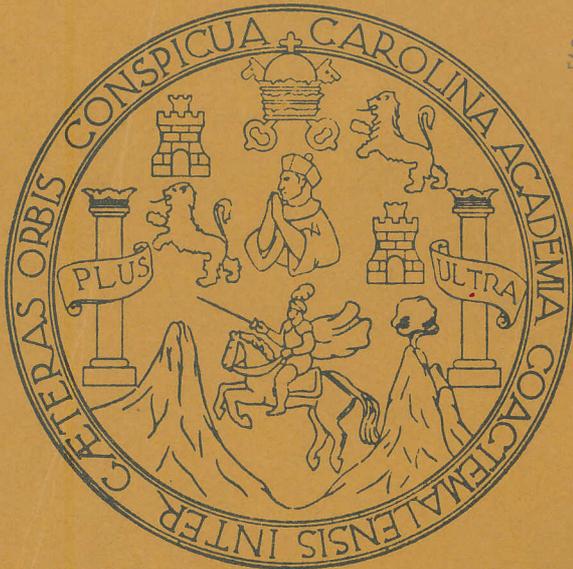


22

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS



"METABOLISMO DEL LEUCOCITO"

HENRY BERRISFORD STOKES BROWN

Guatemala, Febrero de 1970.

PLAN DE TESIS

- I. INTRODUCCION
- II. OBJETIVOS
- III. GENERALIDADES
- IV. RESPIRACION
- V. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS
 - a) Glucógeno
 - b) Glucólisis
 - c) Ciclo de ácido tricarboxílicos
 - d) Ciclo del fosfogluconato.
- VI. METABOLISMO DE PROTEINAS
 - a) Aminoácidos
 - b) Glutation.
- VII. METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS
- VIII. SISTEMAS ENZIMATICOS
 - a) Catalasa y peroxidasa
 - b) Fosfatasas
 - c) Betaglucuronidasa
 - d) Nucleasas.
- IX. METABOLISMO DE LIPIDOS
- X. AGUA Y ELECTROLITOS
- XI. SUMARIO
- XII. BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

La importancia del estudio del metabolismo del leucocito estriba en el papel fundamental que estas células juegan en el mecanismo de defensa del organismo a infecciones.

El leucocito tiene una vida media muy corta, y por consiguiente puede mostrar alteraciones en otras partes del organismo. Además, siendo un tipo de célula de fácil obtención y purificación ofrece la oportunidad de estudiar sistemas celulares homogéneos.

Un conocimiento detallado del metabolismo del leucocito normal permite por lo tanto una mejor evaluación de alteraciones funcionales, en células modificadas por procesos patológicos. Esto en sí, es de gran ayuda para una mejor orientación diagnóstica y provee un medio que estima los méritos de las medidas terapéuticas.

OBJETIVOS.

1. - Revisar los avances logrados durante los últimos 20 años en el conocimiento del metabolismo y función del leucocito tanto en condiciones normales como patológicas.
- 2.- Establecer hasta que punto las alteraciones metabólicas del leucocito pueden ser utilizadas como medio de diagnóstico de algunas alteraciones patológicas.
3. - Establecer con base en investigaciones llevadas a cabo, cuales pruebas funcionales del leucocito pueden ser utilizadas para evaluar los méritos de las medidas terapéuticas durante la recuperación del individuo enfermo.

GENERALIDADES SOBRE LEUCOCITOS.

Entre los leucocitos, el neutrófilo polimorfonuclear ha sido estudiado más extensamente y por ello, su metabolismo se conoce con bastante amplitud.

Su tamaño oscila entre 10 y 15 micras de diámetro. Su forma cambia constantemente con el movimiento. La porción principal puede tomar la forma de un pedículo ancho o de un pseudópodo con finas fibrillas saliendo de él. Vistos con contraste de fases, los lóbulos nucleares, aparecen homogéneos o presentan oscurecimiento periférico. El citoplasma contiene gran número de gránulos (50 a 200), los cuales varían en forma y tamaño dependiendo de la especie, así: Los neutrófilos humanos, de Ratas y de Caballos, muestran gránulos pequeños - cuyo tamaño está casi en el límite de resolución del microscopio de luz (aproximadamente 0.2 micras). Los leucocitos de conejos y cobayo tienen gránulos mayores.

Estudios histoquímicos de la serie mielocítica muestran reacciones fuertemente positivas para ácidos ribonucleicos y débiles o ausentes para glucógeno. Con la maduración de la célula, el ácido ribonucleico disminuye y aparece el glucógeno con mayor positividad, lo mismo lípidos, oxidasas, deshidrogenasas, fosfatasas, lipasas, etc.

No se conoce exactamente el mecanismo para la formación y mantenimiento del núcleo lo cual merecerá mayor estudio.

Los leucocitos se producen de células primitivas de la médula ósea, --
siendo su proceso de maduración así:

Mieloblasto — promielocito → mielocito → metamielocito → juvenil → neutrófilo.

Durante las fases iniciales de desarrollo, el proceso de síntesis proteí-
ca del leucocito es muy activo como se evidencia por un retículo endoplas-
mático bien desarrollado. Con la maduración y el apareamiento de gránu-
los, la síntesis proteínica disminuye (1).

Experimentalmente se ha llegado a encontrar que en un momento dado,
en una persona normal, hay de 20 a 30 mil millones de leucocitos circulantes.
Una cantidad similar es marginada en las paredes de vasos sanguíneos o rete-
nidas en capilares.

Los neutrófilos permanecen en circulación por un tiempo corto, siendo
su vida media de aproximadamente 6 horas. Una vez emigran a los tejidos,
nunca retornan al compartimiento intravascular. Sin embargo, por cada --
leucocito polimorfomuclear circulante, hay en la médula ósea, 50 a 100 co-
mo reserva (1).

La constancia relativa de la concentración de leucocitos sugiere que hay
un mecanismo dinámico de retroalimentación que controla su liberación de -
la médula ósea.

Los neutrófilos son células incapaces de dividirse. Su vida media dentro

de los tejidos extravasculares, no se conoce exactamente; aunque se infiere que
es de pocos días, ya que neutrófilos maduros no se pueden mantener en cultivos
de tejidos por un período mayor de 72 horas (1).

De los datos que preceden se deduce, que a diario gran cantidad de neutrófi-
los mueren y desaparecen. Se calcula que de 50 a 100 ml. de glóbulos blancos
se eliminan diariamente. El destino de éstos no se conoce y se presume que son
eliminados hacia el exterior por los intestinos, la piel y los pulmones. (1)

Como se sabe, una de las características de los neutrófilos es la de contener
en su citoplasma, gran cantidad de gránulos, los cuales han sido recientemente
aislados. Los gránulos aislados se lisan al congelarlos y descongelarlos alternati-
vamente o a un Ph de 5 o menos y al tratarlos con saponina (2). Su análisis ---
muestra gran concentración de proteínas, trazos de lípidos, ácidos nucleicos, --
proteínas, fofatasas, nucleasas, nucleosidades, betaglucuronidasa y aryl sulfata-
sa (2). La mayoría de estas enzimas muestran actividad óptima a pH ácido.

Las características físicas y químicas de los gránulos de neutrófilos los hacen
muy similares a los lisosomas. Los gránulos contienen además de hidrolasas á-
cidas dos sustancias antimicrobianas llamadas fagocitina y lizosima.

En una reacción inflamatoria resultante, por ejemplo, de la introducción de
bacterias dentro de los tejidos, la función de los neutrófilos se sumariza en las -
siguientes fases:

Marginación o adhesión de las células a las paredes endoteliales de los capilares.

Locomoción.

Emigración a través de las paredes del vaso sanguíneo a los tejidos.

Atracción hacia los microbios o quimiotaxismo.

Fagocitosis.

Degranulación.

Digestión o expulsión del cuerpo extraño.

La marginación o adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular, es un proceso no bien entendido el cual sugiere cambio en las propiedades de la superficie endotelial y en los leucocitos. En condiciones normales, la carga de los polimorfonucleares, es negativa debida en parte a la presencia de ácidos siálicos en la membrana celular (3).

La locomoción es una de las principales características de los neutrófilos. Usualmente el movimiento no se verifica en línea recta, sino que tiende a cambiar de dirección cada cierta distancia (1).

El camino seguido por una célula tiende a ser en forma de zig-zag. La velocidad de desplazamiento varía dependiendo del medio que la rodea. En condiciones ideales, las células pueden transitar a 35-40 micras por minuto. El mecanismo intrínseco de la locomoción no se conoce exactamente. Se ha propuesto que este movimiento es de tipo ameboide, y más recientemente, --

que se deba a corrientes organizadas del citoplasma.

La habilidad de los leucocitos polimorfonucleares de penetrar por aberturas pequeñas se conoce hace mucho tiempo. La observación microscópica muestra un paso gradual por el capilar o la vénula. El leucocito se constríe marcada-- mente al pasar por la pared vascular. El mecanismo que se ha propuesto es que el leucocito es engolfado por células endoteliales y así es pasado al otro lado. - Otras hipótesis es que entre las células endoteliales existen poros por los cuales penetra el leucocito.

Quimiotaxismo es la atracción que diferentes compuestos químicos ejercen - sobre la célula. Observación directa de los movimientos de los neutrófilos mues-- tra que cuando las células se encuentran a una distancia aproximada de 100 micras de una partícula dada, su movimiento hasta entonces al azar, desaparece y la célula se dirige en línea recta hacia el objeto a digerir. La base para esta respuesta quimiotáxica no se conoce. Se ha propuesto la existencia de un gradiente de con- centración, sea una posible explicación a éste fenómeno.

La atracción química de los leucocitos hacia las bacterias, sucede aún en la au-- sencia de suero, complemento o glucosa en el medio. Cuando se estudia el qui-- miotaxismo en complejos de antígeno anticuerpo hay una participación de compo-- nentes del de suero sensibles al calor. Los complejos de descritos son directamente quimiotaxicos e interaccionan con el complemento para producir una sustan--

cia resistente al calor que atrae a los polimorfonucleares (4).

Durante la fagocitosis, cuando el leucocito se pone en contacto con una partícula de un tamaño pequeño, ésta pasa directamente a través de la membrana celular. Cuando se trata de una bacteria de gran tamaño como el bacilo megaterio, el leucocito la ingiere más lentamente. Se estima que una pequeña cantidad de fluido extracelular entra al leucocito junto con la partícula ingerida. Otro mecanismo propuesto es que la partícula no penetra directamente a la membrana celular, sino se adhiere a ella y el resto del leucocito la rodea para luego engolfarla.

Antiguamente se creía que la fagocitosis era un fenómeno meramente físico. Sin embargo, hoy sabemos que es un proceso activo que necesita el expendio de energía la cual tiene origen en la glicolisis (5).

