

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

TOXICIDAD “IN VITRO” EN GRANULOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA: APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE
FLUJO AL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES
INMUNITARIAS EN EL EJERCICIO

NIEVES MARIA BLASCO LAFARGA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de gener de 1999 davant un tribunal format per:

- Dr. José Ricardo Cabo Soler
- Dra. Pilar León Moreno
- Dr. Argimiro Rodríguez Jerez
- Dr. Marcial Martínez Silvestre
- Dra. Eulalia Alonso Iglesias

Va ser dirigida per:

Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Dra. Gloria Juan Roig

Dra. Rosa M^a Guasch Aguilar

©Copyright: Servei de Publicacions
Nieves María Blasco Lafarga

Dipòsit legal: V-3745-2009

I.S.B.N.: 978-84-370-7501-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



UNIVERSITAT DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA

TOXICIDAD *IN VITRO* EN GRANULOCITOS DE
SANGRE PERIFERICA: APLICACION DE LA
CITOMETRIA DE FLUJO AL ESTUDIO DE LAS
ALTERACIONES INMUNITARIAS EN EL EJERCICIO

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Nieves María Blasco Lafarga
Licenciada en Medicina y Cirugía

Valencia, Septiembre de 1998

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor J. Enrique O'Connor Blasco, por su gran ayuda, su agudo ingenio y su inagotable capacidad de trabajo y a quien sinceramente agradezco haber despertado mi interés por la investigación...y (es evidente que,)..por la música portuguesa.
- A las Dras. Gloria Juan Roig y Rosa Guasch Aguilar, por su apoyo, sus enseñanzas y los buenos ratos pasados durante este tiempo.
- A la Dra. Eulalia Alonso Iglesias, por los ánimos que me ha dado en todo momento; por prestarme su apoyo, sus valiosos consejos...y sus CDs de música celta !!...
- A los Dres. Argimiro Rodríguez Jerez y Consuelo García Lucerga, del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia, por su colaboración en la obtención de muestras de sangre de deportistas tras episodios de esfuerzo intenso y especialmente al Dr. Rodríguez Jerez por su estupendo humor y sus explicaciones sobre fisiología del ejercicio físico.
- Al Dr. Antonio Iradi Casal, del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia, por su orientación en el estudio estadístico de este trabajo.
- A la Dra. Pilar León Moreno, del Servicio de Inmuno-Hematología del Hospital Dr. Peset, a las Dras. Isabel Benet e Isabel Marugán, del Servicio de Hematología del Hospital Clínico, y, de forma especial, a Amparo Pinilla, del laboratorio de Hematología del Hospital Dr. Peset, por su ayuda en la obtención de muestras de sangre de donantes sanos.
- A la Dra. M^a Dolores Planelles Silvestre, del Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación del Hospital La Fe de Valencia, por la realización de los experimentos de activación mitogénica in vitro.
- A la Dra. Amparo Mir Belenguer, del Dpto. de Medicina de la Universidad de Valencia, por ayuda en la puesta a punto de la técnica de determinación por citometría de flujo de la molécula CD11b.
- A la compañía Izasa, S.A. por la donación de anticuerpos monoclonales para la

realización de parte del presente trabajo.

- A la Dra. Elena Mascarell, por su colaboración en el desarrollo de los procesos iniciales de esta Tesis.

- A la Dra. Carmen Ruiz Cebrián, de Izasa, S.A. por su desinteresada ayuda con el tratamiento estadístico de los datos, y a quien agradezco sinceramente las “horas extras” de trabajo...y el agua de Valencia!!...

- A Guadalupe Herrera Martín, por compartir “las inquietudes maternas”, los rollos de los malos momentos...y las risas de los buenos!!...

- A Virginia Corrochano James, por tantas horas de trabajo juntas y por estar siempre dispuesta a animar y ayudar en todo lo posible.

- A M^a José Martínez, M^a José Pastor, Delia Teixeira, Dolores García, Marisa Santolaria, Arantxa Galán y Lourdes García Rubio por su amistad, su ayuda y sus ánimos durante la realización de este trabajo, y al resto de compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina.

- A Rafa Aguirre, Ximo Chismol, Pedro Domenech, Paco Enguix, Ismael Fargueta, Alberto Pons, Jose M. Pelayo, Toni Pérez, Pablo Seminario y Carlos Semper, del Servicio de Traumatología y Ortopedia del Hospital Universitario Dr. Peset, y a Emilio Garijo y Manolo Carbonell, del Servicio de Urgencias del mismo hospital, por su valiosa colaboración en la obtención de muestras sanguíneas de esta Tesis.

- A todos mis amigos y familia; en particular a mis hermanos, por tantas risas y enfados y por sus impagables horas de canguro; y a Chelo, por su enorme ayuda y por ser una fenomenal “suegra” e incansable abuela.

- Y, muy especialmente, a mi madre, por ser mi mejor amiga, y a mi padre, por haber conseguido siempre hacerme reír.

A mi hija María, a quien espero saber inculcar la curiosidad, la paciencia y la constancia que necesitará si algún día decide seguir este camino;

A Jose, por lo que hemos conseguido juntos y por lo que nos queda por recorrer. Por estar siempre ahí.

I.	<u>INTRODUCCIÓN</u>	
1.	ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA INMUNITARIO.....	11
2.	INTERACCIONES ENTRE EL SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y EL ESPECÍFICO.....	12
3.	LA RESPUESTA INFLAMATORIA.....	14
4.	FISIOLOGÍA DE LOS PMNS.....	15
4.1	Ciclo vital de los PMNs.....	16
4.2	Mecanismos implicados en la acción de los PMNs.....	18
4.2.1.	Mecanismos de reclutamiento de los PMNs.....	19
4.2.2.	Expresión de receptores de superficie y transducción de señal.....	20
4.2.3.	Funcionalidad de las moléculas de adhesión de la superficie de los PMNs...21	
4.2.4.	Interacción entre PMNs y células endoteliales.....	29
4.2.5.	Desgranulación y liberación del contenido citoplásmico.....	30
4.2.6.	Mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno.....	31
4.2.7.	La explosión oxidativa.....	33
4.2.8.	Mecanismos bactericidas no oxidativos.....	37
4.2.9.	Regulación de la función de los PMNs.....	38
4.2.10.	Actividad de los PMNs y daño tisular.....	41
5.	ALTERACIONES INMUNITARIAS EN EL EJERCICIO FÍSICO.....	42
5.1.	Introducción a la inmunología del ejercicio físico.....	42
5.2.	Modelos de relación entre ejercicio físico y alteración inmunitaria.....	44
5.3.	Aproximaciones al estudio de la función inmunitaria en el ejercicio físico.....	45
5.3.1.	Estudios transversales.....	45
5.3.2.	Estudio longitudinales.....	46
5.3.3.	Estudios en condiciones de entrenamiento.....	46
5.4.	Parámetros inmunitarios en deportistas.....	47
5.4.1.	Número de leucocitos.....	48
5.4.2.	Linfocitos.....	50
5.4.3.	Células Natural Killer.....	51
5.4.4.	Moléculas de adhesión.....	52
5.4.5.	Inmunoglobulinas.....	52
5.4.6.	Citokinas.....	53
5.4.7.	Otros factores necesarios para el Sistema Inmunitario.....	53
6.	EJERCICIO FÍSICO Y PMNs.....	54
6.1.	Cambios inducidos por el ejercicio en el número de PMNs circulantes.....	54
6.2.	Cambios inducidos por el ejercicio en la funcionalidad de los PMNs.....	54
7.	EJERCICIO FÍSICO Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	59
7.1.	Generación de radicales libres durante el ejercicio físico.....	59
7.2.	Consecuencias del estrés oxidativo relacionado con el ejercicio físico.....	62
7.2.1.	Fenómenos de peroxidación lipídica.....	62
7.2.2.	Cambios en el estado redox celular.....	64
7.2.3.	Niveles de enzimas antioxidantes.....	65

8. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	49
8.1. Estructura de un citómetro de flujo.....	51
8.2. Características del análisis por citometría de flujo.....	52
9. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PMNs POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	66
9.1. Ventajas de la citometría de flujo.....	68
9.2. Métodos citométricos de estudio de los PMNs.....	69
II. OBJETIVOS.....	80
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	89
1.1. Reactivos y productos.....	89
1.1.1. Fluorocromos.....	89
1.1.2. Anticuerpos monoclonales.....	89
1.1.3. Estímulos para la activación celular.....	90
1.1.4. Mitógenos.....	91
1.1.5. Agentes oxidantes.....	91
1.1.6. Otros reactivos y productos.....	91
2. SUJETOS Y PARÁMETROS DEL ESTUDIO.....	93
2.1. Sujetos de estudio.....	93
2.2. Fases y parámetros del estudio.....	93
3. METODOS ANALÍTICOS.....	94
3.1. Extracción, manejo y conservación de las muestras de sangre.....	94
3.2. Obtención de la suspensión leucocitaria.....	95
3.3. Introducción in vitro de estrés oxidativo en leucocitos.....	96
3.4. Inducción de estimulación celular in vitro.....	96
3.5. Procedimientos analíticos.....	
3.5.1. Determinación de la distribución y estado funcional de las poblaciones leucocitarias y linfocitarias.....	97
3.5.2. Determinación de la expresión del receptor de activación temprana CD69.....	98
3.5.3. Determinación de la expresión del receptor de activación tardía CD25.....	99
3.5.4. Estimación del potencial de membrana mitocondrial.....	99
3.5.5. Contenido intracelular en peróxido de hidrógeno.....	100
3.5.6. Medida simultánea de los niveles intracelulares de ión superóxido y peróxido de hidrógeno.....	100
3.5.7. Medición de niveles intracelulares de Glutathion reducido.....	100
3.5.8. Medida de la respuesta de proliferación linfocitaria a la estimulación mitogénica.....	101
3.5.9. Determinación de la expresión de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas β_2	103
4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	105

IV. RESULTADOS

A) ESTUDIOS IN VIVO.....	107
1. ESTIMACIÓN DE LAS ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS INDUCIDAS POR EJERCICIO FÍSICO INTENSO.....	107
1.1. Efectos del ejercicio intenso sobre la distribución de poblaciones linfocitarias.....	
1.2. Efectos del ejercicio intenso sobre la distribución de subpoblaciones funcionales de linfocitos T.....	108
1.3. Efectos del ejercicio intenso sobre el estado de activación de subpoblaciones linfocitarias T.....	109
1.4. Efectos del ejercicio intenso sobre la capacidad proliferativa in vitro de linfocitos en cultivo.....	110
1.4.1. Respuesta proliferativa in vitro mixta de linfocitos T y B.....	110
1.4.2. Respuesta proliferativa in vitro de linfocitos B.....	111
1.4.3. Respuesta proliferativa in vitro de linfocitos T.....	111
1.5. Efecto del ejercicio intenso sobre la capacidad de utilización in vitro de interleukinas exógenas por linfocitos en cultivo.....	111
1.5.1. Utilización de Interleukina-4 por células B.....	112
1.5.2. Utilización de Interleukina-2 por células T.....	112
2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO INTENSO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS PMNS.....	113
2.1. Efectos del ejercicio intenso sobre la expresión de la molécula de adhesión CD11b en granulocitos y monocitos.....	114
2.2. Efectos del ejercicio intenso sobre la respiración mitocondrial en granulocitos y monocitos.....	115
2.3. Efectos del ejercicio intenso sobre el contenido intracelular en especies reactivas del oxígeno.....	116
B) ESTUDIOS IN VITRO.....	116
1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE AGENTES OXIDANTES.....	118
2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EXTRACELULAR SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INTRACELULAR.....	119
2.1. Efecto del estrés oxidativo extracelular sobre los niveles de oxidantes intracelulares.....	119
2.2. Efecto del estrés oxidativo extracelular sobre los niveles de GSH intracelulares.....	119
2.3. Efecto del estrés oxidativo extracelular sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	120
3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN INDUCIDA IN VITRO SOBRE LOS NIVELES DE OXIDANTES INTRACELULARES.....	120
4. EFECTO DE LOS PROOXIDANTES EXÓGENOS SOBRE LA ACTIVACIÓN CELULAR IN VITRO.....	121
4.1. Expresión del marcador de activación temprana CD69.....	122

4.2. Expresión del marcador de activación celular tardía CD25.....	122
5. EFECTO DE LOS PROOXIDANTES EXÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DE LA FAMILIA DE LAS INTEGRINAS B₂.....	124
5.1. Efecto de los prooxidantes exógenos sobre la expresión espontánea de CD18, CD11a, CD11b y CD11c.....	125
5.2. Efecto de los prooxidantes exógenos sobre la expresión de CD18, CD11a, CD11b y CD11c inducida por fMLP o PMA.....	127
V. <u>DISCUSIÓN</u>	
1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA DE ESTUDIO.....	175
1.1. Mantenimiento de condiciones fisiológicas en el material celular.....	176
1.2. Variabilidad interindividual e intercelular.....	178
1.3. Valor del análisis multiparamétrico.....	180
1.4. Detección de heterogeneidad de respuesta.....	181
2. RELEVANCIA DEL EJERCICIO INTENSO COMO MODELO DE ESTRÉS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA: PAPEL DEL PMN Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	182
2.1. Ejercicio físico y estrés oxidativo.....	183
2.2. Alteraciones inmunitarias en el ejercicio intenso.....	185
2.3. Alteraciones in vivo en células linfoides de sujetos sometidos a ejercicio intenso: Relación con el modelo in vitro de estrés oxidativo.....	186
2.4. Alteraciones en la función de los PMNs: Relación con el estrés oxidativo exógeno.....	194
2.5. Posibles interacciones entre PMNs y linfocitos en los efectos observados.....	209
2.6. Relación de los resultados obtenidos con la frecuencia de infecciones en sujetos sometidos a ejercicio intenso.....	215
VI. <u>CONCLUSIONES...</u>	219
VII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	222

INTRODUCCION

1. ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA INMUNITARIO.

El Sistema Inmunitario es un sistema de defensa notablemente adaptativo que ha evolucionado en los vertebrados para protegernos no sólo de microorganismos patógenos intracelulares (virus, algunas bacterias y pequeños parásitos, etc.), extracelulares (la mayoría de bacterias, grandes parásitos) y alérgenos (pelo de animales, polen, químicos), sino también de nuestro propio crecimiento potencialmente incontrolado como en la malignización neoplásica o las enfermedades autoinmunes. Dicho sistema es capaz de generar una enorme diversidad de células y moléculas que participan en el reconocimiento y eliminación de una casi ilimitada variedad de invasores extraños, a través de fenómenos dinámicos, adaptables y de elevada complejidad (Clancy, 1998).

Para ello, el Sistema Inmunitario está dividido en dos ramas funcionales:

- A) Sistema Inmune no específico, innato o natural: actúa como primera línea de defensa o resistencia básica a la enfermedad y consta de dos tipos de mecanismos:
- a) Mecanismos Externos: dependientes de las estructuras tisulares de piel y mucosas, que forman barreras inespecíficas, mecánicas y químicas, contra los microorganismos invasores: barreras anatómicas (piel y mucosas) y barreras fisiológicas (temperatura, pH, tensión de oxígeno);
 - b) Mecanismos Internos: barreras endocíticas y fagocíticas, dependientes de la acción de distintas células fagocíticas (fagocitos mononucleares, neutrófilos) o con capacidad citotóxica natural (eosinófilos, células citotóxicas asesinas naturales o *natural killer* (NK); y barreras solubles, dependientes de proteínas solubles y producidas por un amplio abanico de células: factores del

complemento, interferones, lisozima, proteínas de fase aguda, derivados activos del oxígeno y nitrógeno, etc.,

B) Sistema Inmune específico o adaptativo: entra en acción cuando son superadas las primeras defensas y es inducible y capaz de reconocer específicamente y eliminar selectivamente a cada microorganismo y molécula extraña, así como de recordarlo en una reinfección posterior (memoria inmunológica específica). Incluye la acción de células (linfocitos B y T) y moléculas solubles (anticuerpos, citokinas) específicas. Opera bajo la restricción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Clancy, 1998; Kuby, 1994).

