cromogénicos: unidades para

α -trombina = μ Kat / mg.

unidades para γ -trombina = titulación

con p-nitrofenil-p'-guanidinobenzoato en (%).

(Bang N.U. et al.,1977).

(Elion J., et al., 1977; Kingdon H.S., et al., 1977).

Se pueden producir fragmentos semejantes a ellas, por proteólisis inespecífica y quizás también por acción de proteasas neutras leucocitarias directamente sobre los factores de coagulación especialmente sobre protrombina (II) y/o indirectamente a través de otros sistemas interrelacionados con el de coagulación. El cuadro resultante "in vivo", se puede confundir con una activación clásica del sistema de coagulación-fibrinólisis. (Kordich L.C., 1982).

Estos resultados se pueden observar en pacientes con LA, razón por la cual es importante el estudio de la interacción de la ATIII con las enzimas leucocitarias provenientes de leucocitos normales y leucémicos en un sistema aislado.

OBJETIVOS

1-. Esclarecer uno de los posibles mecanismos de la diátesis hemorrágica sufrida por los pacientes con Leucemias agudas, especialmente del tipo granulocítico, con el fin de contribuir al tratamiento terapéutico de base disminuyendo las complicaciones hemorragíparas.

2-. Se evalúa la acción de enzimas leucocitarias aisladas de leucocitos normales y leucémicos sobre los sistemas de coagulación y fibrinólisis, estudiando especialmente los efectos de la misma sobre el inhibidor fisiológico (natural) del sistema de coagulación Antitrombina III, en sistemas purificados.

Se demuestran las modificaciones sufridas por la Antitrombina III desde los puntos de vista inmunológico y funcional, datos que hasta el presente se desconocían.

3-. Además se demuestra la acción de estas enzimas sobre el Fibrinógeno, Factor I, sustrato fundamental para la coagulación y la fibrinólisis; y sobre la Protrombina, sitio principal de activación para la producción de trombina, la enzima coagulante del Fibrinógeno.

MATERIALES Y METODOS

OBTENCION DE LA MUESTRA

La extracción de sangre venosa se realizó con agujas y jeringas siliconadas. La sangre se recogió en tubos que contenían anticoagulante citrato de sodio 3.8% en la relación 1 de anticoagulante a 9 de sangre.

Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y los plasmas sobrenadantes se pasaron a tubos plásticos. Los plasmas que no fueron procesados en forma inmediata se fraccionaron en ampollas plásticas y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

TIEMPO DE PROTROMBINA DE QUICK

Los plasmas citratados se procesaron dentro de las 2 horas posteriores a la extracción de sangre.

En un tubo de Kahn se colocaron 0.1 ml de tromboplastina y 0.1 ml del plasma a estudiar, esta mezcla se incubó a 37 °C durante 1 minuto, luego se agregó 0.1 ml de cloruro de calcio 0.02 M, tomando el tiempo de coagulación de la misma.

El tiempo obtenido se refirió a una curva patrón realizada con una mezcla de plasmas normales. (Quick A.J., 1952).

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL CON CAOLIN

En un tubo de Kahn conteniendo 0.2 ml de mezcla cefalina-caolín se agregó 0.2 ml de plasma citratado, y se incubó a 37°C durante 3 minutos. A dicha mezcla se agregó 0.2 ml de cloruro de calcio 0.02 M y se registró el tiempo de coagulación. Los valores normales fueron 35-45 segundos. (Proctor R., et al., 1961).

TIEMPO DE TROMBINA

A 0.2 ml de plasma citratado a 37°C se le agregó 0.1 ml de solución de trombina de 10 unidades/ml y se tomó el tiempo de coagulación.

DOSAJE DE FIBRINOGENO

A 0.1 ml de plasma citratado, se le agregó 2 ml de solución de trombina (200 unidades), se mezcló rápidamente y dejó 15 minutos hasta coagulación completa.

Se recogió la fibrina formada sobre una varilla de vidrio. Se lavó con agua destilada durante 1 a 2 minutos luego se colocó la varilla en etanol 10 % durante 2 minutos. Se secó a 80°C durante 30 minutos y se pesó.

Valores normales: 0.1 a 0.3 g/100 ml. (Wycoff M., 1966).

DOSAJE DE PROTROMBINA (FACTOR II)

Se diluyó el plasma a estudiar 1/10 en tampón Michaelis pH 7.38; 0.1 ml del mismo se agregó a un tubo conteniendo 0.1 ml de plasma deficitario en factor II y 0.1 ml de tromboplastina a 37°C. Se dejó 60 segundos y se agregó 0.1 ml de cloruro de calcio 0.025 M y se tomó el tiempo de coagulación.

Se refirió a una curva patrón.

Valores normales : 80 - 120 %. (Duckert F., 1960).

DOSAJE DE FACTOR V

Se procedió de la misma manera que en el dosaje de protrombina sustituyendo el plasma deficitario en factor II por plasma deficitario en factor V.

Valores normales : 80 - 100 %. (Duckert F., 1960).

DOSAJE DE FACTOR VII-X

El plasma deficitario en Factores VII-X deberá tener por lo menos 20% de Factor II. Se obtuvo filtrando plasma bovino por filtros Seitz con 20-80% de asbesto, el valor del blanco de este plasma deficitario deberá ser mayor de 3 minutos.

La muestra se trabajó de la misma forma que para Factor II, reemplazando el plasma deficitario por el correspondiente. Los valores obtenidos se refirieron a la curva de calibración correspondiente. V. Normales : 80-120% .
(Duckert F., 1960).

DOSAJE DE FACTOR VIII (Globulina anti hemofílica)

El plasma citratado a medir se diluyó 1/10 (correspondiendo al 100% de Factor VIII); se utilizó cefalina diluída 1/500 en Tampón Michaelis pH 7.35 como activador del sistema.

El plasma deficitario en Factor VIII se activó con celita 512 (2 mg/ml de plasma a 37°C) durante 3 minutos, luego se centrifugó durante 15 minutos para retirar la celita. El sobrenadante quedó en condiciones de ser usado.

En un tubo de Kahn se pipeteó 0.1 ml de plasma deficitario en Factor VIII activado, 0.1 ml de cefalina y 0.1 ml de la dilución de plasma a medir.

Se incubó 60 segundos y se recalcificó con cloruro de calcio 0.025 M; se tomó el tiempo de coagulación y se refirió a la curva de calibración correspondiente.

Valores Normales : 50-150 % (Duckert F., 1960 modificado).

DOSAJE DE FACTOR IX

Se trabajó de la misma forma que para el dosaje de Factor VIII utilizando plasma deficitario en Factor IX activado. Valores Normales : 50-150 % (Duckert F., 1960 modificado).

DOSAJE DE FACTOR XI

Los plasmas a estudiar se diluyeron en citrato-salina (1/5) en las proporciones: 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

Como activador del sistema se utilizó cefalina diluída 1/500 y suspensión de celita 512 de 20 mg/ml.

En un tubo de Kahn se pipetearon 0.1 ml de la dilución del plasma a medir, 0.1 ml de cefalina, 0.1 ml de la suspensión de celita 512 y 0.1 ml de plasma deficitario en Factor XI. Se colocó a 37°C durante 60 segundos. Se recalcificó con cloruro de calcio 0.025 M y se tomó el tiempo de coagulación. La dilución 1/8 se consideró el 100% de Factor XI.

Los tiempos obtenidos se refirieron a la curva de calibración. Valores Normales: 50-150 % (Nossel H.L., 1964).

DOSAJE DE FACTOR XII

Se procedió de la misma forma que para Factor XI, reemplazando el plasma deficitario por el correspondiente en Factor XII. Valores Normales: 50-150 % (Nossel H.L., 1964).

FACTOR XIII

Se mezcló 0.2 ml de plasma citratado con 0.05 ml de glicerol 50% y se incubó a 56°C durante 2 minutos y medio, luego de enfriar a 0°C se dejó a 25°C.

A 0.2 ml de la mezcla se agregaron 0.05 ml de glutatión 0.2 M y 0.2 ml de trombina de 125 U/ml y se dejó actuar durante 20 minutos.

Luego se agregó 0.5 ml de monodansilcadaverina 2 mM y 1 ml de caseína 0.4%. A los 30 minutos se detuvo la reacción agregando 2 ml de ácido tricloroacético 10%.

La proteína se lavó 6 veces por centrifugación con 10 ml de una mezcla etanol-éter (1:1), se secó y se disolvió en 2 ml de Tris-HCl 0.05 M, urea 8M, dodecil sulfato de sodio (SDS)

0.5% pH 8.0 y se midió la amina unida a la proteína.

Se midió la fluorescencia a una excitación de 355 nm y emisión de 525 nm. (Lorand L., et al., 1969).

DOSAJE DE PLASMINOGENO

En dos tubos de ensayo se colocaron los siguientes reactivos: caseína 3 ml, tampón fosfato 2.4 ml, solución de euglobulinas 0.5 ml, estreptoquinasa 0.1 ml y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Al tiempo 0 y 60 minutos se tomaron 2 ml de la mezcla de reacción y se agregaron a un tubo de centrifuga conteniendo 3 ml de ácido tricloroacético 11.5% y se dejaron a 25°C durante 30 minutos.

Se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se filtró sobre lana de vidrio hasta obtener un líquido perfectamente claro.

Se preparó un tubo control, conteniendo 3 ml de tampón fosfato y 3 ml de caseína que se incubó y trató en las mismas condiciones a los 0 y 60 minutos.

Se leyó en el espectrofotómetro a 280 nm. La diferencia entre el tiempo 60 y 0 minutos correspondió a la tirosina liberada en 60 minutos a 37°C.

Los resultados se expresaron en unidades de caseína por ml de plasma.

Según Remmert L.F., et al., 1949, 1 unidad de caseína corresponde a la liberación de 450 ug de tirosina en 1 hora a 37°C. La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución de tirosina de 100 ug/ml.

EXTRACTO SALINO FENOLADO DE CEREBRO HUMANO (TROMBOPLASTINA)

A un cerebro humano obtenido dentro de las 24 horas post mortem y sin evidencias de congestión, absceso, tumores o traumatismo, se le separaron las meninges y se lo lavó con

agua fría para eliminar todo el resto de sangre y se cortó en rodajas de 2 cm lavándolo nuevamente.

Se secaron los trozos sobre papel de filtro y en una licuadora eléctrica a muy baja velocidad se rompió en trozos grandes. Al cerebro así tratado se agregaron 1500 ml de solución salina fenolada precalentada a 45°C, se mezcló y se dejó 30 minutos a 37°C. Se dejó decantar a 4°C durante 48 horas.

Se separó el sobrenadante y se agregó al mismo un volumen de la capa superior del sedimento, equivalente a la décima parte del volumen total del sobrenadante.

Los tiempos normales de Protrombina fueron 12-13 segundos.

CEFALINA

El cerebro humano limpio y sin restos de sangre, se cortó en trozos pequeños y se maceró en un mortero con acetona tratando de formar películas finas, procedimiento que se repitió sucesivamente con 5 alícuotas de acetona.

El polvo de cerebro obtenido se filtró a través de papel de filtro y se secó a temperatura ambiente y luego a 37°C.

Se pesó 1.2 g del polvo y se agregó a 25 ml de cloroformo y se agitó durante 2 horas descartando el sedimento.

El líquido sobrenadante se evaporó hasta sequedad y la película se emulsionó con 12.5 ml de cloruro de sodio 0.154 M.

Antes del uso se diluyó 1/500 en solución de cloruro de sodio 0.154 M (fisiológica).

TIEMPO DE PLASMA RECALCIFICADO

Se incubó 0.2 ml de plasma libre de plaquetas a 37°C con 0.2 ml de cloruro de calcio 0.025 M. Se tomó el tiempo de coagulación.

Valores Normales: 70-140 segundos.

PLACAS DE FIBRINA

En placas de Petri estériles se colocó 10 ml de una solución de fibrinógeno 1% fresca y estéril y se coaguló por agregado de 0.2 ml de trombina (5 U/ml) mezclando rápidamente.

Las placas destinadas a estudiar la acción directa de la plasmina se calentaron a 60°C durante 1 hora.

Las placas se sembraron con 5 ul de las soluciones o extractos en estudio . Se observó el área de lisis producida.

PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA (PDF)

Preparación de la suspensión de estafilococos

Se partió de una cepa de *Staphylococcus aureus* Newman D₂C, coagulasa negativos con factor aglutinante positivo.

Se mantuvo la cepa en estrías en agar con infusión de corazón-cerebro.

El crecimiento bacteriano se realizó en agar con una infusión de cerebro-corazón a 37°C durante 18 horas en un agitador a 90 rpm.

Se centrifugó el cultivo y el sedimento bacteriano se suspendió en cloruro de sodio 0.154 M y se calentó a 70°C durante 90 minutos. Después se realizó el control de esterilidad, se lavó una vez con cloruro de sodio 0.154 M y dos veces con agua deionizada. Se suspendió en agua deionizada y se liofilizó. La estabilidad fue de 8 meses a 4°C.

Para realizar la determinación de PDF se preparó una suspensión de bacterias de 3 mg / ml de tampón imidazol pH 7.5.

Determinación

El suero de los pacientes y los controles normales se extrajo con ácido ϵ -aminocapróico.(EACA).

Se realizaron diluciones sucesivas del suero a estudiar se agregó 1 gota de la suspensión de estafilococos, se mezcló y luego de dos minutos se leyó la aglutinación. La última dilución en la que se observó aglutinación positiva se multiplicó por el factor de sensibilidad de los estafilococos. Valores Normales: hasta 4 ug/ml de muestra. (Hawiger J.,1970).

LISADO DE LEUCOCITOS

100 ml de sangre oxalatada (oxalato de sodio 0.1 M, 1 volumen para 9 volúmenes de sangre) se mezclaron con 200 ml de dextranso de Peso molecular medio 184000 3% p/v en solución de cloruro de sodio 0.154 M y se dejaron sedimentar a 0°C durante 60 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se descartó el sedimento. Se centrifugó el sobrenadante a 800 rpm durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el sedimento en 2 ml de cloruro de sodio 0.34% por cada 10 ml de sangre original. Se colocó a 37°C durante 5 minutos (hemólisis de eritrocitos residuales), luego se agregó 4 ml de cloruro de sodio 0.154 M y centrifugó a 800 rpm durante 7 minutos.

Se descartó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en cloruro de sodio 0.154 M. Se repitió el procedimiento cinco veces. Luego se suspendió el sedimento en un mínimo volumen conocido de cloruro de sodio 0.154 M y se efectuó el recuento de leucocitos en cámara de Neubauer modificada. Se obtuvo generalmente 10^{10} células por ml.

Todo el proceso se efectuó con material plástico para evitar la contaminación plaquetaria.

Luego se efectuó la lisis celular por diferentes métodos:

a) congelamiento y descongelamiento sucesivo (4 veces) en una mezcla de hielo seco-etanol y baño maría a 37°C.

Luego se centrifugó y determinó la concentración protéica en el sobrenadante por el método de Lowry O.H., et al (1951).

b) luego de congelar y descongelar 3 veces, se sonicó a los leucocitos durante 15 segundos en un baño de hielo en un aparato Virtis 45 y se obtuvo una suspensión homogénea. Se centrifugó y determinó la concentración protéica en el sobrenadante.

Se guardó la solución en alícuotas en tubos plásticos a - 20°C. hasta su uso.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Se utilizó el método de Lowry O.H., et al., 1951., basado en dos reacciones: 1) una interacción inicial de la proteína y los iones cobre (Cu^{++}) en medio alcalino y 2) una reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno respectivamente, debido a la acción del complejo Cu^{++} -proteína.

El producto final se midió espectrofotométricamente a 660 nm.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR IDR

IDR: inmunodifusión radial (Mancini G., et al., 1965).

Se utilizaron placas comerciales M-Partigén, (Boheringwerke) con antisuero específico.

Se midieron los diámetros de los halos de difusión protéicos a las 48 o 72 horas y se graficaron versus las

concentraciones protéicas de la curva de calibración.
Se interpolaron las muestras incógnitas.

ANTITROMBINA III POR INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN
ACETATO DE CELULOSA GELIFICADO.

Se colocó la tira de cellogel, previamente equilibrada con el tampón en una cuba para electroforesis saturada con el mismo tampón.

Con un extensor de 1 cm de ancho se esparció la solución de heparina de 20 U/ml sobre uno de los bordes de la tira desde el compartimiento anódico hacia el catódico hasta su absorción.

Se sembraron 4 ul de plasma coloreado con azul de bromofenol, en el extremo inferior catódico y colocaron los puentes en los extremos catódico y anódico, se corrió a 20 volt/cm durante 45 minutos a 25°C en tampón veronal-veronal sódico pH 8.6.

Luego se rotó la tira 90° se barrió el resto de la superficie de la misma libre de heparina, con antisuero (20 ul) hasta su absorción, luego se efectuó la electroforesis durante 140 minutos.

La tira se lavó durante toda la noche en solución fisiológica y se coloreó con azul brillante Coomassie R-250 0.1% y lavó hasta decoloración del fondo.

Se secó y blanqueó. (Sasseti B., et al., 1980).

Para medir concentración inmunológica de ATIII también se realizó la corrida electroforética en acetato de celulosa en una dimensión por el método de Laurell C.B., 1965, según las condiciones detalladas en la segunda dimensión de la técnica anterior.

ANTITROMBINA III (ATIII) ACTIVIDAD POR SISTEMA TIEMPO DE TROMBINA.

Se midió la trombina residual luego de su reacción con ATIII, por tiempo de coagulación sobre una solución de fibrinógeno 3% p/v en tampón Tris-HCl 0.01 M, albúmina 1% pH 8.0.

Técnica:

En tubos plásticos colocados a 37°C se agregaron

ATIII 0.1 ml	4	3	2	1	0	UI/ml
Trombina 0.1 ml	3	3	3	3	3	UI/ml

Se incubaron con intervalos de 2 minutos durante 5 minutos. Se tomó 0.1 ml de cada tubo y se agregó a 0.4 ml de fibrinógeno y registró el tiempo de coagulación.

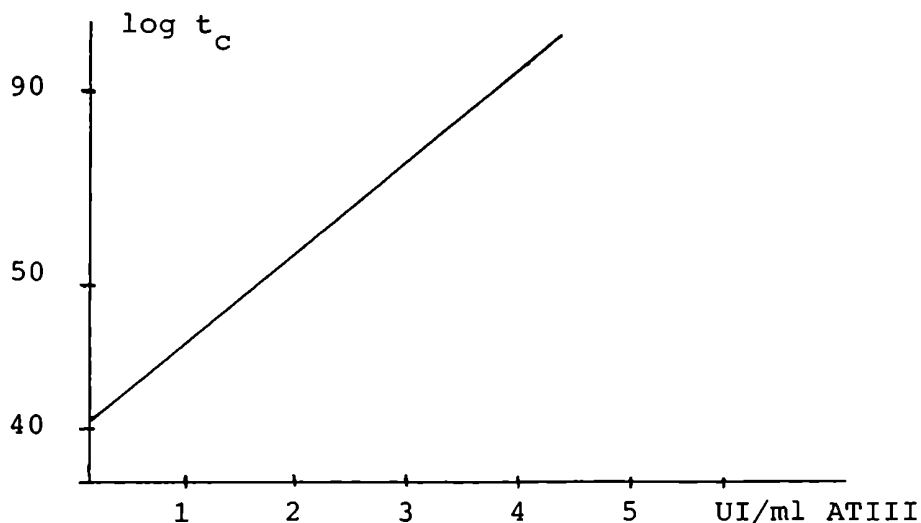
Tiempo de coagulación (segundos) tipo:

95 83 65 52 40

Se graficó log t_c versus concentración de ATIII en UI/ml y se obtuvo una recta. Las muestras incógnitas se compararon con la misma.

Todas las soluciones se prepararon antes del uso.

La solución de trombina se mantuvo en hielo.



COFACTOR DE LA HEPARINA (ATIII)

A) Método con sustrato cromogénico S-2160

(Ødegard O.R., et al., 1975)

La Antitrombina III se hizo reaccionar con trombina en un medio con heparina y luego se midió la trombina residual con sustrato cromogénico.

S-2160: Benzoil-fenil-valil-arginil-p-nitroanilina HCl. La heparina en exceso se neutralizó con polibrene 1 mg/ml mezclado una parte con dos partes de sustrato de 0.5 mg/ml.

Las muestras se diluyeron previamente 1:30 en tampón Tris 0.05 M, NaCl 0.18 M, heparina 3 U/ml pH 9.1.

En dos tubos de plástico se agregaron 400 ul de muestra diluída y de control y se colocaron a 37°C durante 2 a 6 minutos. Luego se colocó 100 ul de solución de trombina de 30 U/ml y se incubó 30 segundos a 37°C, inmediatamente se colocaron 300 ul de mezcla sustrato-polibrene y se dejaron actuar durante 60 segundos y se detuvo la reacción con 300 ul de ácido acético concentrado.

Se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco de reactivos reali-zado sustituyendo el orden de agregado colocando en primer lugar el ácido acético.

Se efectuó una curva de calibración con plasma normal diluído 1:20, 1:30 y 1:60 correspondiendo al 150%, 100% y 50% de actividad de ATIII como cofactor de la heparina.

Se graficó absorbancia a 405 nm versus % de ATIII y se obtuvo una recta en la cual se interpolaron las muestras.

B) Método con sustrato cromogénico S-2238.

(Kabi Diagnostica, 1977.).

S-2238: H-D-fenil-Pip-arginil-p-nitroanilina.2 HCl.

El sustrato se utilizó en concentración de 0.75mM y

dos volúmenes del mismo se mezclaron con un volumen de polibrene de 1 mg/ml.

La solución de trombina empleada fue 10 UI/ml. El tampón utilizado fue Tris 0.05M, EDTA disódico 2.8 g/L cloruro de soio 10.2 g/l y 3 U/ml de heparina pH 8.4.

El resto de la técnica fue igual a la utilizada con sustrato S-2160.

Valores Normales: 70-130%.

C) Método con sustrato Chromozym TH.

Chromozym TH: Tos-glicil-prolil-arginil-p-nitroanilina.

Tampón utilizado: Tris-HCl 100 mM, heparina 1.75 U USP/ml, Aprotinina 6.5 U.I./ml, NaCl 150 mM pH 8.1.

Solución de trombina de 10 U/ml.

Solución de sustrato: 1.9 mM.

Se utilizó una técnica similar a la del sustrato S-2160 Y se leyó la Absorbancia a 405 nm.

Valores Normales: 87 x diferencia de absorbancia entre el blanco y la muestra: 11-14 UI/ ml.

DOSAJE DE CALICREINAS PLASMATICAS

A) Método con sustrato cromogénico Chromozym PK.

(Amundsen E., et al., 1977).

Chromozym PK : N-benzoil-(L)-prolil-(L)-fenilalanil-(L)-arginil-p-nitroanilina (clorhidrato).

Se utilizó en concentración 1.5 mM en tampón Tris-imidazol 0.15 M pH 7.9.

Las calicreínas plasmáticas fueron activadas por contacto con sulfato de dextrano en frío, durante 7 minutos y luego se procedió a colocar 0.75 ml de tampón imidazol en un tubo se agregó 20 ul de plasma o plasma activado con dextrano y se mezcló y colocó 0.25 ml de solución de sustrato tomando el tiempo de incubación a 37°C exactamente de 3 minutos.

Luego se detuvo la reacción con 0.20 ml de ácido acético 20%. Se leyó la absorbancia a 405 nm (D1). Para cada determinación se realizó un blanco colocando en primer lugar el ácido acético y se leyó la absorbancia contra agua destilada a 405 nm (D2).

Se calculó la diferencia de absorbancia por resta D1-D2 y se dividió por 3.

Los resultados se refirieron a una mezcla de plasmas normales y se expresaron en % de los controles.

Se expresaron también en UI /ml de acuerdo a:

$U/ml = D.O./\text{minuto} \times K$

$K = V \times F / E \times d \times v$ donde

E= coeficiente de extinción molar a 405 nm de la p-nitroanilina = $10.4 \text{ l cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$.

V=volumen de la muestra de reacción.

v= volumen de plasma.

d= distancia de paso de luz de la cubeta = 1 cm.

U= unidad (cromo-calicreína de enzima) o cantidad de enzima que hidroliza 1 umol de sustrato por minuto en las condiciones experimentales dadas.

K= 5,9 para plasma no activado.

K= 11,7 para plasma activado (diluído al 1/2 con dextrano).

Valores Normales: Precalicreínas 0.75-1.25 UI/ml.

Calicreínas circulantes en plasma: ninguna actividad o bien trazas.

B) Método con sustrato cromogénico S-2302.

(Kabi Diagnostica, 1978).

S-2302: H-D-prolil-L-fenilalanil-L-arginil-p-nitroanilina. Solución 1.5 mM.

Activador utilizado: cefalina 1/1000, en tampón Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.7 g/l pH 7.8.

Se efectuó la reacción con un esquema similar al método A y luego se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco de reacción.

Los resultados se refirieron a una curva de calibración realizada con plasma normal diluído correspondiendo al 25 %, 50%, 75% y 100% de precalicreínas.

DOSAJE DE MUCOPOLISACARIDOS ACIDOS

Método del Carbazol. (Bitter T., et al., 1962).

Los mucopolisacáridos ácidos precipitados por una sal de amonio cuaternaria y disueltos en una solución de NaOH reaccionaron con el carbazol para dar productos coloreados que se midieron a 530 nm.

A tres tubos de ensayo rotulados Blanco, Testigo y Muestra se colocaron 3 ml de tetraborato de sodio disuelto en ácido sulfúrico (9.55g/l) y se colocaron en un baño de hielo durante 5 minutos.

Luego se colocó 0.5 ml de agua en el blanco, 0.5 ml de testigo de heparina (2.5-40 ug/ml) y 0.5 ml de la muestra y se hirvieron en un baño de agua durante 10 minutos. Luego se agregaron 0.1 ml de reactivo de carbazol (0.125g/100 ml) y se hirvieron durante 15 minutos. Se enfrió y se leyó contra el blanco a 530 nm. después de 15 minutos.

Se graficó absorbancia versus concentración y se obtuvo una recta, en la cual se interpolaron las muestras.

OBTENCION DE α -TROMBINA A PARTIR DE PLASMA HUMANO

Se partió de la primera fracción de Cohn (I+II+III) (Cohn E.J. et al., 1950) y se activó la Protrombina a trombina y luego se purificó.

Otención de la fracción I+II+III de Cohn.

En un tubo de centrifuga preenfriado a -50°C se colocó 25 ml de plasma citratado y agregaron 100 ml de etanol 95% mezclado con 1 ml de tampón acetato de sodio pH 4.0 a una velocidad de 20 ml por minuto agitando mecánicamente.