Puesto que tanto la bacteria como el leucocito tienen una carga negativa neta, se puede pensar que ambas se repelen. Sin embargo, ya que esto no sucede, debe existir un tipo de unión entre ambas, indiferente de la carga de la membrana.

Ciertas substancias del suero de naturaleza similar a los anticuerpos o al complemento llamadas opsoninas, actúan sobre la superficie bacteriana, posiblemente por adsorción, haciéndolas más susceptibles a la fagocitosis. Además del efecto opsonico, el suero estimula la función celular lo cual puede deberse a un efec

to osmótico, a una inactivación de sustancias tóxicas o a otros efectos no conocidos. In vitro la velocidad de la fagocitosis es mayor en soluciones hipotónicas de cloruro de sodio y es disminuida o suprimida en soluciones hipertónicas. El requerimiento de cationes divalentes para una fagocitosis efectiva es inferido por la acción depresora, que sobre esta tienen los agentes quelantes (1).

El pH óptimo para la fagocitosis oscila entre 6 y 8, y está poco influenciado por el oxígeno del medio (1).

En un medio libre de carbohidratos, los leucocitos continúan ingiriendo partículas durante más o menos una hora, utilizando como fuente de energía glucógeno endógeno. Una vez que la fagocitosis ha cesado, esta puede restaurarse por la adición de glucosa al medio, con lo cual se estimula además la síntesis de glucógeno.

Cuando una bacteria es ingerida no flota libremente en el citoplasma, sino que es mantenida en una invaginación de la membrana celular. Similarmente, tanto las enzimas como los componentes antibacterianos, se encuentran contenidos en gránulos intracitoplasmáticos o sea los lisosomas. Durante la fagocitosis, las enzimas hidrolíticas, contenidas en los gránulos son liberadas en los sitios donde se encuentran las bacterias o partículas ingeridas, sucediendo entonces el fenómeno de la degranulación.

Se ha sugerido como mecanismo de la reacción de degranulación que al contac

to con las partículas ingeridas los gránulos se fusionan y liberan hidrolasas directamente en el sitio de inclusión de las partículas.

En los neutrófilos el proceso de ingestión y digestión es en muchos aspectos similar al de los animales superiores y al hombre. La célula engolfa las partículas en un recinto o estómago, donde después se descargan las enzimas digestivas. El material engolfado es degradado sin que exista una autólisis del material citoplasmático.

Se ha comprobado que las bacterias para ser destruidas por el leucocito, necesitan permanecer durante un tiempo no menor de 15 minutos dentro de la célula.

Durante la fagocitosis el leucocito produce gran cantidad de ácido láctico a partir de la glicolisis. Esto hace que el pH intracelular sea de 4 o 5. Este grado de acidez y la presencia intracelular de ácidos orgánicos es letal para muchos tipos de bacterias. Es de notar sin embargo, que el grado de acidez per se no es la causa de muerte de las bacterias ya que estas pueden sobrevivir a pH bajo.

La enzima lizosima es una aminopolisacaridasa que se encuentra presente en gran concentración en los gránulos de los polimorfonucleares. La lizosina degrada la membrana celular de varias especies de bacterias.

En su metabolismo, los polimorfonucleares producen peróxido de hidrógeno el cual tiene actividad antimicrobiana, también produce leucocidinas y

fagocitina, éstas últimas se encuentran localizadas en los gránulos y son liberadas durante la fagocitosis.

El destino de una partícula ingerida por los neutrofilos varía dependiendo de la naturaleza de la misma. Sustancias inertes como el carbón o partículas de polistereno permanecen dentro de la célula por varias horas, mientras que las bacterias son rápidamente degradadas.

Bajo ciertas condiciones las bacterias ingeridas por el leucocito son expulsadas de la célula. Esto equivale a un proceso de regurgitación y representa una especie de defecación.

El leucocito juega un papel importante en el mecanismo de defensa del organismo contra la invasión de cuerpos extraños. Esto se puede apreciar por la mayor susceptibilidad a infecciones en personas con agranulocitosis.

Condiciones en las cuales el número de leucocitos se encuentran disminuidos, tales como irradiación masiva, resultan en una baja resistencia a infecciones. Niveles sanguíneos altos de esteroides, resultan en un aumento en el número de leucocitos y en una disminución de la habilidad fagocitaria de los mismos.

Debe enfatizarse que siendo la función del leucocito sumamente compleja, trastornos de esta función a cualquier nivel, darán como resultado una baja en su capacidad fagocitaria. Esto explica porque en ciertas formas de leucemia la susceptibilidad a la infección está aumentada a pesar de que el número de neutrófilos es mayor que lo normal.

RESPIRACION DE LOS LEUCOCITOS

La respiración endógena del leucocito es aproximadamente 45 veces mayor que la de una plaqueta. Sin embargo, debido a que hay 50 veces más plaquetas que leucocitos en la sangre circulante, el consumo de oxígeno en ambos tipos de células es aproximadamente igual. (6)

El consumo de oxígeno es afectado por los procedimientos de aislamiento. Se inhibe por trauma, el lavado, la exposición a soluciones hipotónicas y puede ser totalmente reprimido por diálisis (6).

La utilización del oxígeno por el leucocito es afectado, directamente por el nivel de hormona tiroidea circulante y puede ser rápidamente alterado por la administración de triiodotironina (7). Es de notar sin embargo que los leucocitos humanos contienen enzimas capaces de deiodizar a la tirexina a un pH fisiológico (7).

Existen otros factores capaces de alterar invitro la respiración del leucocito, entre estos se deben considerar, la presión parcial del bióxido de carbono (8), la concentración de glucosa en el medio y la presencia de pirógenos bacterianos y complejos de antígeno anticuerpo (9). La Saponina, el tiouracilo, el cloranfenicol, el cianuro, el fluoruroacetato, el ácido malónico y el p-cloromercuribenzoato, actúan como depresores del consumo de oxígeno, mientras que el dinitrofenol y el ácido ascórbico actúan como estimu-

ladores (10).

El consumo de oxígeno de los leucocitos intactos es dos veces mayor que el de homogenizados de las mismas células (10).

Durante la fagocitosis el consumo de oxígeno aumenta proporcionalmente al número de partículas ingeridas. La energía necesaria para este proceso es derivada de la glicólisis (5).

Invitro, la enzima respiratoria más activa en leucocitos dializados es la al-faglicerofosfato deshidrogenasa. En estas condiciones tanto el succinato como el piruvato, estimulan la respiración. Por otra parte en células intactas el único intermediario del ciclo de Krebs que estimula la respiración es el piruvato (11).

La velocidad de respiración varía según el tipo de célula, siendo mayor en los macrófagos alveolares, y descendiendo sucesivamente en los monocitos, polimorfonucleares y linfocitos (5).

La respiración de los leucocitos de cobayos medida en un medio con buffer de bicarbonato es relativamente insensible al efecto depresor del cianuro y la antimicina. Es sensible, sin embargo, al amobarbital que es un inhibidor de ciertas flavoproteínas. Con base en esta evidencia se ha propuesto que reacciones extramitocondriales que utilicen NADPH sean la ruta principal en el proceso de reoxidación de nucleótidos de pirimidina. Esta hipótesis debe considerarse con mucha cautela mientras no se establezca definitivamente el

sitio de acción de la antimicina y el amobarbital (8).

Durante la fagocitosis el consumo de oxígeno aumenta notablemente siendo 5 veces mayor que en la célula en reposo (12).

Rossi y Zatti (13) han sugerido varios mecanismos para explicar la estimulación respiratoria por la fagocitosis. Uno de ellos es que la disminución en el pH intracelular debido a acumulación de ácido láctico causa liberación y activación de una enzima granular NADPH-Oxidasa. El piruvato producido durante glicolisis estará entonces en una concentración mayor que la coenzima. En estas condiciones la deshidrogenasa del ácido láctico utiliza NADPH para reducir el exceso de piruvato formado. El NADP regenerado servirá de estímulo para la actividad del ciclo de las pentosas. Esta hipótesis ha sido recientemente modificada, postulándose que la activación de NADH oxidasa presente en el citoplasma es el resultado de un aumento transitorio en el pH intracelular debido esencialmente al aumento de producción de lactato durante la fagocitosis. Esta enzima tiene un pH óptimo bajo (13).

Otro mecanismo sugerido es que como resultado de la degranulación un sistema NADPH-Oxidasa dependiente del manganeso es liberado de los gránulos rotos y estimula directamente el ciclo de las pentosas. La estimulación del consumo de oxígeno y del ciclo de las pentosas producido durante la fagocitosis precede la degranulación y está asociado con mayor reoxidación de NADPH₂.

Inmediatamente después del contacto de los leucocitos con partículas opsonificadas, hay un aumento en la oxidación de NADH₂ y del carbono uno de la glucosa. En estudios finales del proceso hay aumento en la producción de lactato (13)



METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

a) Glucógeno: El contenido de glucógeno de los leucocitos es similar al del músculo y al del hígado o sea más o menos 1 a 2% de su peso húmedo total. El glucógeno de los glóbulos blancos no es estático ya que disminuye durante la fagocitosis. La glucosa tiene un efecto conservador en la utilización de glucógeno como fuente de energía.

Histológicamente se ha encontrado que el glucógeno aparece en los -- gránulocitos en la fase de mielocitos, y aumenta en concentración con la maduración. Las células blásticas mieloides tienen muy poco contenido de glucógeno o pueden no tenerlo.

En leucemia mieloide crónica (LMC), la concentración de glucógeno en el leucocito se encuentra disminuida, Por otra parte, leucocitos de paciente con mononucleosis infecciosa o policitemia vera, muestran niveles elevados (14).

En la actualidad gracias al empleo de técnicas sensibles se ha encontrado que el linfocito contiene una cantidad apreciable de glucógeno y que este se encuentra afectado en enfermedades linfoproliferativas (15).

Tanto la glucosa, como la galactosa, pueden ser utilizadas en la síntesis de glucógeno. Cuando la galactosa es el sustrato más disponible, se utiliza más rápidamente que la glucosa. La razón de este fenómeno, posiblemente -

se encuentre en que la galactosa sufre modificaciones metabólicas que la glucosa (16, 17).

De estudios de pacientes con enfermedades por errores del metabolismo del glucógeno, han permitido establecer que el hígado y los glóbulos blancos utilizan mecanismos similares para su degradación, los cuales son diferentes de los utilizados por el músculo (28).

Se ha demostrado también que en enfermedades de depósito de glucógeno, la concentración de glucógeno en los leucocitos al igual que en el hígado se encuentra elevada. El mecanismo enzimático responsable de esta acumulación de glucógeno no ha sido establecido.