En la Figura 1 (tomada de Smith, 1995) podemos ver la relación entre los diversos componentes del Sistema Inmunitario.

2. INTERACCIONES ENTRE EL SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y EL ESPECÍFICO.

Aunque muchos agentes infecciosos pueden ser eliminados por los mecanismos innatos, sin involucrar necesariamente a los procesos adaptativos (Eichmann, 1991), ambos sistemas están intrínsecamente enlazados. Los mediadores humorales pertenecientes al sistema adaptativo conocidos como citokinas, secretados por la mayoría de las células inmunitarias, son los principales reguladores de la respuesta inmunitaria. Son una familia de proteínas capaces de amplificar o disminuir la mayoría de los tipos de actividad inmunitaria (Del Prete et al., 1994; Smith, 1994; Vikingsonn, Pederson y Müller, 1994). El patrón de secreción de las citokinas, que depende de la naturaleza del agente

infeccioso, coordina el desarrollo de cada uno de los tipos celulares componentes del sistema inmunitario y las interacciones entre ellos (Del Prete, Maggi y Romagnani, 1994).

Algunas respuestas inmunitarias tienen consecuencias patológicas debido a reacciones alérgicas, inflamatorias o citotóxicas contra los tejidos del organismo. La intensidad y calidad de cada función inmunológica refleja el resultado neto de la influencia de los diferentes mediadores inmunopotenciadores e inmunosupresores. En muchos casos, las disfunciones inmunológicas son causadas primariamente por la alteración de los mecanismos inmunorreguladores, más que por defectos inherentes al sistema inmunitario. Por esta razón, el mantenimiento de la salud requiere que el sistema inmunitario opere a su óptima, más que a su máxima, actividad.

Dado el papel dinámico del sistema inmunitario en el mantenimiento de la homeostasis corporal, no es de sorprender que la composición de este sistema esté en un estado constante de recambio (Coligan et al, 1991) en el que algunas subpoblaciones de células T tienen larga supervivencia mientras que otros leucocitos, como los granulocitos y las células B son renovadas con rapidez (Cannon, 1993; Smith, 1994).

Esta participación en la homeostasis corporal conlleva a que el sistema inmunitario no actúe de forma aislada sino que interactúe continuamente con otros sistemas con el fin de integrar la respuesta inmunitaria de cada sujeto en el buen funcionamiento del resto de su organismo. Las interacciones más conocidas se producen con los sistemas cardiovascular, endocrino y nervioso (Ader, 1992;

Smith, 1994), aunque su verdadero significado fisiológico no siempre puede comprenderse del todo. Estas observaciones han favorecido el desarrollo de nuevas disciplinas como la psiconeuroinmunología y la neuroinmunoendocrinología (Ader, 1992; Smith, 1994).

3. LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

La reacción inflamatoria ocurre independientemente del sistema inmunitario cuando se produce un daño físico en el organismo. Se caracteriza por: aumento del flujo sanguíneo hacia el área afectada para diluir agentes potencialmente tóxicos, incremento de la permeabilidad capilar para facilitar la transmisión de moléculas más grandes a través del endotelio, y migración de leucocitos (principalmente neutrófilos y en menor grado macrófagos) a través de las células endoteliales por diapedesis, desde el sistema circulatorio y hacia los tejidos de alrededor. Estos procesos se inician en pocos minutos pero sus consecuencias pueden mantenerse durante semanas a meses. El objetivo de los leucocitos es retirar los restos (*debris*) y restaurar la normal estructura y función tisular. Algunas subpoblaciones leucocitarias están capacitadas para la fagocitosis, función que llevan a cabo internalizando y digiriendo el tejido necrótico así como el material extraño. La duración y magnitud de la respuesta inflamatoria dictará el resultado final. Si el tejido está excesivamente dañado y la respuesta inflamatoria es muy prolongada será más difícil restaurar la arquitectura tisular normal.

La inflamación aguda es la fase inicial del proceso inflamatorio y se caracteriza por: rubor, calor, tumor y dolor. Los leucocitos participan activamente

en el proceso que sigue al daño tisular y/o la infección. El primer tipo celular que aparece en el lugar afectado es el neutrófilo o polimorfonuclear (PMN). Dependiendo del agente desencadenante actuarán también células mastocíticas, eosinófilos y basófilos. Además se implican las células epiteliales y del tejido conectivo (fibroblastos) y otros factores solubles como las proteínas de fase aguda, los interferones y el sistema del complemento. Si la infiltración de neutrófilos no es suficiente para limpiar el área inflamada se pone en marcha un soporte adicional integrado por monocito-macrófagos y linfocitos, lo que marca la entrada en la inflamación crónica, de mayor duración y que involucra varios tipos celulares diferentes de la sangre y el tejido conectivo específico de la zona del organismo afectada (macrófagos pulmonares o alveolares, células de Kupffer, células de Langerhans, etc.)(Clancy, 1998).

El hecho de que las principales características y componentes de la inmunidad innata concurren en la respuesta inflamatoria da lugar, como veremos, a que ambos procesos suelen aparecer juntos.

4. FISIOLÓGÍA DE LOS PMNs.

Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) o granulocitos son las células más abundantes de la serie blanca en la circulación sanguínea (5×10^3 /mL). La intrincada regulación y redundancia del sistema inmunitario también alcanza a las varias funciones de los PMNs. El hecho de que los PMNs representen el 50-60% del total del conjunto leucocitario circulante, los hace fácilmente accesibles a la investigación experimental. Además, como hemos visto, los PMNs, que son

células esenciales para la defensa del huésped, también están involucrados en la patología de varias condiciones inflamatorias (Smith, 1994).

La importancia de los PMNs en la defensa del huésped se demuestra ante las deficiencias en número y/o función. La neutropenia inducida por quimioterapia, o algunos raros defectos hereditarios de la función neutrofílica, como el metabolismo oxidativo, los gránulos específicos o las moléculas de adhesión, son importantes factores de riesgo para el desarrollo de infecciones potencialmente fatales (McCarthy y Dale, 1988; O’Gorman y Corrochano, 1995).

Un aspecto negativo de los mecanismos defensivos de los PMNs estriba en que su acción puede tanto proteger como dañar al huésped, pues no es capaz de distinguir entre el patógeno y las células del tejido infectado y, una vez activados sus mecanismos de defensa, éstos actúan indiscriminadamente, desencadenando una respuesta inflamatoria. Por esta razón, infección e inflamación son dos procesos que suelen ir juntos. Una excesiva respuesta inflamatoria, mediada por los PMNs entre otros, desencadena patologías inflamatorias características como el distrés respiratorio, la glomerulonefritis, la artritis reumatoide o determinadas alteraciones cardiovasculares (Smith, 1994).

4.1. Ciclo vital de los PMNs.

El ciclo de vida del PMN puede ser dividido en fase de médula ósea, fase de sangre periférica y fase tisular. Al igual que la mayoría de las células sanguíneas, los PMNs se originan en la médula ósea durante la hematopoyesis a partir de precursores mieloblásticos. Allí su diferenciación y maduración dura

unos 14 días.

La médula ósea produce $60-400 \times 10^7$ PMNs / día, pudiendo incrementar este número en respuesta a varias circunstancias como infecciones o procesos inflamatorios.

Una vez en la sangre, los PMNs tienen una vida media de 6 a 9 horas, durante la cual se mueven reversiblemente desde el acervo circulante al marginal, acoplados a las células endoteliales.

Cuando son requeridos en los tejidos, en los que tendrán una vida media de 2 a 4 días, los granulocitos dejan la sangre atravesando, generalmente de forma irreversible, las células endoteliales modificadas por la inflamación o como resultado de la adhesión de los PMNs. Existe un flujo continuo, pues los PMNs marginales son atraídos desde la sangre hacia los tejidos ante diversos estímulos infecciosos e inflamatorios para realizar sus funciones. En su migración los PMNs, en primer lugar, se adhieren al endotelio vascular; después penetran la unión entre las células endoteliales que limitan la pared vascular y finalmente atraviesan la membrana basal vascular, saliendo a los espacios tisulares. Para ello requieren la formación de pseudópodos, la fusión de su membrana y la adherencia de la misma. Además, gracias a receptores de membrana, los PMNs pueden reconocer a los agentes patógenos y son capaces de desplazarse rápidamente a los lugares donde se ha producido una invasión microbiana. Esto hace que los PMNs sean las células más abundantes en la mayoría de lesiones tisulares.

Una vez finalizada su misión, los PMNs serán excretados al tracto gastrointestinal o eliminados en el bazo.

4.2. Mecanismos implicados en la acción de los PMNs.

Una vez se ha iniciado la respuesta infecciosa o inflamatoria, los PMNs son las primeras células reclutadas hacia los sitios de infección o daño. Sus dianas incluyen bacterias, hongos, protozoos, virus, células infectadas por virus y células tumorales (Smith, 1994). La evasión de las defensas de los PMNs puede crear una oportunidad para que las infecciones locales se establezcan, a menos que el agente infeccioso se vuelva inocuo por interacción con componentes de memoria inmunitaria, como anticuerpos neutralizantes (por ej. Ig A e Ig G) ya presentes. La respuesta de los PMNs a la infección/ inflamación consiste en una serie de pasos secuenciales y coordinados en una cascada que ha sido bien caracterizada. Muchos de estos pasos pueden ser estudiados *in vitro* con PMNs aislados (Pyne, 1994a).

Los procesos defensivos de los PMNs son complejos e implican varias fases en varias fases: detección del estímulo y transducción de la señal de activación, quimiotaxis, ingestión o fagocitosis, desgranulación y destrucción o depuración de material extraño o residuos no útiles.

Los PMNs no sólo existen en estados quiescentes o activados, sino también en varios estados intermedios. Por ejemplo, el “priming“ o estimulación es un mecanismo por el cual los PMNs quiescentes adquieren un estado de preactivación que les capacita para generar una respuesta más poderosa una vez que se requiera la actividad microbica (Smith, 1994).

Clásicamente los PMNs se han considerado células puramente efectoras, pero es importante destacar que parece que también sintetizan y liberan

mediadores humorales como citokinas, que, como hemos visto, juegan un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Lloyd y Oppenheim, 1992).

4.2.1. Mecanismos de reclutamiento de PMNs.

Los factores quimiotácticos generados por los propios agentes infecciosos, así como aquellos liberados como resultado de su contacto inicial con fagocitos y otros componentes del sistema inmune, son la señal fundamental para el reclutamiento de PMNs adicionales en los sitios de infección.

La respuesta funcional empieza cuando los PMNs se adhieren al endotelio vascular. Bajo la influencia de un gradiente quimiotáctico generado localmente y por la difusión de sustancias desde el sitio de infección, los PMNs tienen que penetrar el lecho endotelial y moverse por el tejido conjuntivo hacia los sitios de infección (diapédesis) donde finalmente se agregan y adhieren a componentes de la matriz extracelular como la laminina y la fibronectina.

La comunicación entre las células del sistema inmunitario, y entre éstas y las de las barreras sanguíneo-tisulares o las células diana, es un requisito previo para una respuesta inmune eficiente y bien ordenada. En estas interacciones célula-a-célula están involucrados dos mecanismos fundamentales. El primer sistema de comunicación lo mantienen factores solubles como son las citokinas. El segundo mecanismo se basa en la interacción entre células, a través de contactos íntimos célula a célula, facilitado por un conjunto de moléculas de superficie celular que actúan vía unión receptor-ligando: son las denominadas

“moléculas de adhesión”.

4.2.2. Expresión de Receptores de Superficie y Transducción de Señal.

Hemos visto como los PMNs responden a los estímulos externos a través de receptores moleculares situados en la superficie de su membrana, que median la activación y la modulación de las funciones fagocíticas. La unión de un ligando a su receptor inicia una serie de procesos bioquímicos que desencadenan la transducción de dicho estímulo en respuestas celulares específicas. Los PMNs tienen receptores para N-formil péptidos y otros factores quimiotácticos (C5a y Leukotrieno B4), para opsoninas (porción Fc de la IgG y fragmentos C3b y C3bi del complemento), y para otros moduladores exógenos de la función neutrofílica (como Factor Activador Plaquetario (PAF), agentes β -adrenérgicos, adenosina, interleukinas IL-1 e IL-8 y Factor de Necrosis Tumoral (TNF)).

Los PMNs en reposo presentan muy pocos de estos receptores sobre su membrana pero tienen unas 10^5 moléculas procedentes de los depósitos intracelulares, que son reclutadas junto a la membrana ante el estímulo de la célula por citocinas, lipopolisacáridos bacterianos, contacto con superficies o cualquiera de los ligandos estimulantes. La unión de un ligando, por ejemplo al receptor de formil-péptido, resulta en una rápida conversión a una asociación de alta afinidad con las denominadas proteínas G y, posiblemente, con el citoesqueleto. El complejo ligando-receptor es entonces internalizado en el endosoma.

En la Figura 2 (tomada de: Romero y Roche, 1996) se representa el mecanismo de transducción de señales que lleva a la activación de la NADPH oxidasa en los

granulocitos.

4.2.3. Funcionalidad de las moléculas de adhesión de la superficie de los PMNs.

Para poder actuar en la zona inflamada, los leucocitos tienen que: sentir la presencia de los microorganismos invasores o de las áreas afectadas, enlazarse a las células endoteliales que bordean los capilares sanguíneos de esas zonas afectadas, penetrar entre las células endoteliales hacia el interior de los tejidos que las rodean y destruir los microorganismos en cuestión. Con este objetivo, se han desarrollado mecanismos moleculares que involucran a varios miembros de diferentes familias de las moléculas de adhesión (Gahmberg, 1998).

Según su estructura, estas moléculas están clasificadas en diferentes familias que incluyen: A) Superfamilia de las Inmunoglobulinas,

B) Selectinas,

C) Integrinas,

D) Diriginas.

A) Superfamilia de las Inmunoglobulinas:

Es la familia más abundante de las moléculas de superficie (más de 70 componentes) y su estructura se caracteriza por la repetición de dominios similares a los encontrados en las Inmunoglobulinas -“dominios Ig”- (Pigott y Power, 1993) (Fig. 3 A: tomada de Pigott y Power, 1993). Por mutación y selección, el dominio Ig ha evolucionado para cumplir diferentes funciones como: receptores para factores de crecimiento, receptores para la porción Fc de las Ig, receptores de células T, de antígenos MHC, CD2, CD3, CD4, CD8 y, por último y la que parece ser su principal función: como moléculas de adhesión, (Holness y Simmons,

1994). Algunas de las más importantes son: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, CD31 (PECAM-1) y MAdCAM-1.

El rodamiento leucocitario es requisito previo para la firme adherencia a los capilares sanguíneos. Sin embargo, la adhesión de los leucocitos mediada por las selectinas no terminará en fuerte adhesión y transmigración a no ser que colaboren la superfamilia de las Inmunoglobulinas. (Zimmerman, 1992).

Los principales ligandos de las proteínas de la superfamilia inmunoglobulina se unen a otros miembros de la misma familia (como los antígenos MHC que se unen al receptor de células T) o a las integrinas: por ejemplo, para las interacciones entre leucocitos y células endoteliales son fundamentales ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1, que sirven de ligandos para las integrinas LFA-1 (CD-18/CD11a) y VLA-4 (Shimizu, 1992).

- ICAM-1 e ICAM-2 se unen a la integrina β_2 LFA-1 (CD11a/CD18) a través de los dominios Ig 1 y 2. Ambas moléculas tienen porciones citoplásmicas diferentes, por lo que dan lugar a distinta señalización celular. ICAM-1 se une también a la integrina Mac-1 (CD11b/CD18) por el dominio Ig3 (Zimmerman, 1992). ICAM-2 no aumenta tras estímulo por citokinas mientras que ICAM-1 sí puede ser activada por IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y LPS (Acevedo, 1993) y está elevada en pacientes con síndromes inflamatorios como shock séptico, LAD, cáncer y trasplantes (Gearing, 1992).