Se continuó la agitación durante 15 minutos más. El pH de la suspensión fue 5.8-5.9. Se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos a -5°C . Se descartó el sobrenadante. El precipitado contenía γ -globulina, β_1 -lipoproteína, euglobulinas, fibrinógeno y Protrombina.

Obtención de α -trombina.

El proceso se realizó en dos días.

(Fenton J.W., et al., 1977).

1) 100 g de la fracción I+II+III de Cohn se suspendieron en 100 ml de tampón Tris 0.02 M, NaCl 0.15 M, citrato sódico 0.02M polietilenglicol (PEG) 6000 40 g/l pH 8.0 a 23°C , se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C .

2) El precipitado se reservó para la preparación de plasminógeno.

3) Al sobrenadante se añadió 1/10 de su volumen de cloruro de bario 1 M, gota a gota durante 15-30 minutos a 23°C .

Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C .

Se descartó el sobrenadante y se suspendió el precipitado en 250 ml de agua, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C . El precipitado se suspendió en agua hasta 60 ml. Se añadió 7.5 ml de sulfato de amonio 3.3 M y se llevó a pH 8.0 con amoníaco, se agitó durante 10-20 minutos a 23°C . Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C .

Se ajustó el pH a 6.0-6.2 con HCl 0.2 N y se dializó contra 2000 ml de NaCl 0.15 M durante toda la noche a 4°C .

Día 2: 1) se pasó el dializado a través de una columna de Amberlite CG-50 tipo I (Rohm-Haas, USA), resina de intercambio iónico., de 4 x 10 cm. Se eluyó con NaCl 0.15 M pH 8.0 a 4°C. Se lavó la columna con 50 ml de NaCl 0.15 M.

2) Se activó el eluido durante 30-60 minutos a 23 °C por agregado de tromboplastina en tampón Tris 0.2 M, CaCl₂ 0.25 M pH 7.4. Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se descartó el precipitado de tromboplastina.

3) Se adsorbió la trombina en una segunda columna de Amberlite CG-50 Tipo I de 4 x 10 cm en NaCl 0.15 M pH 8.0 a 4°C.

Se lavó la columna con 300-50.0 ml de NaCl 0.15 M frío.

Se eluyó la trombina con NaCl 0.75 M frío, conservando las fracciones eluidas con A_{280 nm} mayores de 2.0.

Se obtuvieron 2 a 7 mg de trombina /ml.

Se conservó congelada en alícuotas a -20 °C hasta su uso..

PURIFICACION DE FIBRINOGENO A PARTIR DE PLASMA HUMANO

Se adsorbió el plasma humano citratado con hidróxido de aluminio en la proporción 11:1, y se agitó 20 minutos a 37°C

Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Luego se ensayó el tiempo de protrombina en el sobrenadante (debe ser mayor que 15 minutos).

El fibrinógeno se precipitó con glicina libre de amoníaco 2.2 M/l de plasma y se agitó suavemente durante 30 minutos. El fibrinógeno floculado se separó por centrifugación a 5000 rpm durante 45 minutos.

La pasta gelatinosa se resuspendió en citrato de sodio 0.055 M y un volumen igual al de la primera capa sobrenadante. Se reprecipitó con glicina utilizando el mismo procedimiento, se disolvió luego en el mínimo volumen de citrato de

sodio 0.055M y se liofilizó en un aparato Dhacel TD 2001. durante 24 horas en alícuotas de 10 ml. (Kazal, L.A., et al., 1963).

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Método de capa delgada.

(Laemli U.K., 1970; Wycoff M., et al, 1977; Weber K. et al., 1969)

Se preparó geles de poliacrilamida en capa fina en la proporción 7%.

Se tamponó el film de poliacrilamida durante 2 horas en Tris-glicina pH 8.3.

Se sembraron 3 ul de muestra coloreada con azul de bromofenol, previamente secado en un portaobjeto y se colocó el film en la cubeta sobre un soporte rígido.

Se conectaron 220 volts durante 2 horas. Se coloreó durante 3 horas en una solución de azul brillante Coomassie 1:20 de una solución madre de 5 g de colorante disueltos en 500 ml de metanol+ 100 ml de ácido acético +400ml de agua.

Se decoloró durante toda la noche en una mezcla de metanol:acético:agua:glicerina = 20:10:68:2.

Se secó a temperatura ambiente.

La solución de poliacrilamida se efectuó mezclando solución de acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8% con tampón Tris-HCl pH 8.8 , agua y persulfato de amonio 0.1 g/ml en la proporción 8:8:16:0.160 y se agregó Temed 0.015 ml. Se quitó el aire con una bomba de agua y se colocó entre dos placas sujetas con una luz entre placas de 1-2 mm y se dejó polimerizar.

Luego se efectuó la corrida electroforética.

Un procedimiento similar se efectuó para la electroforesis en poliacrilamida en disco, dejando polimerizar en tubos de 0.75 cm de diámetro por 15 cm de longitud.

FILTRACION DEL LISADO DE LEUCOCITOS POR SEPHADEX G-200

3 g de Sephadex G-200 se colocaron en agua destilada durante 3 días y luego 2 días en tampón fosfato 0.05 M pH 7.2.

Se armó una columna de vidrio de 1.2 x 90 cm y se empacó. El volumen vacío se determinó con la siembra de 1 ml de azul dextrano 2000 de 1 mg/ml en agua destilada. (Vo).

Se sembró 1 ml de lisado de leucocitos, 4 a 10 mg de proteína, y se eluyó con tampón fosfato 0.05 M pH 7.2.

Se recogieron fracciones de 3 ml/tubo con un flujo de 12 ml/hora a 8 ml/hora.

Se registró la absorbancia de los eluidos a 280 nm.

Se utilizó un aparato refrigerado, cromatógrafo LKB Combi Cold Rac, 5201.

En algunos casos se utilizó tampón fosfato 0.025 M pH 7.2 con un flujo de elución de la columna de 7 ml/hora.

Los picos protéicos se guardaron a -20°C hasta su uso. (Sakuragawa N., et al., 1976, modificado).

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (CATIONICO)

Se utilizó CM-SEPHADEX C-50; 2.5 g del mismo se equilibraron con tampón fosfato 0.05 M, NaCl 0.2 M, MgCl_2 0.005 M pH 7.5 durante 48 horas a temperatura ambiente con varios cambios de tampón.

Luego se quitó el aire atrapado en el gel con una bomba de vacío durante unos minutos y se armó una columna de 1.5 x 30 cm.

Se sembraron los picos protéicos obtenidos por filtración en Sephadex G-200 dializados previamente contra el tampón fosfato 0.05 M pH 7.5 de equilibrio de la columna de intercambio; 5 ml, alrededor de 2.0 mg de proteína y se eluyó con un gradiente de NaCl 0.2-1.0 M en el tampón de equilibrio de la columna pH 7.5.

Se recogieron fracciones de 1.5 a 2.0 ml por tubo a una velocidad de elución de 8 ml/hora.

Se registró la absorbancia a 280 nm. Se utilizó un cromatógrafo refrigerado LKB, Combi Cold Rac 5201.

Los picos obtenidos se congelaron a -20°C hasta su uso. (Schmidt W., et al., 1974, modificado).

FILTRACION POR SEPHADEX G-150

Se colocó Sephadex G-150 equilibrado en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4 en una columna de 1.5 x 30 cm a 4°C.

Se determinó el volumen vacío con 1 ml de azul dextrans 2000 de 1 mg/ml, y el volumen del solvente (Vs) con 1 ml de glucosa de 1 mg/ml.

La posición de elución de la glucosa se investigó con clinistix.

Se sembraron 0.5 ml de plasma humano normal citratado o bien plasma proveniente de distintos pacientes, se recogieron fracciones de 1.0-1.5 ml a una velocidad de elución de 2 ml/hora.

El coeficiente de distribución de Antitrombina III se calculó con el volumen de elución de ATIII (V_{AT}) de la siguiente manera:

$$K_{AT} = \frac{V_{AT} - V_o}{V_s - V_o}$$

Los niveles de ATIII se midieron por el método de Laurell C.B., 1965.

La ATIII se ubicó en la posición de la Albúmina en los plasmas humanos normales.

Los valores promedio obtenidos fueron :

$$K_{AT} = 0.35 \pm 0.03 \qquad V_{AT} = 24 \pm 5 \text{ ml.}$$

$$V_s = 44 \pm 8.0 \text{ ml.} \qquad V_o = 15 \pm 0.4 \text{ ml.}$$

Se utilizó un cromatógrafo LKB Combi Cold Rac, refrigerado modelo 5201.

Se registró la absorbancia a 280 nm.

(Sas G., et al., 1980).

INCUBADOS DE PLASMA NORMAL CON α -Manosidasa (EC N°3.2.1.24)

La enzima α -Manosidasa se utilizó en una concentración de 17 U/mg de proteína: solución madre.

La concentración ideal para su acción sobre las glucoproteínas se encuentra en el rango de 25 unidades de enzima por 1 ml de glucoproteína 0.02-0.05 M. El pH óptimo se determinó en 4.5-5.0.

Se utilizó tampón acetato pH 4.5, y tampón Tris-HCl 0.1 M, citrato sódico 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 8.5.

Se incubaron 0.9 ml de plasma normal citratado con 0.1 ml de la enzima disuelta en tampón acetato (4×10^{-2} unidades), a 25°C durante 20 horas en tubos de material plástico.

Luego se detuvo la acción por el agregado de 0.1 ml de tampón Tris-HCl pH 8.5.

Simultáneamente se efectuó el control reemplazando la enzima por tampón acetato pH 4.5.

Luego se efectuaron las determinaciones pertinentes.

INCUBADOS DE ANTITROMBINA III CON α -Manosidasa.

Se sustituyó el plasma normal por Antitrombina III de 2 mg/ml en los experimentos detallados anteriormente, se incubó a 25°C durante 23 horas y se detuvo la reacción con tampón Tris-HCl pH 8.5.

Luego se efectuaron las determinaciones pertinentes.

Simultáneamente se efectuó un control reemplazando a la enzima por tampón acetato pH 4.5.

DETERMINACION DE ACIDO SIALICO

(Método de Warren L., 1959.)

La muestra protéica liofilizada se pesó y suspendió en NaCl 0.154 M en una concentración cercana a 100mg/ml.

Se hidrolizó con ác. sulfúrico 2 N durante una hora a 100°C. Se centrifugó y mezcló 0.2 ml del sobrenadante con 0.1 ml de solución de periodato de sodio 0.2 M en ácido fosfórico 9 M. Se agitó vigorosamente y dejó a 25°C durante 30 minutos. Luego se agregó 1 ml de arsenito de sodio 10% en sulfato de sodio 0.5 M y ác. Sulfúrico 2 N; se agitó hasta asegurarse la desaparición del color amarillo-marrón.

Luego se agregaron 3 ml de ácido tiobarbitúrico 0.6% en sulfato de sodio 0.5 M y se hirvió en baño maría durante 25 minutos.

Se enfrió y leyó la absorbancia a 549nm y a 532nm contra blanco de reactivos efectuado con NaCl 0.154 M en lugar de la proteína.

Se efectuaron controles normales simultáneamente.

Cálculo:

umoles de ácido siálico = $0.09 \times D.O.549 - 0.03 \times D.O.532$

donde:

0.09 y 0.03 contienen el volumen final y los coeficientes de extinción molares del ácido siálico y de la 2-deoxiribosa que interfiere en esta zona de longitud de onda.

(Máxima absorción de 2-deoxiribosa = 532 nm.)

En otros casos se utilizó una mezcla de proteínas que previamente se dosaron por el método de Lowry y se ajustaron a las curvas de calibración eligiendo el rango óptimo.

ACTIVIDAD DE ESTERASAS. ENSAYO COLORIMETRICO CON TAME.

(Roberts P.S.,1958, modificado).

El método se utilizó para calicreínas plasmáticas (Webster M.E.,et al.,1961) y también se utilizó para trombina y plasminógeno.

El plasminógeno se activó con estreptoquinasa de 10000 U/ml a plasmina y se midió como tal.

TAME: p-tosil-L-arginil-metil éster , clorhidrato.

Se formaron los complejos férricos de los ácidos hidroxámicos del TAME y se midieron a 525 nm.

A tubos conteniendo 0.20 ml de enzima y 0.10 ml de tampón Tris-HCl 0.75 M pH 8.6 se agregaron 60 ul de TAME 0.13 M.

Se incubó a 37°C durante una hora y se agregó 0.50 ml de clorhidrato de hidroxilamina 1 M en NaOH 1.75 M preparada previamente y se colocó la mezcla a 25°C durante 30 minutos.

Luego se agregaron 0.25 ml de una mezcla de ácido tricloroacético 0.37 M- HCl 4 M y la solución se trató con 4 ml de cloruro férrico 0.11 M en HCl 0.04 M y se leyó el % T exactamente a los 5 minutos a 525 nm. Se realizó un blanco sustituyendo la enzima por agua destilada.

Se efectuó la curva de calibración con un rango de concentración de enzima adecuado para cada caso (0-1.0 U/ml), cada vez que se realizó la determinación.

Velocidad de desaparición del TAME(con enzima)-Velocidad de desaparición del TAME(sin enzima,blanco)=Velocidad de hidrólisis del TAME debido a la enzima.

Los duplicados no deberán diferir en más del 3 %.

OBTENCION DE ANTITROMBINA III, A PARTIR DE PLASMA HUMANO.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN HEPARINA-SEPHAROSA 4 B.

Se colocaron 3 g de Sepharosa 4 B activada con bromuro de cianógeno en 600 ml de HCl 1 mM durante 15 minutos y se lavó con la misma solución en un Buchner .

Se lavó luego con 15 ml de tampón acoplante CO_3HNa 0.1 M, NaCl 0.5 M pH 8.3 y de inmediato se mezcló con 70 ml de heparina liofilizada 0.4% (280 mg) disuelta en tampón NaCO_3H 0.1 M, NaCl 0.5 M pH 8.0.

Se mezcló y colocó en un baño de hielo y con agitación muy suave durante 7 minutos se ajustó a pH 11.0 con gotas de NaOH 5 N. Se dejó 2 horas a 25°C con agitación muy suave.

Se mezcló con etanolamina 0.1 M pH 8.0 y se dejó 1 hora. Luego se lavó sucesivamente con agua destilada, tampón acetato/acético 0.1 M pH 4.7 y NaHCO_3 0.5 M pH 8.3.

Se resuspendió en tampón Tris-HCl 0.02 M, citrato 0.01 M, NaCl 0.15 M pH 8.5.

Se armó una columna de material plástico de 1.2 x 15 cm o 2.3 x 12 cm en otros casos (se utilizó material plástico pues la heparina se adhiere al vidrio y disminuye el rendimiento).

Se sembraron 0.5 a 5.0 ml de plasma citratado, se dejó penetrar en la columna y se lavó con 3 ó 4 ml de tampón Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.15 M pH 7.4. Se colocaron 80 ml de gradiente Tris-HCl 0.1 M, citrato 0.01 M, NaCl (0.15-1.5) M, pH 7.4, se recogieron 1 a 3 ml por tubo según los casos con una velocidad de elución de 12 a 13 ml/hora.

Se sembraron los tubos de NaCl 1.0 M en adelante, previa diálisis contra NaCl 0.15 M, en placas para IDR o en inmunoelectroforesis sobre acetato de celulosa. (Mancini G.,

et al.,1965; Laurell C.B.,1965). Figura 21.

Los tubos que contenían Antitrombina III, se mezclaron y se concentraron por liofilización y se guardaron a 4°C hasta su uso.

En otras oportunidades se sembró un extracto protéico obtenido a partir de plasma humano normal en lugar del plasma sin tratar y luego se continuó de la misma forma. (método B de preparación de Antitrombina III).

La cantidad de heparina unida a Sepharosa 4 B se determinó por el método de ácido urónico por la reacción de carbazol (Bitter T.,et al.,1962) modificado y se encontró en un rango promedio de 4-5 mg / ml de gel que fue adecuado para la cromatografía de afinidad de Antitrombina III. Figura 22. (Miller-Andersson M.,et al.,1974).

PREPARACION DE ANTITROMBINA III.

Método A

Primera etapa: cromatografía de afinidad en Heparina-Sepharosa 4 B. (Miller-Andersson M.,et al.,1974).

Segunda etapa: aislamiento de Antitrombina III.

Luego de ajustado el pH a 7.35 con NaOH 1 M, se agregaron 2 g de PEG por cada 10 ml de eluido de la primera etapa. El PEG (Carbowax 4000) se agregó lentamente durante 10 minutos con agitación suave. Luego de 20 minutos más se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 5000 rpm.

Al sobrenadante se le repitió la operación.

Se dejó 20 minutos más y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos y a 4°C, el precipitado se disolvió en tampón y se guardó a 4°C hasta la etapa de remoción del PEG. (Thaler E.,et al.,1975).

Nota: el plasma humano fresco mejoró el rendimiento.

El plasma congelado, almacenado, tuvo un 25% de reducción

en el rendimiento.

Método B

Primera etapa: precipitación con PEG del plasma humano normal. Todo el proceso se realizó a 4°C.

El plasma citratado se ajustó a pH 7.35 con una solución de fosfato de potasio monobásico saturada.

Se agregaron 1.5 g de PEG por cada 10 ml de plasma con agitación constante y durante 15 minutos. Se dejó 15 minutos más y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Al sobrenadante se le agregó 2 g de PEG por cada 10 ml de plasma original. Se centrifugó y disolvió el precipitado en la mitad del volumen inicial en tampón y luego se sembró en la columna de heparina-sepharosa 4 B.

Se efectuó una nueva precipitación con PEG con los fines de concentrar los eluidos, (4 g cada 10 ml de eluido), y se continuó como método A.

Segunda etapa: heparina-Sepharosa 4 B.

Remoción del PEG.

Al precipitado final de PEG, disuelto en tampón se agregó sulfato de amonio sólido hasta 50 % de saturación con agitación suave durante 15 minutos. Se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se removió la capa lipídica flotante y se llevó el sulfato de amonio al 95 % de saturación .

El precipitado se separó por centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se disolvió en un volumen de agua pequeño conocido, que se dializó contra acetato de amonio 0.01 M a 4°C.

La preparación final se congeló en alícuotas a -20°C o se liofilizó y guardó a 4°C hasta su utilización.

(Wickerhauser M., et al., 1979).

El material obtenido fue homogéneo en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Figura 23.

A medida que envejeció se observaron pequeñas cantidades de material polimerizado, dependiendo del método de preparación, hecho que también fue observado por otros autores (Murano G., et al., 1981).

Rendimiento del método.

	Volumen (ml)	ATIII (U/ml)	Total ATIII	%
Plasma	15.0	0.7	10.5	-
Heparina-Sepharosa 4B	3.0	2.0	6.0	57
PEG	0.8	5.4	4.3	72

PROTROMBINA HUMANA PURIFICADA.

Método de obtención : (Biggs R., 1976).

La Protrombina se preparó a partir de una mezcla de 10 plasmas humanos normales citratados y frescos según el esquema:

- 1.- adsorción sobre $(HO)_3Al$.
- 2.- elución y
- 3.- cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A 50 (dos veces).

DEAE-Sephadex A 50 en forma citrato: 0.5 g de DEAE-Sephadex se colocaron en agua destilada hasta su hinchamiento. Después se agregaron 100 ml de NaOH 0.5 N y se lavó en un embudo Buchner con agua destilada hasta cloruros negativos. A continuación se agregó ácido cítrico 0.5 N (500 ml) y se lavó con agua destilada hasta neutralidad.

Procedimiento:

2 l de plasma se adsorbieron con agitación durante 30 minutos a 37°C con 100 ml de hidróxido de aluminio 2M. Luego se centrifugó y se lavó el hidróxido con 200 ml de ClNa 0.45% en citrato de sodio 10^{-3} M y se eluyó con 50 ml de citrato sódico 0.1 M ajustado a pH 6.8 con ácido cítrico.

El eluido del hidróxido de aluminio se diluyó con 50 ml de tampón Tris-HCl 20mM pH 7.5 y se agitó 15 minutos con 0.5 g de DEAE-Sephadex A 50 en la forma citrato. Luego se lavó con alícuotas de 75 ml de tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.1 M en Tris 20 mM pH 7.5 y NaCl 0.1 M en Tris 0.1 M pH 7.5. El DEAE-Sephadex A 50 lavado se resuspendió en 10 ml de la última solución.

Esta suspensión se colocó en una columna conteniendo alrededor de 3 g de DEAE-Sephadex A 50 equilibrada en la misma solución. El cromatograma se desarrolló con 200 ml de gradiente lineal de NaCl (0.12-0.47 M) en tampón Tris 0.1 M pH 7.5. Se recogieron fracciones de 1.5 ml.

La Protrombina y el factor X se separan y la Protrombina se diluye a una concentración de cloruros 0.24 M y se coloca en la columna previamente equilibrada con NaCl 0.14 M en Tris 0.1 M pH 7.5. El factor II eluido se concentra y se guarda en tampón fosfato 0.1 M pH 6.0 hasta su uso a -20°C.

La concentración de II se determinó utilizando como coeficiente de extinción molar $E = 1\text{cm} / 0.1\% = 1.38$ a 280 nm. (Di Scipio R.G., Biochemistry 16:698,1977), y se comparó con el dosaje de proteínas totales.

La actividad de II se determinó por dosaje biológico de coagulación específico y se refirió a una curva de calibración realizada con una mezcla de PN.

Se obtuvieron alrededor de 10 U/mg.

REACTIVOS

Las drogas y solventes de uso general fueron de grado analítico, las específicas fueron:

Abbott (U.S.A.)

- . Heparina sódica.
- . Polybrene.

American Type Culture Collection (U.S.A.)

- . Staphylococcus aureus Newman D₂C.

Astra (Argentina)

- . Acido ξ -aminocapróico. (EACA).

Bayer (Argentina)

- . Trasylol. (aprotinina).

Behringwerke AG (Alemania)

- . Partigén y antisuero anti α_1 -antitripsina.
- . Partigén y antisuero anti α_2 -macroglobulina.
- . Partigén y antisuero anti Antitrombina III.
- . Partigén y antisuero anti Fibrinógeno.
- . Partigén y antisuero anti C₁ inactivador.
- . Partigén y antisuero anti Plasminógeno.
- . Antisuero anti Protrombina.
- . Antisuero anti Factor VII.
- . Antisuero anti Factor VIII.
- . Antisuero anti Factor IX.
- . Antisuero anti Factor X.
- . Antisuero anti Factor XIII, cadenas A y S.

Boehringer Mannheim (Argentina)

- . Chromozym TH.
- . Chromozym PK.

Chemetron (Italia)

- . cellogel.

General Diagnostics (USA)

- . Reactivos deficitarios en los factores de coagulación:
II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII.

Kabi (Suecia)

- . Sustratos cromogénicos:
S-2160.
S-2238.
S-2302.

Merck (Argentina)

- . Acetona.
- . Folin-Ciocalteu.
- . Sulfato de bario.
- . Tirosina.

Parke Davis (USA)

- . Trombina bovina.

Pharmacia Fine Chemicals Co. (Suecia)

- . Sephadex G-150.
- . Sephadex G-200.
- . Sephadex G-25 coarse.
- . CM Sephadex C-50.
- . Sepharosa 4 B activada con bromuro de cianógeno.

Richmond (Argentina)

- . caolín.

Rohm Haas (USA)

- . Amberlite CG-50 Tipe I.

Sigma Chemicals Co. (USA)

- . Agarosa Tipo II EEO medio para electroforesis.
- . Albúmina bovina.
- . Azul brillante Coomassie R.
- . Caseína.
- . Celita 512.
- . Dextrano PM 184000.
- . Dodecil sulfato de sodio.
- . Elastasa pancreática.
- . Fibrinógeno bovino.
- . Glutati6n.
- . Imidazol.
- α -Manosidasa.
- . Monodansilcadaverina.
- . Sulfato de dextrano PM 5000.
- . TAME (p-Tosil-L-arginil-metil éster .HCl).

RESULTADOS

I. Acción de E.P. sobre los sistemas plasmáticos de coagulación y fibrinólisis.

En las Tablas 5, 5.1, 5.2 (AyB), se muestran los cambios obtenidos "in vitro" en los sistemas de coagulación y fibrinólisis de una mezcla de plasmas humanos normales, que se incubaron previamente con diferentes concentraciones de elastasa pancreática porcina (E.P.) (EC N°3.4.21.11).

Bajo estas condiciones experimentales, disminuyeron los niveles de los factores I, V y VIII pero se activaron los factores IX, XI y XII aumentando sus niveles plasmáticos. Este aumento precedió al desencadenamiento del sistema de coagulación y luego se obtuvo un coágulo en el tubo de incubación, cuando se incrementó la concentración enzimática.

Fue variable el rango de la activación y disminución de los niveles de los factores e inhibidores naturales (ATIII-Cofactor de la Heparina).

La activación medida con el tiempo de plasma recalcificado aumentó con la incubación.

El cofactor de la heparina disminuyó notablemente a mayores concentraciones de E.P. y la ATIIIb se encontró modificada por la misma. Figura 19.

Se halló aumento de la actividad fibrinolítica que se visualizó en las placas de fibrina, además se produjeron PDF en el plasma, tal vez por fibrinógenolisis primaria pues el nivel del plasminógeno se halló en rangos normales.

II. Acción de los lisados leucocitarios crudos sobre los sistemas de coagulación y fibrinólisis.

Se realizaron lisados de leucocitos normales y leucémicos,

Tiempo de incubación (minutos)	FACTORES (%)							T. Trombina (seg.)
	II	V	VII-X	VIII	IX	XI	XII	
0	100	100	110	100	200	100	110	23
10	100	100	110	80	155	100	115	25
30	100	100	105	70	155	100	105	27
60	100	85	105	40	155	100	100	30
90	80	80	100	40	155	100	90	32
P.N.+S.F.	100	100	100	100	100	100	100	17

Cofactor de la Heparina: 48-67 %.

Antitrombina III inmunológica bidimensional (ATIII_{ib}): modificada.

Plasma recalcificado: a los 30 min. de incubación: 75 seg. menor que el normal diluído al 1/2 con solución fisiológica. A los 60 min. 105 seg. menor que el control normal diluído al 1/2 con solución fisiológica (S.F.).

TABLA 5: Plasma humano normal incubado con 100 µg/ml de Elastasa pancreática (E.P.) (EC N° 3.4.21.11).

7.5 unidades de enzima por ml de plasma humano normal.

Tiempo de incubación (min.)	II	V	VIII	IX	XI	XII	T. Trombina (seg.)
30	100	100	110	170	170	110	21
60	100	80	105	170	120	140	23
P.N.+S.F.	100	100	100	100	100	100	18

ATIII_{ib} : modificada.

Cofactor de la Heparina : 30 min.: 65 %; 60 min.: 60 %.

PDF. : 36 - 48 µg/ml (coagulando el plasma incubado con trombina y agregando ácido ε-aminocaprónico (EACA) y luego centrifugando y determinación.)