En los glóbulos blancos, la actividad de fosforilasa está disminuida en aquellas enfermedades de depósito de glucógeno asociados con deficiencia de fosforilasa hepática y no así en los tipos de enfermedad con deficiencia de fosforilasa muscular. En el tipo III de glucogenosis, los niveles de enzima desramificadora ("Debranching enzyme"), son anormales tanto en los leucocitos como en el tejido hepático. Por otra parte los niveles de esta enzima están normales en los otros tipos de glucogenosis. Se deduce de estos hechos que los leucocitos son de utilidad para el diagnóstico de ciertos tipos de enfermedad por depósito de glucógeno.

Yunis y Arimura (19) estudiando el metabolismo del glucógeno, encontraron

que en el leucocito existen dos tipos de fosforilasa. Estas se designan como "a" y "b" (alfa - 1, 4 - glucan: ortofosfato glucasil transferasa, E. C. 2. 4. 1. 1. "a" y "b"), ambas pueden existir en forma activa o inactiva. La fosforilasa "b" del músculo para ser activada requiere ácido adenilico (AMP), mientras que la fosforilasa hepática en presencia del nucleótido muestra una ligera activación. En el músculo la conversión de fosforilasa "b" a "a" es acompañada de fosforilización de la de la enzima, dimerización y por consiguiente, duplicación de su peso molecular.

La enzima obtenida del músculo es inactivada por el glucagón y su actividad es estimulada por la cisteína. Lo contrario es cierto para la hepática.

Yunis y Arimura (19), utilizando una enzima obtenida del cloroma (tumor formado por granulocitos inmaduros), encontraron que la fosforilasa del leucocito es similar a la hepática en que es activada por glucagón y es susceptible a la adición de cisteína. Estos mismos autores encontraron que las células del cloroma contienen una fosforilasa quinasa capaz de convertir la fosforilasa "b" del músculo de conejo en fosforilasa "a". Existe también una fosfatasa que cataliza la reacción inversa.

Scott (20 y 21) ha reportado que cuando los leucocitos polimorfonucleares se incuban en un medio conteniendo cantidades inadecuadas de glucosa o completamente libres de esta, se produce una degradación de las reservas de glucógeno. Adición de glucosa al medio estimula la síntesis de glucógeno.

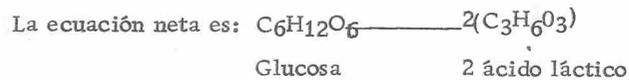
La concentración de glucosa que produce una estimulación óptima es llamada por el autor "carga de glucosa".

Este mismo autor ha sugerido que los sistemas enzimáticos que intervienen en síntesis y degradación de glucógeno se encuentran íntimamente ligados al glucógeno intracelular imitando una organela, la cual en el proceso de equilibrio dinámico del glucógeno parece permanecer constante. Esto último con base a la falta de efecto de puromicina en el proceso de síntesis y degradación del glucógeno. Es de notar sin embargo que si agrega puromicina después de depauperar las reservas de glucógeno, este antibiótico inhibe la incorporación de glucosa. La actinomicina "D" que inhibe la síntesis de RNA en el leucocito, no modifica el equilibrio dinámico del glucógeno (20).

a) Glicolisis: Es el proceso de desdoblamiento de glucógeno, glucosa y otros azúcares para producir anaeróticamente piruvato o lactato.

El metabolismo aeróbico sigue casi todos los pasos de anaeróbico y por eso se denomina glicolisis aeróbica. La única diferencia entre ambos procesos es la utilización de los nucleótidos reducidos de nicotinamida y el destino de del piruvato.

En la serie de reacciones que se llevan a cabo durante la glicolisis, se producen 36 kilocalorías por el mol de glucosa degradado. Esta cantidad de energía es suficiente para almacenar 2 moles de fosfato en ATP (Adenosina trifosfato).



En la oxidación directa de la glucosa (respiración, la reacción de deshidrogenación sucede al principio de la secuencia de reacciones. En el ciclo de Embden-Meyerhof (glicólisis) esta reacción sucede en una etapa más tarde.

Durante la glicólisis se distinguen 4 etapas:

1. - La conversión de glucosa a 2 moles de triosa fosfato.
2. - Deshidrogenación de triosa fosfato con NAD para formar fosfoglicerato.
3. - Conversión de fosfoglicerato a piruvato.
4. - El piruvato producido puede ser metabolizado aeróbica o anaeróticamente

te. La degradación aeróbica conduce al ciclo de Krebs, y la cadena respiratoria. En la degradación anaeróbica, la coenzima NAD es regenerada en su paso de hidrogenación que, produce ácido láctico en el músculo y etanol en la levadura.

La glucosa al ser absorbida por las células, es fosforilada convirtiéndose en glucosa 6 fosfato (En esta reacción intervienen, la enzima hexoquinasa) que es su forma metabólicamente activa.

En 1939, Kempner (22), reportó que el leucocito normal posee una actividad glicolítica alta y presentó evidencia que indicaba que la vía preferencial de utilización de glucosa era la glicólisis anaeróbica. Es de hacer notar que tanto los leucocitos normales como los leucocitos obtenidos de pacientes con leucemia - mieloide crónica (LMC) muestran también una actividad elevada de glicólisis aeróbica, lo que dificulta en ciertas condiciones demostrar el efecto de Pasteur (23). Pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) manifiestan una actividad comparativamente baja de glicólisis.

Dependiendo del origen del material estudiado, así como del procedimiento de aislamiento y de ensayo in vitro se han reportado en la literatura, datos contradictorios con referencia a glicólisis.

Por lo anterior se ha sugerido, que el elevado grado de glicólisis en medio aeróbico es un artificio debido a las condiciones de incubación (24).

El consumo de oxígeno decrece cuando se lavan y trituran los leucocitos, así como cuando éstos se someten a grados variables de daño físico, observándose que una disminución de la respiración estimula la glicólisis (anaerobia) (25).

Frei (25) reportó que los leucocitos macrófagos alveolares, muestran en reposo un alto consumo de oxígeno. Señala también, que el alto nivel de glicólisis aeróbica encontrado, es real y no producto de artificios.

En los leucocitos del cobayo, la glicólisis es mayor en las células circulantes que en las obtenidas a partir de exudados, siéndo influenciada tanto por la concentración de glucosa, como de fructosa del medio (26).

La producción de ácido láctico, se encuentra bajo control hormonal. Disminuye durante el embarazo y su nivel es más alto en leucocitos de infantes que aquellos de niños mayores. (27)

En leucocitos de humanos y de cobayos, en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas, la glicólisis es estimulada por la fagocitosis. Es evidente que la energía para la fagocitosis es derivada de la glicólisis. Esto se comprueba en experimentos en los cuales se inhibe selectivamente el ciclo de Krebs, el sistema citocromo y la glicólisis. Se observa también, que compuestos que inhiben la glicólisis son inhibidores de la fagocitosis.

Cuando la fagocitosis se ha iniciado, los inhibidores de la glicólisis no tie-

nen ningún efecto. Esto sugiere que media vez sucede la degranulación y se liberan las enzimas necesarias, ya no es indispensable el gasto de energía para la destrucción de los microorganismos (29).

Los distintos tipos morfológicos de leucocitos tienen diferente capacidad para la glicólisis. En orden decreciente su capacidad es: Monocitos, Neutrófilos y los Linfocitos (29).

c) Ciclo de Acidos Tricarboxílicos o Ciclo de Krebs: Como se ha descrito anteriormente, de los intermediarios del ciclo de Krebs sólo el ácido pirúvico estimula el consumo de oxígeno en los leucocitos intactos y el seccinato de homogenizados.

Los leucocitos humanos tienen una actividad considerable de aconitasa y de deshidrogenasa málica. (30) En general las células inmaduras de pacientes con leucemia linfocítica y monocítica, tiene mayor actividad de aconitasa que las células blancas de individuos normales. Los basófilos y los eosinófilos, tienen mayor actividad de aconitasa que los neutrófilos (30, 31).

La actividad de deshidrogenasa isocítrica se encuentra elevada en leucocitos provenientes de paciente con leucemia mieloide crónica, leucemia aguda y Hodgking, y baja en LLC (32).

Los leucocitos normales tienen aproximadamente 10 veces mayor actividad de fumarasa por célula que los eritrocitos, observándose elevación del nivel enzimático en individuos con leucemia granulocítica aguda y monoblastica, pero no en leucemia linfocítica. La mayor actividad de fumarasa es observada en las formas inma-

duras.

Rabinowiz (33) estudiando la enzima deshidrogenasa láctica, encontró que en los leucocitos polimorfonucleares, la actividad de la enzima es 3 veces mayor que en los linfocitos.

En las enfermedades linfoproliferativas la actividad de la enzima es aún menor.

En los granulocitos la actividad de la enzima aumenta con la maduración de la célula llegando a un máximo en las células maduras.

d) Ciclo del Fosfogluconato: En 1956, Coxon y Robinson (34) demostraron la existencia del ciclo del fosfogluconato (oxidación de la glucosa), en los leucocitos circulantes.

En el leucocito el 90% de la glucosa es metabolizada vía la glicólisis, quedando sólo un 10% para el camino del fosfogluconato (35). En pacientes leucémicos, la cantidad de glucosa metabolizada por el ciclo del fosfogluconato es mayor que lo descrito anteriormente.

La explicación de este posiblemente se encuentre a nivel de la hexoquinasa. Durante la fagocitosis el metabolismo de la glucosa vía 6-fosfoluconato, aumenta marcadamente (35).

Rabinowitz (33) estudiando en los leucocitos los sistemas enzimáticos, que intervienen en el ciclo, encontró que la glucosa 6- fosfato deshidroge-

nasa, que es 4 veces activa en el leucocito polimorfonuclear que en el linfocito. En las enfermedades linfoproliferativas y en mieloblastos de pacientes con leucemia granulocítica crónica, la actividad de la enzima es baja en esta entidad, la actividad de la enzima aumenta con la maduración celular.

La deshidrogenasa del fosfogluconato, muestra un efecto similar, aunque en menor grado. Esta enzima también aumenta en actividad con la maduración de la célula.

En contraste con los resultados anteriores, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa muestra un comportamiento diferente a las enzimas descritas ya que su actividad es mayor en los linfocitos que en los leucocitos polimorfonucleares, siendo máxima en enfermedades linfoproliferativas (33).

En los linfocitos intactos, la utilización de glucosa por el ciclo del fosfogluconato es aumentado por la fitohemaglutinina, substancia obtenida del *Phaseolus vulgaris* (36).

METABOLISMO DE LAS PROTEINAS

a) Aminoácidos: Con la excepción de la arginina, la concentración de aminoácidos en los leucocitos es mayor que la de los eritrocitos o del plasma --- (37 - 38).

La proporción de la mayoría de los aminoácidos entre el leucocito: plasma, va de 4.8 a 14.5, mientras que la del ácido glutámico; ornitina, -- glicina y serina es de 20.