- ICAM-3 es ligando para las integrinas LFA-1 o CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$) y CD11d/CD18 ($\alpha_d\beta_2$) y está expresada constitutivamente en todos los leucocitos en reposo y las células presentadoras de antígenos. Juega un papel clave en la

iniciación de las respuestas inmunitarias, la adhesión celular (sobre todo entre LFA-1 e ICAM-1, con lo que incrementan la adhesión vía integrinas β_2) y la transducción de señales (Holness, 1995), así como en la activación por antígenos de las células T llevadas a cabo por células de Langerhans en la piel (Acevedo, 1993; Campanero, 1993).

- CD31 (PECAM-1 ó endo-CAM) es expresada principalmente por las células endoteliales a nivel de las uniones intercelulares y por las subpoblaciones de linfocitos T, aunque también puede aparecer sobre plaquetas, otros leucocitos como neutrófilos y monocitos, y tumores de extirpe mieloide y linfoide. Es muy importante para la migración transendotelial de los leucocitos a través de las células endoteliales vasculares. (Müller, 1993).

B) Selectinas:

Son una pequeña familia de proteínas Ca^{++} -dependientes formada por tres miembros: Selectina-L (leucocitos), Selectina-P (plaquetas) y Selectina-E (endotelio) (Rosen y Bertozzi, 1994). A diferencia de la mayoría de moléculas de adhesión, que se unen a proteínas, las selectinas que se unen a los carbohidratos. Median la inicial adherencia de los leucocitos circulantes a la pared del capilar durante la captura y rodamiento en la fase de la inflamación. Estos enlaces son lábiles, con lo que permiten a los leucocitos rodar a lo largo del endotelio vascular en la dirección del flujo sanguíneo (von Adrian, 1993).

Están formadas por tres tipos de dominios protéicos (Fig. **3 B**: tomada de Pigott y Power, 1993). En el extremo N-terminal hay un dominio lectina calcio-dependiente, que es responsable de la unión del ligando. Le siguen un dominio con actividad

similar al Factor de Crecimiento Epidérmico (dominio-EGF) y un número variable de repeticiones, que pueden encontrarse también en las proteínas reguladoras del complemento. Se sabe que, tanto el dominio lectina como el EGF están directamente involucradas en la adhesión celular y pueden determinar la especificidad de unión al ligando, siendo su función la de dirigir las interacciones leucocitarias con el endotelio vascular (Tedder, 1995). Esto las convierte en atractivas dianas para los agentes terapéuticos diseñados para tratar procesos como: daño por isquemia-reperfusión, diabetes, rechazo de aloinjerto renal, hipersensibilidad retardada, procesos inflamatorios ó metástasis (von Adrian, 1993).

- La Selectina-E (ELAM-1 ó CD62E) es expresada por las células endoteliales activadas por citokinas en las zonas inflamadas y media la adhesión de neutrófilos, monocitos y algunas células T memoria al endotelio vascular . (Tedder, 1995).

- La Selectina-L (LAM-1 ó CD62L) es expresada por linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Media la adhesión leucocitaria al endotelio al endotelio en los sitios de inflamación y el retorno linfocitario (“homing”). Su amplia distribución le proporciona un papel importante en el tráfico de todas las líneas leucocitarias (Tedder, 1995). Tras la activación celular, los leucocitos sufren una pérdida reversible de la Selectina-L, lo que evita su posterior vuelta a zonas inflamadas (Walcheck, 1996). Se ha detectado niveles elevados en el suero de pacientes con SIDA y leucemia, mientras que disminuyen en el Síndrome del Distrés Respiratorio del Adulto (Gearing y Newman, 1993).

- La Selectina-P (GMP-140 ó CD62P) aparece rápidamente sobre las células endoteliales y en las plaquetas en respuesta a varios agentes pro-inflamatorios como: trombina, histamina, factores del complemento, radicales libres y citokinas. La expresión es muy corta (minutos) por lo que media las interacciones inmediatas de neutrófilos y monocitos a células endoteliales y plaquetas activadas (Tedder, 1995).

C) Integrinas:

Glicoproteínas que aparecen predominantemente sobre la superficie de leucocitos y que parecen ser los principales mediadores de la adhesión célula-matriz extracelular, pero también están involucradas en la adhesión célula a célula (Haas y Plow, 1994). Precisamente, el nombre de integrina fue acuñado para dar significado al presumible papel de estas proteínas en la integración del citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular (Ruoslahti, 1990).

Parece que todas las células y tejidos del organismo poseen al menos algún miembro de esta familia de moléculas de adhesión. Son heterodímeros compuestos por subunidades α y β asociadas de forma no covalente. Las subunidades β presentan una fuerte homología entre ellas mientras que las subunidades α presentan entre sus secuencias menor homología (Fig. 3 C: tomada de Pigott y Power, 1993).

Las integrinas fueron inicialmente clasificadas en tres subfamilias: integrinas β_1 o proteínas VLA, integrinas β_2 o LeuCAMs e integrinas β_3 o citoadhesinas. Sin embargo, esta clasificación es menos rígida desde que se han identificado, al menos, 8 subunidades β y 16 subunidades α diferentes y

continúan descubriéndose nuevas integrinas y ligandos, como la $\alpha_4\beta_7$ (Gahmberg et al., 1998). Incluso se ha demostrado que subunidades α individuales se asocian con más de un tipo de subunidades β (Pigott y Power, 1993).

El sitio de unión del ligando de las integrinas parece estar formado por secuencias de ambas subunidades y sus dominios forman conexiones con el citoesqueleto, dotando a las integrinas de la capacidad de servir como eslabón entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Ruoslahti, 1990). Además, últimamente está dedicándose mucha atención a otra función con la que se ha relacionado a las integrinas: los mecanismos extra e intracelulares de la transducción de señales.

Hasta el momento se ha descrito cuatro integrinas β_2 : el denominado complejo CD11/CD18 (**tabla 1**: tomada de Ghamberg et al., 1998). Están constituidas por una cadena β_2 común -CD18-, de un peso molecular de 95 kDa (Arnaout, 1990), a la que se asocian de forma no-covalente las cadenas específicas α -CD11- diferentes para cada una de ellas y con pesos moleculares de 180 kDa, 170 kDa y 150 kDa, respectivamente (Sánchez-Madrid et al., 1983; Springer y Anderson, 1986; Anderson y Springer, 1987). Estas cuatro subunidades son conocidas como: CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$), CD11b/CD18 (Mac-1, Mo-1 ó receptor para C3bi $\beta_M\beta_2$), CD11c/CD18 (p150/95, $\alpha_X\beta_2$) y la reciente CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$). La expresión de las integrinas β_2 está restringida a los leucocitos, pero entre los distintos subtipos de leucocitos la distribución de CD11/CD18 difiere. Los linfocitos de sangre periférica expresan principalmente CD11a mientras que PMNs, monocitos y células NK expresan las tres

subunidades de integrinas β_2 (Arnout, 1990; Kishimoto y Anderson, 1992). Algunos de los ligandos conocidos para las integrinas son proteínas víricas, bacterianas, factores de la coagulación, fibrinolíticos y proteínas del complemento, además de los miembros de la superfamilia de Ig: ICAM-1, -2, -3, -4 y -5, VCAM-1 y CD-31 entre otros. Varios agonistas incrementan la expresión en superficie de las integrinas β_2 , entre ellos ionóforos de calcio, ésteres de forbol, fMLP, GM-CSF, C5a, TNF- α y LTB₄; sin embargo, los mecanismos de su activación no son del todo conocidos (Carlos y Harlan, 1990; Gahmberg et al., 1998; Haas y Plow, 1994).

- LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$) es expresada por la mayoría de las células blancas de la sangre. Interviene en las interacciones leucocito-leucocito y leucocito-endotelio y se le ha involucrado en la inflamación, la adhesión y destrucción mediada por células T citotóxicas y células NK, las reacciones entre linfocitos, la proliferación de las células T (antígeno-específica e inducida por Con-A), así como la respuesta dependiente de anticuerpos (Larson y Springer, 1990). También se ha implicado en la metástasis del linfoma y en algunas neoplasias de pulmón (Tang y Honn, 1995). Sus ligandos son ICAM-1, -2, -3, -4 y -5 (Arnout, Lanier y Faller, 1988; Forsyth y Levinsky, 1989; Harlan et al., 1985; Lo et al., 1989; Mentzer et al., 1987; Smith et al., 1989a; Tevede, Keizer y Figdor, 1987).

- Mac-1 (Mo-1, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$). Expresada también por la mayoría de las células blancas en las que juega un importante papel en las interacciones entre leucocitos y entre éstos (fundamentalmente el neutrófilo) y el endotelio. Se le ha relacionado con los procesos inflamatorios, la quimiotaxis y fagocitosis

leucocitaria y la unión del complemento. Ligandos: ICAM-1, -2 y -3, LPS, kininógeno, factor X de la coagulación, C3bi y fibrinógeno (Albelda y Buck, 1990; Gahmberg et al., 1998; Larson y Springer, 1990).

- p150,95 (CD11c/CD18, $\alpha_x\beta_2$) es igualmente expresada por casi todas las células blancas e involucrada en las interacciones entre leucocitos y con el endotelio. Participa además en la quimiotáxis, la activación de células B y la destrucción mediada por células T citotóxicas. Sus ligandos son C3bi, fibrinógeno y parece que ICAM-1 (Gahmberg et al., 1998; Lo et al., 1989; Kishimoto y Anderson, 1992; Pigott y Power, 1993).

La importancia de las integrinas β_2 se ha demostrado *in vivo* en el Déficit de Adhesión Leucocitaria (LAD) de Tipo I (Anderson et al., 1985; Kishimoto y Anderson, 1992; Larson y Springer, 1990). En este trastorno autosómico recesivo existe una ausencia total o parcial de la expresión de integrinas β_2 leucocitarias que conduce a un defecto en el reclutamiento de PMNs a los sitios de inflamación (Harlan, 1985; O’Gorman, Corrochano y Myones, 1993). Los PMNs están ausentes de los tejidos inflamados, pero otros leucocitos (monocitos y eosinófilos) sí son capaces de emigrar a los sitios de inflamación, posiblemente por medio de VLA-4 (Anderson et al., 1985; Kishimoto y Anderson, 1992; Winn y Harlan, 1993).

Como hemos visto, las integrinas se unen a las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) y a varias proteínas solubles, muchas de las cuales están involucradas en procesos como inflamación, crecimiento celular, diferenciación, formación de uniones y polaridad (Albelda y Buck, 1990). La amplia distribución

de integrinas también sirve para relacionarlas con múltiples campos como hematología, neurobiología, trombosis, oncología, Sida, inflamación y biología de la evolución (Arnout et al., 1988; Forsyth y Levinsky, 1989; Harlan et al., 1985; Haas y Plow, 1994; Lo et al., 1989; Mentzer et al., 1987; Smith, 1989; Tevelde et al., 1987).

D) Diriginas:

Son receptores implicados en el inicio de la adhesión endotelio-leucocito y favorecen el asentamiento de éstos en los diferentes órganos linfoides. Sus ligandos son las selectinas. El representante más conocido es el CD44, una glicoproteína de amplia distribución, expresada por algunas células hematopoyéticas, células epiteliales, fibroblastos y células gliales. CD44 está involucrada en la adhesión célula-célula y célula-matriz, así como en la activación de las células T. El procesamiento alternativo del RNAm da lugar a diferentes isoformas que contienen inserciones de varios tamaños de la porción extracelular de la molécula (variantes CD44). La forma estándar del CD44 se une a hialuronato y las variantes CD44 se unen a fibronectina, laminina y colágeno (Pigott y Power, 1993).

4.2.4. Interacción entre PMNs y células endoteliales.

Los PMNs emigran ampliamente por todo el organismo para mediar en la vigilancia inmune y organizar las respuestas inflamatorias contra los antígenos extraños. Durante las primeras fases de la inflamación, PMNs y células endoteliales activadas expresan las selectinas, que median una interacción débil e inestable. Cada selectina reconoce secuencias específicas de carbohidratos, tanto

sobre los leucocitos como en el endotelio, con lo que media en el sostenimiento de determinadas subpoblaciones leucocitarias e induce a las células circulantes a enlentecer su flujo y “rodar” junto a la pared de los vasos sanguíneos.

Ciertos factores desencadenantes, como IL-8 y MIP-1 β , activan las moléculas de adhesión leucocitarias. Este es un paso importante pues las integrinas de los leucocitos no enlazan correctamente hasta su activación. A partir de entonces se produce una adhesión fuerte, mediada por las integrinas, que se unen a su receptores específicos. Tras adherirse firmemente al endotelio, los leucocitos emigran al interior del tejido bajo la influencia de factores promigratorios. Muchas de la citokinas que desencadenan la adhesión pueden actuar como factores quimiotácticos (Adams y Shaw, 1994). La cascada de adhesión permite introducir especificidad y regulación en cada secuencia de la interacción, de forma que el proceso de la adhesión leucocitaria al endotelio pueda ser rápidamente amplificada y perfectamente controlada.

En la Figura 4 (tomada de Kuby, 1994) podemos observar la implicación de las moléculas de adhesión en el proceso de migración de leucocitos.

4.2.5. Desgranulación y liberación del contenido citoplásmico.

Los PMNs requieren de una compleja maquinaria de proteínas microbidas y enzimas digestivos para la ingestión y destrucción de los microorganismos invasores. Para ello, adquieren durante su diferenciación diversos complejos enzimáticos, almacenados en gránulos específicos, que les permitirán ejercer su función:

a) Gránulos primarios o azurófilos:

Suelen ser de función intracelular. Contienen lisozima (o muramidasa), hidrolasas ácidas (beta-glucuronidasa, fosfatasa ácida, alfa-manosidasa y N-acetilglucosaminidasa), proteasas (como elastasa, catepsina G y catepsina D), mieloperoxidasa (que puede modular la desgranulación inactivando algunos factores quimiotácticos e inhibiendo el burst respiratorio y la fagocitosis), glucosaminoglicanos, factor de inactivación del C5a, cationes y proteínas catiónicas microbicidas (que incluyen las defensinas y la proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (BPI). Entre estas enzimas, la mieloperoxidasa participará en mecanismos oxidativos de destrucción, mientras que las proteínas catiónicas lo harán por mecanismos oxígeno-independientes.

b) Gránulos secundarios o específicos:

Normalmente secretan su contenido al medio extracelular y son fundamentales en la movilización de mediadores de la inflamación, pues contienen activadores de la cascada del complemento. También contienen colagenasa, activador del plasminógeno, glicoproteínas, lactoferrina (que inhibe tanto la división celular de bacterias que usan el hierro como nutriente esencial, como el daño tisular por radicales libres dependientes del mismo), proteína de unión a la vitamina B₁₂, NADPH oxidasa, citocromo-b, fosfatasa alcalina, lisozima, histaminasa, factor quimiotáctico de monocitos y receptores para fMLP, C3bi (CD11b/CD18) y laminina.

c) Gránulos terciarios:

Poseen también una función secretora. Contienen arilsulfatasa, citocromo-b, glucosaminoglicanos, gelatinasa, algunas proteínas de adhesión (CD11/CD18),

sulfatos. Incluyen varias vesículas citoplasmáticas que contienen hidrolasas, material endocitado, NADPH oxidasa, enzimas relacionados con la elastasa y fosfatasas alcalinas leucocitarias.