Placas de fibrina calentadas y sin calentar(30 min.): positiva.

Plasminógeno: 2,2-2.4 U.C./ml.(V.N.: 2.5 ± 0.5 U.C./ml).

TABLA 5.1 : Plasma normal incubado con Elastasa pancreática.

200 µg/ml de plasma.

Proporciones de P.N.+S.F. iguales a las de la Tabla 5.

A)				FACTORES (%)		I (mg /ml) Cof. Hep. (%)	
Tiempo de T. Trombina incubación (seg.)	(min.)	V	VIII	IX	XII		
0	15.5	100	97	100	100	220	100.
30	17	90	80	115	100	179	65
60	18	80	60	100	150	245	80
90	18	80	60	100	110	220	50
B)							
0	16	100	110	100	110	220	100
30	15.5	80	110	110	140	220	110
60	17	80	110	140	110	210	70
90	19	80	105	130	110	210	75
P.N.+S.F.	16	100	100	100	100	245	120

ATIII_{ib} : modificada.
 Plasminógeno : 2.2-2.4 U.C./ ml.

TABLA 5.2 : Plasma normal incubado con Elastasa pancreática.

A) E.P.: 10 µg/ml de plasma

B) E.P.: 5 µg/ml de plasma

Proporciones de P.N. y S.F. iguales a las de la Tabla 5.

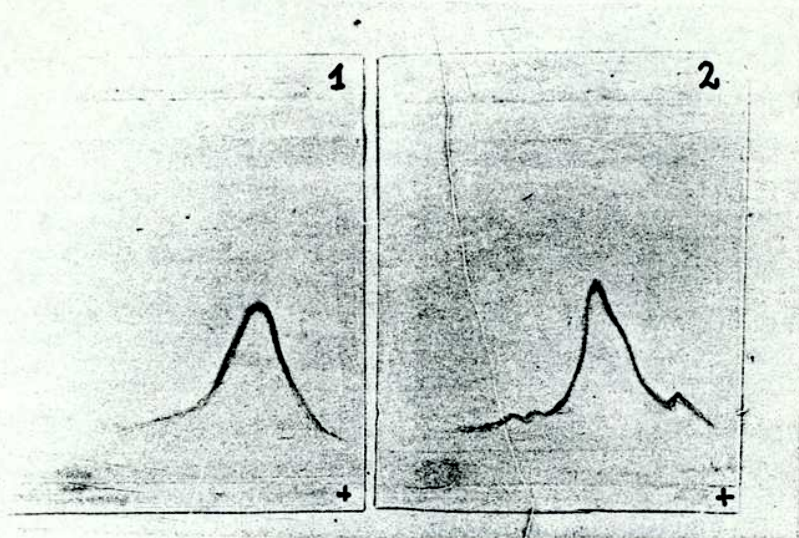


FIGURA 19 : Inmunoelectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado.

Antisuero Anti-Antitrombina III.

Incubados de P.N. con E.P. 30 min. a 37°C.

1. P.N. + NaCl 0.154 M. (10 ul/ml de plasma).

2. P.N. + E.P. (10 ug/ml de plasma).

Procedimiento según Materiales y Métodos.

(Tabla 5.2).

según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizaron leucocitos leucémicos provenientes de pacientes con LA y LMC.

El empleo de leucocitos de LMC permite obtener un gran número de células maduras e inmaduras (blastos) con un pequeño volumen de sangre venosa. Esto es muy conveniente, ya que la cantidad de sangre venosa extraída puede ser crítica en los pacientes con LA.

En la Tabla 6 se observan las concentraciones plasmáticas residuales inmunológicas del Fibrinógeno, Plasminógeno y los factores de complemento C_{3C} y C_4 luego de la incubación con enzimas leucocitarias.

En la Tabla 7 se muestra la acción de estas enzimas sobre el I humano purificado y se compara con la acción producida por α -trombina purificada sobre el mismo. Se midió la actividad fibrinolítica de estas enzimas, midiendo el área de lisis producida sobre una placa de fibrina, preparada con fibrinógeno humano purificado coagulado con trombina bovina. Se midió la actividad inmunológica residual del Fibrinógeno humano.

La acción enzimática leucocitaria fue comparable a la acción de la E.P. y de la α -trombina, en las concentraciones experimentales utilizadas.

III. Acción de enzimas aisladas de lisados leucocitarios por filtración en Sephadex G-200 y purificación por cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50, sobre los factores de coagulación y la ATIII.

Se efectuó la filtración por Sephadex G-200 de los lisados leucocitarios de leucocitos normales y leucémicos. Figuras 15, 15.1, 15.2 y 15.3.

Luego se cromatografiaron los picos protéicos obtenidos en CM-Sephadex C-50. Figuras 16, 16.1 y 16.2.

Los espectros de absorción de los picos obtenidos, reali-

	T U B O S					N°
	1	2	3	4	5	
Plasma normal (μ l)	20	20	20	20	20	20
E.P. (1 mg/ml)	10					
Sobren.LMC (9.5 mg/ml)			20			
Sobren.L.A. (6 mg/ml)				20		
Pico 1 ^o (Seph.G-200, 0.5mg/ml)		20				
Solución fisiol. (S.F.)						20
Plasminógeno (VN:10-20mg/dl)	17.6	15.8	17.6	17.0	17.6	
Fibrinógeno (VN:150-500 mg/dl)	174	170	202	174	178	
C _{3c} (VN:50-120mg/dl)	85	59	72	58	67	
C ₄ (VN:20-50mg/ml)	16	13.8	16	13.8	16	

Incubados 30 minutos a 37°C y determinación de la actividad inmunológica residual plasmática en placas de inmunodifusión radial (M-Partigén), luego de 48 horas a 25°C.

Siembra: 5 μ l de cada tubo.

Sobren. LMC= sobrenadante de lisado de leucocitos de LMC.

Sobren. L.A.= sobrenadante de lisado de leucocitos de LA.

C_{3c} = Activador de C₃. (β ₁-C-globulina).

C₄ = β ₁-E-globulina.

TABLA 6 : Incubados de plasma humano normal con enzimas leucocitarias crudas y E.P.

Fibrinógeno 1g/100ml (µl)	200	200	200	200	200	200	200
E.P. (1 mg/ml)	200						
Sobrenad. Leucoc. LMC. (9.5mg/ml)	200						
Sobrenad. Leucoc. LA. (6 mg/ml)		200					
Pico 1' (Sephadex G-200) (0.5mg/ml)			200				
α-Trombina humana (0.41mg/ml)							200
Solución Fisiológica							200

Fibrinógeno I.D.R. (mg/100ml)

P.D.F. (estáfilococos)

N.H.	N.H.	N.H.	N.H.	N.H.	N.H.
±	±	±	±	±	-
340	404	340	404	340	404

- 126 -

Placa de fibrina (de fibrinógeno humano purificado) coagulada con trombina bovina sin calentar : positiva con E.P., Pico 1', Sobren.LMC, Sobren. LA.

Con α-Trombina humana purificada se produce un coágulo a los pocos segundos, se realizó la determinación con el sobrenadante. (Fibrinógeno no coagulable por Trombina).

N.H.: no se registra halo de difusión en la placa a las 48 horas a 25°C.

TABLA 7 : Incubación de fibrinógeno humano purificado con enzimas leucocitarias, E.P. y α-Trombina humana purificada (Fenton).

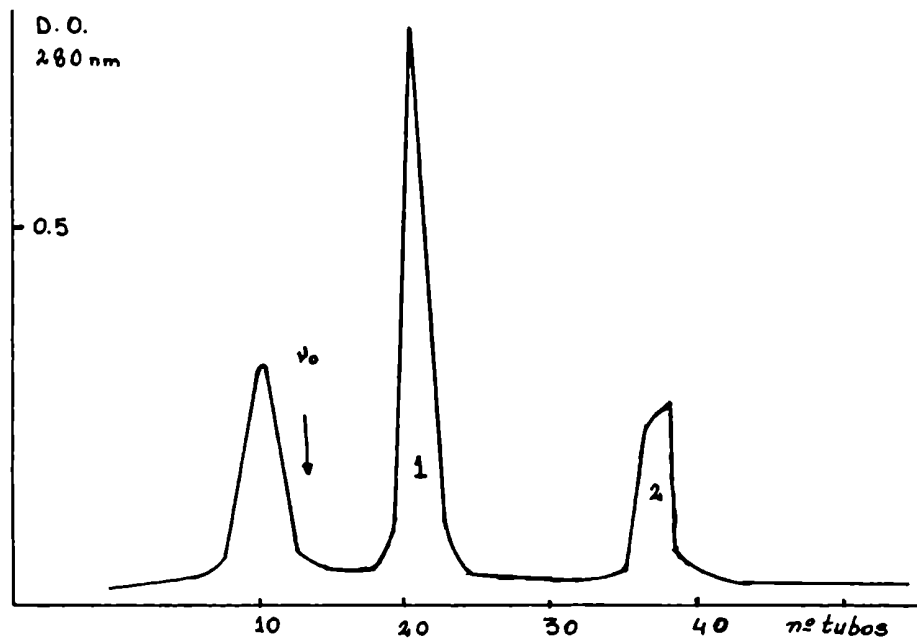


FIGURA 15 : Filtración por Sephadex G-200.

Lisado de leucocitos normales.(1 ml).

V_0 determinado con Azul Dextrano 2000 1mg/ml

Tampón fosfato 0.025 M pH 7.2

Columna : 1.2 x 90 cm.

Flujo : 7 ml/ hora.

Fracción : 3 ml / tubo.

Concentración protéica promedio del

lisado: 4 mg/ml.

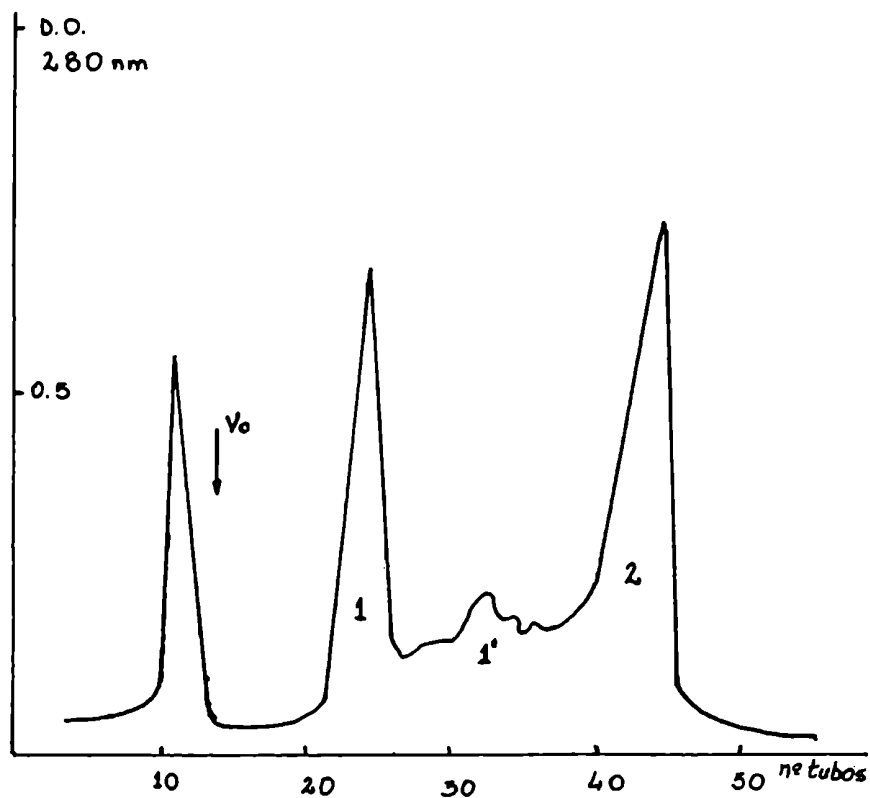


FIGURA 15.1: Filtración por Sephadex G-200.

Lisado de leucocitos de leucemia mieloide crónica, 1 ml.

Concentración protéica promedio: 10 mg/ml.
Condiciones experimentales idénticas a las del lisado de leucocitos normales.

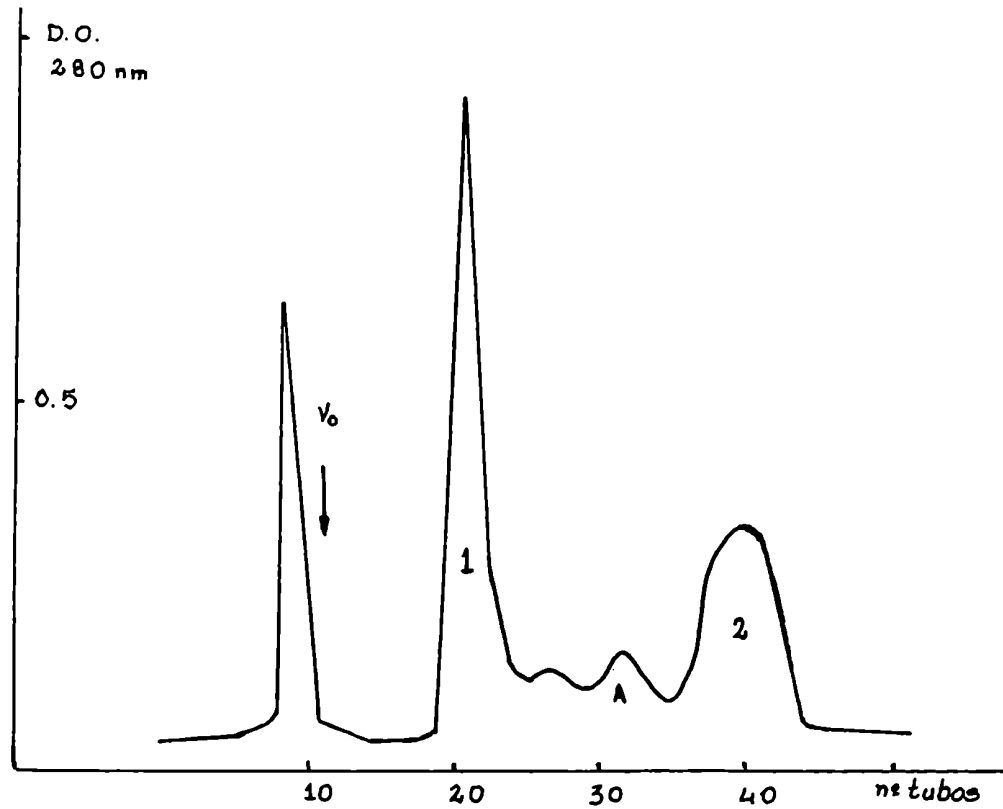


FIGURA 15.2: Filtración por Sephadex G-200.

Lisado de leucocitos de Leucemia promielocítica aguda. 1 ml.

Concentración protéica promedio: 10 mg/ml.
Condiciones experimentales idénticas a las del lisado de leucocitos normales.

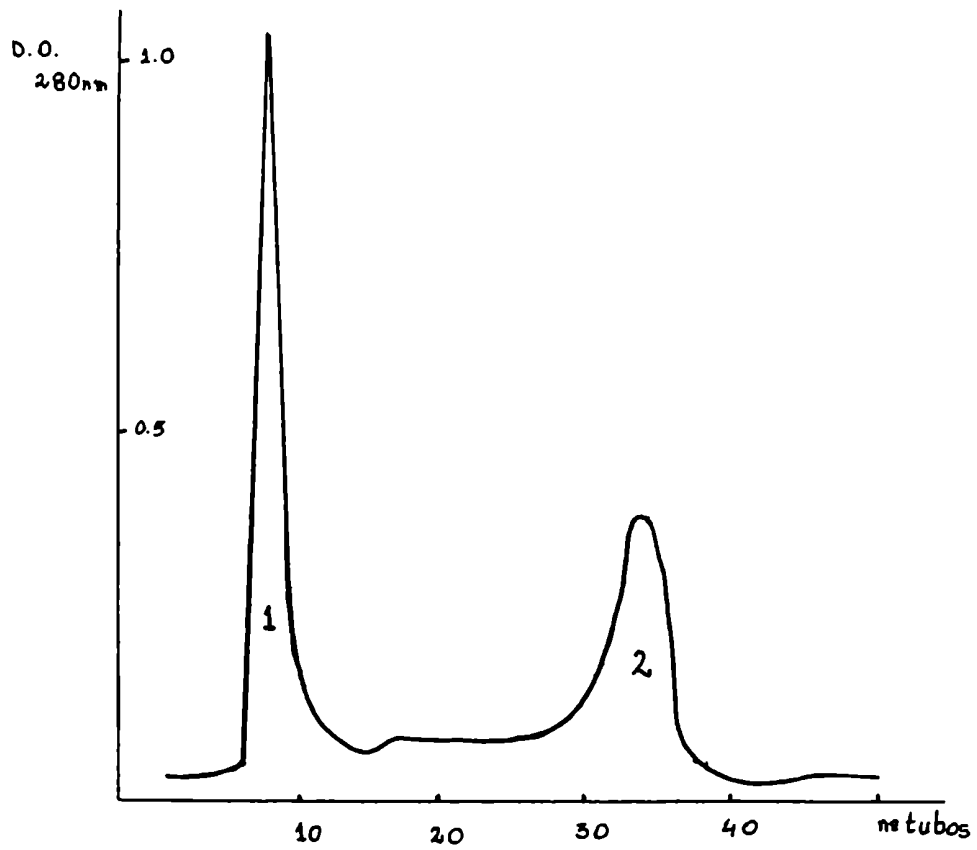


FIGURA 15.3: FILTRACION por Sephadex G-200.

Lisado de leucocitos de leucemia mielomonocítica (aguda). 1 ml.

Concentración protéica promedio: 10mg/ml.

Condiciones experimentales idénticas a las del lisado de leucocitos normales.

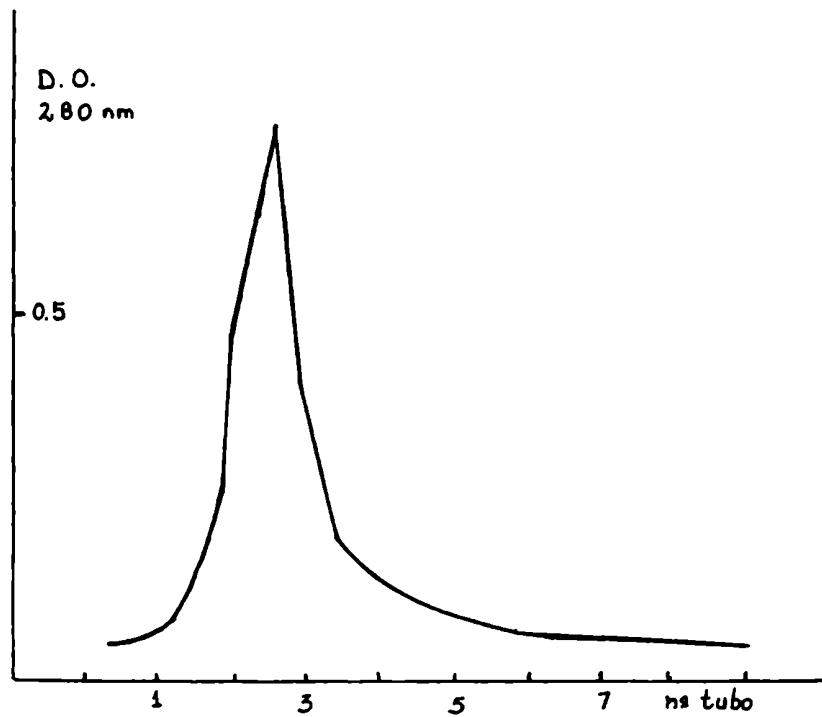


FIGURA 16 : Cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50.

Pico 1 proveniente de Sephadex G-200 de lisado de leucocitos normales.

Tampón fosfato 0.05 M, Cl_2Mg 0.005 M, NaCl (0.2-1.0 M), pH 7.5.

Columna: 1.5 x 30 cm

Flujo: 8 ml/hora.

Fracción: 2 ml/tubo.

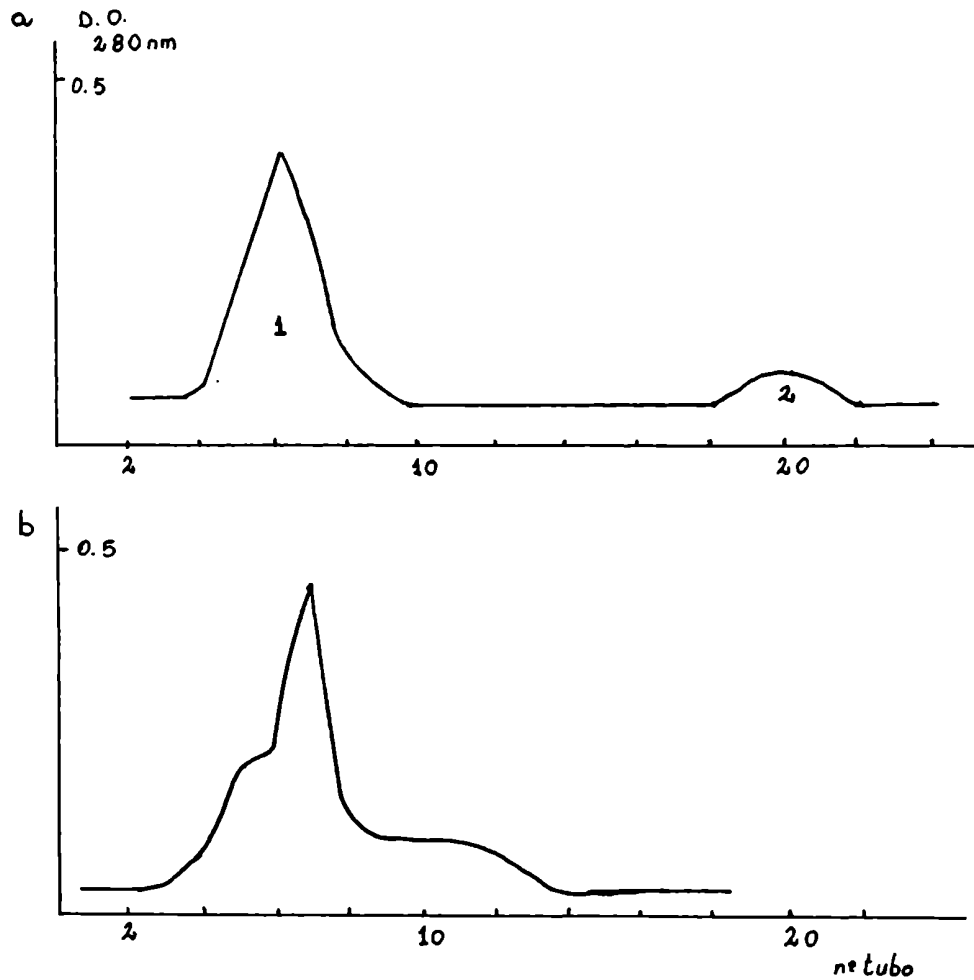


FIGURA 16.1 : Cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50.
a) Pico 1 proveniente de Sephadex G-200 de lisado de leucocitos de LMC.
b) Pico 1 proveniente de Sephadex G-200 de lisado de leucocitos de LMC.
Condiciones experimentales idénticas a las correspondientes al Pico 1 de leucocitos normales.

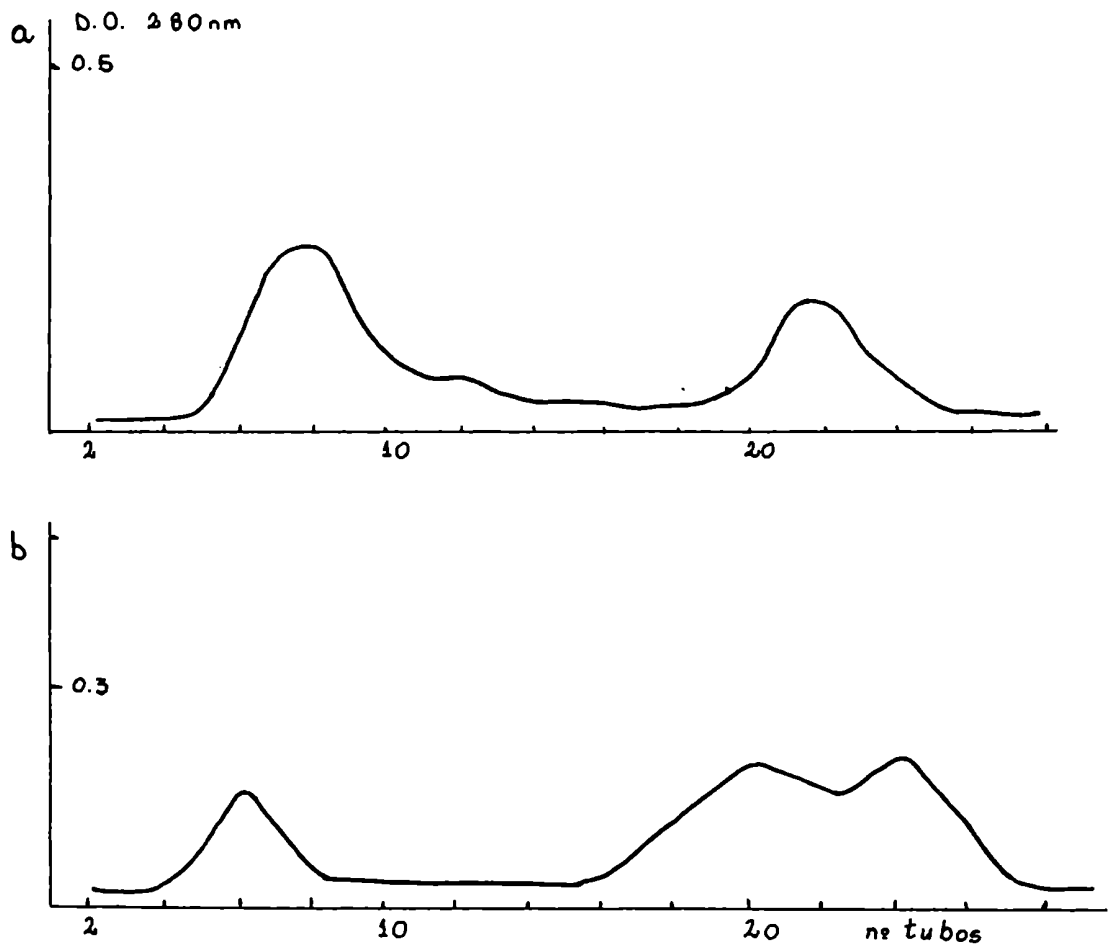


FIGURA 16.2: Cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50.

a) Pico 1+1' proveniente de Sephadex G-200 de lisado de leucocitos de LMC.

b) Pico 2 proveniente de Sephadex G-200 de lisado de leucocitos de LMC.