Hay un patrón fácilmente obtenible de aminoácidos de los leucocitos de cada especie.

En pacientes con leucemia mieloide crónica, los niveles de nitrógeno alfa amino son bajos. Este hecho debe interpretarse con cautela ya que según observaciones de Nour-Eldin (39), existe una variación diaria del nitrógeno - alfa amino en células leucémicas.

Los cambios característicos observados en los aminoácidos de pacientes con leucemia mieloide crónica son: aumento de ácido glutámico y prolina, con disminución de los niveles de ornitina (40 -47).

Los glóbulos blancos de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) incorporan tanto in vivo como in vitro 1 Leucina y 1-valina a una velocidad mayor que leucocitos de personas normales (41).

En leucocitos de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) la 1 a-- lanina y 1 cisteina se incorporan también más rápidamente que en leucoci--

bitos de personas normales.

In Vitro: la velocidad relativa de incorporación en proteínas de glicina marcada con carbono catorce, decrece en el orden leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, individuos normales.

En leucocitos de pacientes con LMC, la administración de 6-mercaptopurina por varios días disminuye la incorporación de aminoácidos en las proteínas (41).

En médulas óseas normales, la presa de leucina marcada con tritio, es mayor en los mieloblastos para luego decrecer progresivamente a medida que los elementos medulares maduran. La incorporación de aminoácidos a proteínas en los linfocitos es influenciada por los corticosteroides. Estos últimos hallazgos indican las bases de la forma en que actúa la 6-mercaptopurina.

La 1-cisteína, homocisteína, y el glutatión modifican y mejoran la leucopenia inducida en pacientes leucémicos sometidos al tratamiento con mostaza nitrogenada (42-43). In vivo Leucocitos de pacientes con leucemia linfocítica aguda o crónica incorporan 1-cisteína y 1 metionina a una velocidad mayor que leucocitos normales. In vitro la incorporación de estos aminoácidos depende de la -- tensión de oxígeno y es independiente de la concentración de glucosa. (43)

En leucocitos de pacientes leucémicos, los niveles de ácido glutámico están -- aumentados. Lo mismo sucede con la deshidrogenasa del ácido glutámico. Los leucocitos de pacientes resistentes al tratamiento muestran una mayor actividad de deshidroge

nasa glutámica comparada con leucocitos obtenidos de animales susceptibles.

(49) En leucocitos de pacientes con LLC, IIA y aquellos con leucocitosis reactiva, se observan niveles mayores que los normales de transaminasa glutámica oxalacética.

Se han encontrado niveles bajos de arginina en los leucocitos de individuos normales, lo que se atribuye a una elevada actividad de arginas^a (30). Tanaka (30), encontró mayor actividad de arginasa en pacientes con talasemia mayor y anemia perniciosa, y una actividad normal en LMC, metaplasia mieloide, policetemia vera y leucocitosis neutrofilica, este autor también reporta que los neutrófilos tienen mayor actividad de arginasa que los linfocitos.

Enzimas para la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos: la leucina, isoleucina y valina se han encontrado ampliamente distribuidos en los leucocitos y en los tejidos (44). En la enfermedad de "Maple Syrup" parece que existe un defecto en la descarboxilación oxidativa de la leucina, isoleucina y valina, pudiéndose detectar el defecto a nivel de los leucocitos; esto se puede aprovechar para el diagnóstico de la enfermedad.

b) Glutacion: Platt en 1931, (45) fué el primero en descubrir el glutatión en los leucocitos encontrando en estos una mayor concentración que en los eritrocitos en la proporción de 7:1. En los leucocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica, hay una mayor concentración que lo normal.

Beaty (46) reportó que durante la síntesis protenínica se producen en los leucocitos, una sustancia pirógena que induce fiebre al inyectarla endovenosamente a los conejos. El mecanismo de la formación de esta proteína en los leucocitos - polimorfomucleares no se conoce. Su biosíntesis es inhibida por el cloranfenicol, la actinomicina "D" y la puromicina. La actinomicina "D" parece interferir con la síntesis DNA-dirigida de RNA. El cloranfenicol actúa bloqueando la adherencia del RNA mensajero al ribosoma. La puromicina interrumpe la síntesis de proteínas mediante la liberación de cadenas peptídicas incompletas del complejo ribosoma RNA aminoácido.

METABOLISMO DE ACIDOS NUCLEICOS

a) Contenido de Acidos Nucleicos: Los leucocitos polimorfonucleares de seres humanos, son células diploides que contienen 0.7×10^{-12} gramos de fosforo de DNA (97-98). Los linfocitos aislados de ganglios linfáticos pueden ser tetraploides (49-50).

No se ha encontrado diferencia entre la composición del DNA de leucocitos normales y la de los leucocitos leucémicos. Existen sin embargo diferencias fisicoquímicas entre ambos tipos de célula.

El contenido de RNA varía significativamente durante la maduración del leucocito, siendo mayor entre más inmadura es la célula. En casos de leucemia aguda, la relación RNA/DNA es mayor que lo normal (47-51).

b) Pyrimidinas: En los leucocitos se han encontrado enzimas para la síntesis de "novo" de las pirimidinas incluyendo carbamilsulfato transferasa, dihidroorotasa, ácido dehidrocrotico deshidrogenasa y carboxilasa del ácido orotidílico. La actividad de estas enzimas es más alta entre más inmadura es la célula. Se eleva también en casos de pacientes con leucemia, mononucleosis infecciosa y anemia perniciosa (52). Por otra parte en pacientes con aciduria orótica congénita, se han reportado niveles bajos de decarboxilasa del ácido orótico aún después del tratamiento con 6-azauridina (53).

Prager (54) reportó en neoplasias de la serie blanca, una serie de defectos en el metabolismo de las pirimidinas. La sintetasa del ácido timidílico catali-

za la conversión de la deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxiuridina trifosfato (dUTP) en presencia del metileno tetrahydrofolato. Esta enzima muestra mayor actividad que lo normal, en pacientes con LMC y L.A (leucemia aguda).

c) Purinas: Las purinas se sintetizan a partir de pequeños precursores como glicina, 5-fosforibosilpirofosfato, ácido fórmico y glutamida.

Scott (55) ha sugerido que los leucocitos humanos no pueden llevar a cabo -- los pasos iniciales de la síntesis "de novo" de las bases purínicas en contraste con su capacidad de hacerlo con las bases pirimidínicas. La glicina marcada con -- carbono catorce in vitro es incorporada a los ácidos nucleicos. El ácido fórmico se incorpora a los ácidos nucleicos en pacientes con leucemia aguda pero no en pacientes con LMC, LLC y en individuos normales. En células blancas normales, el ácido fórmico se incorpora in vitro sólo cuando se agrega al medio otros intermediarios de las purinas tales como el aminoimidazolecarboxamida o el ribotido correspondiente, lo cual sugiere que los leucocitos poseen las enzimas para cerrar el anillo purínico (55).

Smellie (56) encontró experimentalmente que la médula ósea in vivo y el timo de conejos eran capaces de utilizar el ácido fórmico en la síntesis de purinas in vivo pero que esta capacidad era prácticamente nula en condiciones in vitro. El autor concluye que en estas condiciones la médula ósea y el timo tienen capacidad limitada para la síntesis "de novo" de purinas y que probablemente utilizan purinas sintetizadas en otras partes del organismo, como el hígado (57). En apoyo de estas especu-

laciones se ha descrito en la médula, un camino para la fosforilización de las bases purínicas preformadas (58).

La implicación médica de éstas observaciones es que conociendo éstos mecanismos íntimos, durante el tratamiento de las neoplasias de la sangre, podría discriminarse farmacológicamente entre la inhibición de la síntesis "de novo" de las purinas y la utilización de purinas preformadas. (59).

En el timo la incorporación del ácido fórmico a ácidos nucleicos, es sensible a la acción del metotrexate, lo cual es la base de la acción quimioterápica de esta sustancia (60).

Se acepta en general que las purinas se catabolizan por la xantina oxidasa a través del camino:



Un camino de menor importancia sería desviado a la formación de 8-hidroxihipoxantina y 2-8 dihidroxipurina.

Se ha descubierto que leucocitos de ratones normales, contienen xantina oxidasa, la cual convierte a la xantina en ácido úrico. La actividad de esta enzima es mayor en los granulocitos que en los leucocitos provenientes del bazo.

Además se ha observado que los linfocitos de ratones leucémicos contienen menor cantidad de xantina oxidasa y de uricasa que los normales. (67)

En la utilización por el leucocito de bases preformadas, nucleósidos y nucleótidos se encuentra que estos pueden servir como precursores de ácidos nucleí-

cos. Aparentemente los nucleótidos son incorporados después de su defosforilización (68).

Tanto en leucocitos normales como en leucocitos leucémicos, la adenina o guanina marcadas con carbono ¹⁴C son grandemente interconvertidas intracelularmente en otras bases purínicas.

Muchos factores afectan la utilización de bases purínicas y nucleótidos purínicos en los leucocitos son (55 - 61).

In vitro la utilización de bases y nucleótidos purínicos es afectada por la tensión de oxígeno, el tipo y grado de madurez de la célula así como la condición física de las mismas. Se ha encontrado por ejemplo que la adenina es incorporada más rápidamente al DNA en leucocitos de pacientes con LMC que en aquellas de pacientes con LLC.

La incorporación de la adenina a DNA refleja la habilidad reproductora celular. En leucocitos de pacientes con LMC, la incorporación de purina marcada con carbono catorce es mayor en DNA que en RNA. Esta relación es menor en leucocitos de pacientes con LLC o individuos normales (61).

Para explicar la resistencia de ciertas especies de mamíferos con leucemia, al tratamiento con 6-mercaptopurina se ha aducido a la inhabilidad del leucocito de utilizar purinas exógenas (59). Esto sin embargo no se ha demostrado en leucocitos humanos (61).

En los leucocitos, nucleótidos del uracilo y timino son más fácilmente, incorporados a los ácidos nucleicos que sus correspondientes bases (62). La citocina y el ácido orótico, son utilizados más efectivamente que el uracilo para la biosíntesis del RNA. La incorporación de nucleótidos de piridina marcada con tritio ha sido empleada extensamente para investigar la vida media de los leucocitos (63 - 64).

Normalmente tanto en la circulación periférica, como en la linfática hay células mononucleares que son capaces de incorporar timidina tritiada al DNA. Estas células son semejantes a los monocitos, a los linfocitos inmaduros, a los linfocitos atípicos y a las células plasmáticas. (65).