Una serie de estímulos fisiológicos o artificiales pueden causar desgranulación. El contenido granular es vertido al interior de una vesícula fagocítica, formándose un fagosoma, o al medio extracelular, dependiendo de la intensidad del estímulo o lesión y de la respuesta inmunitaria. La desgranulación se acompaña de una disminución de la carga eléctrica de superficie y de un aumento de adhesividad celular (Ortega, 1994). La señal celular que desencadena esta desgranulación es un incremento del Ca^{++} citoplasmático desde $0,1 \mu\text{M}$ a $1 \mu\text{M}$, consecuencia de la liberación desde los diferentes depósitos intracelulares (Newburger y Palmer, 1991; Warren et al., 1990). Normalmente, la desgranulación producida por estímulos específicos afecta a los gránulos secundarios, aunque puede ser más o menos intensa, alcanzando a todos los tipos de gránulos en función del tipo de estímulo, de la concentración de éste y del nivel de Ca^{++} alcanzado (Smolen y Boxer, 1990).

Este fenómeno morfofuncional, está implicado en procesos esenciales de la célula. A través de la desgranulación, el PMN :

- a) Libera al medio o al interior de fagosomas sustancias tóxicas para las bacterias.
- b) Externaliza receptores que mantienen el estado de activación celular y reconocen señales quimiotácticas.
- c) Expresa moléculas de adhesión que posibilitarán su migración celular a los tejidos.

d) Transloca la oxidasa NADPH-dependiente, enzima clave de la respuesta bactericida oxidativa a la membrana plasmática o fagosomal donde tiene lugar dicha respuesta.

4.2.6. Mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno.

Las principales células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos y monocitomaqurofagos) tienen varias propiedades en común, entre las que destaca su propiedad para fagocitar y destruir microorganismos invasores. Para llevar a cabo la destrucción están dotados de dos tipos de mecanismos: dependientes e independientes del oxígeno. Entre los más eficaces bacteriotóxicos se encuentran los radicales libres, derivados del oxígeno molecular, que presentan una gran reactividad química, debido al desapareamiento electrónico de su orbital externo, transformándose unas especies en otras a través reacciones en cadena (Haliwell y Gutteridge, 1990). En la Fig. 5 (tomada de Ramón, 1993) se muestran las vías de reducción de oxígeno en estado basal a H₂O, siguiendo la vía univalente.

La alta potencia bactericida dependiente de las especies reactivas del oxígeno lleva asociada como contrapartida toxicidad tisular, pues lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos son susceptibles de sufrir profundas modificaciones estructurales y funcionales por el ataque de los RL, lo que les hace responsables de la lesión y muerte celular en circunstancias tanto patológicas como también en condiciones normales. Así, se les ha relacionado con la patogenia de enfermedades con un componente inflamatorio importante como: shock séptico, enfermedades por depósito de inmunocomplejos (glomerulonefritis, Síndrome de Good-Pasture), enfermedades por depósito (gota)

y también se han implicado en la lesión producida por reperfusión tras infarto de miocardio (isquemia-reperfusión) (Haliwell, 1991; Haliwell y Gutteridge, 1990; Leaver et al., 1995; Schmid-Schönbein, 1993).

Con la evolución de las especies se han desarrollado mecanismos enzimáticos para protegerse de estos reactivos oxigénicos reduciéndolos a agua, pero cuando la capacidad de reducción (sistemas antioxidantes) se desborda, se produce un desequilibrio oxidativo y aparecen sus efectos tóxicos.

No sólo el oxígeno puede generar RL; hay otras muchas moléculas orgánicas e inorgánicas que lo hacen y pueden, por tanto, ser tóxicas (Mason y Chignell, 1981). Además se generan RL en muchas cadenas metabólicas como en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, en el metabolismo de fármacos, etc.

4.2.7. La explosión oxidativa.

La interacción de los PMNs con los agentes patógenos es acompañada de una explosión oxidativa o respiratoria (“burst oxidativo”), con generación masiva de RL (Curnutte, 1991) y liberación de enzimas hidrolíticos intralisosomales, cuya misión es la eliminación de dichos patógenos. En estado basal, la energía que consume el PMN depende fundamentalmente de la glucólisis (Curnutte y Babior, 1990 b). Sin embargo, cuando la célula es activada, el O_2 se consume en una reacción no mitocondrial, en la que es reducido para formar superóxido por una oxidasa NADPH-dependiente, que es activada por la proteína quinasa C (PKC) tras su translocación a las membrana plasmática o fagosomal, obteniéndose la energía por la vía de las pentosas (Rosoff y Potter, 1991).

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es producido por la NADPH óxido-reductasa,

denominada comúnmente NADPH oxidasa, un complejo enzimático unido a la membrana que cataliza la transferencia de electrones simples del NADPH del citosol al oxígeno extracelular. El sitio de unión para el NADPH está expuesto en el lado citosólico mientras que el sitio de unión para el oxígeno parece estar localizado en la capa lipídica exterior de la membrana plasmática (Babior et al., 1981). La transferencia de electrones es vectorial y el $O_2^{\cdot-}$ es así liberado al espacio pericelular o al interior de las vacuolas fagocíticas. El NADPH es principalmente aportado por el shunt hexosa monofosfato (Rossi, 1986). Su afinidad por la oxidasa es 10 a 50 veces mayor que la del NADH, que no funciona como donante de electrones en condiciones fisiológicas (Rossi, 1986).

En las células en reposo la NADPH oxidasa está inactiva y desensamblada en subunidades localizadas en diferentes compartimentos intracelulares. Cuando las células son estimuladas por agonistas quimiotácticos o fagocitosis es rápidamente reconstituída y activada. Su actividad puede ser valorada por la producción de H_2O_2 . Bajo condiciones rigurosas la quimioluminiscencia luminol-dependiente es proporcional a la tasa de formación del H_2O_2 que refleja directamente la actividad de la NADPH oxidasa (Wymann et al, 1987a). El consumo de oxígeno no mitocondrial es una medida fiable del burst respiratorio de los PMNs y eosinófilos, pero en los monocitos la inhibición del transporte mitocondrial de electrones puede afectar al burst respiratorio (Thelen et al., 1988).

Además de la NADPH oxidasa, iniciadora de la respuesta oxidativa, hay otros enzimas implicados en ella como podemos ver en la Figura 6 (Rothe y Valet, 1990; Curnutte y Babior, 1990a; Newburger y Palmer, 1991; Ortega, 1994):

- a) Superóxido dismutasa (SOD) citoplásmica, que cataliza la formación de H_2O_2 a partir de $O_2^{\cdot-}$ y es la primera defensa celular frente a los radicales libres.
- b) Catalasa, que transforma al H_2O_2 en H_2O y $\frac{1}{2} O_2$.
- c) Glutathion peroxidasa, que convierte al H_2O_2 en $2 H_2O$ mediante el paso de la forma reducida de glutathion a su forma oxidada.
- d) Mieloperoxidasa (MPO), que interviene en la formación de compuestos clorados altamente tóxicos para las bacterias a partir de cloro y H_2O_2 .

La transformación del H_2O_2 en otras especies reactivas del O_2 se produce dentro del fagosoma, ya que el H_2O_2 citoplásmico es degradado eficazmente por catalasa y glutathion peroxidasa (Rothe y Valet, 1993). Estos sistemas antioxidantes citoplásmicos modulan la respuesta oxidativa y mantienen la integridad celular, aunque en ocasiones la propia célula muere debido a la toxicidad de los radicales libres, cuando la acción bacteriotóxica es intensa, formando parte del pus.

Bajo condiciones fisiológicas el burst respiratorio es inducido por agonistas quimitácticos selectivos que se unen a los receptores de la membrana plasmática: C5a (Fernández et al., 1978); N-Formil metionil péptidos (p.ej. fMLP) que son fragmentos N-terminal de las proteínas bacterianas (Schiffmann et al., 1975); lípidos bioactivos como el factor activador de plaquetas (PAF) y el leukotrieno B4 (LTB4) que son formados por los mismos fagocitos (Baggioni et al., 1988; Jenkins et al., 1980); derivados tisulares como NAP-1/IL-8 (Baggioni et al., 1989) y MGSA (Moser et al., 1990); y NAP-2, liberado por las plaquetas activadas (Walz et al., 1989).

Aunque no están relacionados estructuralmente y actúan vía distintos

receptores, estos agonistas quimiotácticos inician de la misma manera la transducción de la señal y desencadenan el burst respiratorio por mecanismos similares. Sin embargo, la magnitud y duración de la respuesta varía considerablemente, sugiriendo diferentes procesos de regulación. La intensidad de la respuesta para un agonista está relacionada con el número de receptores ocupados. Por ejemplo: con los N-Formil péptidos se alcanzan las máximas tasas de producción de superóxido cuando están ocupados aproximadamente el 10% de los receptores (Sklar et al., 1985).

Los PMNs humanos tienen unas proteínas de unión a GTP con una subunidad α específica lipofílica que parece tener importancia en dicha activación (Buss et al., 1987; Jones et al., 1990; Sternweis, 1986). Estas proteínas G han sido implicadas en la activación de la NADPH oxidasa (Curnutte et al., 1979; Nasmith et al., 1989). Tras la interacción receptor-ligando y acoplamiento de la proteína G al receptor se activa una fosfolipasa C (Smith et al., 1986) que genera dos segundos mensajeros, 1,4,5-inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 es liberado al citosol y se une a receptores específicos de organelas intracelulares que almacenan calcio, induciendo su liberación y aumentando así el calcio citosólico libre (Volpe et al., 1988) mientras que el DAG permanece unido a la membrana y activa la protein kinasa C (Billah et al., 1989). No está claro si las variaciones de los niveles de calcio influyen en la activación del burst, pero no son esenciales puesto que la respuesta puede ser inducida en ausencia de calcio libre extracelular (Pozzan et al., 1983). En los PMNs no se ha observado aumento del calcio libre citosólico tras la estimulación. Sin embargo se obtiene una

respuesta oxidativa cuando la protein kinasa C se estimula por ésteres de forbol o diacilglicerol exógeno (Dewald et al., 1988). La depleción de calcio evita el burst, presumiblemente porque bajo esas condiciones la fosfolipasa C permanece inactiva y no se forma diacilglicerol. Como resumen, estas observaciones indican que pueden estar operando dos distintas secuencias de transducción de señal en la activación del burst respiratorio por agonistas quimiotácticos. Una secuencia es calcio-dependiente y lleva a la activación de la proteín kinasa C; la otra es calcio-independiente y no involucra a la fosfolipasa C o la proteín kinasa C. Los efectos de la depleción de calcio indican que ambas secuencias pueden actuar juntas para inducir el burst.

4.2.8. Mecanismos bactericidas no oxidativos.

La destrucción de los microorganismos depende, además de mecanismos oxidativos, de la liberación de enzimas microbicidas y digestivas y de péptidos citotóxicos. Las enzimas hidrolíticas liberadas como hemos visto en la desgranulación de los PMNs, incrementan el daño microbiano iniciado por los derivados oxigénicos y participan en la ingestión de microorganismos muertos y células huésped dañadas. Serán proteasas como la elastasa y la catepsina-G hidrolizarán proteínas de las envolturas celulares bacterianas mientras que la lisozima degradará los componentes polisacáridos. La BPI, factor que es altamente tóxico para las bacterias Gram-negativas pero no para las Gram-positivas ni para los hongos, puede también neutralizar las endotoxinas, lipopolisacáridos (LPS) tóxicos de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas. La azurocidina es también activa contra las bacterias Gram-negativas y,

en menor grado, contra Gram-positivas y hongos. La lactoferrina secuestra el hierro libre, evitando así el crecimiento de los microorganismos ingeridos que sobrevivan al proceso de destrucción. Así, los mecanismos bacteriostáticos y bactericidas de los PMNs pueden ser de algún modo independientes.

4.2.9. Regulación de la función de los PMNs.

Las actividades de las células inmunitarias están reguladas por un complejo equilibrio de vías contrarreguladoras (y aparentemente redundantes), que son controladas por mediadores humorales o por contacto directo célula a célula. El Sistema Inmunitario no es autónomo: la actividad de sus componentes celulares y humorales está influenciada por mediadores solubles secretados a partir de los sistemas endocrino, nervioso y cardiovascular, así como por aquellos producidos por otras células del propio sistema inmunitario. Estos mediadores incluyen citokinas, hormonas y lípidos bioactivos, muchos de los cuales son secretados en respuesta al estrés. Las células inmunitarias sintetizan y liberan pequeñas cantidades de la mayoría de estos factores que tienen así el potencial para funcionar como sistemas de amplificación autocrinos y paracrinos (Reichlin, 1993). Los procesos microbicidas de los PMNs pueden ser influenciados (tanto positiva como negativamente) por muchos de estos mediadores.

La respuesta de los fagocitos a la activación y la consecuente producción de superóxido y otros derivados reactivos oxigénicos, puede verse aumentada por distintos tipos de pretratamientos o acondicionamientos de las células. Este proceso, llamado estimulación (“priming”), significa la preparación para mejorar la respuesta. Los agentes estimulantes de los fagocitos incluyen endotoxinas

bacterianas, lípidos bioactivos, activadores de la proteína quinasa C, ionóforos y varias citocinas y hormonas. No se sabe mucho el mecanismo de estimulación pero parece que el desarrollo de la respuesta puede ser mediado por diferentes procesos intracelulares. De hecho, entre los agentes enumerados, pueden distinguirse los que inducen el *burst* por ellos mismos (por ejemplo: PAF, ésteres de forbol, diacilgliceroles y ionóforos) de los que no lo hacen como el interferón γ los factores estimulantes de colonias. Otra diferencia está en el tiempo requerido para la estimulación: el PAF y activadores de la proteína quinasa C tienen efecto inmediato sobre PMNs y monocitos, mientras los factores estimulantes de colonias granulocito-macrófago necesitan algunas horas para su estimulación y el interferón γ varios días (Baggioni et al., 1988; Dewald et al., 1984; Thelen et al., 1988).

Los PMNs también interactúan recíprocamente con otras células como células T, células endoteliales y plaquetas, tanto a través de contacto directo célula a célula, como a través de mediadores humorales. Se ha demostrado que un gran número de estos mediadores son potentes agentes de estimulación de los PMNs *in vitro* y algunos *in vivo*. La activación de la cascada del complemento también genera fragmentos que mejoran la fagocitosis (C3b), la quimiotaxis y la actividad microbicida (C5a) (Thelen, Dewald y Baggiolini, 1983).

a) Citocinas:

Se ha demostrado que muchas citocinas, incluyendo factores de crecimiento hematopoyéticos y pirógenos, son potentes agentes de estimulación de los PMNs *in vitro* (Steinbeck y Roth, 1989). Las citocinas son proteínas

inmuno-reguladoras producidas y secretadas en diferentes combinaciones y en diferentes cantidades por la mayoría de células inmunitarias, incluyendo macrófagos, PMNs y linfocitos (Lloyd y Oppenheim, 1992; Nicola, 1989). Tienen poderosas y múltiples acciones que se superponen (pleiotrópicas) sobre las células diana y pueden actuar de forma concentración-dependiente para amplificar o disminuir todas las respuestas del sistema inmunitario. Algunas citokinas también interaccionan para producir amplificaciones por adición o sinergismo de las respuestas inmunes.

Se conocen varias citokinas que actúan estimulando los PMNs. Entre las que actúan sobre los precursores celulares mieloides, IL-3 y factores estimulantes de colonia granulocito-macrófago, sólo las últimas actúan sobre los PMNs maduros y los estimulan para producir una potente respuesta de burst a los péptidos quimiotácticos y fagocitosis. Las citokinas inflamatorias clásicas, IL-1 α y 1 β y TNF- α también estimulan a los PMNs para producir burst. A diferencia de la IL-1, el TNF- α induce directamente la formación de O₂⁻ y H₂O₂.

b) Hormonas neuroendocrinas:

En la inmunorregulación están involucradas las principales hormonas de estrés, tanto a nivel sistémico como a nivel local. La hormona del crecimiento y la prolactina son agentes inmunopotenciadores. Los glucocorticoides y los opiáceos pueden mejorar algunas respuestas inmunes a muy bajas concentraciones, pero son generalmente considerados como inmunosupresores (Ader, Felten y Cohen, 1990). Las interacciones bidireccionales de citokinas y neurotransmisores con neuronas y células inmunes, proporcionan medios de comunicación química entre

los sistemas neuroendocrino e inmunitario. Las concentraciones plasmáticas de estas hormonas fluctúan a lo largo del día debido a su secreción pulsátil y el rápido aclaramiento metabólico, estando ambos parcialmente regulados por retroalimentación negativa (Ader, Felten y Cohen, 1990).