Condiciones experimentales idénticas a las del pico 1 de lisado de leucocitos normales.

zados con un espectrofotómetro Beckman DB, en el rango UV, se compararon con los obtenidos con E.P. y α -Manosidasa, disueltas en el tampón correspondiente a cada pico. Figuras 17 y 18.

La concentración protéica y el contenido de hidratos de carbono de los picos protéicos eluidos se muestran en las Tablas 21 y 22.

Los picos enzimáticos eluidos de Sephadex G-200 y los purificados por cromatografía de intercambio iónico se hicieron interactuar con plasma humano normal a 37°C durante 30 minutos.

Se dosaron los factores de coagulación II, V, VII, VIII, IX y XI. Se realizó el T.Q. y se dosó el inhibidor natural ATIII por el método del sustrato cromogénico S-2238 (ATIIIb). Tabla 8. Se determinó, además, la ATIIIb sobre cellogel.

Se compararon los datos del estudio de coagulación obtenidos con los picos protéicos provenientes de Sephadex G-200 y de cromatografía de intercambio iónico con los controles normales utilizando la distribución t de "Student". Se hallaron diferencias significativas (con nivel de confianza del 95%) en el TQ, Factores II, V y ATIIIb para los picos de Sephadex G-200 y TQ, factores II, V, VIII y VII y la ATIIIb para los picos de intercambio catiónico. Tabla 9.

Las placas de fibrina sin calentar resultaron positivas para los picos obtenidos por intercambio catiónico.

IV. Acción inhibitoria de la Aprotinina (Trasylol) sobre los lisados leucocitarios.

Dentro de la terapia aplicada a los pacientes con LA se utiliza el Trasylol. Se realizaron experimentos con lisados de leucocitos provenientes de LMC y LAM en un medio plasmático con y sin Trasylol. Tablas 10 y 11.

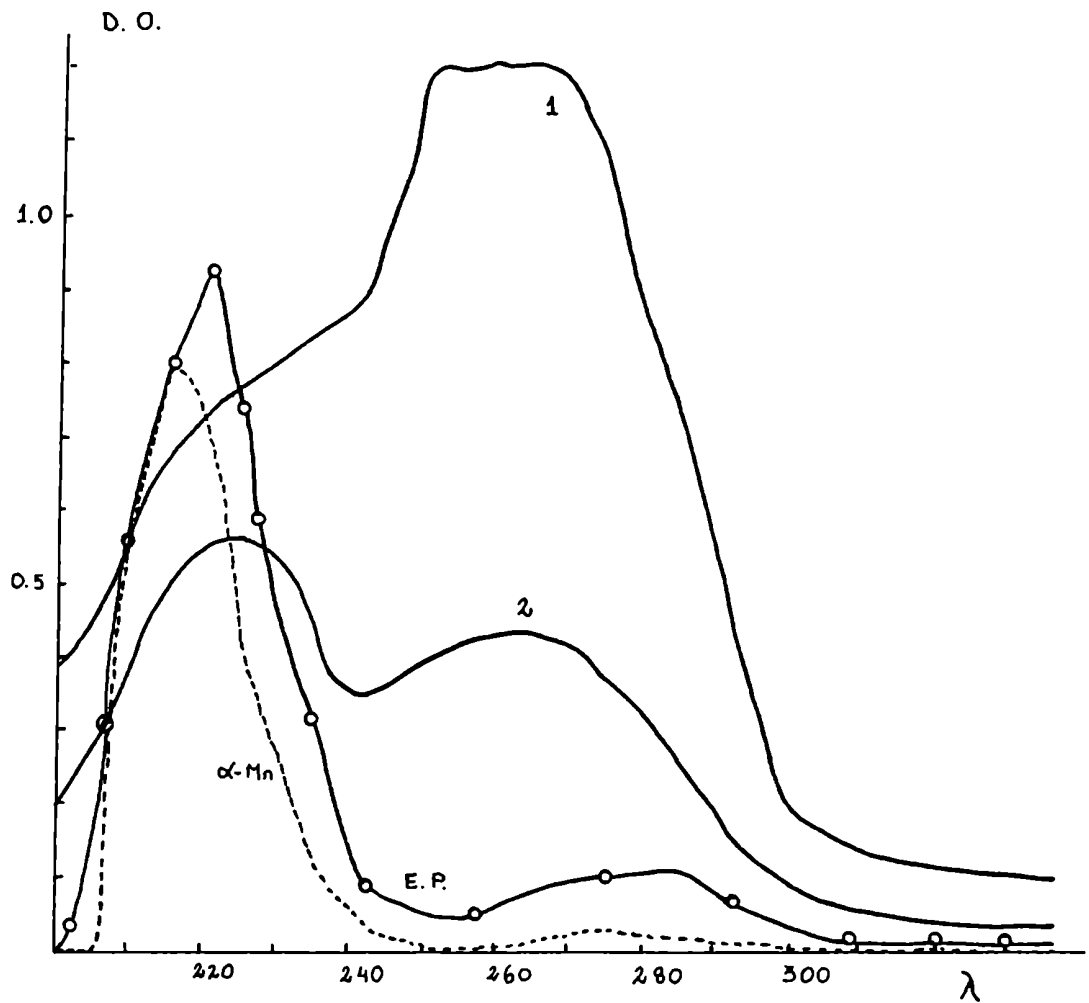


FIGURA 17 : Espectros UV en espectrofotómetro Beckman DB
 paso de luz: 1 cm.

1= Pico 1 de filtrado en Sephadex G-200 de
 lisado de leucocitos de LAMMo.

2= Pico 2 del mismo lisado.

E.P.= Elastasa pancreática .

α -Mn= α -Manosidasasa.

Las enzimas se disuelven en el mismo tampón de los picos.

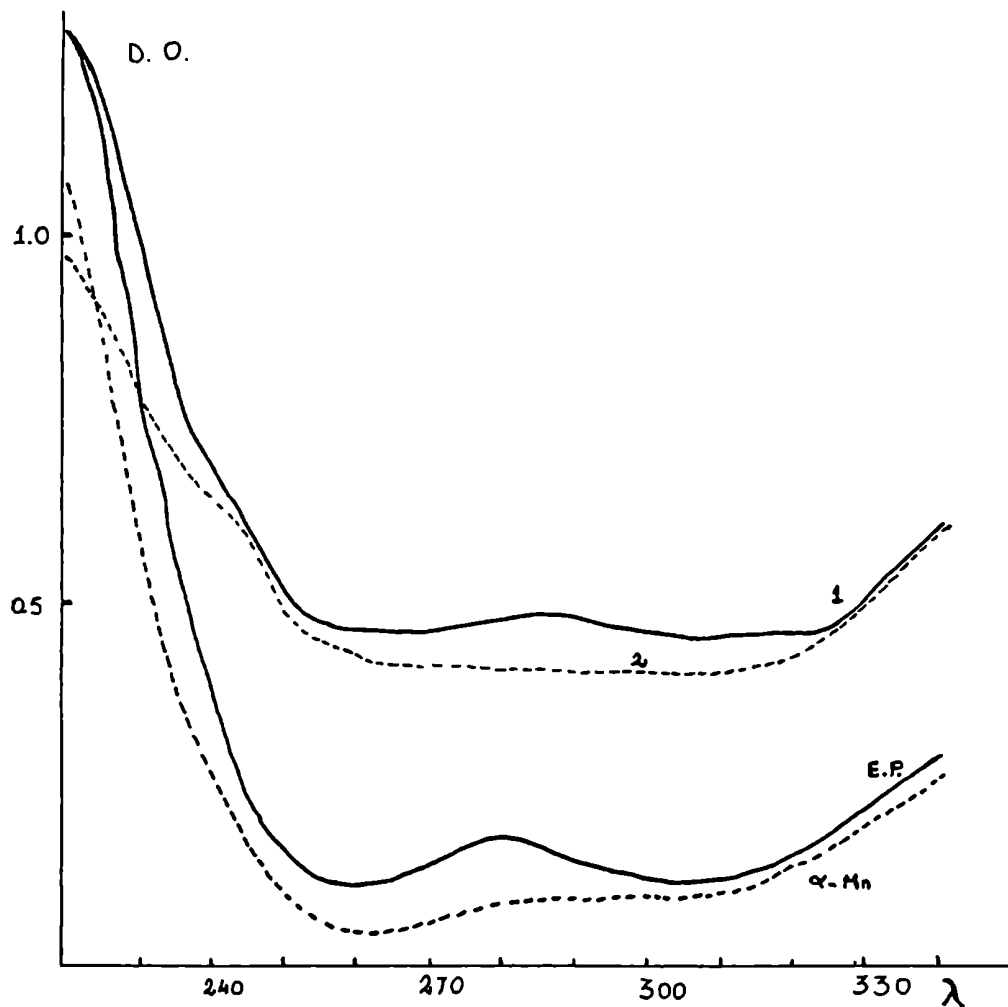


FIGURA 18 : ESPECTROS UV en espectrofotómetro Beckman DB
 Picos 1 y 2 provenientes de cromatografía de
 intercambio en CM-Sephadex C-50 del pico
 1+1'eluido de Sephadex G-200 de lisado de leuco-
 citos de LMC.

E.P.:Elastasa pancreática

α -Mn: α -Manosidasa.

Las enzimas se disuelven en el mismo tampón de los eluidos

Lisado de LMC (10^{11} células/ml)

Filtración por Sephadex G-200				Cromatografía de intercambio iónico			
siembra	mg Picos	mg Tot.	% Rec	siembra	mg Picos	mg Tot.	% Rec.
10.0	1+1'	3.15		2.0	1	0.45	
					2	0.024	24
	2	1.95	51	1.2	1	0.215	18
				0.4	1	0.06	
10.0	1	0.48		0.3	1	0.13	
					2	0.01	47
	1'	2.87		2.0	1	0.36	18
	2	3.35	67	2.0	1	0.042	
					2	0.63	
					3	0.66	67
						1.33	

TABLA 21 : Proceso de obtención de enzimas leucocitarias y su purificación.

Picos		H.de Carbono	C.Protéica	% respecto Prot.
		ug/ml	ug/ml	
1 + 1'	a	10	80	12.5
2	a	12.5	155	8.0
1	b	12.6	55	22.9
1'	b	6.3	80	7.9
2	b	15.0	290	5.2
I 1	a 1+1'	14.9	60	24.8
I 2	a 1+1'	7.5	4	187.5
I 1	b 1	3.8	17	22.4
I 2	b 1	10.2	3	340.0
I 1	b 1'	5.0	45	11.1
I 1	b 2	5.0	7	71.4
I 2	b 2	7.0	55	12.7
I 3	b 2	11.3	73	15.4
I 1	a 2	11.3	43	26.3
I 1	a 2	7.0	10	70.0
I 2	a 2	5.0	5	100.0
E.P.		10.0	100	10.0

E.P. = elastasa pancreática porcina tipo III.

I = picos de cromatografía de intercambio iónico.

a, b = picos obtenidos por filtración en Sephadex G-200

\bar{X} (picos 1) = 25.1 %.

Valores teóricos de % de H.de C. en elastasa leucocitaria respecto de la proteína = 21.2 %.

TABLA 22 : Dosaje de Hidratos de carbono por el método de carbazol de los picos protéicos obtenidos por filtración de lisados leucocitarios.

T.Q.	FACTORES (%)							Conc. Prot. ATIII _{ib} mg/ml.	ATIII _b (%)
	II	V	VII	VIII	IX	XI			
Plasma N.	100	100	100	100	100	100	100	N.	100
Pico 1 ^a	10	80	-	95	120	110	110	0.37	70
Pico 2 a	15	80		120	110	110	110	0.39	107
Pico 1 b	100	78		110	50	110	110	0.16	67
Pico 1 ^c b	105	80		110	80	120	120	0.41	104
Pico 2 b	60	70		115	70	80	80	0.67	85
P.I.1 a ₁	85	80	-	140	100	120	120	0.06	79
P.I.2 a ₁	110	80	-	150	140	100	100	0.004	86
P.I.1 b ₁	80	70	-	145	140	120	120	0.017	85
P.I.2 b ₁	70	80	-	150	140	140	140	0.003	90
P.I.1 b ₁₋₆₀	70	95	95	170	60	50	50	0.045	80
P.I.1 b ₂	70	75	50	145	60	50	50	0.007	76
P.I.2 b ₂	70	75	50	160	75	55	55	0.055	90
P.I.3 b ₂	75	75	75	160	55	55	55	0.073	80
P.I.1 a ₂	30	75	75	150	60	55	55	0.043	75
P.I.1 a ₂	70	80	70	145	55	55	55	0.01	75
P.I.2 a ₂	85	100	100	145	50	50	50	0.005	80

Se incuban 0.5 ml de plasma humano normal con 0.1 ml de cada pico protéico, durante 30 minutos a 37°C. y luego se efectúan las determinaciones.

TABLA 8 : Incubados de plasma normal con picos provenientes de Sephadex G-200 y de Cromatografía de intercambio iónico de los mismos.(P.I.).

PLASMA NORMAL+PICOS PROVENIENTES DE SEPHADEX G-200. (N=10)

$\bar{X} \pm S$	II	V	VII	VIII	IX	XI	ATIII _b
(%) 73 ± 7	58 ± 40	78 ± 4	110 ± 9	86 ± 29	106 ± 15	87 ± 19	
***	***	***	#	#	#	#	*

PLASMA NORMAL+PICOS PROVENIENTES DE CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO. (N=11)

68 ± 12	74 ± 19	81 ± 9	74 ± 17	151 ± 9	85 ± 34	77 ± 33	82 ± 6
***	***	*	**	***	#	#	***

PLASMA NORMAL+SOLUCION FISIOLÓGICA DE CLORURO DE SODIO. (N=15)

90 ± 10	100 ± 20	100 ± 20	100 ± 20	100 ± 50	100 ± 50	100 ± 50	105 ± 25

*** p < 0.001

** p < 0.01

* p < 0.05

p < 0.1

Diferencias respecto de los controles normales.

TABLA 9 : Valores promedio y una desviación standard.
Test de Student.

F A C T O R E S (%)

	II	V	VII	VIII	IX	XI	XII
Plasma normal+leucocitos+S.F.	80	65	75	67	120	90	50
Plasma normal+leucocitos+Tsl.	110	80	80	85	80	95	85
Plasma normal+sol.fisiol.	100	100	100	100	100	100	100
Plasma normal control fresco	102	100	100	115	140	135	105

Se incuban 2.7 ml de plasma con 0.3 ml de aprotinina (Trasylol:Tsl) de 10000 UI y sobrenadante de lisado de leucocitos de LMA ($1,1 \times 10^8$ células/ml), a 37°C durante una hora.

Se utilizan 0.3 ml del sobrenadante.S.F.:NaCl 0.154 M.

ATIII_{ib} = se modifica con leucocitos y se modifica levemente cuando se agrega Tsl.

Volumen final en cada caso: 3.3 ml.

Dosaje de factores: promedio de triplicados.

TABLA 10 : Incubados de plasma humano normal citratado con leucocitos (extracto crudo) en presencia y ausencia del inhibidor de serinoproteasas aprotinina (Trasylol: Tsl).

	FACTORES (%)							ATIII _b
	II	V	VII	VIII	IX	XI	XII	
Plasma nor.+leucocitos+S.F.	80	70	70	70	125	75	65	80
Plasma nor.+leucocitos+Tsl	100	85	80	85	95	70	70	60
Plasma nor.+S.F.	100	100	100	100	100	100	100	100

Se incuban 0.8 ml de plasma normal con 0.1 ml de sobrenadante de lisado de leucocitos de LMC (5 x 10¹¹ células/ml) y 0.1 ml de aprotinina (Trasylol:Tsl) de 20000 UI.

S.F.: NaCl 0.154 M.

Valores promedio de triplicados.

Volumen final en cada caso: 1.0 ml.

ATIII_b: medida con sustrato cromogénico S-2238.

ATIII_{ib}: normal cuando se agrega el inhibidor de serinoproteasas Trasylol.

TABLA 11 : Incubados de plasma normal con sobrenadante de lisado de leucocitos de LMC en presencia y ausencia de Trasylol.

Además se determinó el perfil de ATIIIb en cellogel, de los mismos. Figura 19.1.

V. Acción de enzimas leucocitarias sobre el sistema plasmático de calicreínas. Activación plasmática.

Se midió la fase alta de activación de la coagulación plasmática, determinando los niveles de calicreínas residuales en plasma humano normal luego de la incubación con lisados leucocitarios y los picos eluidos de Sephadex G-200 correspondientes a los mismos leucocitos. Tablas 12.1 y 12.2.

En la Tabla 13 se pueden observar los valores promedio con una desviación standard de calicreínas plasmáticas, en plasma normal, en pacientes con LA y en plasma normal incubado con enzimas leucocitarias.

VI. Acción de α -Manosidasa (EC N°3.2.1.24) sobre el sistema de coagulación y la ATIII.

Se incubó plasma humano normal con α -Manosidasa y se determinó la ATIIIb sobre acetato de celulosa. Figura 19.2.

La α -Manosidasa también actúa sobre fibrinógeno purificado (Figura 28) y sobre ATIII humana purificada como puede verse en las Figuras 26.1 y 26 , produciendo otras fracciones protéicas, que se destacan por electroforesis en film de poliacrilamida.

VII. Acción de enzimas leucocitarias sobre la ATIII plasmática.

Sobre la base de las modificaciones de los perfiles electroforéticos bidimensionales de la ATIII halladas cuando se incubó el inhibidor con leucocitos normales o leucémicos se estudió la filtración por Sephadex G-150.

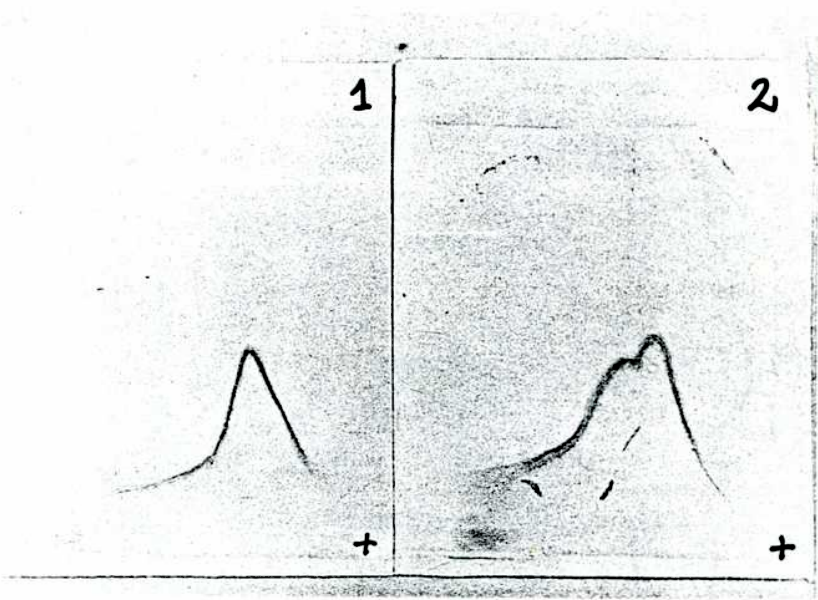


FIGURA 19.1 : Inmunoelectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado.
Antisuero Anti-Antitrombina III.
Procedimiento según Materiales y Métodos y Tabla 10.

1. P.N. + extracto leucocitario de LAM +
+ aprotinina (Trasylol).
2. P.N. + extracto leucocitario.

Incubados de P.N. con extractos leucocitarios de leucemias con y sin aprotinina en el medio.

Δ U / ml

Tiempo (min)	0	10	30	60	90	\bar{X}	\bar{X}	%Activación resp.delP.N.
LAMMO+P.N.	0.55	0.54	0.53	0.51	0.67	0.56	147	
Pico 1 (Seph.)	0.68	0.56	0.57	0.49	-	0.58	153	
LN+P.N.	0.44	0.45	0.39	0.53	0.64	0.49	129	
P.N.	-	-	-	-	-	0.38	-	

Pico 1 : proveniente del lisado de leucocitos de LAMMO filtrado por Sephadex G-200.
 Leucocitos de LAMMO : 10^{11} células / ml.
 Leucocitos normales : 10^{10} células / ml.
 1 ml de plasma humano normal se incuba con 0.3 ml de lisado o pico.

La determinación de calicreínas plasmáticas se efectúa dentro de las 4 horas de obtenido el plasma.

TABLA 12.1 : Determinación de calicreínas plasmáticas de incubados de plasma normal con enzimas leucocitarias, por método de sustrato cromogénico.

Tiempo (min.)	$\Delta U / ml$	\bar{x}	% de Activación respecto al P.N.
P.N.	30		
	-	0.50	-
Pico 1 + P.N.	0.35	0.45	90
Pico 1	-	0.01	2
LN + P.N.	1.01	0.98	196
LN	-	0.01	2
LAMMO + P.N.	1.40	1.24	248
LAMMO	-	0.01	2

Lisados de leucocitos:

LAMMO :leucocitos de LAMMO 10^{11} células/ml.

LN :leucocitos de Normales 10^{10} células/ml.

Se incubó 1 ml de plasma normal con 0.3 ml de lisado de leucocitos o pico.

Pico 1 : Proveniente de lisado de leucocitos de LAMMO filtrado a través de Sephadex G-200.

Las determinaciones se efectuaron dentro de las 4 horas de obtenido el plasma.

TABLA 12.2 : Determinación de calicreínas plasmáticas de incubados de plasma normal con enzimas leucocitarias.

		$\bar{x} \pm s$ (Δ U/ml)
PLASMA NORMAL	N = 12	0.77 \pm 0.25
P.N.+enzimas L.	N = 6	0.70 \pm 0.33
L.A. (Pacientes)	N = 6	0.51 \pm 0.07 *

Enzimas L. : enzimas leucocitarias provenientes de extractos crudos o de picos protéicos de cromatografía en gel.

L.A. : pacientes con Leucemia aguda sin tratamiento quimioterápico.

: diferencia significativa respecto del plasma normal.

TABLA 13 : Valores promedio de calicreínas plasmáticas.
Método de sustrato cromogénico.

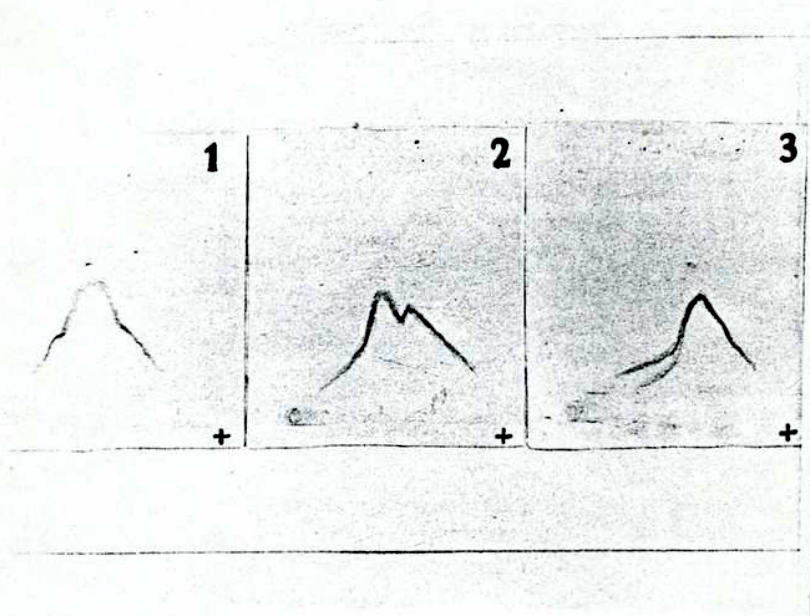


FIGURA 19.2 : Inmunoelectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado.
Antisuero Anti-Antitrombina III.
Procedimiento según Materiales y Métodos.

Incubados de P.N. con α -Manosidasa.

α -Manosidasa 1.7 U/mg.

1. P.N. (0.45 ml)+ Tampón (0.1 ml)

2. P.N. (0.45 ml)+ α -Manosidasa (0.1 ml)

3. P.N. (0.45 ml)+ α -Manosidasa (0.1 ml)+
+ aprotinina (Trasylol: 0.02 ml).

Tampón: β -Alanina/ ácido acético pH 4.5.

Se filtraron los plasmas de controles normales, de pacientes leucémicos y provenientes de pacientes con diferentes patologías, con modificación inmunológica de ATIIIb y también plasmas normales tratados con leucocitos y α -Manosidasa con fines comparativos. Figuras 20, 20.1, 20.2 y 20.3.

La concentración de ATIII, de las fracciones eluidas cercanas a la zona de la albúmina, se determinó por inmunolectroforesis unidimensional según Laurell, por medida de la altura, expresada en cm, de los picos de reacción Antígeno-Anticuerpo y se compararon con una curva de calibración obtenida con plasma normal. Se utilizó antisuero monoespecífico anti-ATIII y acetato de celulosa gelificado. Figura 21.

El coeficiente de distribución de ATIII se calculó del volumen de elución de ATIII (V_{AT}) de la siguiente manera:

$$K_{AT} = \frac{V_{AT} - V_0}{V_s - V_0}$$

Donde:

V_0 se determinó filtrando 0.5 ml de una solución de azul dextrano 2000 de 1 mg/ml y V_s con una solución de glucosa de 1 mg/ml realizadas en el tampón de elución Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4.

Los resultados promedio obtenidos con plasma normal, en 5 oportunidades, fueron:

$$V_0 = 15 \pm 0.4 \text{ ml} ; V_s = 44 \pm 8.0 \text{ ml} ; V_{AT} = 24 \pm 5.0 \text{ ml} ; \\ K_{AT} = 0.35 \pm 0.03.$$

La K_{AT} obtenida concordó con la hallada por otros autores ($K_{AT} = 0.39$; Sas G., et al., 1980), en condiciones experimentales semejantes a las utilizadas. La concentración de ATIII por este método estuvo comprendida en el rango plasmático normal con un promedio de 24 mg/dl (0.8 U/ml). Figura 21.