Li y Osgood (66) estudiando el metabolismo de ácidos nucleicos en el leucocito, descubrieron en 1949, la Fitoheماغlutina. Como se describe anteriormente, esta sustancia fué extraída del phaseolus vulgaris. Posteriormente, se demostró que la fitoheماغlutina causaba aglutinación, división y producción de gamaglobulina en los linfocitos, notándose que su presencia causaba cambios morfológicos en los linfocitos, los cuales aumentaban de tamaño hasta parecer plasmocitos.

Mueller (67) notó que la adición de fitoheماغlutina a cultivos de leucocitos humanos, producía una aceleración exponencial en la síntesis de RNA. Este efecto precede a la estimulación de síntesis de proteínas. La estimulación en la síntesis de RNA depende hasta cierto límite, de la cantidad de fito

heماغlutina empleada. Esta observación ha sido empleada como fundamento para la cuantificación de la fitoheماغlutina.

Otras sustancias tienen también efecto estimulante sobre la síntesis de DNA. Kasamura (68) ha aislado del plasma de pacientes con leucemia mieloide crónica una sustancia no dializable capaz de estimular esta síntesis.

SISTEMAS ENZIMATICOS EN LOS LEUCOCITOS

a) Catalasa y Peroxidasa: Las peroxidasa y las Catalasas, son enzimas con núcleo porfirínico conteniendo ion férrico. Catalizan reacciones en las cuales el peróxido de hidrógeno es el ion aceptador de electrones.

El tipo de reacción que catalizan las peroxidasa puede sumarizarse así:



En la que el AH₂ es un donador de electrones por ejemplo citocromo "c", ácido ascórbico o un indicador de oxidación.

Las catalasa desdoblan el peróxido de hidrógeno de acuerdo a la ecuación:



Las catalasas y las peroxidasa son similares en su manera de actuar, y pueden corresponder a un simple grupo llamado hidropoxidasa. En ciertos casos las catalasas y peroxidasa pueden mostrar determinada especificidad por un tipo de donador de electrones (73).

Los glóbulos blancos son ricos en actividad de peroxidasa. La enzima involucrada ha sido designada: mieloperoxidasa o verdoperoxidasa. Este último término no se debe al color verde de los infiltrados leucémicos (73).

En los estudios publicados sobre leucocitos no se ha hecho una separación muy definida entre las actividades de catalasa y la peroxidasa. Sin embargo Vercauteren (75) ha establecido que las actividades de estas enzimas son diferen-

ciables y están asociadas con distintos tipos de partículas intracelulares. Ambas puede ser separadas por fraccionamiento con sulfato de amonio y son inhibidas diferentemente por 2-amino-1,2,4,-triazol (75).

Klebs (76) demostró que la tintura de guayaco se pone azul en contacto con piocitos. Desde entonces reacciones histoquímicas peroxidicas, han sido ampliamente usadas en la clasificación de los leucocitos. Agner (74) aisló mieloperoxidasa de líquido de empiema tuberculoso, encontrando poca actividad de catalasa asociada. Se ha estimado que la mieloperoxidasa constituye del 1 al 2% del peso de los leucocitos de mamíferos encontrándose más elevada en tumores leucémicos de ratas (77).

La actividad de catalasa y peroxidasa es mayor en los leucocitos de la serie mielóide que en los linfocitos. Esta actividad es mayor entre más inmaduras sean las células. (74). Los eosinófilos son especialmente ricos en su contenido de catalasa (78). Cuando se fraccionan leucocitos, la actividad de mieloperoxidasa sedimenta con la fracción granular. Durante el proceso de fraccionamiento de mitocondria por ultracentrifugación es posible separar la actividad de la mieloperoxidasa de las actividades de citocromo-oxidasa, y deshidrogenasa succínica. (79).

El papel que desempeñan las catalasas y las peroxidasa en la economía del glóbulo no se conoce exactamente, aunque lo más probable es que participen en la

destrucción de toxinas bacterianas. Además en los leucocitos la mieloperoxidasa, puede funcionar como un pigmento respiratorio (74) Cannellakis y colaboradores (80), demostraron que en presencia de peróxido de hidrógeno, la mieloperoxidasa es capaz de degradar el ácido úrico a urea y allantoina. Schultz (77), reportó que la mieloperoxidasa se encuentra localizada en el leucocito, junto con enzimas hidrolíticas del lisosoma de los polimorfonucleares.

Los lisosomas aislados de leucocitos humanos son más pesados que los de otras especies, y su contenido de mieloperoxidasa es mayor.

b) Fosfatasa: En el leucocito se han distinguido dos tipos de fosfatasa: la fosfatasa ácida con un pH óptimo de 5 y la fosfatasa alcalina con un pH óptimo de 10. El sustrato más comúnmente empleado para estimar la actividad de estas enzimas, ha sido el beta-glicerofosfato (81).

Follete (81), comparó la actividad de fosfatasa alcalina con adenosina 5-fosfato (5-AMP), glucosa 1 fosfato y betaglicerofosfato encontrando mejores resultados con éste último.

En el leucocito hay marcada diferencia entre una y otra especie, con respecto a la distribución de la fosfatasa alcalina (82), así en el humano, la actividad se restringe a los leucocitos neutrófilos. Su actividad se detecta primero en el estado de mielocito y aumenta con la maduración celular. Se ha demostrado experimentalmente en individuos normales que la actividad de la enzima puede aumentar con la administración de ACTH o corticosteroides adrenales

les (83).

En pacientes con insuficiencia suprarrenal crónica (Enfermedad de Addison) son los corticosteroides los únicos que aumentan la actividad de la enzima -- (83). En pacientes sometidos a situaciones de "Stress", se ha observado que la actividad enzimática del leucocito aumenta: En infección piógena, infarto de miocardio, y durante la cirugía (81). Con base en estas observaciones se puede decir que, en individuos normales la actividad de la enzima es influenciada por alteraciones en la sistema hipófisis adrenal. (84)

Interés en el uso de la determinación de fosfatasa alcalina como un instrumento de diagnóstico, ha surgido por el hecho de que en pacientes con LMC, los niveles de la enzima son bajos. Esto se comprobó histoquímicamente en granulocitos maduros de pacientes con LMC. (85) En contraposición, los valores enzimáticos encontrados en pacientes con leucemia monocítica aguda y leucemia linfocítica son persistentemente normales o moderadamente aumentados (86).

Leucocitos de pacientes con policitemia vera o metaplasia mieloide, en niveles de maduración similares, han mostrado actividades mayores que lo normal. Esto sugiere que la poca actividad de fosfatasa alcalina observada en pacientes con LMC se debe al proceso neoplásico per se. y no a su estado de maduración (86).

Se ha propuesto una posible relación entre la actividad de la fosfatasa alca

lina y anomalías en la distribución de cromosomas de grupo 7 (XXI y -- XXII), de la clasificación de Denver. Así en el mongolismo se obtienen niveles más altos que los normales en la actividad de la enzima en los leucocitos (87, 88).

Individuos con diagnóstico de LMC, sometidos a tratamiento quimioterapéutico y en los cuales se ha logrado regresión del cuadro hematológico, -- muestran en los leucocitos una actividad normal de fosfatasa alcalina. Existe la posibilidad que en pacientes con LMC, haya a nivel de la médula ósea, 2 poblaciones diferentes de precursores de granulocitos. Uno con un componente cromosómico normal y otro con delección. Si este es el caso, la quimioterapia suprime el tipo anormal de célula precursora, permitiendo a los -- precursores normales generar granulocitos maduros, con una actividad normal de fosfatasa alcalina. (88).

Niveles bajos de fosfatasa alcalina se han encontrado también en leucocitos de individuos con hemoglobinuria paroxística nocturna, púrpura trombocitopénica idiopática, mononucleosis infecciosa, anemia perniciosa, anemia aplásica, algunos casos de metaplasia mieloide, sarcoidosis, granulocitopenia y en hipofosfatemia (89, 90).

Rossiter (86) demostró que sustancias sufactantes como la saponina y sales biliares, liberan cantidades significativas de fosfatasa de leucocitos de co-

nejos. La fosfatasa ácida y la alcalina, sedimentan en su mayor parte con la fracción granular de los neutrófilos. In vivo es probablemente que se liberen de esta fracción durante la degranulación que sigue a la fagocitosis.

No tiene significación comparar la actividad de la fosfatasa alcalina y la ácida en un tipo dado de leucocitos a no ser que además se consideren las especies de origen y la presencia de factores complicantes tales como, influencia endocrina y enfermedad.

Cram y Haigth (82) reportan que en el hombre, la mayor actividad de fosfatasa ácida, se encuentra en los linfocitos. En conejos, la mayor actividad de fosfatasa alcalina se encuentra en los granulocitos.

Janoff (91), encontró que los mononucleares de pacientes con tuberculosis resistente al tratamiento, tenían mayor actividad de fosfatasa ácida. In vivo, la actividad de fosfatasa ácida en el leucocito del cobayo, aumenta con dosis crecientes de Vit. A. Esto puede ser debido a la acción lítica de la vitamina "A" sobre la membrana del lisosoma (91).

Perillie (92) demostró que en leucemia granulocítica crónica, la actividad de fosfatasa alcalina no es estimulada por hormonas adrenocorticales ni por -- pirógenos. En individuos normales o en pacientes no leucémicos hay una clara estimulación por éstas sustancias.

A la fecha, no se sabe si el aumento en la actividad de fosfatasa alcalina en

estas condiciones, se deba a una mayor síntesis de enzima por los granulocitos maduros, o bien, si el estímulo produce su efecto primariamente en los precursores de los granulocitos. Blisel (93), ha reportado niveles de fosfatasa alcalina en diferentes estados patológicos: En Tularemia, los niveles se encuentran aumentados durante todo el curso de la enfermedad. En pacientes con fiebre "Q" o con fiebre por picadura de mosca ("Sandfly fever"), la actividad de la enzima se presenta elevada únicamente durante la convalecencia.

Cuando se inyecta al paciente intravenosamente una toxina se produce un aumento en la actividad de fosfatasa alcalina del leucocito. La posibilidad de estimulación debida a pirexias fue excluida al comprobarse que no se produce ningún aumento en la actividad de esta enzima en el leucocito al producir fiebre experimentalmente.

c) Betaglucuronidasa: Fishman (70) Follete y Valentine (71) han estudiado ampliamente el papel de la betaglucuronidasa en el leucocito.

Anlyan y Fishman (69) determinaron el contenido de betaglucuronidasa de la sangre entera notando que la fracción boba que contiene los leucocitos, tenía la mayor actividad de la enzima. Estos autores también observaron, que un aumento en el número de leucocitos aumentaba la actividad de la enzima. De todos los tipos de leucocitos, los linfocitos y los polimorfonucleares son los que contienen la mayor actividad.