4.2.10. Actividad de los PMNs y daño tisular.

Hemos comentado cómo los PMNs, siendo esenciales para la defensa del huésped, han sido también implicados en la patología de muchas condiciones inflamatorias crónicas y en el daño por isquemia-reperfusión (Smith, 1994; Weiss, 1989). En los fluidos aislados de los sitios de inflamación se pueden detectar enzimas hidrolíticas de origen neutrofílico e inhibidores de proteasas inactivados oxidativamente (Weiss, 1989). El daño tisular del huésped se puede producir por varios mecanismos independientes: activación prematura durante la migración; liberación extracelular de productos microbicidas durante la destrucción de algunos microorganismos; eliminación de células infectadas o dañadas y de restos celulares, afectando a otras células en el proceso de remodelación del tejido, etc.

El daño por isquemia-reperfusión está asociado a un flujo de PMNs hacia los tejidos afectados y su subsecuente activación. Puede ser desencadenado por sustancias liberadas por las células del huésped dañadas o como consecuencia de la generación de superóxido a través de la xantina oxidasa (Smith, 1994). El superóxido también es la señal para el reclutamiento de PMNs adicionales al sitio afectado y la isquemia puede ser mantenida por la obstrucción de los capilares por agregados de PMNs activados (McCord, 1987). Podemos encontrar un buen

ejemplo de la paradoja de los PMNs en los enfermos con Síndrome del Distrés Respiratorio del Adulto (Smith, 1994). Aunque los PMNs activados dañan el tejido pulmonar, muchos individuos afectados mueren por infecciones pulmonares. El mecanismo puede involucrar al agotamiento de la capacidad microbicida de los PMNs como resultado de estar manteniendo la respuesta inflamatoria, lo cual, a su vez, impide la consiguiente respuesta a los agentes infecciosos.

5. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS EN EL EJERCICIO FÍSICO.

5.1. Introducción a la Inmunología del ejercicio.

Es evidente el beneficio que el ejercicio físico supone sobre prácticamente todos los aspectos de la salud y existe la creencia generalizada de que “ejercicio regular y desarrollo de la forma física hacen al individuo más sano”. Con respecto a la relación con la inmunidad, los primeros estudios publicados están fechados en los años 20 (Bailey, 1925; Nicholls y Spaeth, 1922; Oppenheimer y Spaeth, 1922), y sin embargo aún existen aspectos poco claros en cuanto a la influencia del ejercicio sobre el Sistema Inmunitario.

Por lo general, se opina que el ejercicio físico adecuado incrementa las funciones inmunológicas y que el ejercicio moderado y practicado de forma regular potencia la resistencia a las infecciones y al crecimiento de tumores inducidos experimentalmente en animales (Mackinnon y Tomasi, 1986; Simon, 1984). Sin embargo, algunos estudios han asociado el ejercicio extenuante a una mayor susceptibilidad a infecciones y tumores experimentales, principalmente

infecciones víricas del tracto respiratorio superior (IRS), durante el entrenamiento intensivo, época de competiciones y, sobre todo, en el sobreentrenamiento. Del mismo modo, la práctica de actividad física intensa durante el transcurso de una infección se ha asociado a un aumento de la gravedad de ésta (Horstmann,1950; Weinstein, 1973). Estos efectos negativos del ejercicio parecen estar en relación, principalmente, con el volumen y la intensidad del ejercicio realizado, aunque otros factores importantes son duración, frecuencia, características metabólicas (ejercicio aerobio o anaerobio), estado inmunitario, estado previo de forma física o grado de entrenamiento del sujeto. (Heath et al., 1991; Nieman et al., 1989; Peters y Bateman, 1983; Peters et al., 1993). El entrenamiento moderado y la participación en eventos más cortos y no-competitivos, no parece alterar la incidencia de IRS (Nieman, Johansen y Lee, 1989; Nieman et al., 1990). Aunque en la actualidad se están realizando más estudios controlados, el mecanismo de las alteraciones del sistema inmunitario inducidas por el ejercicio no está aún bien definido, pero lo que sí está claro es que el ejercicio es, de alguna manera, un regulador de la función inmunológica.

Aunque los incrementos en los contajes de leucocitos circulantes inducidos por el ejercicio fueron publicados por primera vez a principios de este siglo, ha sido recientemente cuando se han estudiado las potenciales alteraciones funcionales. En general, la intensidad y duración de un episodio aislado de ejercicio parecen dictar la magnitud y dirección de los cambios en los contajes y porcentajes de los leucocitos circulantes en sangre. Este es también el caso de la función, aunque las alteraciones funcionales no estén necesariamente relacionadas

con los cambios numéricos (Smith, 1995).

5.2. Modelos de relación entre ejercicio físico y alteración inmunitaria.

Se han propuesto tres modelos para explicar la relación entre ejercicio regular y susceptibilidad a la infección, tanto entre la población general como entre los deportistas. Estas tres hipótesis se centran en diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria al ejercicio, siendo por tanto compatibles y no excluyentes entre sí.

Nieman y Nehlsen-Cannarella (1992) proponen un modelo “*en forma de J*” para describir la relación entre la cantidad de ejercicio y la incidencia de IRS. Sugiere que los sujetos que se ejercitan moderadamente presentan una menor incidencia de IRS comparada con la población sedentaria; por el contrario, los atletas que llevan un entrenamiento extenuante sufrirían un incremento de la incidencia de infecciones. Aunque este modelo es consistente con los datos existentes de estudios epidemiológicos realizados en corredores, se necesitan más trabajos para confirmar el modelo en otro tipo de deportistas, así como para definir más claramente la “cantidad” de actividad física que se requiere en cada categoría (sedentaria, moderada, intensiva) y para explicar los mecanismos involucrados.

Pedersen y Ullum (1994) sugieren una hipótesis de “*ventana abierta*” para describir el periodo de tiempo tras un ejercicio intensivo durante el cual el atleta está en mayor riesgo de infección. Según este modelo, el ejercicio moderado estimula la función inmune durante un corto periodo tras el ejercicio. En cambio, el ejercicio extenuante induce una inicial estimulación seguida de una supresión

de mayor duración (horas); sería durante esta “ventana abierta” de depresión inmunitaria cuando el atleta tendría un mayor riesgo de contraer la infección. Debido a que los deportistas de élite entrenan intensivamente al menos una vez al día, es posible que una significativa cantidad de su tiempo se incluya en este periodo de supresión inmune.

Smith y Weidemann (1990) proponen un *modelo neuroendocrino* para explicar la respuesta inmune al ejercicio de variable intensidad. Proponen la liberación, durante el ejercicio, de hormonas inmunomoduladoras que combinan su acción inmunoestimulante o inmunosupresora dependiendo de la intensidad del ejercicio. El ejercicio moderado induce la liberación de hormonas inmunoestimulantes, como hormona de crecimiento, prolactina y endorfinas / encefalinas, así como de citokinas estimulantes. Sin embargo, a medida que la intensidad de ejercicio incrementa por encima de un umbral crítico, se activa el sector inmunosupresor del eje hipotalámico-hipofisario, liberando hormonas inmunosupresoras como las catecolaminas, el cortisol y la ACTH. Este modelo da una explicación fisiológica para la relación observada entre la intensidad y/o volumen del entrenamiento y la incidencia de IRS.

5.3. Aproximaciones al estudio de la función inmunitaria en el ejercicio físico.

5.3.1. Estudios transversales.

Este tipo de aproximación ha permitido comparar las variables inmunitarias de deportistas en reposo o tras ejercicio, tanto respecto a referentes clínicos como respecto a valores obtenidos de sujetos control no-deportistas equivalentes. Varios estudios presentaron, en atletas, niveles por debajo de lo

normal de ciertos parámetros inmunes como factores del complemento (Nieman et al., 1989), IgA secretora (Gleeson et al., 1995; Tomasi et al., 1982), algunas subclases de inmunoglobulinas séricas (Gleeson et al., 1995; Gmunder et al., 1990) y actividad oxidativa de los PMNs (Pyne et al., 1995; Smith et al., 1990). Sin embargo, se observa una gran variabilidad en muchos de los parámetros inmunitarios y no está claro si estos valores inferiores reflejan diferencias reales debidas al ejercicio o si son diferencias inherentes individuales.

5.3.2. Estudios longitudinales.

Este tipo de estudios se centra en las respuestas aguda y crónica (es decir, entrenamiento) al ejercicio, tomadas a varios tiempos, en atletas en temporada de competición. Así puede analizarse cómo el sistema inmunitario responde al ejercicio a corto y largo plazos y estimar los posibles mecanismos involucrados. Sin embargo, no todos los estudios han incluido controles apropiados para tomar en cuenta posibles variaciones diurnas y estacionales. Además pueden escapar otras variables, como el estrés psicológico, el efecto de los viajes y los cambios en los regímenes de entrenamiento.

5.3.3. Estudios en condiciones de sobreentrenamiento.

Para obtener resultados óptimos en cualquier deporte es importante mantener un adecuado balance entre entrenamiento y recuperación. Los deportistas de élite requieren altos volúmenes de entrenamiento y se entrenan duramente para adaptarse a entrenamientos cada vez más duros. Cuando el ejercicio severo y el desequilibrio en la homeostasis que éste conlleva, no se acompañan de una adecuada recuperación, el atleta puede sufrir un síndrome de

sobreentrenamiento (Virus, 1994). También en estos modelos se han estudiado las respuestas inmunitarias, en un intento de comprender la relación entre sobreentrenamiento y susceptibilidad a la infección en atletas (Lehmann et al., 1991; Mackinnon y Hooper, 1996; Pyne et al., 1995). Con esta investigación es posible controlar el volumen y la intensidad del entrenamiento, pero no todos los deportistas responden igual al entrenamiento más intenso y, hasta el momento, todos los intentos de identificar parámetros realmente específicos y sensibles de sobreentrenamiento han fracasado (Gabriel et al., 1998; Hooper et al., 1995).

Aunque parece no haber ningún enfoque ideal, combinando los datos de todos los estudios es posible ir avanzando en la comprensión de las respuestas inmunes de los atletas al ejercicio de entrenamiento y competición.

5.4. Parámetros inmunitarios en deportistas.

5.4.1. Número de leucocitos, distribución celular y proliferación linfocitaria.

En general los deportistas presentan, en reposo, recuentos y distribución de subpoblaciones leucocitarias clínicamente normales (McCarthy y Dale, 1988), aunque se ha sugerido que los que están sometidos a entrenamiento intenso pueden tener recuentos leucocitarios y linfocitarios en reposo en el límite inferior de la normalidad, pues parece que los recuentos leucocitarios en reposo disminuyen progresivamente tras un periodo de entrenamiento intenso o sobreentrenamiento (Lehmann et al., 1991). Sin embargo, Hooper y Mackinnon (1995), no encontraron cambios durante una temporada de competición de seis meses en nadadores de élite, en el número de leucocitos y linfocitos, excepto un incremento en los PMNs antes de la competición principal y sólo en los nadadores

que presentaban síntomas de sobreentrenamiento.

Los episodios agudos de ejercicio sí parecen provocar cambios en el número de leucocitos circulantes y en la distribución de sus subpoblaciones y, a veces, en la capacidad de los linfocitos de proliferar en respuesta a antígenos (Eskola et al., 1978). Durante y después del ejercicio se observa leucocitosis. El número de leucocitos circulantes puede aumentar en cuatro o cinco veces durante y después del ejercicio intenso y permanecer elevado hasta veinticuatro horas después. La magnitud de este incremento suele ser relativo a intensidad y duración (Fry et al., 1992; McCarthy y Dale, 1988). La leucocitosis es debida tanto al aumento de los PMNs como de los linfocitos y en menor grado al número de monocitos.

En el caso del ejercicio intenso se produce una respuesta bifásica: inmediatamente al ejercicio aumenta el número de leucocitos entre un 50-100%. Tras unos 30 min. se produce una caída del número de linfocitos por debajo del 30-50% de los valores pre-ejercicio permaneciendo disminuídos durante 3-6 horas, mientras que se mantiene una marcada y prolongada neutrofilia (Gabriel, Urhausen y Kindermann, 1992; Gabriel et al., 1994). Estas rápidas modificaciones del número de leucocitos sugieren la existencia de alteraciones en la distribución y compartimentación de los leucocitos (Levi et al., 1988). El grado de leucocitosis podría estar relacionado con las diferencias en los niveles de catecolaminas registrados durante el ejercicio. Puesto que las catecolaminas inducen una rápida leucocitosis, los elevados niveles de catecolaminas registrados en el ejercicio máximo pueden provocar una movilización de los leucocitos más rápidamente

que en el ejercicio moderado (Eskola et al., 1978; Robertson et al., 1981).

5.4.2. Linfocitos.

A) Recuento:

Existe controversia respecto a los recuentos de linfocitos tras el ejercicio. Algunas publicaciones hablan de linfocitosis tanto en deportistas bien entrenados tras ejercicio extenuante, como en no entrenados tras ejercicio submáximo (Ahlborg y Ahlborg, 1978; Hedfors et al., 1976; Moorthy y Zimmerman, 1978; Robertson et al., 1981; Steel et al., 1974; Soppi et al., 1982; Yu et al., 1977), mientras que otros grupos no han comprobado dicha linfocitosis (Eskola et al., 1978; Hanson y Flaherty, 1981). Es posible que la elevada variación individual en el número de linfocitos explique, en parte, las diferencias observadas entre estudios. Tal variación inter e intraindividual puede deberse también a las diferentes respuestas hormonales (cortisol, catecolaminas y péptidos opiáceos) al ejercicio, pues estas moléculas son potentes inmunorreguladores. Además, el momento en que se obtienen las muestras sanguíneas es fundamental, puesto que la linfocitosis postejercicio es transitoria, con independencia de duración e intensidad del ejercicio (Ahlborg y Ahlborg, 1970; Robertson et al., 1981; Steel et al., 1974).

B) Distribución de subpoblaciones:

En general, parece que las células T citotóxicas/supresoras (CD3+CD8+) aumentan entre un 50-100% después de ejercicio intenso, mientras que las T colaboradoras/inductoras (CD3+CD4+) y las células B (CD19+) se ven poco afectadas, disminuyendo la proporción entre células T cooperadoras y supresoras

(CD4+/CD8+)(Edwards et al., 1984; Fry et al., 1992; Landmann et al., 1984).

C) Respuesta a la activación mitogénica in vitro:

Se han descrito efectos significativos sobre la respuesta proliferativa de linfocitos a la estimulación mitogénica tras el ejercicio (Green et al., 1981). El ejercicio máximo produce disminución de la respuesta proliferativa linfocitaria a los mitógenos de células T fitohemaglutinina (PHA) y concavalina A (Con A) en linfocitos de corredores entrenados, disminución que no se produce, en los mismos deportistas, tras un ejercicio submáximo (Eskola et al., 1978). En sujetos no entrenados disminuyen las respuestas a PWM, PHA y Con A tras un ejercicio submáximo (Hedfors et al., 1976). El hecho de que el ejercicio altere la capacidad proliferativa linfocitaria sugiere que un único episodio de ejercicio podría producir un efecto de larga duración (días) sobre la función inmunitaria. Así, en los deportistas podría existir una supresión crónica de la capacidad de los linfocitos para proliferar en respuesta a ciertos estímulos.