Con fines comparativos se filtraron plasmas provenientes de pacientes con tromboembolismo pulmonar, cirrosis hepática,

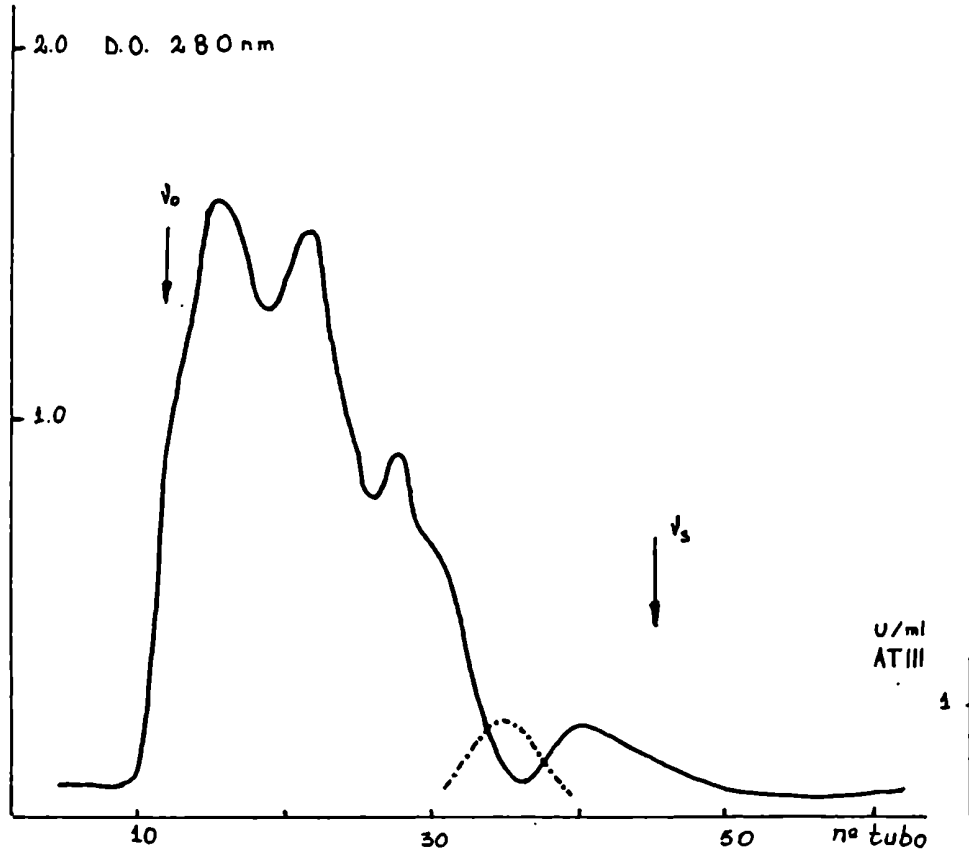


FIGURA 20 : Filtración por Sephadex G-150.
 Columna: 1.5 x 30 cm.
 2 ml/hora ; 1.3 ml/tubo.
 Tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4.
 0.5 ml de plasma normal humano. 4°C.
 Vo con Azul Dextrano 2000 1mg/ml.
 Vs con glucosa 1mg/ml. $V_{AT} = 24 \pm 5$ ml.

$$\frac{V_{AT} - V_o}{V_s - V_o} = K_{AT}$$

$$\begin{aligned} K_{AT} &= 0.35 \pm 0.03 \\ V_o &= 15 \pm 0.4 \text{ ml} \\ V_s &= 44 \pm 8 \text{ ml} \end{aligned}$$

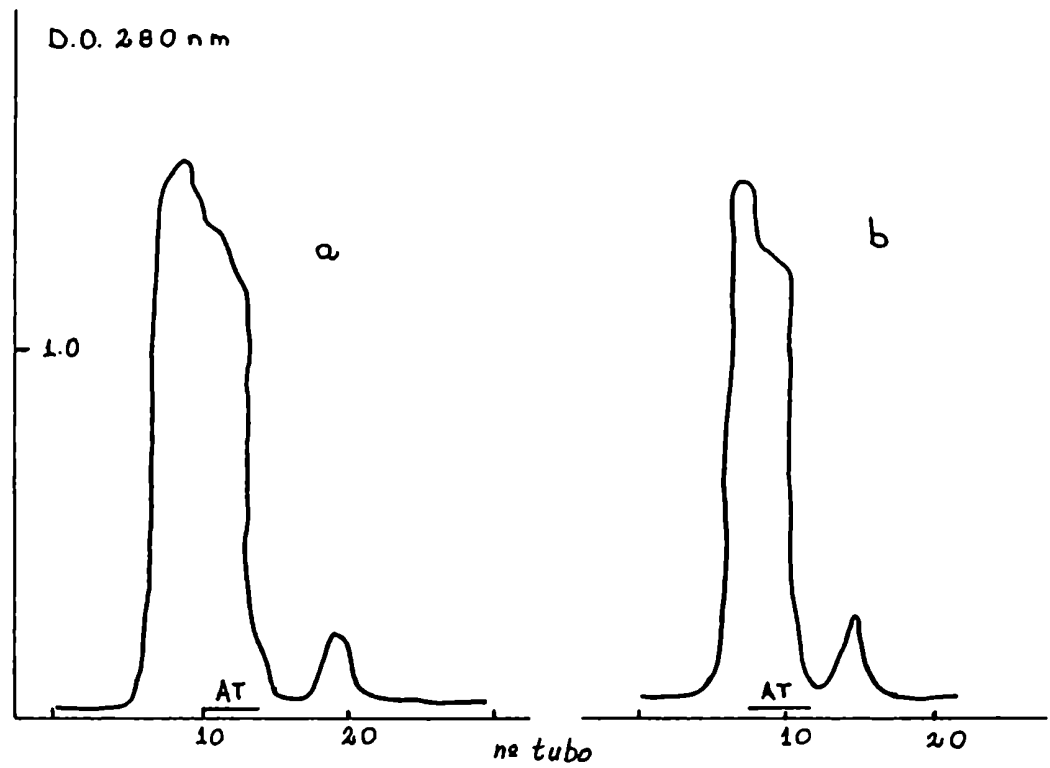


FIGURA 20.1: Filtración por Sephadex G-150.

a) 0.5 ml de plasma de LAMMO

$$K_{AT} = 0.19$$

b) 0.5 ml de plasma de cirrosis hepática.

$$K_{AT} = 0.25$$

Condiciones experimentales iguales a las del plasma normal

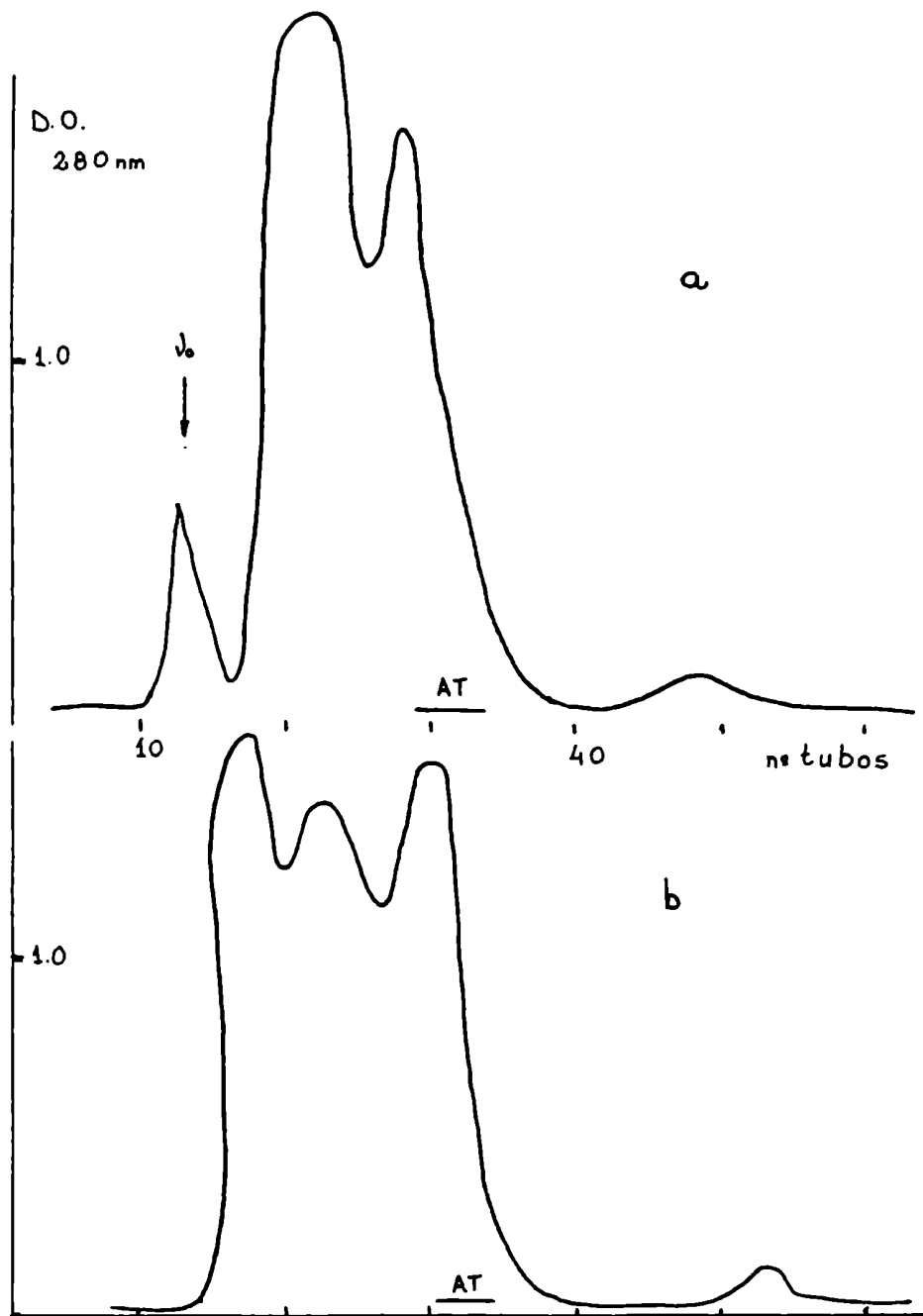


FIGURA 20.2 : Filtración por Sephadex G-150.

a) plasma normal + α -Manosidasa $K_{AT} = 0.39$

b) plasma de LLA. $K_{AT} = 0.25$

Condiciones experimentales iguales a las del plasma normal.

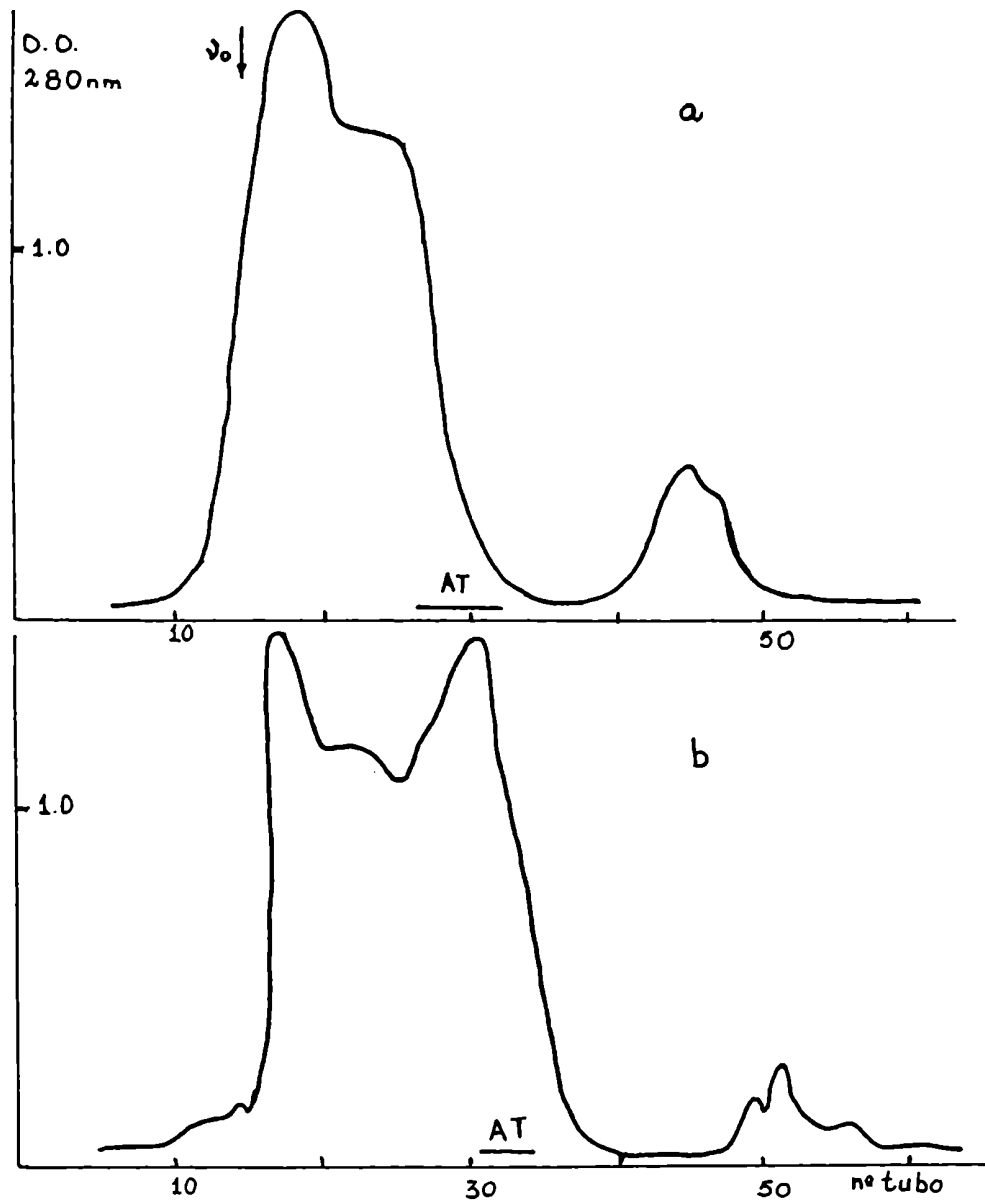


FIGURA 2.3: Filtración por Sephadex G-150.

a) plasma normal+ leucocitos de LMC. $K_{AT}=0.32$

b) plasma de tromboembolismo pulmonar.

$K_{AT}= 0.24.$

Condiciones experimentales iguales a las del plasma normal.

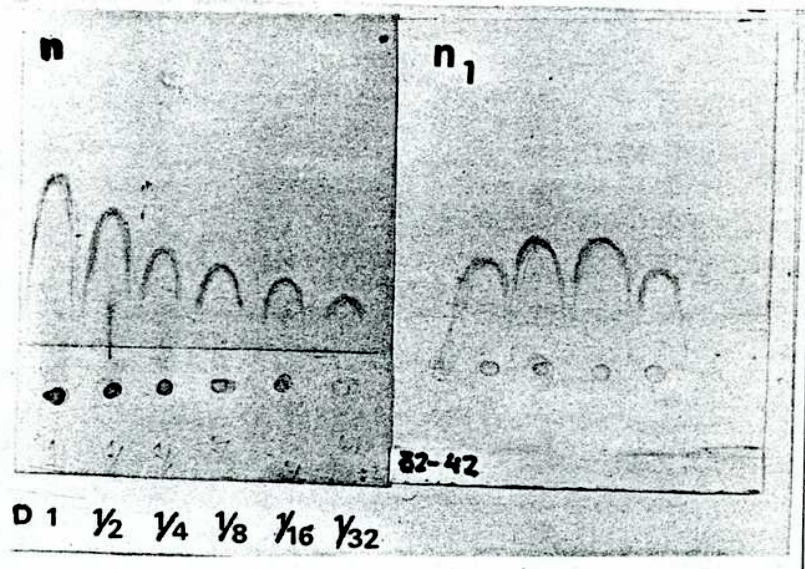


FIGURA 21 : Inmunoelectroforesis según Laurell.
Antisuero Anti-Antitrombina III.
Medida de la concentración de la ATIIIi
en eluidos cromatográficos.
Procedimiento según Materiales y Métodos.

n = curva de calibración.

n₁ = fracción 32-42 del P.N.₁ filtrado por
Sephadex G-150.

LAMMO, LAL y se incubó plasma normal con α -Manosidasa y lisado de leucocitos de LMC. Figuras 20.1, 20.2 y 20.3.

Los resultados promedio de dos determinaciones en cada caso fueron:

	V_{AT} (ml)	K_{AT}
1) Tromboembolismo pulmonar	22	0.24
2) Cirrosis hepática	19	0.25
3) LAMMO	18	0.20
4) LAL	23	0.25
5) PN + α -Manosidasa	28	0.39
6) PN + lisado de leucoc.LMC.	26	0.32

La incubación de PN, con α -Manosidasa, se realizó mezclando 0.5 ml de PN con 0.4 ml de tampón acetato pH 4.5 y 0.1 ml de enzima (0.12 U/ml) durante 20 horas a 25 °C y luego se agregaron 0.1 ml de tampón Tris-HCl pH 8.5 para detener la reacción. A continuación se sembraron 0.5 ml de la mezcla en la columna de Sephadex G-150 como en todos los demás casos.

La incubación de PN con lisado de leucocitos de LMC se realizó mezclando 0.8 ml de PN con 0.1 ml del lisado (5×10^{11} células/ml correspondientes a cerca de 10 mg/ml de proteínas) y 0.1 ml de NaCl 0.15 M durante 60 minutos a 37 °C y luego se sembraron 0.5 ml del total.

VIII. Purificación de ATIII a partir de plasma humano normal. Interacción con enzimas leucocitarias.

Se efectuó según dos métodos diferentes, involucrando una de las etapas la cromatografía de afinidad sobre Heparina-Sepharosa 4B. Figura 22.

Por ambos métodos A y B (Materiales y Métodos) se obtuvo la ATIII purificada. En la Figura 23 se puede observar que la ATIII obtenida por estos procesos muestra una sola banda protéica en gel de poliacrilamida en capa fina en presencia de SDS.

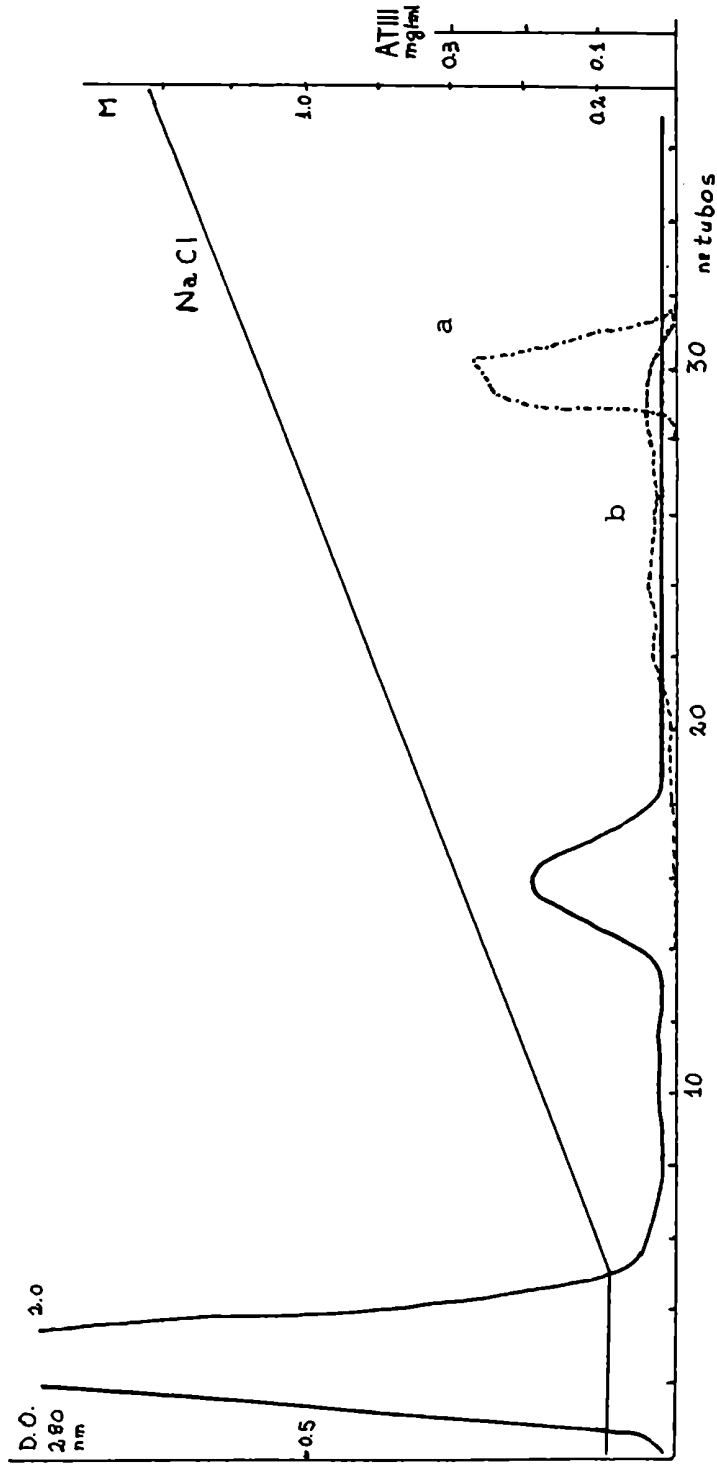


FIGURA 22 : Cromatografía de afinidad en Heparina-Sepharosa 4B.

Plasma humano normal. Obtención de Antitrombina III.

Columna: 2.3 x 12 cm. 5 ml de plasma. 3 ml/tubo.

Tampón Tris-HCl 0.1 M, citrato sódico 0.01 M, NaCl (0.15-1.5) M, pH 7.4
13 ml/hora.

Línea punteada: lugar de elución de Antitrombina III humana.

a : normal ; b : alterada por enzimas leucocitarias.

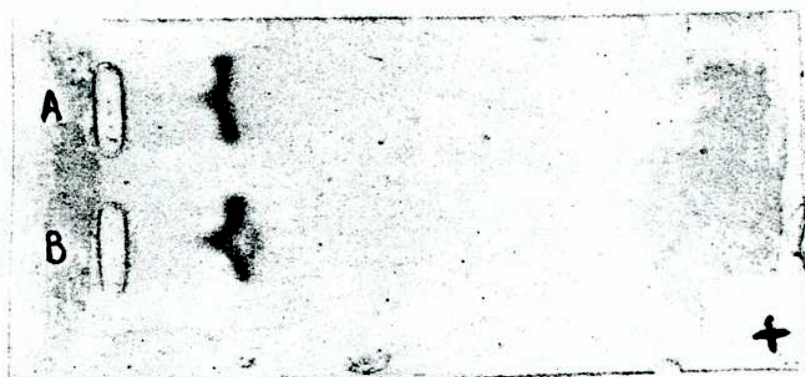


FIGURA 23 : Electroforesis en gel de poliacrilamida.
Antitrombina III humana purificada.
(Métodos A y B, ver Materiales y
Métodos).

A: una sola banda.

B; una sola banda.

La ATIII obtenida se dosó inmunológicamente por IDR y se obtuvo un valor promedio de 24 mg/100ml (Valores Normales en plasma: 17-30 mg/100 ml). Luego se efectuó la inmuno-electroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa : ATIIIib. El perfil de la ATIII purificada coincidió con el obtenido con PN, luego no sufrió modificaciones importantes en el proceso de obtención. Figura 24.

Además se determinó su actividad biológica, funcional, por métodos amidolíticos mediante el uso de sustratos cromogénicos, obteniendo una concentración promedio de 32UI/ml con Chromozym TH, y se comprobó su capacidad de interactuar con trombina y heparina por el método del tiempo de trombina. Tabla 14.

También se incubó durante 30 minutos a 37°C con enzimas leucocitarias y se determinó la actividad biológica progresiva de ATIII residual por el tiempo de trombina. Tabla 14. Además se dosó la actividad inmunológica residual por IDR, Tabla 15 y se efectuó la electroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa. Figuras 24 y 25.

Para visualizar las modificaciones introducidas por las enzimas leucocitarias y la formación de complejos, se realizaron incubaciones de ATIII humana purificada según las Tablas 16 y 17 y se efectuó la electroforesis en gel de poliacrilamida en film. Figura 26.

Simultáneamente se compararon los resultados con los obtenidos con α -trombina con y sin heparina en el medio, con E.P., con α -Manosidasa y con y sin Trasylol según los esquemas de las Tablas 18 y 19.

Luego se efectuaron las corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida en film. Figuras 26.1 y 26.2 y 26.3.

Se determinó la actividad residual de la ATIII como cofactor de la heparina, con el sustrato cromogénico Chromozym TH, luego de la incubación a 37°C durante 30 minutos con enzimas

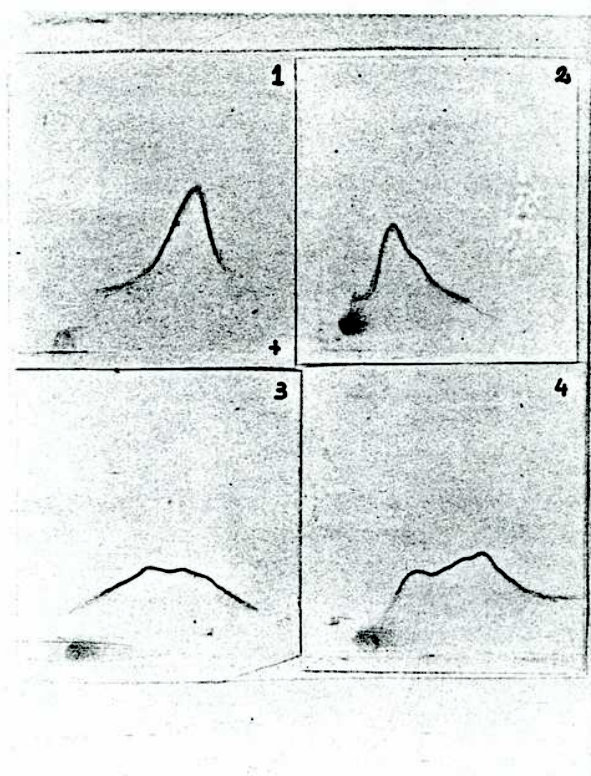


FIGURA 24 : Inmunoelectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado.

Antisuero Anti-Antitrombina III.

Procedimiento según Materiales y Métodos.

Tablas 14 y 15: ATIII incubada con 10 ug de cada enzima o fracción enzimática.

1. ATIII humana purificada.

2. ATIII + E.P.

3. ATIII + I L.N.

4. ATIII + I LAMMo.

Plasma normal (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ATIII (1 U/ml) (ml)		0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Solución fisiológica pH 7.4 (ml)	0.1		0.05						
E.P. (10 µg/ml) (ml)				0.05					
Pico intercambio L.N. (10 µg/ml) (ml)					0.05				
Pico intercambio L.A. (15 µg/ml) (ml)						0.05			
Tiempo de Trombina (seg.)		25	55	45	43	39	38		

1
16
0
1

Incubación de plasma normal con ATIII humana purificada y enzimas leucocitarias a 37°C durante 30 minutos. Luego se realiza el tiempo de trombina.

ATIII concentración de 2.1 µg/ml (método de Lowry).

Solución fisiológica: NaCl 0.154 M.

L.N.= leucocitos normales.

L.A.= leucocitos de LAMMo.

Pico intercambio: pico protéico obtenido por cromatografía de intercambio iónico.

TABLA 14 : Actividad biológica progresiva residual de ATIII. Acción de enzimas leucocitarias crudas, evaluación por un método de coagulación (tiempo de trombina).