Follette y Valentine (71) reportan que en los tejidos neoplásicos, hay un --

aumento de actividades de betaglucuronidasa. En contraste con esto, en LLC y leucemia blástica, la actividad de la enzima es baja. El hecho de encontrar una menor actividad enzimática en leucemia linfocítica crónica, puede ser debido a que los linfocitos circulantes son fundamentalmente pobres en betaglucuronidasa o bien que el linfocito patológico es metabólicamente diferente. Follette y Valentine (71) encontraron persistente actividad de betaglucuronidasa más baja que lo normal en todos los casos en los cuales había linfocitosis sin importar la etiología de la misma.

Una comparación de la actividad de betaglucuronidasa en suspensiones compuestas por diferentes tipos de leucocitos, en diferentes estadios de maduración, permite establecer que hay una actividad normal o ligeramente elevada en casos de LMC cuando las células estudiadas tienen un grado de maduración por arriba de la fase blástica. Por otra parte, cuando se estudian leucocitos de pacientes con leucemias blásticas, o exacerbaciones blásticas de leucemia mielocítica crónica, los valores de actividad de betaglucuronidasa son persistentemente bajos.

En casos de LMC con mal pronóstico, los niveles de la enzima son bajos. Esto sucede también en exacerbaciones blásticas y en procesos infecciosos graves. Cuando el paciente se recupera, los niveles enzimáticos retornan a la normalidad.

Caygill (94) ha sugerido que la actividad de betaglucuronidasa, presente en el

plasma y en el líquido sinovial, se origine en el leucocito, siendo liberada por la degranulación de la célula durante la fagocitosis.

d) Nucleasas: En los leucocitos tanto la ribonucleasa como la deoxirribonucleasa se encuentran dentro de los gránulos. Ambas son liberadas del gránulo durante los distintos procesos del leucocito.

Al igual que la ribonucleasa del páncreas, la de los leucocitos, actúa sobre las uniones adyacentes a fosfodiésteres, de pirimidinas.

Al comparar la actividad de esta enzima en individuos normales, con la actividad en pacientes leucémicos, se encontró que en estos últimos, la actividad es 10 veces menor (113).

La actividad de ribonucleasa está disminuida en policitemia vera, metaplasia mieloide, mononucleosis infecciosa, enfermedad de Hodgking y en procesos infecciosos (113).

Tanto la ribonucleasa como la dexirribonucleasas parecen ser fosfodiesteras (114). Existe una enzima en los leucocitos neutrófilos de los conejos, la cual es identificada como una fosfodiesterasa; pero se diferencia de la ribonucleasa y dexirribonucleasa en los requerimientos del tipo de fragmento nucleósido. (115).

Dependiendo de su pH óptimo se distinguen dos tipos de dexirribonucleasa: una con pH óptimo de 5 y otra con pH óptimo de 7.4.

En leucocitos de niños prematuros se ha encontrado que poseen una ac-

tividad mayor de deoxirribonucleasa alcalina, que la de niños a término (113).

METABOLISMO DE LIPIDOS

El contenido y la composición de los lípidos en los leucocitos ha sido extensamente estudiado por Boyd (95), quién ha encontrado que los lípidos forman de 1 al 3% de la masa total de la célula. En una población de glóbulos blancos, el contenido de lípidos se distribuye en la siguiente forma: grasas neutras 30%, fosfolípidos 45% y colesterol 20%. Los ácidos grasos forman el 65% del contenido total de lípidos del leucocito.

Estos resultados han sido confirmados por otros autores. Sin embargo la concentración relativa de grasas neutras no ha sido constante (96, 97). La fosfatidiletanolamina y la fosfatil colina forman la mayor parte de la fracción de fosfolípidos. El contenido de colesterol y de fosfolípidos es directamente proporcional al número de granulocitos (98).

Los linfocitos y los granulocitos inmaduros no son teñidos por colorantes para grasas, y los granulocitos la toman únicamente cuando llegan a la fase mielocítica.

Durante el embarazo y la infección, pero no en la fagocitosis, el contenido de lípidos de los leucocitos es alterado (98).

Los glóbulos blancos de pacientes con LMC presentan niveles altos de fosfolípidos y de lípidos totales, mientras que leucocitos obtenidos de individuos con LLC o con leucemias agudas, muestran niveles normales o bajos (100).

La incorporación a lípidos de acetato marcado con carbono catorce, es de 100 veces más activa en el leucocito que en el eritrocito (99). La incorporación in vitro de acetato es influenciada por inhibidores de la respiración y de la glicólisis dependiendo del tipo de célula (100).

El acetato marcado es incorporado en su mayor parte en triglicérido y en menor grado en fracciones de fosfolípidos.

Kidson (100 - 101) mostró una mayor síntesis de lípidos en glóbulos blancos de pacientes con leucemia mieloide y una síntesis baja o normal en pacientes con policitemia vera y LLA.

Elsbach (102), ha sugerido que la composición intracelular de ácidos grasos en el leucocito, depende tanto de síntesis como de transporte y concluye que el transporte activo es preferencial para el ácido linoléico el cual es un ácido graso esencial.

La incorporación de fósforo 32 (³²P) en fosfolípido y especialmente en ácido fosfatídico, y fosfatil serina se ha encontrado elevado durante fagocitosis (103-104).

Existe intercambio significativo entre los lípidos del plasma y los leucocitos, -- siendo mayor para triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. La dirección predominante del cambio es de leucocito al plasma. (105).

Desde el punto de vista enzimático, se ha descrito repetidamente en varias especies, la presencia en los leucocitos de esterases y lipasas. La esterasa se definen como aquellas enzimas que hidrolizan ésteres de ácidos grasos de cadena corta; y las

lipasas, esteras de ácidos grasos de cadena larga. Rossiter (86) describió en el leucocito una esterasa capaz de hidrolizar tributirina y metilbutirato.

La actividad de la esterasa está presente tanto en los granulocitos como en los mononucleares, y se encuentra disminuida en glóbulos blancos de pacientes con LMC. En contraste, la actividad de la lipasa es normal en esta enfermedad (106).

Majerus (107) estudiando la biosíntesis de ácidos grasos en el leucocito, llegó a las siguientes conclusiones:

a) Los leucocitos son incapaces de llevar a cabo la síntesis de novo de ácidos grasos.

b) La enzima que falta en el leucocito, es la acetil-CoA carboxilasa.

c) Los leucocitos contienen actividad de sintetasa de ácidos grasos, pero en ausencia de una fuente de malonil CoA, la actividad de la sintetasa, es presumiblemente no funcional. Esta inhabilidad puede ser corregida en extractos de leucocitos, por la adición de malonil CoA, ó acetil-CoA carboxilasa.

Es posible que células primitivas del tejido hematopoyético, tengan la capacidad para formar ácidos grasos y que ésta actividad se pierda a medida que la Acetil CoA carboxilasa disminuye su actividad durante el proceso de maduración. De acuerdo con la hipótesis anterior, la actividad de sintetasa de ácidos grasos, medida en leucocitos maduros, es debida a vestigios de la enzima, la cual en estas condiciones tiene un recambio muy lento.

Los niveles de la enzima Acetil CoA, carboxilasa encontrados en leucocitos de pacientes con leucemia aguda, con gran número de formas blásticas, sugieren que esta hipótesis es cierta.

La inhabilidad de los leucocitos de sintetizar ácidos grasos, nos hace preguntarse cómo es que éstas células son capaces de mantener el complemento de lípidos complejos que se requieren en la membrana celular. Posiblemente éstas células son capaces de activar ácidos grasos transportados en el plasma y por consiguiente usan ácidos grasos preformados para la compleja biosíntesis de lípidos.

Braunsteiner (108), reportó que en el leucocito, la lipasa necesita como sustratos, emulsiones de triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga. Según este autor ésta es la única forma de diferenciar la actividad de lipasa con respecto a la esterasa.

El pH óptimo de la lipasa en macrófagos intactos de pacientes con LLC es de 9.2. Los macrófagos de cobayos muestran una actividad de lipasa 10 veces más alta que la de pacientes con leucemia mieloides crónica y de granulocitos normales. El alto contenido de lipasa en los macrófagos está probablemente relacionado con su función, ya que estos tienen que desdoblar los lípidos de los tejidos necróticos.

AGUA Y ELECTROLITOS.

En términos generales se puede asegurar que en comparación con los eritrocitos, el cerebro y el músculo, los leucocitos tienen intracelularmente -- una concentración alta de sodio y potasio.

Rigas (109) al estudiar y analizar la composición electrolítica de los -- leucocitos en sus distintos estadios de maduración encontró que el contenido de sodio, potasio y agua de los granulocitos permanecen inalterados, mientras que el contenido de magnesio disminuye. Los sólidos totales y el contenido de nitrógeno y calcio aumentan con la edad de la célula. En los linfocitos, con excepción del potasio, el contenido de todos los elementos descritos disminuye con la maduración. Suspensiones de piocitos extraídos de abscesos, muestran que la permeabilidad de los mismos a ciertos cationes como sodio y el potasio. Varios autores han investigado la permeabilidad y el transporte activo de iones en los leucocitos. Los hallazgos indican que mientras el sodio y el potasio son mantenidos dentro de la célula contra un gradiente de -- concentración, el cloro no sigue este patrón y se difunden libremente (111).

La actividad metabólica leucocitos de conejos medida a cero grados, se traduce en una pérdida sensible de sodio y potasio. Al aumentar la temperatura a 37°C, la concentración intracelular de los iones aumenta.

Elsbach (110) ha sugerido un mecanismo de transporte de electrolitos directamente influenciado por glicólisis.

Karnovsky (112) ha sugerido que durante la fagocitosis solutos, que normalmente están fuera del leucocito entrarán dentro de este con la partícula ingerida. Este fenómeno es análogo al aumento en el consumo de glucosa por amebas durante fagocitosis

S U M A R I O .

Fuera de sus diferencias morfológicas, los diferentes tipos de leucocito, -
presentan una constitución enzimática y un metabolismo esencialmente distin
tos. Es más, leucocitos del mismo tipo difieren metabólicamente cuando son
aislados de pacientes leucémicos o de individuos normales.

En el leucocito el proceso de maduración se traduce en un comportamien
to fisiológico y metabólico claramente diferenciable.

Los granulocitos difieren de los mononucleares en su concentración de glu
cógeno, lípidos, mucopolisaridos y necesariamente en su habilidad glicolítica
y de respiración.

Los granulocitos muestran actividades de fosfatasa alcalina, arginasa y aril
sulfatasa, muy por encima de la observada en los mononucleares.

El leucocito neutrófilo posee una cantidad de gránulos citoplasmáticos, los
cuales están asociados con enzimas hidrolíticas.

Estas enzimas son liberadas durante la degranulación que precede a la fago
citosi.

Por otra parte, los eosinófilos, muestran una gran actividad de catalasa y
arilsulfatasa, y niveles bajos de hexoquinasa y fosfatasa alcalina.