5.4.3. Células Natural Killer (NK).

Las células NK son una subpoblación de células mononucleares, también denominadas linfocitos grandes granulares, con fenotipo CD3-CD16+CD56+. Las células NK pueden reconocer y destruir células infectadas por virus, células tumorales y algunos microorganismos sin exposición previa. Son, por tanto, importantes en la defensa del huésped contra el crecimiento tumoral y la infección vírica. En reposo, el número y la actividad citotóxica NK de los deportistas parece normal o levemente aumentado (Mackinnon, 1989; Nieman et al., 1995). Se ha publicado una disminución del número de células NK circulantes durante los

periodos de entrenamiento en nadadores de élite (Gleeson et al. 1995), pero no está claro si esto resultó en alteraciones de la actividad citotóxica. En general se ha visto un aumento de dicha actividad después del ejercicio, tanto moderado como máximo (Kappel et al., 1992; Mackinnon et al., 1988; Nieman et al., 1993), volviendo a niveles basales tras una hora del ejercicio breve, pero se mantiene suprimida entre una y seis horas tras ejercicio más intenso (Kappel et al., 1992; Mackinnon et al., 1988; Nieman et al., 1993; Pedersen et al., 1989). Está en debate si esta disminución representa una verdadera supresión de la actividad o si es debida a una redistribución de las subpoblaciones de linfocitos circulantes en el ejercicio (Kappel et al., 1992; Mackinnon et al., 1992; Nieman et al., 1993).

5.4.4. Moléculas de adhesión.

Trabajos recientes indican que, en comparación con los linfocitos T y B, las células que expresan alta densidad de moléculas de adhesión (por ejemplo LFA-1), tales como células NK y monocitos son las más rápidamente movilizadas a la circulación: entran en la circulación más rápidamente y en números más altos durante un ejercicio intenso, y salen más rápidamente después (Gabriel et al., 1991, 1992 y 1994). Esto sugiere que los cambios en los números de células circulantes están mediados por las moléculas de adhesión. Como ejemplos, la activación de las moléculas de adhesión por citokinas y el aumento de la temperatura corporal mejoran la adherencia de las células al endotelio vascular y como consecuencia su entrada a los sitios de inflamación, presumiblemente músculo esquelético (Gabriel, 1994) y en corredores de fondo la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en los monocitos aumentó progresivamente con la

intensidad y volumen de entrenamiento, con los niveles más altos durante la alta competición (Baum, Liesen y Enneper, 1994). También se ha comprobado el aumento de la expresión de los receptores para C3bi (CR₃ ó CD11b) en los leucocitos.

5.4.5. Inmunoglobulinas.

Varios estudios han presentado concentraciones séricas clínicamente normales en los deportistas (Green et al., 1981; Heath et al., 1991), pero en otros estudios, se obtuvieron niveles más bajos de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM en los deportistas respecto a sujetos control (Gleeson et al., 1995).

En general los niveles séricos de Ig disminuyen ligeramente (<20%) o no cambian tras el ejercicio agudo (Sawka et al., 1989) pero sí parecen existir cambios en la Ig secretoras durante el ejercicio y los periodos de entrenamiento intensivo: Se han descrito niveles bajos de IgA salivar tras breves intervalos de ejercicio (Mackinnon y Jenkins, 1993), ejercicio intenso prolongado (Gleeson, 1995) y durante periodos competitivos en deportistas de élite (Tomasi et al., 1982) e incluso se han publicado estudios sobre la disminución transitoria de la IgA de la leche materna tras episodios de ejercicio máximo (Gregory et al., 1997). Se ha sugerido que la intensidad del ejercicio puede ser un factor importante en la respuesta de la IgA, pues parece disminuir más después de ejercicio intenso (Mackinnon y Jenkins, 1993) que de ejercicio moderado (McDowell et al., 1991; Mackinnon y Hooper, 1994).

5.4.6. Citokinas.

Los niveles plasmáticos de citokinas sólo cambian ligeramente durante el

ejercicio, aunque se ha determinado un aumento de la excreción urinaria tras ejercicio intenso (Northoff, Weinstock y Berg, 1994). Sprenger et al. (1992) describieron incrementos de IL-6 e IL-1 β y receptores solubles de IL-2 e IL-6 en plasma y de Interferón- γ (IFN γ) y TNF α urinarios. En general, el ejercicio moderado provoca pequeños cambios mientras que el ejercicio extenuante se asocia a grandes incrementos de la excreción urinaria de la mayoría de las citokinas, y a una disminución de la producción *in vitro* de citokinas (Northoff, Weinstock y Berg, 1994). Sin embargo y aunque se han detectado pruebas recientes consistentes con la modulación de la producción de citokinas por el ejercicio severo, no existe correlación directa entre los cambios en la citokinas y las alteraciones de la función inmune en los deportistas. Es posible que el aumento de la aparición de citokinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF α refleje una respuesta inflamatoria aguda al ejercicio extenuante.

5.4.7. Otros factores necesarios para el Sistema Inmunitario.

Se ha propuesto recientemente que el ejercicio intenso regular como el que realizan los deportistas de élite pueden deplecionar sustancias específicas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema inmunitario como la glutamina o la vitamina C (Parry-Billings et al., 1992; Peters et al, 1993) a través del aumento de la excreción y del recambio. Parece que los niveles bajos de vitamina C pueden reducir la actividad antioxidante plasmática alterando la quimiotaxis leucocitaria.

6. EJERCICIO Y PMNs.

6.1. Cambios inducidos por el ejercicio en el número de PMNs circulantes.

Linfocitos y PMNs contribuyen conjuntamente a la leucocitosis inducida por máximo y submáximo ejercicio. En general, cuando la intensidad del ejercicio excede el 60% del consumo máximo de O₂ (VO₂ max.) se activa la liberación de cortisol, que hace predominar la neutrofilia, aunque este umbral puede ser más bajo si la carga de trabajo es de larga duración (McCarthy y Dale, 1988). La movilización a la circulación desde los acervos marginales de todos los tipos leucocitarios es desencadenada por el ejercicio máximo tanto en sujetos entrenados como en no-entrenados, mientras que episodios de ejercicio submáximo realizados de forma crónica incrementan la movilización de los PMNs con preferencia a los linfocitos (Ferry et al., 1990).

6.2. Cambios inducidos por el ejercicio en la funcionalidad de los PMNs circulantes.

Mientras que se han realizado muchos estudios funcionales con linfocitos y células NK aislados, sólo recientemente se han utilizado PMNs para este tipo de estudios (Smith y Weidemann, 1993; Smith, 1995), aunque con resultados algo conflictivos. Por ejemplo, en respuesta a un simple test de ejercicio, la capacidad microbicida de las células puede cambiar en una dirección, y sin embargo, otra función como la fagocitosis puede cambiar en la dirección contraria (Smith, 1997).

En general, los episodios aislados de ejercicio tienen efectos dependientes

de la intensidad sobre ciertas funciones neutrofilicas. Existe abundante bibliografía sobre los efectos del ejercicio de moderada intensidad sobre dichas funciones. Se han publicado incrementos en las capacidades de quimiotaxis, de fagocitosis y de destrucción de microorganismos de los PMNs de sujetos no entrenados (Smith et al., 1992), aunque sobre ésta última existe controversia, pues algunos autores no detectaron cambios en la actividad microbicida sobre *Candida albicans in vitro* respecto a los valores pre-ejercicio (Ortega, Barriga y De la Fuente, 1993). Se han observado incrementos claramente dependientes de la intensidad del ejercicio en la expresión de los receptores para el fragmento C3bi del complemento (CR3 o CD11b), así como en la liberación a la circulación de mayores cantidades de elastasa. También se han publicado estudios sobre incrementos temporales, aunque con grandes variaciones interindividuales, de la actividad específica de producción intracelular de H₂O₂ y HOCl en PMNs estimulados con zimosan opsonizado (OZ) (Smith et al., 1990) y en respuesta a la estimulación con PMA.

Respecto a la duración del ejercicio, la actividad microbicida de los PMNs no parece cambiar tras un ejercicio breve (menos de 30 minutos) (Lewicki et al., 1987), pero puede aumentar hasta 6 horas después de un ejercicio prolongado (60 minutos) tanto en sujetos entrenados como no entrenados (Smith et al., 1990).

En cuanto al ejercicio más severo, estudios sobre PMNs de deportistas entrenados presentaron una actividad respiratoria más baja tanto en reposo como después del ejercicio, en comparación con las células de individuos no entrenados

(Lewicki et al., 1987; Smith et al., 1990). Estudios más recientes (Baum, Liesen y Eneper, 1994; Hack et al., 1994; Pyne et al., 1995) confirman estos datos y hablan de la supresión de determinadas actividades de los neutrófilos de atletas durante carreras más largas y severas, en comparación con los de entrenamiento moderado. Por ejemplo, Pyne y su grupo mostraron la disminución progresiva de la actividad oxidativa de los PMNs de nadadores de élite durante doce semanas de entrenamiento intensivo, observando los valores más bajos en la fase de máximo entrenamiento y su parcial recuperación en la fase de reposo posterior (Pyne et al., 1995).

Así, y con la excepción de fagocitosis y desgranulación, el ejercicio a máximo esfuerzo generalmente suprime la mayoría de las funciones de los PMNs. En un estudio comparativo entre corredores de fondo, triatletas y controles no entrenados, el ejercicio progresivo hasta el agotamiento duplicó la capacidad fagocítica de los PMNs de muestras tomadas a las 24 horas del ejercicio (Hack et al., 1992 y 1994). Usando un protocolo de ejercicio similar, el grupo de Lewicki encontró un aumento de la actividad fagocítica inmediatamente después del ejercicio pero ningún cambio en la adherencia o en la capacidad bactericida en sujetos desentrenados, mientras que ambas disminuían y no cambiaba la fagocitosis en ciclistas de élite (Lewicki et al., 1987). En ciclistas de resistencia, ejercicio continuo a 110 % del umbral anaeróbico durante unos 20 minutos no alteró la capacidad de los PMNs de fagocitar *E. coli* (Gabriel et al., 1994), aunque una semana después de una carrera de ciclismo de 240 Km., el mismo protocolo de ejercicio, en los mismos sujetos, disminuía en un 37 % la generación de H_2O_2

en células estimuladas con PMA, y no se habían encontrado cambios antes de la carrera (Gabriel et al., 1994). Otros trabajos centrados en la supresión de funciones son los de Smith (Smith et al., 1992) sobre la disminución sustancial de la actividad específica de producción de H_2O_2 y HOCl en PMNs estimulados con OZ tras ciclismo a esfuerzo máximo; la disminución en la quimioluminiscencia estimulada por PMA tras una carrera de 10.000 m., mientras que tras una carrera de 2.000 m. no se observó ningún cambio significativo (Kokot et al., 1988), y la caída en la producción de superóxido en células estimuladas con PMA inmediatamente tras el ejercicio (aunque 1 hora después aumentaba al menos un 20% y permanecía elevada durante 24 horas (Hack et al., 1992 y 1994). En otro estudio, el ejercicio progresivo hasta la extenuación aumentó las respuestas de quimioluminiscencia de los PMNs al OZ, pero este efecto fue abolido por N-acetilcisteína (Huupponen, et al., 1995).

Del mismo modo que los episodios simples de ejercicio exhaustivo, los periodos intensos de entrenamiento deprimen de forma crónica algunas funciones de los PMNs. La intensidad, duración, tipo y regularidad del entrenamiento son factores críticos. Algunas comparaciones entre sujetos entrenados y no entrenados son difíciles de interpretar debido a que los programas de entrenamiento están pobremente descritos. Sin embargo, los efectos del entrenamiento son más consistentes que los cambios referidos tras ejercicio agudo. Al igual que en el ejercicio aislado las actividades quimiotáctica, fagocítica y microbicida parecen mejorar, pero se pueden observar resultados contradictorios según las publicaciones. Por ejemplo: las determinaciones basales de estas tres actividades

fueron significativamente más altas en las células aisladas de jugadores de baloncesto comparando con las células de controles no entrenados (Ortega et al., 1993). En otro grupo de jugadores de baloncesto también fue mayor la capacidad de los PMNs de destruir bacterias y de generar superóxido durante la temporada de competición (Benoni et al., 1995b). El mismo grupo publicó que los PMNs de personas activas presentaban capacidades de adherencia y bactericida más altas, pero más baja generación de superóxido que los sujetos inactivos (Benoni et al., 1995a). Hack y colegas (1994) resumieron que no existían diferencias entre las actividades fagocítica, quimiotáctica y la producción de superóxido de los PMNs aislados de corredores altamente entrenados y de los de controles desentrenados. Aunque la actividad fagocítica no resultó diferente entre ciclistas entrenados y controles desentrenados, Lewicki y colegas (1987) publicaron que la capacidad bactericida neutrofílica era significativamente más baja en los ciclistas antes del ejercicio, y que este efecto del entrenamiento era aún mayor tras una sesión de ejercicio máximo. Smith y cols. encontraron que la capacidad de los PMNs aislados de ciclistas de élite (que entrenan hasta 25 horas / semana) de generar radicales libres después de su estimulación por OZ fue considerablemente más baja que las respuestas de las células de sus equivalentes no entrenados, tanto antes como después del ejercicio (Smith et al., 1990 y 1992).

Estos diferentes efectos del entrenamiento son, presumiblemente, específicos de cada deporte, debido a la diversidad en la intensidad, el volumen y la frecuencia del entrenamiento. Los atletas de resistencia de élite, por ejemplo, llevan un programa de entrenamiento mucho más exigente, en términos de

volumen e intensidad, que los jugadores de baloncesto.

7. EJERCICIO Y ESTRES OXIDATIVO.

7.1. Generación de radicales libres durante el ejercicio físico.

El ejercicio aeróbico extenuante se ha asociado con estrés oxidativo y daño tisular en el organismo. La generación de radicales libres oxigénicos y otras especies reactivas derivadas del oxígeno pueden ser el mecanismo subyacente por el que el ejercicio físico intenso induzca el daño oxidativo. (Alessi, 1993; Davies et al, 1982)

El ejercicio físico severo conlleva un dramático incremento en la captación de oxígeno, tanto por el organismo en su conjunto como, principalmente, por el músculo esquelético. (Jackson, 1985; Reid et al, 1992)

La mayor parte del oxígeno consumido es utilizado en la mitocondria para el metabolismo de sustratos y la producción de adenosina 5'-trifosfato (ATP), y es reducido en último término a agua. Sin embargo, una pequeña fracción de oxígeno (entre 2-5%) es posiblemente convertida, de forma univalente, en varios intermediarios que escapan de la cadena de transporte electrónico, como $O_2\cdot-$, H_2O_2 y $\cdot OH$ (Chance, Sies y Boveris, 1979). El $O_2\cdot-$ y el $\cdot OH$ son radicales libres por definición, porque contienen en su estructura atómica un electrón no apareado, mientras que el H_2O_2 no lo es (Halliwell y Gutteridge, 1985). Cuando se realiza un ejercicio aeróbico prolongado, la producción de radicales libres es excesiva y las reservas antioxidantes del organismo, que son adecuadas en condiciones fisiológicas (Machlin y Bendich, 1987), se ven insuficientes y son

sobrepasadas por los radicales libres, llevando a extenso daño celular y tisular. (Fig. 7: tomada de Giuliani y Cestaro, 1997).

La producción de radicales libres parece ser el mecanismo por el que se producen una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante el ejercicio y que son indicativos de estrés oxidativo (Jenkins, 1988) pero, aunque existen sólidas pruebas de la relación de los radicales libres con el daño celular y tisular inducido por el ejercicio, aún no se ha establecido un enlace directo de la generación de radicales libres con estos procesos. Por eso continúa haciéndose referencia a ellos como daño oxidativo más que como daño por radicales libres.