	D ² (mm ²)	mg/ml
ATIII (100U/ml)	72.25	24.0
ATIII(100U/ml)+Trombina (partes iguales)	20.25	2.5
ATIII(100U/ml)+Trombina+Pico 1(sephadex G-200)LAMMO	30.25	6.0
ATIII(100U/ml)+Trombina+Heparina	no hay halo medible	
ATIII(100U/ml)+Trombina+Pico 1 LAMMO+Heparina	16.00	1.2

En todos los casos se mantienen las proporciones entre ATIII y Trombina.El Pico 1 proveniente de lisado de leucocitos de LAMMO filtrados por Sephadex G-200 se agrega en la misma proporción en volumen que la trombina. Previamente a la determinación de ATIII residual por Inmuno difusión radial (I.D.R.) se incuban las mezclas a 37 °C durante 15 minutos.

TABLA 15 : Medida de Antitrombina III inmunológica residual por I.D.R.
Acción de trombina y enzimas leucocitarias.

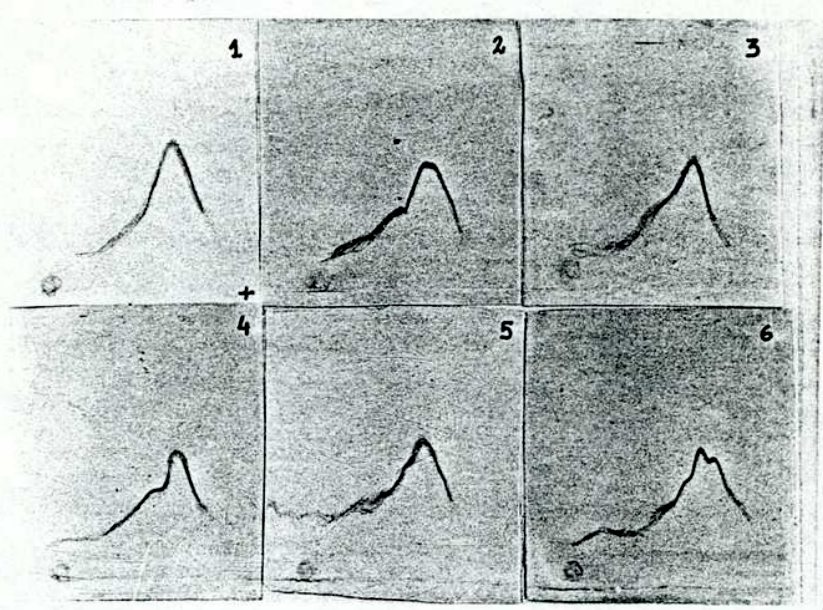


FIGURA 25 : Inmunolectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificada. Procedimiento según Materiales y Métodos. Tablas 15 y 21.

1. ATIII humana purificada.
2. ATIII + α -trombina.
3. ATIII + α -trombina + Pico 1LAMMO.
4. ATIII + α -trombina + Heparina.
5. ATIII + Pico 1' LMC.
6. ATIII + Pico 1+1' LMC.

ATIII incubada con enzimas leucocitarias y con α -trombina.

	1	2	3	4	5	6	7	8
ATIII 2 mg/ml	5	5	5	10				
α -Manosidasa 1.7U/mg				1			10	
Sobrenadante de LMC95mg/ml		5						
E.P. 1mg/ml			5					5
Fibrinógeno humano 1g/100ml					5	5	10	5
Sobrenadante de L.A. 6mg/ml						5		
Tampón β -alanina/acético				10			5	
								1
								163
								1

Tampón : β -alanina/acético pH 4.5

Se incuban las mezclas a 37°C durante 30 minutos y luego se efectúa una electroforesis en gel de poliacrilamida en capa fina. Tampón Tris-glicina pH 8.3 SDS 0.1% durante 90 minutos a 220 volts, a 25 °C.

TABLA 16 : Incubados de ATIII humana purificada con enzimas.

Incubados de Fibrinógeno humano purificado con enzimas.

	1	2	3	4	5	6	7	8
ATIII 2 mg/ml		50	50		5		5	
α -Manosidasa 1.7U/mg	5	5						
α -Trombina humana 0.4mg/ml			200	5				
Sobrenadante de LMC						5	5	
E.P. 1mg/ml								5
Tampón pH 4.5	50	50						

Sobrenadante de lisado de leucocitos de LMC : 9.5 mg/ml.
 Se incuban las mezclas a 37°C durante 30 minutos y luego se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida en capa fina. Tampón Tris-glicina pH 8.3 SDS 0.1% a 220 volts durante 90 minutos a 25°C.
 Tampón pH 4.5 : β -alanina/ác. acético.

TABLA 17 : Antitrombina III humana purificada incubada con enzimas leucocitarias, Trombina humana purificada y Elastasa pancreática.

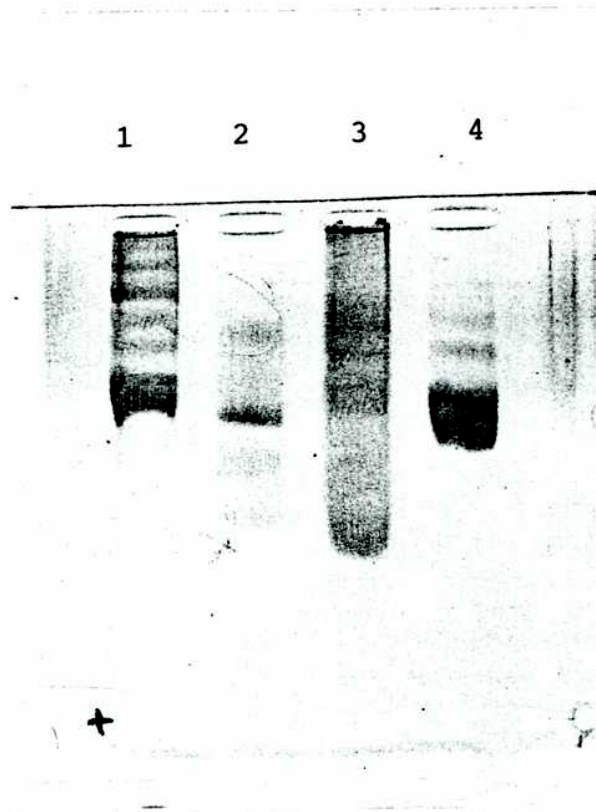


FIGURA 26 : Electroforesis en gel de poliacrilamida.
Procedimiento según Materiales y Métodos.

Tabla 16.

1. ATIII + α -Manosidasa.
 2. ATIII + E.P.
 3. ATIII + extracto de LMC.
 4. ATIII humana purificada. (2 mg/ml).
- Tampón Tris-glicina pH 8.3 SDS 0.1%
220 V. , 1.5 horas, 25°C.

	T U B O S								N°								(μ l)																	
ATIII 2mg/ml																																		
Trombina 5000 UI																																		
Heparina 80.6 UI/ml																																		
Pico 1' (Seph.G-200)																																		

Pico 1' ; 15 μ g/30 μ l. ATIII : 5 U/mg.

Se incuban los tubos a 25°C durante 15 minutos y luego se efectúa la electroforesis en gel de poliacrilamida en capa fina. Tampón Tris-glicina pH 8.3. a 200 volts durante 2 horas a 25°C.

TABLA 18 : Incubados de ATIII humana purificada con trombina y heparina.

Tubos N° (µl)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ATIII 2 mg/ml			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		3	3	3	3
Trombina 5000UI		3		2	2															
Heparina 3.3 mg/ml		3		1	1		1	1	1		1	1		1	1			1	1	1
Pico 1'							30	30	30	30										
Trasylol 100U/ml								1	1		1	1		1	1				1	1
Sobrenad.LMC											3	3								
E.P. 0.2mg/ml													3	3	3	3				
α-Manosidasa																	3	3	3	3

α-Manosidasa: 1.7 U/mg.

Sobrenadante de lisado de leucocitos de LMC : 10 mg/ml.

Pico 1': 15 µg/30 µl.

Luego se incuba cada tubo a 37°C durante 30 minutos. Se agrega a c/u igual volumen de tampón Tris-ClH 0.1 M, NaCl 0.15 M, citrato sódico 0.01 M pH 7.5. SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20% y se calienta en baño de agua hirviendo durante 1 minuto. Luego se efectúa la electroforesis en gel de poliacrilamida en capa fina. Tampón Tris-glicina pH 8.3 SDS 1%. 220 volts durante 2 horas a 25°C.

TABLA 19 : Incubados de ATIII humana purificada con enzimas leucocitarias, trombina, E.P., heparina y trasylol.

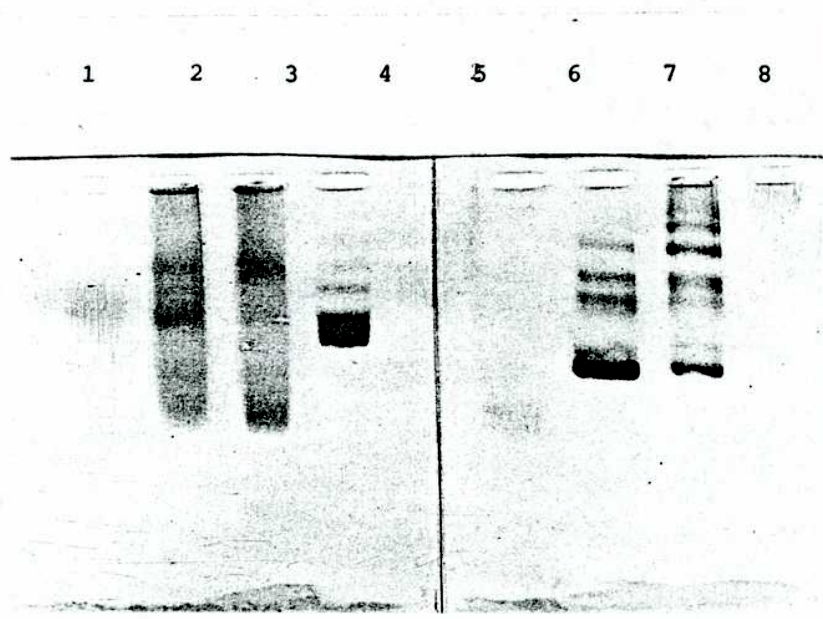


FIGURA 26.1 : Electroforesis en gel de poliacrilamida.
Tablas 16 y 17.

1. E.P.
2. ATIII + extracto de LMC.
3. extracto de LMC.
4. ATIII humana purificada.
5. α -trypsin.
6. ATIII + α -trypsin.
7. ATIII + α -Manosidasa.
8. α -Manosidasa.

Tampón Tris-glicina pH 8.3 SDS 0.1%.
220 V., 1.5 horas, 25°C.

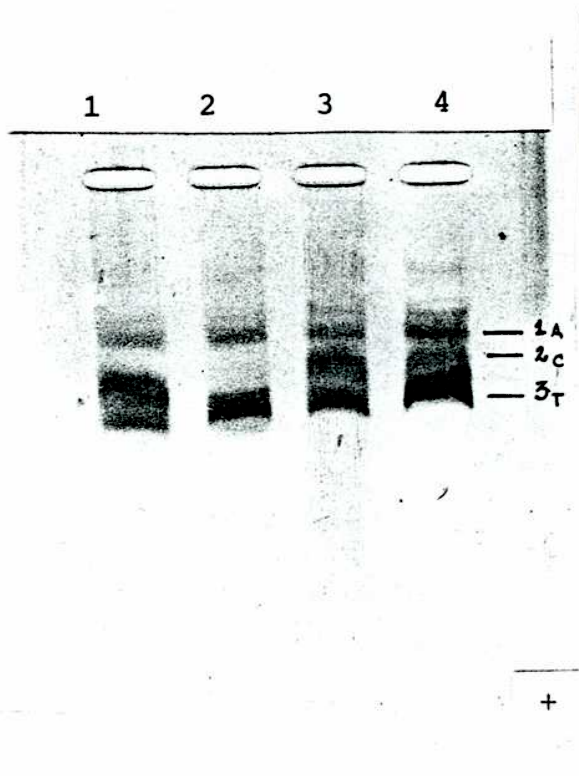


FIGURA 26.2 : Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Tabla 18.

1. ATIII + α -trombina + heparina agregante.
2. ATIII + α -trombina + heparina no agreg.
3. ATIII + Pico 1'.
4. ATIII + α -trombina.

1_A = ATIII; 2_C = complejo ATIII-trombina;
 3_T = trombina.

agreg.: agregante de leucocitos. (heparina cromatografiada: agregante: 350U/ml; no agregante: 550U/ml).

12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



FIGURA 26.3 : Electroforesis en film de poliacrilamida. Condiciones reducidas según el esquema de la Tabla 19.

- 1: ATIII+Hep.+Tro. 2: ATIII+Tro. 3: ATIII+Pico 1'. 4: ATIII+Pico 1'+Hep.
- 5: ATIII+Pico 1'+Hep.+Apr. 6: ATIII+Pico 1'+Apr. 7: ATIII+Lisado LMC+Hep.
- 8: ATIII+Lisado LMC+Hep.+Apr. 9: ATIII+E.P. 10: ATIII+E.P.+Hep. 11: ATIII+E.P.+Hep.+Apr.
- 12: E.P. Hep.:heparina;Tro.:trombina;Apr.:aprotinina;E.P.:elastasa pancreática.

leucocitarias y E.P. y se comparó con la ATIII residual inmunológica medida por IDR. Tabla 20.

Ambas actividades se correlacionaron con :

$r = 0.954$, $p \ll 0.001$. Figura 27.

Donde $r = \frac{\sum XY}{\sqrt{\sum (X^2) \sum (Y^2)}}$ $X = x - \bar{x}$; $Y = y - \bar{y}$

r = coeficiente de correlación lineal.

Se realizó también la determinación de ATIIIib.Figura 25.

IX. Acción sobre Fibrinógeno humano purificado.

Se realizaron incubaciones de Fibrinógeno humano purificado con α -Manosidasa, lisado de leucocitos de LA y con E.P. a 37°C durante 30 minutos. Luego se efectuó la corrida electroforética en un film de gel de poliacrilamida. Figura 28.

X. Acción sobre la Protrombina humana purificada.

Se realizaron incubaciones de II humano purificado (Materiales y Métodos) con E.P., lisado de leucocitos de LAM y lisado de leucocitos de LMC a 37°C durante 60 minutos.

Luego se efectuó la electroforesis sobre un film de gel de poliacrilamida con tampón Tris-glicina pH 8.3, SDS 0.1 % durante 110 minutos a 220 volts a 25 °C. Figura 29.

Tubos N°/ ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Observ.
ATIII 100U/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+ : 10ul
Pico 1 LAMMO	02	-	-	-	-	-	-	-	-	02	-	-	-	-	-	corres-
Pico I LAMMO	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	02	-	-	-	-	ponden
Sobr.LAMMO	-	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	02	-	-	-	a los
Pico 1 LN	-	-	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mismos
Pico I LN	-	-	-	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	leuco-
Sobr. LN	-	-	-	-	-	02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	bitos.
P.N. (100%)	-	-	-	-	-	-	02	-	-	-	-	-	-	-	02	-
E.P. 75U/ml	-	-	-	-	-	-	-	01	02	-	-	-	02	-	-	-
S.F. (NaCl 0.154M)	-	-	-	-	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	02	-
U.I./ml plasma	23.2	24	21.4	4.3	*	369	*	*	-	-	-	-	-	21.5	38.6	-
%De ATIIIinic	60	62	55	11	2	2	170	2	2	-	-	-	-	100	100	-
mg/100 ml	16	15	19.2	10.8	8.5	8	298	-	16	-	-	-	-	24	36.4	-
%De ATIIIinic.	44	41	52	29	23	21	124	-	44	-	-	-	-	100	100	-
ATIIIi/ATIIIb	0.7	0.6	0.9	2.6	11	10	0.7	-	22	-	-	-	-	1	1	-

Incubación a 37°C durante 30 minutos. Luego determinación de ATIIIb con sustrato cromogénico Chromozym TH y de ATIIIi por I.D.R. (Mancini).

* = < 0.86 U.I./ml (despreciable). Sobr.= sobrenadante de lisado de leucocitos.

TABLA 20 : ATIII humana purificada residual biológica e inmunológica luego del tratamiento con enzimas leucocitarias.

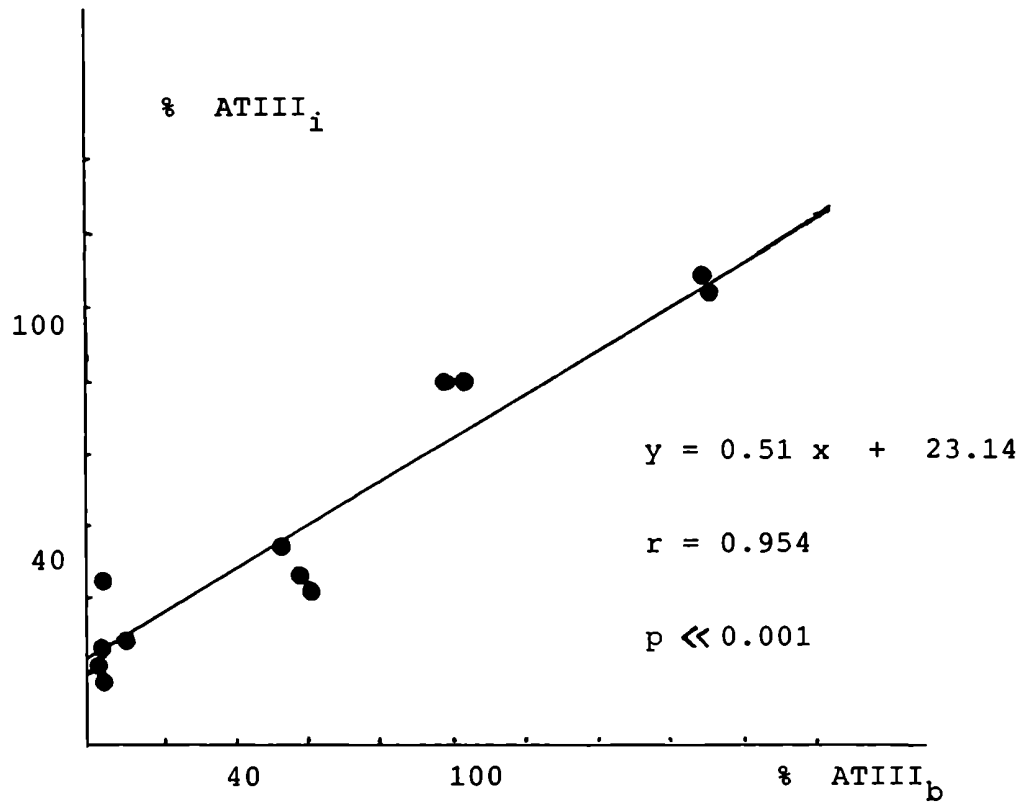


FIGURA 27 : Antitrombina III humana purificada por cromatografía de afinidad. Incubaciones con enzimas leucocitarias y medida de la actividad residual. Correlación entre ATIII inmunológica (IDR) y ATIII medida con sustrato cromogénico S-2238.

IDR = Inmunodifusión radial.

N = 11.

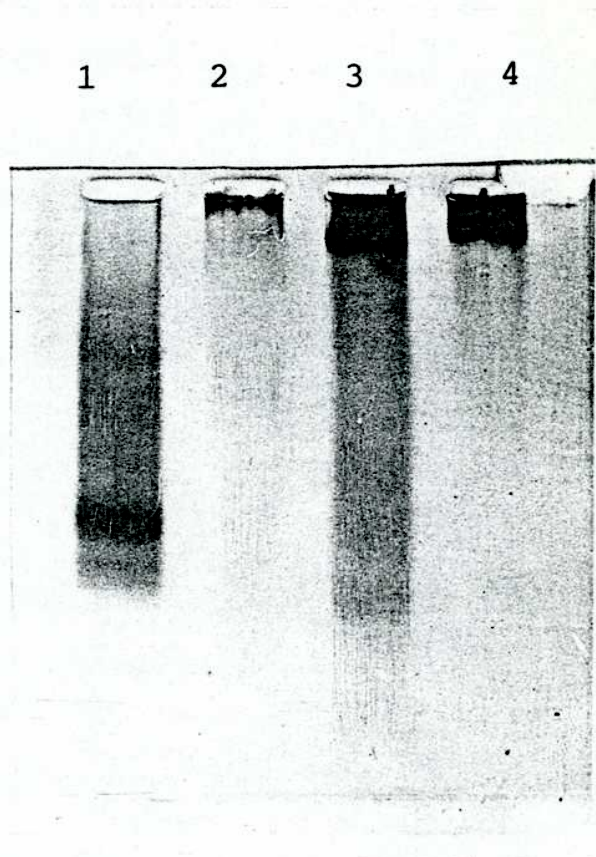


FIGURA 28 : Electroforesis en gel de poliacrilamida.
FIBRINOGENO humano purificado. (I).

Tabla 16.

1. I + E.P. (1mg/ml) partes iguales.
2. I + α -Manosidasa. (I:0.5 g%).
3. I + extracto de LAM.
4. I (1 g/100 ml).

extracto leucocitario de LAM: 6 mg/ml.

α -Manosidasa: 1.7 U/mg.

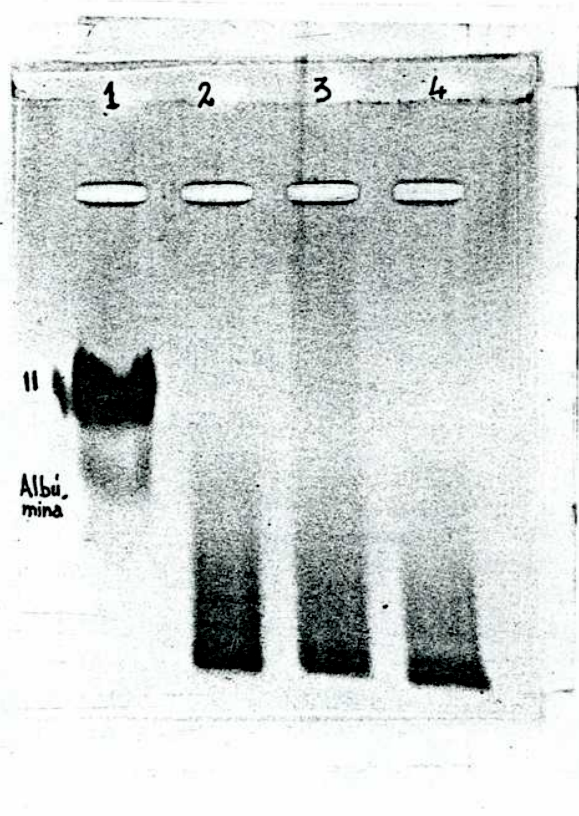


FIGURA 29 : Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PROTROMBINA humana purificada.(II).

20 ul de II y 10 ul de cada enzima que representan 10 ug de proteina.Se incuban 60 minutos a 37 °C y luego electroforesis.

1. II (50 U/ml).
2. II + extracto de LA.
3. II + extracto de LMC.
4. II + E.P. (1 mg/ml).

DISCUSION

"Las modificaciones del sistema de inhibidores naturales, producidas en Leucemias Agudas provocan fundamentalmente un descenso de la α_2 -M, un aumento de la relación : ATIIIi/ATIIIb y cambios en la movilidad y en el trazado electroforético bidimensional de la ATIII en medios con heparina". (Kordich L.C., 1982).

Algunas de las alteraciones plasmáticas halladas pueden ser debidas a la acción de enzimas leucocitarias lisosomales llegando, en algunos casos, a la activación del sistema de coagulación y generación de trombina; en otros, sólo a activaciones parciales del sistema sin generación de trombina y/o generación fibrinolítica y en otras circunstancias a la degradación proteolítica de factores plasmáticos con la aparición de interferencias en la cinética de las reacciones enzimáticas.

En sistemas parcialmente purificados se obtienen modificaciones funcionales e inmunológicas de la ATIII por enzimas leucocitarias.

Cuando se coagula el plasma humano normal (PN) con trombina, la vía clásica de coagulación, (Figura 6), se consumen las actividades enzimáticas de los factores II, V, VIII y XIII, el Fibrinógeno (Factor I), pasa casi totalmente a fibrina encontrándose en el suero normal 1 a 2 ug/ml de factor I y parcialmente los factores XI y XII, mientras que los factores IX, X y VII permanecen activos en el suero.

Se consumen, además, los inhibidores naturales (Anti- X_a - ATIII-Cofactor de la Heparina) (30%) de los sistemas de coagulación y de fibrinólisis (α_2 -antiplasmina, α_2 -M, etc.). El hecho de que una coagulación total, con trombina, disminuya los niveles de la ATIII un 30% del valor inicial, implica que deficiencias aparentemente leves de este inhibidor,

pueden ser clínicamente significativas y producir transtornos trombóticos.

A continuación, la activación del sistema fibrinolítico "in vitro" produce la lisis del coágulo y se forman los productos de degradación de la fibrina (PDF). Este proceso, además, se interrelaciona con la activación de los sistemas plasmáticos de calicreínas y de complemento.

Con la intención de reproducir "in vitro" una coagulopatía semejante a la sufrida por las LA, se utilizó E.P., α -Mannosidasa y enzimas aisladas de lisados de leucocitos normales y leucémicos y se las hizo interactuar con PN y componentes del sistema plasmático de coagulación purificados como F. I, II y especialmente la ATIII.

Cubriendo de esta forma los puntos de activación: II \rightarrow II_a (trombina), de consumo: I \rightarrow fibrina y de inhibición del proceso de coagulación : ATIII, tres lugares fundamentales para interpretar la explicación de algunas de las alteraciones halladas en estos enfermos.

Con las concentraciones de E.P. utilizadas experimentalmente (Tablas 5), el factor II no se alteró cuantitativamente, quizás por ser el menos vulnerable a la acción de la enzima y por hallarse en gran concentración en el plasma normal.

El TT se vió afectado por la concentración de E.P. y dependiente del tiempo de incubación; en esta prueba interesa además, el nivel del factor I.

La ATIII_{ib} (Figura 19) se encontró alterada respecto del perfil obtenido con PN libre de E.P. El incubado con la enzima muestra picos de ATIII₁, ATIII₂ y ATIII₃ y diferente movilidad electroforética. El pico de ATIII₁, es el más anódico, y representa a la ATIII libre, sin complejar con enzimas serinoproteasas, se encuentra muy disminuído.

Las alteraciones obtenidas en el estudio de coagulación de los pacientes con LA no fueron totalmente coincidentes

con estos hallazgos. (Kordich L.C., et al.,1980).Esto puede deberse al hecho de que hay diferencias de acción entre la E.P. y la elastasa leucocitaria humana . Por otro lado, los leucocitos liberan además de la elastasa, un conjunto de enzimas diferentes que pueden actuar en el plasma.(Tabla 1) Para estudiar la acción de las enzimas de origen leucocitario sobre los sistemas de coagulación y fibrinolisis se trataron de aislar a las mismas a partir de lisados de leucocitos humanos normales y de leucocitos provenientes de pacientes con LA.