De todos los tipos de leucocito, los que han sido más extensamente estudia
dos, son los polimorfonucleares neutrófilos. En esta célula se ha mostrado con
mayor detalle cómo su contenido de nitrógeno y su actividad enzimática, varían

con el proceso de maduración.

Tanto las enzimas envueltas en biosíntesis de pirimidinas, como las enzi--
mas del ciclo de ácidos tricarboxílicos disminuyen con la maduración. Por --
otra parte paralelo a este proceso, hay aumento de la actividad de fosfatasa -
alcalina y en la concentración de glucógeno.

Tanto células mieloides jóvenes como las formas iniciales de la serie linfoi
de, son incapaces de llevar a cabo síntesis de novo de purinas. Este fenóme
no puede ser de gran importancia para la quimioterapia de leucemias.

Es necesario enfatizar, la gran importancia que tanto para el médico como
para el biólogo, tiene el exacto conocimiento de los aspectos bioquímicos del
leucocito que permiten diferenciar células normales de malignas. A la fecha se
han encontrado entre estas células diferencias en algunos aspectos del metabolismo
de carbohidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, fósforo y vitaminas.

Puesto que el leucocito puede ser tan fácilmente obtenido, es de esperar, -
que a medida que progresan las investigaciones sobre el metabolismo y función
del leucocito, se puedan encontrar mayores diferencias entre células normales
y neoplásicas, las cuales nos permitan evaluar con más exactitud la eficiencia
de las medidas terapéuticas.

BIBLIOGRAFIA.

1. - Hirsch, J. G. "The inflammatory process I. Neutrophils and eosinophil leucocytes" New York Academic Press Inc. 1965.
2. - Evans, W.H. M.C. Karnovsky. "Neutrophil granules". J. Biol. Chem. 236:30, 1961.
3. - Tullis, J.L. "Blood Cells and plasma proteins" New York, Academic -- Press Inc. 1953.
4. - Boyden S. "Influence of Antigen - Antibody Complement on phagocytosis". J. Exptl. Med. 115:453, 1952.
5. - Karnovsky, M.L. "Basis of phagocytic activity" Physiol. Rev. 42:143, 1962.
6. - Martin, S.P. G.R. McKinney and R. Green "The metabolism of human polymorphonuclear leukocytes" Ann N. Y. Acad. Sci. 59:--996, 1955.
7. - Bisset S.K. and W.D. Alexander "The effect of intravenous injections triiodotyrosine and 1-triiodothyronine on the oxygen consumption of circulating human leucocytes" J. Expt. Physiol. 46:50, - 1961.
8. Rossi F. and M. Zatti "Pathway of glucose oxidation in leukocytes" Cell. Res. 25:182, 1961.
9. - Ponder E. and J. Macleod "The effect of hemolytic substances on white cell respiration". J. Gen. Physiol. 20:267, 1936.
10. McKinney, G.R. S. P. Martin, R.W. Rundles, and R. Green, "Respiration and glycolytic activities of human leucocytes in vitro" J. -- Appl. Physiol. 5:335, 1953.
- 11- Wagner R., N. Meyerreicks, and R. Spraco. "Enzyme studies on --- white blood cell and platelets. V. Dehydrogenase activity. Arch. Biochem. 61:278, 1956.
- 12- Bella, S. "Studies on the effect of certain macromolecular substances - on the respiratory activity of the leucocytes of peripheral blood". J. Exptl. Med. 115: 200, 1962.

Bibliografia...

- 13- Zatti M. and F. Rossi. "Changes of hexose monophosphate activity and of NADPH oxidation in phagocitizing leucocytes Bioch. Bioph. Acta. 99:557, 1955.
- 14- Valentine, W.N., and W.S. Beck "Biochemical studies on leucocytes. I. Phosphatase activity in health, leucocytosis and myelocytic leukemia". J. Lab. Clin. Med. 38:39, 1951.
- 15- Jones, R.V., G.P. Goffi, and M.S.R. Gutt. "Lymphocyte glycogen content in various diseases". J. Clin. Pathol. 15:36, 1962.
- 16- Evans, W. M.C. Karnovski. "Metabolic pathways associated with phagocytosis". Fed. Proc. 19:42 1960.
- 17- Noble E., R.L. Stjernholm, "Carbohydrate metabolism in lymphocytic leukemia leukocytes" Blood, 17:361, 1961.
- 18- Hulsman, W.C. T.L. Oei, and S. Van Crevald. "Phosphorilase activity in leucocytes from patients with glycogen storage disease. Lancet, 2:581, 1961.
- 19- Yunis, A.A. G. Arimura. "Enzymes of glycogen metabolism in white blood cells" Bioch Bioph. Acta 118:325, 1966.
- 20- Scott, R. "Glycogen in human peripheral blood leukocytes. II. The macromolecular state of leucocyte". J. Clin. Invest. 47:353, 1958.
- 21- Scott, B.R. "Glycogen in human peripheral blood leukocytes. II. Characteristics of the synthesis and turnover of glycogen in vitro J. Clin. Invest. 47: 358, 1968.
- 22- Kempner W. "The nature of leukemic blood cells as determined by their metabolism". J. Clin. Invest. 18:291, 1939.
- 23- Beck W.S. "The control of leucocytes glycolysis". J. Biol. Chem. 232:251, 1958.
- 24- Burk, D. J. Laszlo and K. Wight "comparative metabolism of normal human leucocytes". Fed. Proc. 18:199, 1959.
- 25- Frei, E. "Studies of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. Ann. N.Y. Acad. Sci. 113:107 1963.

Bibliografia...

- 26- Martin S.P., G.R. McKinney, and R. Green. "Effect of glucose fructose and insulin on the leucocytes of diabetics" J. Clin. Inves. 32: 1171, 1957.
- 27- Frei, J. Cl. Borel. "Enzymatic studies in the different types of normal - and leukemic human white cells". Blood, 18:317, 1961.
- 28- Cohn, Z.A. and S.I. Morse "functional and metabolic properties of --- polymorphonuclear leucocytes". J. Exptl. Med. 11:667, 1960.
- 29- Cline, M.J. "Leucocyte metabolism" Physiol. Rev. 45:674, 1965.
- 30- Tanaka, K.R., W.N. Valentine. "The arginase activity of human --- leukocytes" J. Lab. Clin. Med. 56:754, 1960.
- 31- Beutler, E. And M.K.Y. Yeh. "Aconitase in human blood". J. Lab. -- Clin. Med. 54:456, 1959.
- 32- Ghiott G.G., Perona and S. Cortesi "Hexokinase and TPN dependent dehydrogenases of leukocytes in leukemias and other hematologic disorders". British J. Hemat 9:345, 1963.
- 33- Rabinowitz Y. "DNA polymerase and carbohydrate metabolizing enzyme content of normal and leukemic glass column separated leukocytes" Blood 27:470, 1966.
- 34- Coxon, R. V. and R.J. Robinson "Carbohydrate metabolism in blood -- cells studied by means of isotopic carbon". Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 145:232, 1956.
- 35- Beck, W.S. "Occurrence and control of the phosphogluconate oxidation - pathway in normal and leukemic leucocytes" J. Biol. Chem. 232: - 271, 1958.
- 36- Mauttafie, L. and C.H. Wang. "The effect of phytohemagglutinin upon glucose catabolism in lymphocytes" Blood 29:690, 1967.
- 37- Mcmenamy, R.H., C.C. Lund, and D.F.H. Wallace, "Unbound amino acid concentrations in plasma, erythrocytes, leukocytes, and urine of patients with leukemia". J. Clin. Invest. 39:1688, 1960.
- 38- Okada S., and T. Hayashi. "Studies on the aminoacid nitrogen content

Bibliografia...

of the blood". J. Biol. Chem. 51:121, 1922.

- 39- Nour-Eldin, G. and J.F. Wilkinson "Aminoacid content of white -- blood cells in human leukemias". Brit. J. Haemat. 1:358, 1955.
- 40- Iyer, G.Y.N. "Free aminoacids in leucocytes from normal and leukemic subjects". J. Lab. Clin. Med. 54:229, 1959.
- 41- Baker, W.H., P.C. Zamecnik, and M.L. Stephenson "In vitro incorporation of C^{14} -dl. leucine into normal and leukemic white -- cells". Blood 12:822, 1957.
- 42- Frantz, I.D., P.L. Zamecnic "Use of C^{14} labelled aminoacids in the study of peptide bonds synthesis" Symposia of Nutrition, 2:94, 1950.
- 43- Weisberger A. S. and L.G. Suhrland "Incorporation of radioactive - 1-cysteine and 1-methionine by leukemic leukocytes in vitro ---° Blood 9:1095, 1959.
- 44- Hardin, E.B., W.N. Valentine "Studies on the sulfhydryl content of human leukocytes and erythrocytes". Am. J. Sci. 228:73, 1954.
- 45- Platt, R. "The blood glutathation in disease" Brit. J. Exptl. Pathol. 12:139, 1931.
- 46- Beaty N.H. R. Persdorf. "Effect of inhibitors of protein synthesis on pyrogen production by granulocytes" Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 126:591, 1967.
- 47- Davidson, J.N., J. Leslie and J. C. White. "quantitative studies on the nucleic acids in normal and leukemic cells from blood and bone marrow. J. Bacteriol. Path. 63:471, 1951.
- 48- Dimayorga G. and H.S. Rosenkranz "A chromatographic study of -- the deoxyribonucleic acids, from normal and leukemic human tissues" J. Nat. Can. Inst. 24:1309, 1960.
- 49- Gums, F.W. and P.H. Fitzgerald "Chromosomes and leukemia" Blood 23:394, 1964.

Bibliografia...

- 50- Hale, A.J. and S.J. Wilson "The deoxyribonucleic acid content of the nuclei of leukemic leukocytes" *Lancet* 1:577, 1960.
- 51- Rigas D.A., M.C. Duerst, B.A. Margaret, E. Osgood "The nucleic acids and other phosphorous compounds of human leukemic leukocytes, relation to cell maturity" *J. Lab. Clin. Med.* 48:356, 1956.
- 52- Smith L.H., F.A. Baker "Pyrimidine metabolism in man". *J. Clin. Invest.*
- 53- Fallon H.J., M. Lotz "Congenital orotic aciduria: Demonstration of an enzyme defect in leukocytes and comparison with drug induced orotic aciduria." *Blood*, 20:700, 1962.
- 54- Prager, M.D.S., E. Bryan "Apparent loss of feed-back inhibition of leukocyte aspartate transcarbamylase in granulocytic leukemias" *Blood* 22:818, 1963.
- 55- Scott J.C. "Human leukocyte metabolism in vitro. Incorporation of adenine- $8C^{14}$ and formate into the nucleic acids of leukemic leukocytes" *J. Clin. Invest.* 41:67, 1962.
- 56- Smellie R.M., S.R. Thomson "The nucleic acid metabolism of animal cell in vitro. *Bioch. Biophys. Acta* 29:59, 1958.
- 57- Lajtha L.G., J.R. Vane "Dependence of bone marrow cells on the liver purine supply". *Nature*, 182:191, 1958.
- 58- Yamada E.W. "The phosphorylation of nucleosides by rabbit bone marrow". *J. Biol. Chem.* 235:3043, 1961.
- 59- Davidson J.D. and T.S. Winter "Purine nucleotide phosphorylase in 6-mercaptopurine sensitive and resistant human leukemias". *Canc. Res.* 24:261, 1964.
- 60- Silber R.B. & F. Huenkens "Studies on normal and leukemic leukocytes. Pyrimidine nucleotide transhydrogenase". *J. Clin. Invest.* 41:230 --- 1962.
- 61- Shapira J., I. Bornstein, W. Wells and R.J. Winzler "Metabolism of human leukocytes in vitro. IV Incorporation and interconversion of adenine and guanine". *Canc. Res.* 21:265, 1965.