Aunque la implicación de los radicales libres oxigénicos en el daño tisular en el ejercicio físico apareció en la literatura ya en los años 70 (Dillard et al., 1978), fue el trabajo de Davies y su grupo el primer intento de establecer una relación causal entre la generación de radicales libres y el daño oxidativo celular en ratones (Davies et al., 1982). Mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) demostraron que la producción de radicales libres se intensificaba en músculo de miembro inferior e hígado de ratón tras una carrera extenuante. La producción incrementada de radicales coincidió con alteraciones celulares como peroxidación lipídica, pérdida de la latencia del retículo sarcoplásmico y desacoplamiento mitocondrial. Otro grupo (Jackson et al., 1985) encontró un aumento del 70% en las señales de EPR asociadas con radicales libres en el músculo contráctil estimulado eléctricamente. El grupo de Kumar (Kumar et al., 1992) publicó que un episodio agudo de ejercicio extenuante de resistencia aumentaba la producción de radicales libres en el

miocardio de hembras de ratas albinas. Además, incrementaba la peroxidación lipídica en el miocardio de los animales tras el ejercicio.

Posteriormente se han desarrollado métodos más sencillos para medir los radicales libres producidos durante el ejercicio físico. Por ejemplo, Reid y cols. utilizaron el fluorocromo 2',7'-diclorofluoresceína como sonda intracelular para medir la producción de reactivos oxidantes en el músculo diafragmático en contracción y encontraron que los radicales libres, incluyendo $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , no sólo aumentaban durante la contracción muscular sino que también contribuían a la fatiga del diafragma (Reid et al., 1992). En otro trabajo mediante técnicas de quimioluminiscencia, Jenkins y su grupo demostraron que los niveles tisulares de radicales libres en músculo de miembro inferior de rata, aumentaron significativamente tras la estimulación con hidroperóxido de tert-butilo en animales que corrían hasta extenuarse, comparados con los controles en reposo (Jenkins et al., 1993). La quimioluminiscencia es un biomarcador ampliamente aceptado para la producción de radicales libres celulares (Allen, 1986).

Aunque la cadena respiratoria mitocondrial parece ser la principal fuente de radicales libres durante el ejercicio físico, se han propuesto otras vías como la reacción catalizada por la xantina oxidasa (XO) y la activación de los neutrófilos. La activación de la XO se produce en el citosol y recuerda al mecanismo del daño por isquemia reperfusión (Meydani y Evans, 1993). Los sustratos para esta vía de generación de $O_2^{\cdot-}$, hipoxantina y xantina, pueden derivar de la degradación de nucleótidos de adenina que presumiblemente ocurre durante el ejercicio severo por un desequilibrio entre la síntesis y la utilización de ATP (Sahlin et al., 1991;

Sjodin et al., 1990). De todas formas, en la hipótesis de la generación de radicales libres por XO en el músculo existen pocas pruebas de la isquemia del músculo esquelético durante el ejercicio dinámico y de la activación en el músculo de la vía de la XO. Sin embargo es posible que la generación de radicales libres tenga su papel en el daño muscular post-ejercicio después de realizar un ejercicio isquémico como la contracción isométrica, durante la cual se degrada gran cantidad de nucleótidos de adenina y se acumulan productos de las purinas (Meydani y Evans, 1993; Sjodin et al., 1990).

Es bien conocido que los neutrófilos activados que lleva el torrente sanguíneo producen O_2^- y H_2O_2 cuando son atraídos hacia los miocitos o las células endoteliales del lecho vascular como resultado del daño celular muscular (Meydani y Evans, 1993). Aunque no parece probable que esta vía explique la producción aguda de radicales libres y el estrés oxidativo durante el ejercicio, dado el tiempo requerido para la infiltración neutrofílica, sí puede servir como fuente secundaria importante de producción de radicales libres y contribuir al daño oxidativo durante esfuerzos físicos de resistencia (Zerba et al., 1990).

7.2. Consecuencias del estrés oxidativo relacionado con el ejercicio físico.

7.2.1. Fenómenos de peroxidación lipídica.

A pesar de la limitadas pruebas directas de la generación de radicales libres durante el ejercicio, sí existe abundante literatura que refuerza indirectamente la existencia de un proceso oxidativo a niveles celular y molecular durante el ejercicio aeróbico prolongado, cuando se produce un marcado incremento del consumo de oxígeno.

Cuando los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas son atacados por radicales libres en presencia de oxígeno molecular, se produce una cadena de reacciones peroxidativas que lleva a la formación de hidrocarburos gaseosos, como etano y pentano y aldehidos, como el malondialdehido (MDA) (Halliwell y Gutteridge, 1985). Los productos de la peroxidación lipídica son los marcadores de daño tisular oxidativo durante el ejercicio más frecuentemente estudiados. Dillard y su grupo (1978) fueron los primeros en mostrar un aumento de la concentración de pentano en el gas espirado de humanos tras un ejercicio de larga duración (Dillard et al., 1978). Este hallazgo ha sido confirmado por varios estudios, como el de Kanter, que publicó un aumento de los niveles de pentano espirado proporcional a la carga de trabajo durante un ejercicio de bicicleta (Kanter et al., 1993). Se han encontrado aumentos del contenido en MDA durante el ejercicio en varios tejidos y el grado de peroxidación lipídica también parece depender de la intensidad del ejercicio (Davies et al., 1982; Ji et al., 1992; Kanter et al., 1993; Alessio, 1993).

7.2.2. Cambios en el estado redox celular.

Como fuente principal de tioles no proteicos, el glutatión (γ -glutamilcisteinilglicina) juega un importante papel en el mantenimiento del estado redox celular y la defensa antioxidante (Meister y Anderson, 1983). Se cree que la proporción de glutatión reducido (GSH) versus oxidado (GSSG) in vivo es superior a 100:1, pero los datos experimentales a menudo indican un valor de 10-50:1 debido a la inevitable oxidación de parte del GSH en el proceso de experimentación. Lew y su grupo (Lew et al., 1985) demostraron que el ejercicio

extenuante en ratas aumentaba significativamente los niveles de GSSG y el cociente de GSSG respecto al glutatión total (GSH+GSSG) en plasma, hígado y músculo esquelético. Por su parte, Gohil confirmó un aumento de GSSG sanguíneo y una disminución de GSH durante el ejercicio de resistencia en humanos (Gohil et al., 1988). Ji y cols. hallaron un incremento del contenido de GSSG en las fibras de tipo oxidativo de músculo esquelético después de una carrera prolongada en ratas, incremento que dependió de la intensidad de ejercicio (Ji et al., 1992). En contraste con el ejercicio prolongado, un ejercicio máximo de corta duración tuvo efectos mínimos sobre el GSH sanguíneo (Gohil et al., 1988).

Los anteriores estudios indican que el músculo está sometido a estrés oxidativo durante el ejercicio aeróbico prolongado. Se produce mayor oxidación de GSH a GSSG debida al aumento de la producción de radicales libres, por lo que la capacidad de reciclaje del GSSG está aparentemente limitada por la actividad de la glutatión reductasa, por el suplemento de NADPH, o por ambas.

7.2.3. Niveles de enzimas antioxidantes.

El ejercicio agudo aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y GSH peroxidasa (GPX) en el músculo esquelético, hígado y corazón (Jenkins, 1988; Ji et al., 1992; Ji y Fu, 1992; Ji, 1993). El umbral y magnitud de la activación parecen ser diferentes para cada enzima y tejido (Ji, 1993). Aunque estos hallazgos sean a menudo considerados como una respuesta adaptativa a la acción por radicales libres en los diversos tejidos medidos, no está claro el mecanismo por el que estas enzimas antioxidantes son activadas en un periodo relativamente corto de tiempo durante

el ejercicio. Todavía no hay conocimientos suficientes sobre la cinética o la regulación de estas enzimas en mamíferos. La activación de la molécula enzimática por modificación alostérica o covalente es posible porque la ocupación parcial de algunas enzimas, como SOD y catalasa, por sus sustratos aumenta su actividad catalítica (Chance et al., 1979). La rápida activación de la síntesis de proteínas enzimáticas inducida por el estrés oxidativo mediante la transcripción se ha demostrado en procariotas (Storz et al., 1990), pero no hay pruebas de dicho mecanismo en los tejidos de mamíferos (Harris, 1992).

De acuerdo con el efecto del ejercicio agudo, el entrenamiento crónico también induce enzimas antioxidantes musculares, entre las que la Mn-SOD y la GPX mitocondrial muestran la mayor inducción (Ji, 1993). Los efectos del entrenamiento sobre la catalasa y la Cu,Zn-SOD son conflictivos. En general el entrenamiento no influye en los sistemas enzimáticos antioxidantes de corazón o hígado tanto como en los de músculo esquelético, aunque el entrenamiento intensivo parece aumentar la SOD en el tejido ventricular izquierdo y el grado de inducción depende de la intensidad del entrenamiento (Powers et al, 1993). El efecto diferencial del entrenamiento sobre varias enzimas antioxidantes puede reflejar las localizaciones específicas celulares en las que se producen radicales libres así como la capacidad basal antioxidante de varios tejidos. El músculo esquelético tiene uno de los niveles más bajos de enzimas antioxidantes del organismo, pero el flujo de oxígeno puede aumentarlo durante el ejercicio severo (Meydani y Evans, 1993).

8. CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo (CMF) es, según la definición de Howard Shapiro (1988), un “proceso en el cual células aisladas u otras partículas biológicas pasan, de una en una en el interior de una corriente líquida, a través de un sensor, el cual mide sus características físicas o químicas”. Este método analiza así la medida de la emisión de fluorescencia y dispersión de luz que se inducen al interaccionar las células o partículas microscópicas con el sistema láser, a medida que desfilan, de una en una y arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección compuesto por lentes situadas frontal y perpendicularmente al haz del láser, y que recoge información sobre el tamaño y la consistencia del citoplasma. En algunos sistemas, además, las células o partículas pueden ser separadas físicamente (“Cell sorting”), de acuerdo a las propiedades exhibidas (Melamed et al, 1990; Shapiro, 1995).

La medida de la cantidad de un determinado componente celular o parámetro biológico, se realiza a través de la excitación de fluorocromos naturales o incorporados a la célula, específicos para el parámetro a valorar, que se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. En cada caso deberán establecerse las condiciones óptimas para asegurar que la emisión de fluorescencia sea proporcional a la concentración del componente celular analizado.

De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar una o más estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas

aisladas dentro de una suspensión, a elevada velocidad y de forma secuencial en el tiempo. Los resultados se presentan en forma de histogramas de distribución de la población celular con respecto a los parámetros individuales. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas que aparecen como homogéneas al utilizar otros métodos de análisis (Raadbruch, 1992).

El creciente número de parámetros biológicos analizables y la producción de citómetros de coste accesible, dotados de sistemas informáticos, a la vez de uso relativamente sencillo y de alta capacidad operativa, junto con el desarrollo tecnológico (óptica, electrónica, anticuerpos, fluorocromos) que ha acompañado a la citometría de flujo desde su aparición en los años setenta, ha supuesto una reducción en la complejidad de los instrumentos y una gran expansión en su número y en el rango de aplicaciones, haciendo actualmente de la citometría de flujo una técnica fundamental en muchos campos básicos y clínicos, donde se requiera identificar células o partículas biológicas, caracterizar sus propiedades y respuestas funcionales y, en algunos casos, separarlas físicamente.

De forma general, podemos hablar de varias áreas de aplicación de la citometría de flujo, como son: Rutina clínica, Investigación clínica, Investigación básica, Biotecnología y Ecología. La mayor parte de las aplicaciones actuales pueden ser incluídas entre dichas categorías, pero van abarcando cada vez mayor número de áreas. Así, en el campo de la Inmunología, la Hematología o la Oncología, en las que la citometría de flujo se utiliza fundamentalmente en la rutina clínica, es progresiva su aplicación a la investigación básica. Además, en

aplicaciones desarrolladas en laboratorio (Investigación básica) como Biología molecular y Fisiología celular, se ha incrementado su adaptación a estudios clínicos y biotecnológicos. Por último, es importante resaltar el progreso de la citometría de flujo en el estudio de microorganismos, en el campo de la Biotecnología y la Ecología (Bauer et al., 1993).

8.1. Estructura de un citómetro de flujo.

Los componentes básicos de un citómetro de flujo, que con mayor o menor complejidad técnica, se encuentran en la mayoría de los instrumentos actuales son: (ver Fig. 8)

A) Sistema hidráulico: Rodea la suspensión celular en flujo, con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra, a velocidad constante y controlada, a través de la zona de detección (“cámara de flujo”), donde las células o partículas son expuestas, una a una, al haz iluminador.

B) Sistema de iluminación: Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros utilizan luz láser, por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio.

C) Sistema óptico: Enfoca el haz de luz láser hacia las partículas de la muestra, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso.

D) Sistema electrónico: Proporciona una iluminación de intensidad constante, detecta y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular

(“Cell Sorting”).

E) Sistema de adquisición y análisis de datos: En la mayor parte de los citómetros modernos, es compatible con ordenadores personales y sistemas operativos comunes (plataformas Ms-DOS, Windows y Macintosh). Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo de lista (matrices de datos no correlacionados), así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas. Los datos obtenidos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones. Existen diferentes programas comerciales de apoyo, utilizables en ordenadores independientes y además, recientemente, se dispone de interesantes programas de dominio público recuperables en Internet.

8.2. Características del análisis por citometría de flujo.

En sentido estricto, cualquier citómetro de flujo mide exclusivamente propiedades ópticas, es decir, luz emitida por fluorocromos o dispersada por las partículas en flujo. La conexión entre las propiedades biológicas de interés y los parámetros ópticos detectables se establece con el uso de marcadores fluorescentes.

La correcta aplicación de los marcadores fluorescentes permite detectar y cuantificar sitios estructurales o seguir funciones dinámicas en las células. Sin embargo, algunas funciones o estructuras de interés biológico pueden ser estudiadas sin necesidad de incorporar marcadores fluorescentes exógenos, puesto que se pueden relacionar con la presencia de moléculas fluorescentes endógenas o

con interacciones físicas específicas entre las células y la luz (Watson, 1991).

Los parámetros habituales de la CMF pueden ser estudiados a través de otros métodos analíticos, incluso utilizando los mismos marcadores fluorescentes (p.ej., espectrofluorimetría, microscopía confocal, etc.). Sin embargo, las características técnicas especiales de la citometría permiten obtener un grado de información sobre estos parámetros que es, probablemente, único entre las técnicas actuales de análisis biológico.

9. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS PMNs POR CMF.

9.1. Ventajas de la citometría de flujo.

Actualmente existe gran número de métodos para el estudio de los PMNs, pero las propiedades que éstos presentan en el citómetro hace de la CMF una técnica particularmente útil para la evaluación de su función. Las principales ventajas sobre algunas de las técnicas más convencionales usadas en el estudio de los PMNs son (Robinson y Carter, 1993):

A) La CMF permite seleccionar electrónicamente (análisis acotado) la población de interés sin necesidad de separación física de las células.

En un histograma biparamétrico típico de una muestra de leucocitos en un citómetro convencional, las subpoblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos y PMNs), se visualizan completamente diferenciadas, debido a sus características de tamaño y complejidad estructural, pues la propiedad específica de dispersión de la luz a 90° está relacionada con las propiedades refractarias del núcleo y los gránulos citoplasmáticos.

Podemos ver, gracias a las propiedades de dispersión de luz frontal y lateral, que los PMNs son claramente diferenciables del resto de leucocitos por su granularidad. Esta propiedad ha sido uno de los métodos más fáciles para separar a los PMNs de linfocitos y monocitos. En el estudio de PMNs y monocitos ésta es una ventaja importante sobre las técnicas convencionales por varias razones:

a) Frente a las técnicas separativas convencionales, la manipulación de las muestras es mínima, lo que reduce la posible activación de las vías metabólicas implicadas y la consiguiente activación funcional celular.

b) Se pueden realizar evaluaciones funcionales más rápidamente y en presencia de otras células que pueden servir como controles internos.

c) Pueden analizarse simultáneamente propiedades de otros leucocitos, lo que conlleva una significativa reducción de tiempo y volumen de la muestra.

d) Cuando se utiliza la CMF no se requieren muchas células, por lo que, generalmente, se necesita de cada paciente un volumen más pequeño de sangre u otro tejido.