El proceso general de obtención de los eluidos protéicos a partir de la filtración de los lisados leucocitarios por Sephadex G-200 y de la cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex C-50, se esquematiza en la Tabla 21, tomando como ejemplo el lisado de leucocitos de LMC.

La Tabla 22 muestra el dosaje de Hidratos de Carbono de los picos de elución de Sephadex G-200 y de CM-Sephadex C-50 y su correspondiente dosaje de proteínas totales.

Las Figuras 15 (1,2 y 3) muestran la filtración de los lisados de leucocitos normales y de diferentes Leucemias a través de Sephadex G-200. Para la misma concentración protéica el pico 2 obtenido por filtración del lisado de LMC es más importante que el pico 2 obtenido de los lisados leucocitarios de LAP y de LAMMo. En cambio, los picos 1 de éstos, son comparativamente algo mayores. Las actividades enzimáticas de los picos 1 y 2 sobre un sistema plasmático normal, en cambio, son comparables (Tabla 8). Se eligen los picos 1 por tener un rango de elución más estrecho, en este sistema, y por carecer de actividad inhibitoria, que a veces está presente en los picos 2.

Cuando se cromatografía el pico 1,por CM-Sephadex C-50, proveniente del lisado de LN filtrado por Sephadex G-200, Figuras 16 (1 y 2), se obtiene un solo pico protéico de elu-

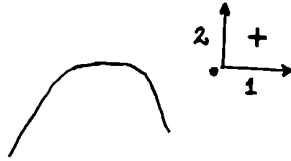
ción y más de uno para los picos provenientes del lisado de leucocitos de LMC en las mismas condiciones experimentales, indicando una composición enzimática diferente entre los LN y los leucocitos leucémicos en los que predominan las células inmaduras (blastos).

En la Tabla 6 se puede observar el efecto antagónico que ejercen concentraciones iguales de E.P. y pico 1', proveniente de la filtración del lisado de LMC a través de Sephadex G-200, sobre el componente del complemento C_{3C} . La E.P. produce modificaciones que permiten mayor penetrabilidad en el gel de agarosa y luego se forma una halo de inmunodifusión radial tal que se interpreta como un incremento inmunológico del C_{3C} respecto del basal del 27%. En cambio, el pico 1' lo disminuye en 12% respecto del basal. Esta acción del pico 1' se correlaciona perfectamente con la del sobrenadante del lisado de LA; en cambio el sobrenadante de LMC produce un efecto semejante al de la E.P. aunque de menor magnitud. Esto sugiere una acción mixta; teniendo en cuenta que las concentraciones protéicas de los sobrenadantes de lisados leucocitarios son 10 veces mayores que las del pico 1', la acción de esta fracción es muy importante. En cambio la acción sobre el componente del complemento C_4 , sobre el fibrinógeno y el plasminógeno, es más variable y menos efectiva, con estas concentraciones enzimáticas.

Los componentes C_4 y C_{3C} del complemento disminuyen en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y el C_{3C} aumenta en las reacciones inflamatorias. Se producen modificaciones en el perfil inmunológico bidimensional del inhibidor del componente del complemento C_1 , cuando se incuba PN con enzimas leucocitarias semipurificadas o extractos crudos leucocitarios provenientes de LA y también con E.P., y luego se realiza la corrida electroforética sobre acetato de celulosa, con antisuero monoespecífico en la segunda dimensión.

Los perfiles obtenidos en cada caso son:

PN + Anti-Inhibidor C_1



PN + E.P.+ Anti-I- C_1



PN + pico 1'+ Anti-I- C_1



PN + extracto LMC + Anti-I- C_1



PN + extracto LAM + Anti-I- C_1



Anti-Inhibidor C_1 =
= Anti-I- C_1 .

El antisuero es comercial y la concentración enzimática utilizada es la misma que figura en la Tabla 6. La vulnerabilidad del inhibidor fisiológico del componente C_1 del complemento puede facilitar la activación de este sistema plasmático, a través de la vía clásica, o sea a partir del componente C_1 , cuando se encuentran enzimas leucocitarias en el medio.

En la Tabla 7 se puede observar que para concentraciones de extractos crudos de enzimas leucocitarias (por dosaje de proteínas totales) de 1.9 mg (sobrenadante de lisado de LMC) y de 1.2 mg (sobrenadante de lisado de LA) se obtiene el mismo efecto que con una concentración de E.P. de 0.2 mg respecto de la misma concentración de fibrinógeno humano purificado.

En cambio, concentraciones protéicas del orden de 0.1 mg, como la del pico 1', tienen muy poco efecto sobre la concentración total del factor I, medida por IDR.

Los resultados de las Tablas 8 y 9, ilustran la acción de los eluidos de Sephadex G-200 y de cromatografía de intercambio iónico, sobre los factores de coagulación y el inhibidor ATIII.

En la Tabla 8 se observa que con diferentes concentraciones protéicas, los picos eluidos de Sephadex G-200 (a y b) (Tabla 21) y los de cromatografía de intercambio catiónico (a_1, a_2 y b_1, b_2) correspondientes a ellos, producen en general modificaciones leves o importantes en el perfil de ATIIIb y disminuyen la ATIIIb y el TQ. Como puede verse, los picos protéicos obtenidos por cromatografía de intercambio iónico, tienen una actividad enzimática por lo menos 10 veces mayor que la de los picos obtenidos inicialmente por filtración en Sephadex G-200, teniendo en cuenta que su concentración protéica es aproximadamente 10 veces menor; luego las modificaciones producidas son más importantes. La Tabla 9 resume estas observaciones y se encuentran diferencias significativas entre los niveles de los factores de coagulación II y V, en el TQ y en la determinación de ATIIIb obtenidos incubando PN con los eluidos de Sephadex G-200 y los controles normales; y entre éstos y el TQ, factores II, V, VIII, VII y ATIIIb obtenidos por incubación de PN con los eluidos de CM-Sephadex C-50. (Nivel de confianza 95%). Algunos de estos re-

sultados coinciden con los hallados en el plasma de los pacientes con LA. (Kordich L.C., et al., 1980).

La elastasa leucocitaria es la principal responsable de la disminución de los niveles de los factores II, V y VIII (Starkey P.M., et al., 1976; Egbring R., et al., 1977) y de la ATIIIb.

Dentro de la terapia aplicada a los pacientes con LA, se utiliza un inhibidor polivalente de proteasas: la aprotinina o Trasylol (Bayer). Es un polipéptido de PM 6000 compuesto por 16 aminoácidos diferentes y se elimina por riñón en forma inactiva.

Inhíbe la activación de protrombina a trombina y fundamentalmente la activación del sistema fibrinolítico. Produce inhibición de las proteasas, dependiente de la concentración, actuando sobre tripsina, quimotripsina, calicreína, plasmina, activador del plasminógeno y catepsina D. Es probable que inhiba también la acción de algunas proteasas leucocitarias directa o indirectamente. En las incubaciones del PN con lisados de leucocitos provenientes de LMC y LAM, el dosaje del factor IX se encontró activado respecto del PN de base y el resto de los factores sobrepasaron la etapa de activación y se hallaron enzimáticamente disminuídos, respecto del PN, bajo estas condiciones experimentales. (Tablas 10 y 11).

La aprotinina inhibe a la trombina o su formación a partir de factor II. El dosaje enzimático de los factores, en el sistema de coagulación, tiene el mismo punto final: la trombina formada convierte el fibrinógeno a fibrina, que se visualiza en un coágulo y se mide el tiempo que tarda en aparecer éste último.

Se observa la prolongación del tiempo de coagulación, con aprotinina, como era previsto y esto se traduce en un "déficit" de factores.

La ATIII determinada por sustrato cromogénico como medida de la trombina residual, se encuentra también disminuída.

Sin embargo, el % de los factores de coagulación, con aprotinina en el medio, fue mayor que el obtenido solamente con el lisado de leucocitos, en la mayoría de los casos, sugiriendo que hubo inhibición de la acción proteolítica de los mismos.

La concentración de aprotinina utilizada en estos experimentos, cubrió el rango terapéutico de empleo habitual, (1000-2000 U/ml de plasma), en los estados de shock severos.

La ATIII_{lib} del incubado de PN con leucocitos leucémicos (extracto), con aprotinina en el medio es normal, sin ella, se observan picos de ATIII complejada y diferente movilidad electroforética. (Figura 19.1). En las Tablas 12 y 13 se encuentra la activación de la etapa alta del sistema de coagulación: las calicreínas plasmáticas, punto de interacción con otros sistemas plasmáticos. (Figura 6).

La activación de las calicreínas es potenciada en presencia de enzimas leucocitarias.

Los valores obtenidos con los plasmas de los pacientes con LA son significativamente diferentes ($0.01 < p < 0.025$) de los correspondientes a los controles normales. Los % de activación de calicreínas obtenidos con PN incubado con lisados leucocitarios y el pico 1 proveniente del filtrado del lisado leucocitario de LAMMo por Sephadex G-200, se refieren al PN de base. Son mayores para el lisado leucocitario proveniente de LAMMo.

El hecho sugiere que, ésta podría ser una de las formas de activación del sistema de coagulación-fibrinólisis por acción de enzimas leucocitarias y también de disminución de los niveles de ATIII, para contrarrestar a la misma.

Además de las proteasas neutras, el PMN tiene hidrolasas ácidas en sus gránulos (Tabla 1), entre las cuales se encuen-

tra la α -Manosidasa.

La α -Manosidasa es una hidrolasa ácida que hidroliza manobiosa, manotriosa y manotetraosa derivadas de fermentos azucarados (Yu-Teh-Li, 1967). Se encuentra en los gránulos azurófilos de los leucocitos granulocitos y también en los vegetales.

Produce un efecto mitogénico sobre los linfocitos (Paus E., et al., 1978). Los linfocitos células T, tienen menor contenido de α -Manosidasa que los linfocitos no T. (Tanaka T., et al., 1979).

La enzima es muy abundante en los granulocitos leucémicos (LAG) y está muy disminuída en las leucemias de tipo linfocitario, (LAL), razón por la cual se postuló su determinación como marcador diferencial entre los dos tipos de leucemias. (Tanaka T., et al., 1978).

Como se observa en las Figuras 19.2, 26, 26.1 y 28, es capaz de modificar funcional y estructuralmente a la ATIII y al fibrinógeno humanos purificados. La Figura 19.2 muestra PN incubado con α -Manosidasa con y sin aprotinina en el medio. Se observa como la α -Manosidasa produce un perfil anormal de la ATIIIb con formación de 2 picos importantes, que se diferencian perfectamente de la modificación introducida por el tampón pH 4.5 (número 1); la aprotinina mejora el perfil pero no lo normaliza, se mantiene la heterogeneidad de la ATIII que se visualiza en la zona catódica con dos bandas de diferente movilidad electroforética en la segunda dimensión (número 3). Las hidrolasas ácidas actúan a pH no fisiológicos (3.0-5.0) pero no se puede excluir su acción en ciertas condiciones patológicas, si al ser secretadas por el leucocito encuentran un entorno fisicoquímico favorable a su acción. La producción de bandas dobles de formación antígeno-anticuerpo, en la determinación de ATIIIb se ha observado en LA (Kordich L.C., 1982) y también en sepsis.

En la filtración del plasma humano a través de Sephadex G-150, en las condiciones experimentales de la incubación de PN con α -Manosidasa, con un exceso de enzima para la ATIII, no se halló diferencia en la filtración de ATIII respecto del control normal. (Resultados, VII.).

En la incubación de PN con lisados de leucocitos de LMC tampoco se obtiene una modificación apreciable del valor de K_{AT} respecto del control normal. Con esta concentración protéica enzimática leucocitaria (1 mg/ml de mezcla de reacción), que es relativamente alta, no se encuentran diferencias en el tamaño molecular de la ATIII, estimado por filtración a través de columnas de Sephadex G-150 (Figuras 20, 20.1, 20.2 y 20.3).

Sin embargo, en las mismas condiciones, se pueden apreciar modificaciones de la ATIII por métodos inmunológicos y por medida de la actividad biológica, Figuras: 19.2, 24, 25, 26, demostrando que funcionalmente se modifica, aunque no se afecte su tamaño molecular, por formación de complejos con serinoproteasas "in vitro", lo suficiente para medirlo por filtración.

La discrepancia con las alteraciones halladas "in vivo" pueden deberse además al hecho de que en las patologías estudiadas, los mecanismos de proteólisis son múltiples y se suman las acciones dando como resultado una molécula de ATIII con tendencia a agregarse. En la cirrosis hepática, las proteínas que están vinculadas al sistema de coagulación, contienen mayor cantidad de ácido siálico que las normales (50-70%); esa mayor carga eléctrica y la acción de enzimas leucocitarias puede producir una molécula fácilmente agregable y cuyo PM sea mayor que el de la proteína normal, en esos casos de patología mixta.

Por otro lado, la alteración de la ATIII en algunos pacientes con déficit congénito de la misma, no se traduce en

una K_{AT} diferente de los controles normales sino en una ATIIIb anormal y un nivel de ATIIIb menor que el normal. (Sas G., et al., 1980). Este patrón se parece a las alteraciones halladas "in vitro" con los incubados de PN y enzimas leucocitarias.

En la Figura 22 se muestra el perfil de elución de la ATIII por cromatografía de afinidad en Heparina-Sepharosa 4B. La ATIII obtenida por este método presenta una sola banda protéica en electroforesis en film de gel de poliacrilamida, Figura 23. En la Figura 22, la curva a se obtiene cuando se cromatografía plasma humano normal o ATIII humana normal y la curva b cuando se incubaba previamente el PN o la ATIII purificada con enzimas leucocitarias. La forma dispersa de la curva b, obtenida por incubación de la ATIII purificada con el pico de intercambio obtenido por filtración del lisado leucocitario de LAMMO (Tabla 20), es debida al hecho de que la ATIII alterada comienza su elución a concentraciones iónicas de NaCl menores que las correspondientes a la ATIII normal, y cubre un rango amplio de concentración iónica. La forma de elución de la ATIII modificada por enzimas leucocitarias, en cromatografía de afinidad, tiene concordancia con el perfil de la ATIIIb sobre acetato de celulosa, con heparina en la primera dimensión, obtenido con los mismos incubados. Esta semejanza es debida a la modificación que sufre la ATIII por acción de las enzimas leucocitarias respecto de su afinidad por la heparina. (Figura 24).

La movilidad electroforética de la ATIII está influenciada por las moléculas de heparina que están cargadas negativamente. La incubación de la ATIII con enzimas leucocitarias, disminuye la afinidad de la ATIII por la heparina de forma irregular y dispersa, obteniéndose la curva b, por cromatografía de afinidad y la corrida electroforética de ATIIIb número 4 de la Figura 24, concordantes.

Cuando se agrega ATIII humana purificada al plasma normal (Tabla 14) y luego de incubar con concentraciones semejantes de enzimas leucocitarias de diferente origen, se determina el TT: se observa un acortamiento del TT respecto del basal (55 segundos), este acortamiento es del mismo orden para los picos de intercambio iónico, sugiriendo que se produce la formación del complejo ATIII-enzima leucocitaria y luego queda menor cantidad de ATIII libre para complejarse con la trombina. La E.P. produce el mismo efecto, pero algo menor dando un resultado comparable al agregado de la mitad de la concentración de ATIII al PN.

En la Tabla 15 se demuestra la formación del complejo de ATIII con trombina y enzimas leucocitarias. Este se forma más rápidamente cuando hay heparina en el medio de reacción y disminuye drásticamente la concentración de ATIII libre. Este resultado es explicable, el anillo de precipitación antígeno-anticuerpo es menor ya que el complejo necesita más tiempo para difundir en agarosa pues su PM es mayor.

La acción de las enzimas leucocitarias sobre la ATIII se ratifica en la Tabla 20. Esta acción es comparable a la de la E.P. y las modificaciones funcionales e inmunológicas se correlacionan positivamente. Figura 27. Los leucocitos no aportan ATIII medible a la mezcla de reacción y tampoco lo hace la E.P., como así era de esperar.

Las Figuras 24, 25, 26, 26.1 y 26.2 muestran las modificaciones de la ATIII que se producen por acción de las enzimas leucocitarias y otras. La Figura 25 en los números 4, 5 y 6 muestra que las modificaciones halladas son semejantes a las de los pacientes con LA, Figuras 7, 7.1 y 7.2.

La Figura 26 muestra la ATIII purificada por cromatografía de afinidad sobre Heparina-Sepharosa 4B. La ATIII, así obtenida, presenta una marcada tendencia a formar agregados moleculares, cuando está aislada del sistema plasmático ori-

ginal; como ya ha sido señalado por otros autores (Wickerhauser M., et al., 1979; Murano G., et al., 1981).

Se puede observar la presencia de dos bandas más pequeñas de menor movilidad electroforética en gel de poliacrilamida. Estas bandas se eluyeron del gel de poliacrilamida con una cantidad mínima de tampón Tris-glicina pH 8.3 y luego se identificaron como ATIII por la IDR en placas de agarosa comerciales con antisuero monoespecífico anti-ATIII. En la misma Figura 26, se muestra la acción de varias enzimas sobre la ATIII purificada. Con α -Manosidasa aumenta el número de bandas protéicas de menor movilidad electroforética y disminuye notablemente la ATIII libre. Con E.P. disminuye la ATIII libre casi totalmente y aparecen bandas protéicas de mayor y menor movilidad electroforética.

La Figura 26.1 comparada con la Figura 26, muestra que el número 2 corresponde a la mezcla de ATIII del número 3 perfectamente. La acción de α -Manosidasa es la misma en ambos casos. El número 1 se corresponde con el número 2 y se puede ver que la banda protéica del medio corresponde al residuo de ATIII libre. El número 8 es α -Manosidasa, que en la concentración experimental utilizada casi no se puede visualizar y se encuentra en el origen de la siembra (PM = 220,000).

La Figura 26.2 muestra la formación de los complejos de ATIII con α -trombina que se identifican claramente. El número 2 corresponde a la mezcla de ATIII y α -trombina en presencia de heparina no agregante (fracción de heparina obtenida por filtración en geles, que no produce agregación leucocitaria, "in vitro") y no se visualiza la formación del complejo ATIII- α -trombina. El pico 1', proveniente de la filtración del lisado de leucocitos de LMC por Sephadex G-200, produce un complejo semejante al de la α -trombina.

La Figura 26.3 muestra en la zona B la ATIII residual

en condiciones reducidas. En 1A se observa la formación del complejo ATIII- α trombina en presencia de heparina; en 1 y 2 C la α -trombina libre. En 3, 4 y 5 A se ve el complejo ATIII-Pico 1', la aprotinina, en ausencia de heparina, es más efectiva en inhibir su formación (6). En los sistemas 7-11, con heparina, no hay inhibición. En la zona comprendida entre C y D aparece una banda protéica en los sistemas 3-11. En 7 y 8 se observa, además, otra banda de movilidad electroforética similar a la de la E.P. (10, 11 y 12 E).

El enfoque isoeléctrico, en agarosa (1mm) del extracto leucocitario de LMC tiene la mayoría de las bandas protéicas ubicadas entre los PI 8.15-8.65 y entre 6.85-4.55. Los picos 1' y 2 obtenidos por filtración en Sephadex G-200 del mismo lisado de LMC (Tabla 21), tienen bandas comunes de PI 5.85 y 6.55. El pico 2 tiene, además, otra en PI 6.85. Luego las actividades proteolíticas estarían distribuidas preferentemente en esas zonas de PI.



CONCLUSIONES

Los estudios realizados con plasma normal (PN) y enzimas leucocitarias provenientes de extractos leucocitarios normales y leucémicos indican que estas enzimas ejercen su acción sobre:

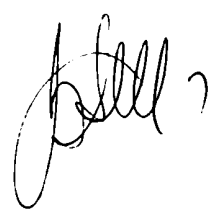
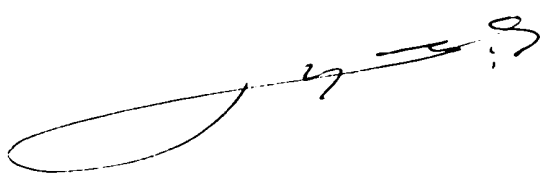
- 1) El sistema plasmático de calicreínas, favoreciendo la activación de la vía alta del sistema de coagulación.
- 2) El sistema plasmático del complemento, hallando variaciones en el componente C_{3c} y modificaciones del perfil inmunológico del Inhibidor de C_1 , sugiriendo otra forma de interacción y activación del sistema de coagula-

ción por este camino.

3) El sistema plasmático de coagulación. Se encontraron variaciones en los niveles de los factores de coagulación y en el Inhibidor natural de coagulación Antitrombina III (ATIII).

4) La ATIII humana purificada a partir de plasma normal, en un sistema aislado, no sufre una degradación exhaustiva por la acción de las enzimas leucocitarias ya que su PM no se modifica significativamente. Las modificaciones sufridas desde el punto de vista inmunológico, el cambio en la movilidad electroforética y la pérdida de actividad antitrombínica, indican que los sitios de unión a la heparina se afectan o bien se eliminan por acción de las enzimas leucocitarias. La pérdida de la actividad antitrombínica se correlaciona con la disminución de la actividad inmunológica ($r = 0.954$; $p \ll 0.001$), sugiriendo que además de los sitios de unión a la heparina, se modifican los sitios de unión al antisuero anti-ATIII para producir el complejo inmune ATIII-anti-ATIII; posiblemente por ruptura de pequeñas porciones peptídicas de la molécula de ATIII o bien por impedimento estérico. Además los perfiles de elución de ATIII normal y de ATIII incubada con enzimas leucocitarias, en cromatografía de afinidad en Heparina-Sepharosa 4B, difieren notablemente, remarcando la modificación de la afinidad de la ATIII por la heparina, observada previamente por los métodos inmunológicos.

Finalmente, las especulaciones previas de la acción de las enzimas leucocitarias en el sistema plasmático de los pacientes con LA, están apoyadas ahora por los hallazgos de los hechos antes mencionados; éstos, sugieren que la alteración sufrida por la ATIII en las LA se debe, al menos en parte, a la acción de enzimas leucocitarias, especialmente elastasa leucocitaria, sobre la misma y sobre los otros componentes del sistema de coagulación humano.



BIBLIOGRAFIA

- .Abildgaard U. A review of Antithrombin III. In: Collen D., Wiman B., Verstraete M. Eds. The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis. Elsevier, North Holland Amsterdam.: 19-29, 1979.
- .Ambruso D.R., Jacobson L., Hathaway W.E. Inherited Antithrombin III deficiency and cerebral thrombosis in a child. Pediatrics 65:125-131, 1980.
- .Amundsen E., Svendsen L. in: New methods for the analysis of coagulation using chromogenic substrates. Witt I. Ed. Verlag W. De Gruyter, Berlin: 211, 1977.
- .Baggiolini M., Bretz U., Dewald B. Subcellular localization of granulocyte enzymes. In: Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Havemann K., Janoff A. Eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich: 9, 1978.
- .Bang N.U., Mattler E. Thrombin sensitivity and specificity of three chromogenic peptide substrates. In: Chemistry and biology of thrombin. Mann Arbor Science. P. Inc. Michigan. USA: 305, 1977.
- .Barbui T., Rodeghiero F. First Italian family with abnormal antithrombin III (ATIII Vicenza). Haematologica 66:715-720, 1981.
- .Baugh R.J., Travis J. Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. Biochemistry 15:836-841, 1976.

- .Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis Blackwell Scientific Publications, Oxford., 1976.
- .Biland L., Duckert F., Prisender S., Nyman D. Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and pronostic value of factor XIII, factor V and plasminogen. *Thrombos. Haemostas. (Stutt.)* 39:646-656, 1978.
- .Bilezikian S.B., Nossel H.L. Unique pattern of fibrinogen cleavage by human leukocyte proteases. *Blood* 50:21-28, 1977.
- .Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analyt. Biochem.* 4:330-334, 1962.
- .Bleyl H., Róka L. Affinity of heparin to antithrombin III, thrombin-antithrombin complex. *Ann. Univ. Sarav. Med. Suppl. 3: Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance.* Wenzel E., Rosenberg R.D., Eds. Homburg-Boston: 33-36, 1983.
- .Bounameaux H., Duckert F., Walter M., Bounameaux Y. The determination of Antithrombin III. Comparison of six methods. Effect of oral contraceptive therapy. *Thrombos. Haemostas. (Stutt.)* 39:607-615, 1978.
- .Bretz U. Stimulation of lymphocytes by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G, in vitro. In: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes.* Havemann K, Janoff A., Eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich: 323, 1978.
- .Burrowes H. The inhibition of human plasma kallikrein by Antithrombin III. *Thrombos. Res.* 7:175, 1975.

- .Campbell E.J.,Senior R.M.,Mc Donald J.A.,Cox D.L. Proteolysis by neutrophils.Relative importance of cell-substrate contact and oxidative inactivation of proteinase inhibitors in vitro. J.Clin.Invest. 70:845-852,1982.
- .Ceustermans R.,Hoylaerts M.,De Mol M.,Collen D. Preparation characterization and turnover properties of heparin-Antithrombin III complexes stabilized by covalent bonds. J.Biol.Chem. 257:3401-3408,1982.
- .Clemmensen I. Inhibition of urokinase by complex formation with human Antithrombin III in absence and presence of heparin. Thrombos. Haemostas.(Stutt.) 39:616-623,1978.
- .Clowes G.H.A.,George B.C.,Villem C.A.,Saravis C.A. Muscle proteolysis induced by a circulating peptide in patients with sepsis or trauma. N.Engl.J.Med.308:545-552,1983.
- .Cofrancesco E.,Vigo A.,Pogliani E.M. GAGs-potentiated inhibition of thrombin,factor Xa and plasmin in plasma and in a purified system containing Antithrombin III.Correlation with total charge density. Thrombos.Haemostas.(Stutt.) 46:749-751, 1981.
- .Cohen A.B.,James H.L. Reduction of the elastase inhibitory capacity of alpha-1-antitripsin by peroxides in cigarettes smoke.An analysis of brands and filters. Ann.Rev.Respir.Dis. 126:25-30,1982.
- .Cohen A.B.,Rossi M. Neutrophils in normal lungs. Ann.Rev. Respir. Dis.127:s3-s9,1983.