Bibliografia...

- 62- William A. M. "Nucleic acid metabolism in leukemic human leukocytes". *Canc. Res.* 22:314, 1962.
- 63- Craddock C.G. and G.S. Nakai "Leukemic cell proliferation as determined by in vitro deoxyribonucleic acid synthesis". *J. Clin. Invest.* 41:360, 1962.
- 64- Cronkite E.P., V.P. Bond. "The use of tritiated thymidine in the study of DNA synthesis and cell turnover in hematopoietic tissues". *Lab. Invest.* 8:263, 1959.
- 65- Bond U.P. Cronkite "Deoxyribonucleic acid synthesizing cells in the blood of normal human beings" *Science* 128:202, 1958.
- 66- Li J.G. and E. Osgood "Phytohemagglutinin, an agglutinating substance" *Blood* 4:670, 1949.
- 67- Ultmann J.E. and P. Feigebson. "Cellular xantine oxidase and uricase levels in leukemic and normal mouse leukocytes." *Blood* 15: 418, 1960.
- 68- Scott, J.C. "Human leukocyte metabolism. in vitro I. Incorporation of adenine-8-C¹⁴ and formate C¹⁴ into nucleic acids of leukemic leukocytes. *J. Clin. Invest.* 41:67, 1962.
- 69- Kasamura S., and Lowenstein "A plasma factor in chronic lymphocytic leukemia which stimulates DNA synthesis and blastogenesis in leukocyte cultures" *Blood* 29:691, 1961.
- 70- Fishman W.H. "Betaglucuronidase" In: *Methods of enzymatic analysis* H.U. Bergmeyer, New York Acad. Press Inc.p. 869, 1963.
- 71- Follette J.H. and W.N. Valentine "The betaglucuronidase content of human leukocytes in health and disease". *J. Lab. Clin. Med.* 40:825, 1952.
- 72- Caygill J.C. and F.R. Jevon "Betaglucuronidase activity in human synovial fluid, blood plasma and leukocytes" *Clin. Chim. Acta* 13:61. 1966.
- 73- Chance B. "On the reaction of catalase, peroxides with acceptors" *J. Biol. Chem.* 182:649, 1950.

Bibliografia...

- 74- Agner, K. "Verdperoxidase. A. ferment isolated from leucocytes" *Acta Physiol. Scan.* 8:1, 1941.
- 75- Vercauteren R. E. "Oxidoreductases of leukocytes" *Enzimologia* - 24:37, 1962.
- 76- Rechcigl, M. "Role of catalase and peroxidases in the metabolism of leukocytes" *Nature*, 199:1001, 1963.
- 77- Schultz, J.R.C. Oddi, K. Kaminker., Jones W. "Myeloperoxidase of the leucocytes of normal human blood. Isolation of the peroxidase granule". *Arch. Bioch. Bioph.* 11:73, 1965.
- 78- Archer G.T. "Release of peroxidase from eosinophil granules in vitro" *Nature*, 194:973, 1962.
- 79- Shultz J. "Myeloperoxidase" *Am. N.Y. Acad. Sci.* 75:22, 1958.
- 80- Canellakis G.S. Tuttle A.C. and Cohen P.A. "A comparative study of the end products of uric acid oxidation by peroxidases". *J. Biol. Chem.* 213:397, 1955.
- 81- Follette J.H. N.W. Valentine, and J. Reynolds "A comparirison of human leucocyte phosphatase activity toward sodium betaglycero phosphate, adenosine 5 phosphate and glucose 1-phosphate". *Blood* 14:415, 1959.
- 82- Haight W.F. R. Rossiter "Acid and alkaline phosphatase in white - cells. Data for the lymphocyte and the polymorphonuclear of man and the rabbit". *blood* 5:267, 1950.
- 83- Valentine W., J. H. Follette, H. Solomon, and J. Reynolds. "The relationship of alkaline phosphate activity to stress to A.C.T.H and to adrenal 17-hydroxi-corticosteroids". *J. Lab. Clin. Med.* 49:729, 1957.
- 84- Valentine W. "The metabolism of the leukemic leukocyte". *Am. J. Med.* 28:699, 1960.
- 85- Koler R. "A.J. Seaman and E. Osggod "Myeloproliferative diseases. Diagnostic value of the leukocyte alkaline phosphatse test." *Am. J. Clin. Pathol.* 30:295, 1958.

Bibliografia...

- 86- Rossiter J.D.M., Cram. "Phosphatase of rabbit polymorphonuclear - leukocytes". Cna. J. Res. 27:290, 1949.
- 87- Alter A.C.C., Lee. "Studies of leukocytes alkaline phosphatase activity in acute leukemia". Clin. Res. 9:164, 1961.
- 88- Fitzgerald P.H., Adams and F.W. Gunz. "Chronic granulocytic - leukemia and the philadelphia chromosome" Blood 21:183, 1961
- 89- Lacher M., A.B. Ley. "The value of leukocyte alkaline phosphatase determinations in the malignant lymphomas". Cancer 17:402, 1964.
- 90- Kretschmer N., M. Stone and C. Bayer. "Hereditary enzymatic --- effects as illustrated by hypophosphatasia". Ann. N.Y. Acad. Sci. 75:279, 1958.
- 91- Janoff A. "Total acid phosphatase content of peritoneal leukocytes obtained from 2-triiodothyronine-treated guinea pigs" Proc. Soc. - Exptl. Med. 116:372, 1962.
- 92- Perillie P.E. "Studies of the changes in leukocyte alkaline phosphatase following pyrogen stimulation in chronic granulocytic leukemia" Blood, 29:401, 1967.
- 93- Blissel W. "Neutrophile alkaline phosphatase changes in tularemia, -- sandfly fever, Q fever and non infectious diseases" Blood 29:802 1967
- 94- Caygill, J.C. F.R. Jevon "Betaglucuronidase activity in human synovial fluid, blood plasma and leukocytes". Clin. Chim. Acta 13:61, 1966.
- 95- Boyd E.M. "Low phospholipid content in dog plasma" J. Biol Chem. 91: 1, 1935.
- 96- Burt, N. S. and J. Rossiter "Lipids of rabbit blood cells. Data for red cells and polymorphonuclear leucocytes". Bioch. J. 46:569, 1950.
- 97- Elsbach P. "Composition and synthesis of lipids in resting and phagocytizing leukocytes". J. Exp. Med. 110:969, 1959.
- 98- Bloom M.C., G.E. Wislock "The localization of lipids in human blood

Bibliografia...

- and bone marrow cells". *Blood* 5:79, 1950.
- 99- Buchman A. A. "Lipid Synthesis by human leucocytes in vitro". *Bioch. J.* 75:315, 1960.
- 100- Kidson C. "Relations of leucocyte lipid metabolism to cell age: Studies in infective leucocytosis". *Brit. J. Exp. Path.* 42:597, 1961.
- 101- Kidson C. "Leucocyte lipid metabolism in Myeloproliferative states". *Austr. Ann. Med.* 11:50, 1962.
- 102- Elsbach P. "Preferential and active transport of linoleic acid by polymorphonuclear leukocytes". *J. Clin. Invest.* 39:893, 1960.
- 103- Elsbach P. "Comparison of uptake of palmitic, stearic, stearic, oleic and linoleic acids by polymorphonuclear leukocytes". *Bioch. Biophys. Acta.* 7:478, 1963.
- 104- Firkin B. G. and W. Williams "The incorporations of radioactive phosphorus into the phospholipids of human leukemic leukocytes and platelets". *J. Clin. Invest.* 40:423, 1961.
- 105- Lovelock J. E. T. James "The lipids of whole blood". *Bioch. J.* 74: -- 137, 1960.
- 106- Hardin E. B., W. N. Valentine and J. Follete. "Esterase and lipase -- activity of leucocytes of erythrocytes in health and disease". --- *Amer. J. Med. Sci.* 229:397, 1955.
- 107- Majerus P. W. and R. Lastre "Fatty acid biosynthesis in human leukocytes". *J. Clin. Invest.* 46:1597, 1967.
- 108- Braunsteiner H. F. Dienstl. "Lipase activity in leukocytes and macrophages". *Blood* 24:607, 1961.
- 109- Rigas D. "Electrolyte, nitrogen and water content of human leukemic leukocytes". *J. Lab. Clin. Med.* 58:234, 1961.
- 110- Elsbach P. J. Schwartz "Studies in the sodium and potassium transport in rabbit polymorphonuclear leukocytes". *J. Gen. Physiol.* 42: - 883, 1959.

Bibliografia...

- 111- Wilson D. C. and J. F. Maney. "The permeability of rabbit leukocytes to sodium, potassium and chloride". *J. Cellular Comp. Physiol.* 34:493, 1949.
- 112- Sbarra A. J. and M. L. Karnovski. "The biochemical aspects of phagocytosis" *Nature*, 192:535, 1961.
- 113- Silber R. K. W. Unger, and J. Keller "RNA metabolism of normal and leukemic" *Blood* 29:57, 1963.
- 114- Kurnick N. B. "Assay of deoxyribonuclease activity" *Methods of biochemical analysis*. 9:1, 1962.
- 115- Anderson E. P. and L. A. Heppel. "Purification and properties of a leukemic cell phosphodiesterase". *Bioch. Biophys. Acta.* 43:79. 1960.

BR. HENRY BERRISFORD STOKES BROWN

DR. OSCAR PINEDA
Asesor.

DR. FEDERICO SANCHEZ
Revisor.

DR. RONALDO LUNA AZURDIA
Director de Fase III.

DR. FRANCISCO VILLAGRAN MUÑOZ
Secretario General.

Vo. Bo.

DR. JULIO DE LEON MENDEZ
Decano.