- .Cohn E.J.,Gurd F.R.N.,Surgenov D.M.,Barnes B.A.,Brown R.K.,
Derovaux G.,Gillespie J.M.,Kahnt F.W.,Lever W.F.,Liv C.H.,
Mittelman D.,Mouton R.F.,Schmid K.,Vroma E. Proteins frac-
tionation. J.Am.Chem.Soc. 72:465,1950.
- .Collen D.,Schetz J.,de Cock F.,Holmer F.,Verstraete M. Me-
tabolism of antithrombin III (Heparin Cofactor) in man:
effects of venous thrombosis and of heparin administration.
Europ.J.Clin.Invest.7:27-35,1977.
- .Collen D.,Verstraete M. Quantitation of thrombin-antithrom-
bin III complexes in human blood. Eur.J.Clin.Invest.7:325,
1977 a.
- .Danishefsky I.,Zweben A.,Slomiany B.L. Human Antithrombin III
Carbohydrate components and associated glycolipid. J.Biol.Chem.
253:32-37, 1978.
- .Davie E.W.,Fujikawa K. The role of serine proteinase in the
early phase of blood coagulation. Biocnem.Soc.Trans.5:1241,
1977.
- .Dovining M. Comparison of the innibition of thrombin by three
plasma protease inhibitors. Biochemistry 17:2649,1978.
- .Downing M.R. The interaction of proteases, Antithrombin III
and heparin. J.Lab.Clin.Med. 95:777-782,1980.
- .Duckert F. Mecanism of the coagulation.Res.Lab.Praxis 50:
224,1960.
- .Dudek-Wojciechowska G.,Latallo Z.S.,Kopec M. α_2 -macroglo-
bulin complexes of clotting and fibrinolytic enzymes.Ann.

- Univ.Sarav.Med. Suppl.3:Antithrombin III,biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston: 55-57,1983.
- .Egbring R.,Havemann K. Possible role of polymorphonuclear granulocyte proteases in blood coagulation.In: Neutral proteases in human polymorphonuclear leukocytes.Havemann K, Janoff A.Eds.Urban and Schwarzenberg.Baltimore-Munich: 442, 1978.
- .Egbring R.,Schmidt W.,Fuchs G.,Havemann K. Demonstration of granulocyte proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. Blood 49: 219-231,1977.
- .Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. Thromb.Diath.Haemorrh. 13:516-530,1965.
- .Ehrlich M.I.,Krushell J.S.,Blumenstock F.A.,Kaplan J.E. Depression of phagocytosis by plasmin degradation products of plasma fibronectin.J.Lab.Clin.Med. 98:263-271,1981.
- .Elion J.,Downing M.R. Structure of human thrombin:comparison with other serine proteases.In: Chemistry and biology of thrombin.Mann Arbor Science.P.Inc.Michigan,USA:97,1977.
- .Feinstein G.,Janoff A. A rapid method for purification of human granulocyte cationic neutral proteinases:purification and characterization of human granulocyte chymotrypsin like enzyme. B.B.A. 403:477-492,1975.
- .Fenton J.W.,Fasco J.J.,Stakrow A.B.,Aronson D.L.,Young A.M., Finlayson J.S. Human thrombins, production, evaluation and properties of α -thrombin.J.Biol.Chem.252:2587-3598,1977.

- .Fish W.W., Björk I. On the reliability of the use of heparin immobilized on agarose for the study of the interactions among heparin, thrombin and Antithrombin. *Thromb. Haemostas.* (Stutt.) 48:84-86, 1982.
- .Friberger P., Egberg N., Holmer E., Hellgren M., Blombäck M. Antithrombin assay. The use of human or bovine thrombin and the observation of a "second" heparin cofactor. *Thrombos. Res.* 25:433-436, 1982.
- .Fritsche H.M., Stemberger H., Fischer M., Vogel G., Blümel G. Antithrombin III substitution in acute hepatic failure. *Ann. Univ. Sarav. Med. Suppl.* 3: Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance. Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston.: 193-197, 1983.
- .Gallin J.I. Abnormal phagocyte chemotaxis: pathophysiology, clinical manifestations and management of patients. *Rev. Infectious Dis.* 3:1196-1120, 1981.
- .Glasser L. Leukemic cells as probes for sequential functional differentiation of the human granulocyte. *Am. J. Clin. Pathol.* 79:45-51, 1983.
- .Godal H.C., Rygh M., Laake K. Progressive inactivation of purified factor VII by heparin and Antithrombin III. *Thrombos. Res.* 5:773-775, 1974.
- .Goldstein I.M., Weissmann G. Non phagocytic stimulation of human polymorphonuclear leukocytes: role of the plasma membrane. *Seminars in Hematology* 16:175-187, 1979.

- .Gonias S.L.,Pizzo S.V. Altered clearance of human α_2 -M complexes following reaction with cis-dichlorodiamineplatinum II. B.B.A. 678:268-274,1981.
- .Gralnick H.R.,Abrell E. Studies of the procoagulant and fibrinolytic activity of promyelocytes in acute promyelocytic leukemia. Brit.J.Haemat. 24:89-99,1973.
- .Griffith M.J.,Kingdon H.S.,Lundblad R.L. Inhibition of the heparin-antithrombin III/thrombin reaction by active site blocked-thrombin. B.B.R.C. 87:686-692,1979.
- .Hathaway W.E.,Neumann L.L.,Borden C.A.,Jacobson L.J. Immunologic studies of antithrombin III Heparin Cofactor in the newborn. Thrombos.Haemostas.(Stutt.) 39:624-630,1978.
- .Hawiger J. Interaction of human fibrinogen with staphylococci: the presence of a binding region on normal and abnormal fibrinogen derivatives. J.Lab.Clin.Med. 75:93-108,1970.
- .Henriksson P.,Nilsson I.M. Effect of leukocytes,plasmin and thrombin on clotting factors.A comparative in vitro study. Thrombos.Res. 16:301-312,1979.
- .Hopmeier P.,Fische M.,Chovanetz E. The Antithrombin III level in ACD blood bags measured by an immunological and functional method.Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl.3:Antithrombin III biochemistry,function,assay and clinical significance. Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston:214-215,1983.
- .Janoff A.,Carp H.,Laurent P.,Raju L.The role of oxidative processes in emphysema. Am..Rev.Respir.Dis. 127:531-538,1983.

- .Jozefowicz M.,Jozefowicz J.,Fougnot C.,Labarre D. New heparin-like insoluble materials. Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl.3: Antithrombin III,biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston: 205-211,1983.
- .Kabi Diagnostica. Determination of antithrombin-heparin cofactor in plasma with S-2238. Laboratory Instruction, april 1977.
- .Kabi Diagnostica. Determination of prekallikrein in plasma with S-2302. Laboratory Instruction,march 1978.
- .Kaula E. von.,Kaula K.N. von. Antithrombin III and diseases. Am.J.Clin.Path. 48:69-79,1967.
- .Kazal L.A.,Tocantins L.M. The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 113:989-994,1963.
- .Kingdon H.S.,Noyes C.M.,Lundblad R.L. Some aspects of the primary structure of bovine alpha,beta and gamma thrombins in: Chemistry and biology of thrombin.Mann Arbor Science. P.Inc.Michigan,USA: 91,1977.
- .Kingemann H.G.,Egbring R.,Holst F.,Gramse M.,Havemann K. Digestion of α_2 -plasmin inhibitor by neutral proteases from human leukocytes. Thrombos.Res. 24:479-483,1981.
- .Klebanoff S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann.Int.Med. 93:480-489,1980.

- .Kociba G.J.,Loeb W.F.,Wall R.L. Development of procoagulant (tissue thromboplastin) activity in cultured leukocytes. J.Lab.Clin.Med. 79:778-787,1972.
- .Kordich L.C. Hemostasia en leucemias agudas no tratadas. Tesis para el Doctorado en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.,Buenos Aires 1982.
- .Kordich L.C.,Sasseti B.,Lago O. Inhibidores naturales del sistema de coagulación en leucemias agudas. Medicina 37:498,1977.
- .Kordich L.C.,Sasseti B.,Lago O. Modificaciones en los factores de coagulación y antitrombina III por acción de enzimas leucocitarias. Medicina 38:840,1978.
- .Kordich L.C.,Sasseti B.,Lago O. Hemostasia en leucemias agudas no tratadas. Sangre 25:1022-1033,1980.
- .Kress L.F.,Catanese J.J. Identification of the cleavage sites resulting from enzymatic inactivation of human Antithrombin III by *Crotalus adamanteus* Proteinase II in the presence and absence of heparin. Biochemistry 20:7432-7438,1981.
- .Kumada T.,Abiko Y. Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor N°805 (MD-805)* in experimental Antithrombin III-deficient animals. Thrombos.Res. 24:285-298, 1981.
- .Kurachi K.,Schmer G.,Hermodson M.A.,Teller D.C.,Davie E.W.. Characterization of human,bovine and horse Antithrombin III. Biochemistry 15:368-377,1976.

- .Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685,1970.
- .Laurell C.B. Antigen-antibody crossed immunoelectrophoresis Anal. Biochem. 10:358-361,1965.
- .Linke R.P. Identification of pre-amyloid derived from a Bence-Jones protein by trypsin digestion. In: Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Havemann K, Janoff A. Eds. Urban and Schwarzenberg. Inc. Baltimore-Munich:439,1978.
- .Longas M.O., Ferguson W.S., Finlay T.H. Studies on the interaction of heparin with thrombin, antithrombin and other plasma proteins. Arch. Biochem. Biophys. 200:595,1980.
- .Longas M.O., Ferguson W.S., Finlay T.H. A disulfide bond in Antithrombin is required for heparin-accelerated thrombin inactivation. J. Biol. Chem. 255:3436-3441,1980 a.
- .Lorand L., Credo R.B. Thrombin and fibrin stabilization. In: Chemistry and biology of thrombin. Mann Arbor Science. P. Inc. Michigan. USA: 311,1977.
- .Louky S.A., Mc Carren J. Neutrophil enzymes in the lung: regulation of neutrophil elastase. Am. Rev. Respir. Dis. 127:s9-s15,1983.
- .Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265,1951.

- .Lundblad R.L., Fenton II J.W., Mann K.G. in: Chemistry and biology of thrombin. Mann Arbor Science. P. Inc. Michigan. USA: 1977.
- .Magnusson S., Petersen T.E., Dudek-Wojciechowska G. Primary structure of Antithrombin III (Heparin Cofactor). Partial homology between α_1 -Antitrypsin and Antithrombin III. Ann. Univ. Sarav. Suppl. 3: Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance. Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston: 15, 1983.
- .Mancini G., Carbonara O., Heremans J.F. Immunological quantitation of antigens by simple immuno-diffusion. Internat. J. Immunochem. 2: 235-254, 1965.
- .Marciniak E., Farley C.H., De Simone P.A. Familial thrombosis due to Antithrombin III deficiency. Blood 43: 219-231, 1974.
- .Marciniak E., Gockerman J.P. Heparin-induced decrease in circulating antithrombin III. Lancet ii: 581-584, 1977.
- .Marciniak E., Gora-Maslak G. Enhancement by heparin of thrombin-induced antithrombin III proteolysis: its relation to the molecular weight and anticoagulant activity of heparin. Thrombos. Res. 28: 411-421, 1982.
- .Matsuoka M., Sakuragawa N., Shimaoka M. Studies on fibrinolytic activities in normal human leukocytes. Acta Med. Biol. 16: 91, 1969.
- .Miller-Andersson M., Borg H., Andersson L.O. Purification of Antithrombin III by affinity chromatography. Thrombos. Res. 5: 439-452, 1974.

- .Mizuochi T.,Fujii J.,Kurachi K.,Kobata A. Structural studies of the carbohydrate moiety of human Antithrombin III. Arch Biochem.Biophys. 203:458-465,1980.
- .Murano G.,Miller-Andersson M.,Williams L. Heterogeneity of purified antithrombin III. Thrombos.Res. 24:489-493,1981.
- .Nienhaus K.H.,Flohr K.,Abt H.,Wenzel E. The influence of storage and blood foreign surfaces on Antithrombin III concentration and Antithrombin III activity. Ann.Univ.Sarav.Med. Suppl.3: Antithrombin III,biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston:216-223,1983.
- .Nordenman B.,Danielsson A.,Björk I. The binding of low-affinity and high-affinity heparin to Antithrombin. Eur.J.Biochem. 90:1-6,1978.
- .Nossel H.L. The contact phase of blood coagulation.Blackwell Scientific Publications.Oxford, 1964.
- .O'Brien J.R.,Etherington M.D. Effect of heparin and warfarin on antithrombin III. Lancet ii:1232,1977.
- .Ødegård O.R.,Lie M.,Abildgaard U. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. Thrombos.Res. 6:287-294,1975.
- .Ofosu F.A.,Blajchman M.A.,Modi G.,Cerskus A.L.,Hirsh J. Activation of factor X and Prothrombin in Antithrombin III depleted plasma: the effects of heparin. Thrombos.Res. 23:331-345,1981.

- .Ogston D. Inhibition of the activated C_{1s} subunit of the first component of complement by Antithrombin III in the presence of heparin. *Thrombos.Res.* 9:217,1976.
- .Ohlsson K. Purification and properties of granulocyte collagenase and elastase. In: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes*. Havemann K, Janoff A. Eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich:89,1978.
- .Ohlsson K., Olsson J. The extracellular release of granulocyte collagenase and elastase during phagocytosis and inflammatory processes. *Scand.J.Haematol.* 19:145-152,1977.
- .Olson S.T., Shore J.D. Binding of high affinity heparin to Antithrombin III. Characterization of the protein fluorescence enhancement. *J.Biol.Chem.* 256:11065-11072,1981.
- .Olson S.T., Srinivasan K.R., Björk I., Shore J.D. Binding of high affinity heparin to Antithrombin III. Stopped flow kinetic studies of the binding interaction. *J.Biol.Chem.* 256:11073-11079,1981 a.
- .Olsson I., Odeberg H., Weiss J., Elsbach P. Bactericidal cationic proteins of human granulocytes, in: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes*. Havemann K., Janoff A. Eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich:18,1978.
- .Olsson P., Larsson R., Lindahl U. Thrombin adsorption and inhibition on different sulphated surfaces. *Ann.Univ.Sarav. Med.Suppl.3: Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance*. Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston: 212-213,1983.

- .Opie E.L. Enzymes and anti-enzymes of inflammatory exudates. J.Exp.Med. 7:316-334,1905.
- .Østerud T. The effect of antithrombin III on the activity of the coagulation factors VII,IX and X. Thrombos.Haemostas. 35:295,1976.
- .Owen W.G. Evidence for an ester bond between thrombin and heparin cofactor. Thrombos.Haemostas. 35:87,1976.
- .Owen W.G. Effect of heparin on the extent of inhibition of thrombin by heparin cofactor. B.B.A. 494:182,1977.
- .Paus E.,Steen H.B. Mitogenic effect of α -mannosidase on lymphocytes. Nature 272:452-454,1978.
- .Pepper D.S.,Bánhegyi D.,Cash J.D. The different forms of Antithrombin III in serum. Thrombos.Haemostas. 38:494-503,1977.
- .Pixley R.,Danishefsky I. Preparation of highly stable Antithrombin-Sepharose and utilization for the fractionation of heparin. Thrombos.Res. 26:129-133,1982.
- .Plow E.F. The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. B.B.A. 630:47-56,1980.
- .Plow E.F. Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. J.Clin.Invest. 69:564-572,1982.
- .Plow E.F.,Edgington T.S. The fibrinolytic pathway of leuko-

cytes. In: Neutral proteases in human polymorphonuclear leukocytes. Havemann K., Janoff A. Eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich:330,1978.

.Powers J.C. Synthetic elastase inhibitors:prospects for use in the treatment of emphysema. Am.Rev.Respir.Dis. 127:s54-s58,1983.

.Powers J.C.,Gupton B.F.,Lively M.O.,Nishino N.,Whitley R.J. Synthetic inhibitors of granulocyte elastase and cathepsin-G. In:Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Havemann K.,Janoff A.Eds.Urban and Schwarzenberg.Baltimore-Munich:221,1978.

.Proctor R.,Rapaport S. The partial thromboplastin time with kaolin. Am.J.Clin.Pathol. 36:212-219,1961.

.Prydz H.,Allison A.C. Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes. Thrombos.Haemostas.(Stutt.) 39:582-591,1978.

.Quick A.J. Fisiología y patología de la hemostasia. Ed. El Ateneo. Buenos Aires 1952.

.Rasche H. Antithrombin III in malignant disease. Ann.Univ. Sarav.Med.Suppl.3: Antithrombin III,biochemistry,function, assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds.Homburg-Boston:143-144,1983.

.Reilly C.F.,Travis J. The degradation of human lung elastin by neutrophil proteinase. B.B.A. 621:147-157,1980.

- .Remmert L.F.,Cohen P.P. Caseinolytic assay for plasminogen determination. J.Biol.Chem. 181:431,1949.
- .Roberts P.S. Measurement of the rate of plasmin action on synthetic substrates. J.Biol.Chem. 232:285,1958.
- .Rodeghiero F.,Barbui T. Two dimensional immunoelectrophoresis of Antithrombin III during disseminated intravascular coagulation in acute leukemia. Thrombos.Res. 12:191,1977.
- .Róka L.,Bleyl H. Activation of reaction thrombin with ATIII by heparin is pH dependent. Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl.3: Antithrombin III,biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds.Homburg-Boston: 73,1983.
- .Róka L.,Bleyl H.,Schmitz H. Contribution of Antithrombin, α_2 -macroglobulin and fibrin to the inactivation of thrombin. Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl.3:Antithrombin III, biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston:47-48,1983 a.
- .Rosenberg R.D.,Damus P.S. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. J.Biol.Chem. 248:6490-6505,1973.
- .Rosenberg R.D.,Jordan R.E.,Farber S. The neutralization of thrombin and other serine proteases of the hemostatic mechanism.In: Chemistry and biology of thrombin.Mann Arbor Science.P.Inc. Michigan.USA;375,1977.
- .Rosenberg R.D.,Jordan R.E.,Faureau L.U.,Lau L.H. Highly

active heparin species with multiple binding sites for antithrombin. B.B.R.C. 86:1319-1324,1979.

.Rosenberg R.D. Biochemistry and function of Antithrombin III as a serine protease inhibitor and heparin cofactor. Ann. Univ.Sarav.Med. Suppl.3: Antithrombin III,biochemistry, function,assay and clinical significance.Wenzel E-Rosenberg R.D.Eds.Homburg-Boston:13-14,1983.

.Rosenberg R.D.,Oosta G.M.,Jordan R.E.,Gardner W.T. Mechanism of Antithrombin III action and the structural basis of heparin anticoagulant function. Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl 3: Antithrombin III,biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston:59-69,1983.

.Sakuragawa N.,Takahashi K.,Hoshiyama M.,Jimbo C.,Matsuoka M, Onishi Y. Pathologic cells as procoagulant substance of disseminated intravascular coagulation syndrome in acute promyelocytic leukemia. Thrombos.Res. 8:263-373,1976.

.Sas G.,Blasko G.,Banhegyi D.,Jako J.,Palos L.A. Abnormal Antithrombin III (Antithrombin III "Budapest") as a cause of a familial thrombophilia. Thrombos.Diathes.Haemorrh. 32:105-115,1974.

.Sas G.,Pepper D.S.,Cash J.D. Investigations on antithrombin III in normal plasma and serum. Brit. J. Haematol. 30:265-272,1975.

.Sas G.,Pepper D.S.,Cash J.D. Plasma and serum antithrombin III: differentiation by crossed immunoelectrophoresis. Thromos.Res. 6: 87-95,1975 a.

- .Sas G., Petö I., Banhegyi D., Blaskó G., Domján G. Heterogeneity of the classical Antithrombin III deficiency. *Thrombos.Haemostas.(Stutt.)* 43:133-136,1980.
- .Sassetti B., Kordich L.C., Lago O. Determinación de antitrombina III por inmunoelectroforesis bidimensional en acetato de celulosa gelificado. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 14:479-482,1980.
- .Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteases, I, Papain. *B.B.R.C.* 27:157-162,1967.
- .Schiessler H., Hochstrasser K., Ohlsson K. Acid-stable inhibitors of granulocyte neutral proteases in human mucous secretions: biochemistry and possible biological function. In: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes.* Havemann K., Janoff A. Eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore-Munich:195,1978.
- .Schmidt W., Havemann K. Isolation of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 355:1077-1082,1974.
- . Schramm W., Marx R. Congenital and acquired Antithrombin III deficiency, clinical symptoms and therapy with Antithrombin III concentrates. *Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl.3:Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance.* Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston:137-141, 1983.
- .Seegers W.H. Theory and clinical applications of Antithrombin III. *Am.J.Clin.Pathol.* 69:367,1978.

- .Shifman M.A.,Pizzo S.V. The in vivo metabolism of Antithrombin III and Antithrombin III complexes.
J.Biol.Chem. 257:3243-3248,1982.
- .Smolen J.E.,Weissmann G. The granulocyte:metabolic properties and mechanisms of lysosomal enzyme release.In:Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes.Havemann K., Janoff A.Eds.Urban and Schwarzenberg.Baltimore-Munich:56, 1978.
- .Smolen J.E.,Weissmann G. The secretion of lisosomal enzymes from human neutrophils: The first events in stimulus-secretion coupling.Lysosomes and lysosomal storage diseases.Early events in neutrophils secretion.Callahan J.W., Lowden J.A.Eds.Raven Press New York:31-61,1981.
- .Solomon A. Possible role of proteases in immunoglobulin degradation and amyloid formation.In:Neutal proteases of human polymorphonuclear leukocytes.Havemann K.,Janoff A.Eds. Urban and Schwarzenberg.Baltimore-Munich:423,1978.
- .Spurling N.W.,Savory J. The influence of residual factor VII on the sensitivity of brain thromboplastin.
Thrombos.Haemostas.(Stutt.) 39:592-599,1978.
- .Starkey P.M.,Barrett A.J. Human lysosomal elastase, catalytic and immunological properties.
Biochem.J. 155:265-271,1976.
- .Steinbuch M.,Pejaudier L.,Lejars A.,Kichenin V.,Audran R. Interaction of C₁-esterase (C₁_S) and Antithrombin III.Ann. Univ.Sarav.Med.Suppl.3:Antithrombin III,biochemistry, function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds.Homburg-Boston:49-53,1983.

- .Tanaka T. Biochemical activities of nine lysosomal enzymes in T and non-T lymphocytes.
F.E.B.S. Letters. 104:161-164,1979.
- .Tanaka T.,Kobayashi M.,Saito O.,Kamada N.,Kuramoto A.,Usui T.
Biochemical activities of lysosomal acid hydrolases in leukemic cells.Clin.Chim.Acta. 117:121-131,1981.
- .Taylor J.C.,Crwford I.P. Purification and preliminary characterization of human leukocytes elastase.
Arch.Biochem.Biophys. 169:91-101,1975.
- .Thaler E. Clinical and therapeutic aspects of hereditary and acquired Antithrombin III deficiencies.Ann.Univ.Sarav. Med.Suppl.3: Antithrombin III,biochemistry,function,assay and clinical significance.Wenzel E.-Rosenberg R.D.Eds. Homburg-Boston:121-129,1983.
- .Thaler E.,Schmer G. A simple two-step isolation procedure for human and bovine Antithromnin III/II(Heparin-Cofactor): a comparison of two methods.
Brit.J.Haematol. 31:233-243,1975.
- .Tollefsen D.M.,Majerus D.W.,Blank M.K. Heparin Cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.
J.Biol.Chem. 257:2162-2169,1982.
- .Travis J.,Baugh R.,Giles P.J.,Johnson D.,Bowen J.,Reilly C.F. Human leukocyte elastase and cathepsin G:isolation,characterization and interaction with plasma proteinase inhibitors. In:Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Havemann K.,Janoff A.Eds.Urban and Swarzenberg.Baltimore-Munich:118,1978.

- .Vainer H., Bussel A. Defective platelet surface markers in chronic myeloid leukemia (CML).
Thrombos.Haemostas. 42:45,1979.
- .Váradi K., Marossy K., Asboth G., Elödi P., Elödi S. Inactivation of human factor VIII by granulocyte proteases.
Thrombos.Haemostas.Suppl.1-76:45-48,1980.
- .Vinazzer H. Preliminary report on the recovery and on the biological half-life of Antithrombin III. Ann.Univ.Sarav.Med. Suppl.3:Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance. Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston:185-187,1983.
- .Visser L., Blout E.R. The use of p-nitro-phenyl-N-tert-butylloxycarbonyl-L-alaninate as a substrate for elastase.
B.B.A. 268:257-260,1972.
- .Wada H., Nagano T., Tomeoku M., Kuto M., Karitani Y., Deguchi K., Shirakawa S. Coagulant and fibrinolytic activities in the leukemic cell lysates.
Thrombos.Res. 30:315-322,1983.
- .Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids.
J.Biol.Chem. 234:1971-1975,1959.
- .Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244:4406-4412,1969.
- .Webster M.E., Preice J.V. Action of the kallikreins on synthetic ester substrates.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 107:186,1961.

- .Weinfeld A., Branchög I., Kutti J. Platelet in the myeloproliferative syndromes.
Clinics in Haematology 4:373-392,1975.
- .Wickerhauser M., Williams C., Mercer J. Development of large scale fractionation methods.VII:Preparation of Antithrombin III concentrate.
Vox Sanguinis 36:281-293,1979.
- .Wintrobe M. Hematología clínica. Intermédica Ed. Leucocitos. Buenos Aires,1969.
- .Witt I., Schmidt B., Brauchle F. Antithrombin III activity during infancy and childhood. Ann.Univ.Sarav.Med.Suppl.3: Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance. Wenzel E.-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston 145-147,1983.
- .Wong R.F., Chang T., Feinman R.D. Reaction of Antithrombin with proteases. Nature of the reaction with trypsin. Biochemistry 21:6-12,1982.
- .Wyckoff M. Micro assay for fibrinogen. J.Lab.Clin.Med. 47:4,1956.
- .Wyckoff M., Rodbard D., Chrambach A. Polyacrilamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems: properties of the stack, valid Rf-measurement and optimized procedure. Analyt. Biochem. 78:459-482,1977.
- .Yin E.T. Effect of heparin on the neutralization of factor Xa and thrombin by plasma alpha₂-globulin inhibitor. Thrombos.Diathes.Haemorrh. 33:43-50,1974.

- .Yu-Teh-Li. Studies on the glycosidases in Jack bean meal.
I. Isolation and properties of α -mannosidase.
J. Biol. Chem. 242:5474, 1967.
- .Zimmerman M., Ashe B.M. Substrate specificity of the elastase and the chymotrypsin-like enzyme of the human granulocyte. B.B.A. 480:241-245, 1977.
- .Zimmermann R.E. Activation of Antithrombin III. Ann. Univ. Sarav. Med. Suppl. 3: Antithrombin III, biochemistry, function, assay and clinical significance. Wenzel E-Rosenberg R.D. Eds. Homburg-Boston: 29-31, 1983.
- .Zuzel M., Cawley J.C., Paton R.C., Burus G.F., Mc Nicol G.P. Platelet function in hairy-cell leukemia.
J. Clin. Pathol. 32:814-821, 1979.