B) La incorporación del parámetro tiempo al protocolo de análisis permite el estudio cinético de fenómenos relacionados con la activación celular, que suceden rápidamente en el tiempo y que no podrían ser detectados por técnicas convencionales, incluyendo la transmisión de señales mediada por segundos mensajeros como el incremento de Ca^{++} intracelular.

C) La desgranulación del PMN es técnicamente fácil de evidenciar, registrando simplemente señales luminosas, ya que se traduce en una disminución de la dispersión frontal y lateral de la luz láser.

D) La complejidad funcional celular puede ser abordada mediante el análisis multiparamétrico. Una selección adecuada de marcadores fluorescentes permite el estudio simultáneo de distintos parámetros: fagocitosis, muerte bacteriana, moléculas de adhesión, producción de radicales libres, calcio, etc.

E) La CMF discrimina subpoblaciones funcionalmente diferentes. Así, pueden ser evaluadas subpoblaciones que emplean diferentes mecanismos oxidativos bactericidas, lo que es de interés para determinar las alteraciones del metabolismo del oxígeno relacionadas con estados patológicos y anomalías a nivel del receptor específico o de las vías de activación implicadas.

F) El número de células individuales que se requieren para el análisis citométrico, permite:

a) Obtener información sobre mecanismos de daño tisular de importancia en la patogenia de enfermedades y estudiar la interacción entre leucocitos y tejidos valorando la influencia del microambiente tisular en la biología celular en muestras tisulares de tamaño reducido.

b) Obviar el factor limitante de la disponibilidad de la muestra en pacientes pediátricos o en patologías como la enfermedad periodontal.

G) Los datos obtenidos se refieren exclusivamente a la población celular funcional. Las células no viables pueden ser excluidas por procedimientos tan sencillos como la selección negativa de éstas identificándolas por sus alteraciones en la dispersión de luz.

9.2. Métodos citométricos de estudio de los PMNs.

Los métodos citométricos desarrollados hasta el presente permiten la

evaluación de numerosos parámetros de relevancia en el estudio del PMN:

A) Recuentos celulares: Además de la posibilidad de cuantificar cada subpoblación por sus propiedades estructurales de tamaño y granularidad que ya hemos visto, se han propuesto otros métodos para discriminar las diferentes poblaciones celulares por CMF, como el uso de la tinción metacromática con naranja de acridina (AO), útil para determinar, entre otras cosas, recuentos celulares diferenciales al intercalarse entre el DNA, el RNA y los gránulos lisosomiales. Con ello, podemos discriminar exactamente entre linfocitos, monocitos, PMNs y eosinófilos, aunque hay que tener cuidado pues la longitud de onda de la fluorescencia del AO puede ser alterada por cambios del pH.

Otro método en la determinación de contajes celulares diferenciales usando CMF es la actividad esterasa. Por ejemplo, la carboxifluoresceína diacetato (CF-DA) es rápidamente hidrolizada por las esterasas celulares a una molécula mucho más fluorescente, la carboxifluoresceína. Esta técnica proporciona otros medios para la identificación de PMNs, con lo cual, también puede informar sobre el estado metabólico de estas células.

B) Quimiotaxis: Aunque este proceso no puede ser objetivado directamente por CMF, se pueden detectar y cuantificar receptores frente a agentes quimiotácticos mediante anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos, evidenciándose distintos grados de afinidad por el anticuerpo y subpoblaciones que difieren en la expresión de dichos receptores (Teunenberg et al., 1988).

La quimiotaxis precisa de la adhesión celular, que es susceptible de ser cuantificada mediante anticuerpos monoclonales frente a moléculas de adhesión.

Recientemente, esta posibilidad ha incrementado los conocimientos sobre los desórdenes quimiotácticos (Ricevutti et al., 1989; Robinson, 1993). Otra forma de abordar el estudio de las alteraciones quimiotácticas, es evidenciar si un determinado agente quimiotáctico es capaz de provocar determinadas respuestas celulares. Ejemplo de ello sería la estimación de la desgranulación o la respuesta oxidativa producida por fMLP.

C) Motilidad: Existen métodos que permiten la medición de la polimerización de la actina, mediante faloidina fluorescente (Belloc et al., 1990; Malorni et al., 1994).

D) Actividad enzimática: Múltiples enzimas pueden ser analizadas. Habitualmente se determinan fosfatasas y glucuronidasas, mediante derivados del naftol, y esterases que al actuar sobre diclorofluoresceína diacetato (DA-DCF) liberan diclorofluoresceína (DCF). La actividad esterásica detecta las subpoblaciones leucocitarias y valora el estado metabólico (Waggoner, 1990).

E) Viabilidad: Se utilizan fluorocromos, como la fluoresceína diacetato, transportados y retenidos por las células vivas en el interior celular, y yoduro de propidio, que penetra en las células muertas (Aeschbacher, 1988).

F) Potencial de membrana: Utilizando fluorocromos aniónicos, como los derivados de la carboxianina, el potencial de membrana es proporcional a la disminución de fluorescencia consecuencia del desplazamiento del fluorocromo por iones al producirse la activación celular (Korchak et al., 1982).

Si el potencial de membrana se determina con fluorocromos catiónicos como la Rhodamina 123, éste es proporcional al incremento de fluorescencia, ya

que este fluorocromo catiónico es incorporado al interior celular (Robinson, 1993). Dependiendo de la concentración utilizada se realizan determinaciones de potencial de membrana mitocondrial o celular (Juan et al., 1994).

G) Niveles intracelulares de Ca^{++} : El fluorocromo más adecuado es INDO-1 por su diferente emisión de fluorescencia en presencia de Ca^{++} unido a proteínas (395 nm) o Ca^{++} libre (525 nm) y la independencia de la medición de la concentración de fluorocromo (Griffioen, 1989).

H) Fagocitosis: La fagocitosis comprende dos procesos claramente diferenciados, la fijación del microorganismo o partícula y su ingestión. La fijación se produce al unirse los microorganismos a C_3 e IgG (opsonización) e interaccionar éstos con sus receptores. Para valorar la expresión de estos receptores se utilizan los anticuerpos monoclonales

Se han desarrollado métodos de detección de fagocitosis utilizando bacterias, virus e inmunocomplejos marcados con fluorocromos (Bjerknes et al., 1989). Ejemplo de método innovador es el que utiliza células de *Candida* muertas por calor y teñidas con fluoresceína y bromuro de etidio, añadido una vez completada la fagocitosis. Los microorganismos fagocitados se evidencian por la fluorescencia verde y los fijados a la superficie celular por la fluorescencia roja, debido a que el bromuro de etidio no penetra en las células (Fattorossi et al., 1989). Bassoe y colegas también han contribuído significativamente en muchas de las técnicas cuantitativas leucocitarias necesarias para la determinación exacta de la fagocitosis (Bassoe et al., 1983^a, 1983^b, 1984 y 1985).

I) Pinocitosis: Para estudios de pinocitosis se emplea dextrano conjugado con

moléculas fluorescentes. Estos estudios son útiles porque, además, permiten evaluar efectos concomitantes en la célula como cambios de pH y de concentración iónica (Davis et al., 1986).

J) Actividad de sistemas oxidativos: Los marcadores utilizados para evaluar la respuesta oxidativa son precursores reducidos no fluorescentes que se oxidan específicamente por determinados radicales libres, transformándose en moléculas fluorescentes (Robinson, 1993; Rothe y Valet, 1993). Esta respuesta oxidativa puede ser desencadenada por múltiples estímulos, fisiológicos o artificiales, entre los que destacan algunos componentes bacterianos:

a) El péptido N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) es un componente de la pared bacteriana que activa a la célula al interactuar con su receptor situado en la membrana plasmática (Fig. 2).

Como consecuencia cuando el fMLP interactúa con el receptor se activa la fosfolipasa C por medio de una proteína G, y así se convierte el fosfatidilinositoldifosfato en inositoltrifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), señales celulares distintas que conducen a la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares y a la activación de la proteína quinasa C que, a su vez, actúa sobre la NADPH oxidasa, iniciando la respuesta bactericida oxidativa (Belloc et al., 1990; Newburger y Palmer, 1991).

b) El lipopolisacárido (LPS) forma parte del lípido A, componente de la pared de las bacterias Gram(-) y responsable del shock endotóxico. El PMN posee varios receptores para LPS. La unión a un tipo de receptores provoca su detoxificación, mientras que la ocupación de otro tipo de receptores conduce a la activación

celular (Lynn y Golenbock, 1992).

c) El forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) es un análogo del diacilglicerol que activa directamente la proteína kinasa C y, como consecuencia, la fosfolipasa D (Fig. 2) (Rosoff y Cantley, 1991; Belloc et al., 1990; Warren et al., 1990).

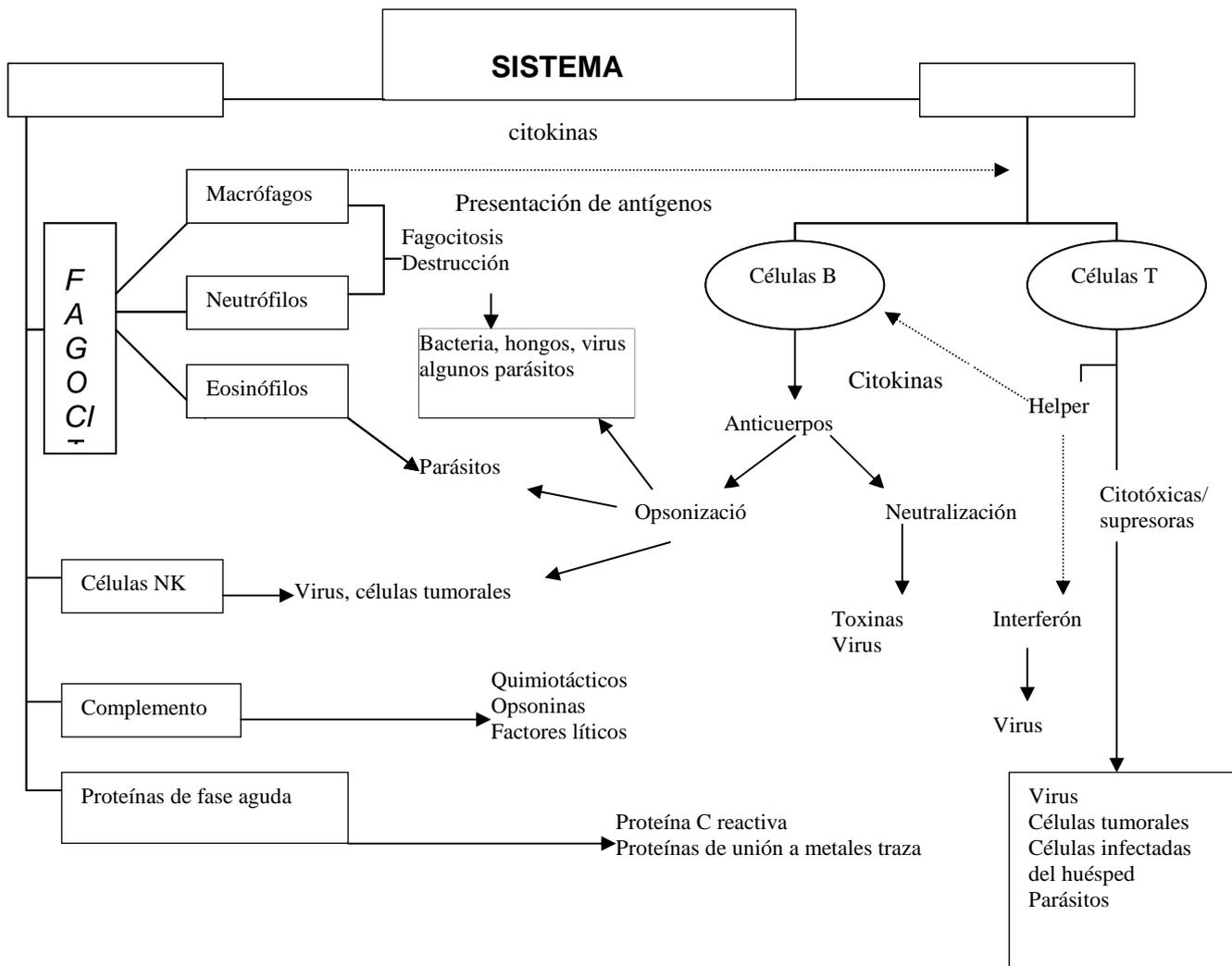


Figura 1. Esquema de las funciones generales y las relaciones entre los componentes del Sistema Inmunitario: Células y señales que interconectan las ramas innata y adaptativa.

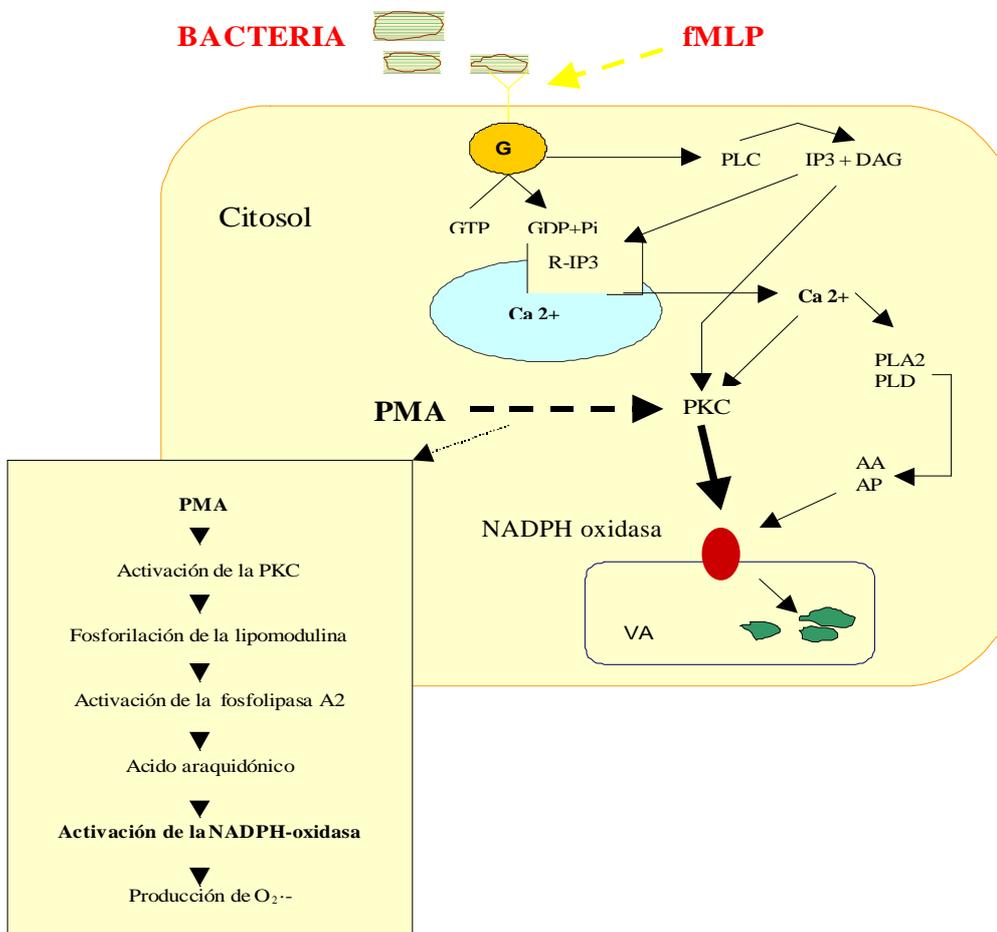


Figura 2. Esquema del mecanismo de activación de la NADPH oxidasa y los sistemas de transducción de señales involucrados. En el mecanismo transitorio, después de la identificación del agente patógeno (bacteria) o la activación por estímulos como el fMLP, por los correspondientes receptores \otimes situados en la membrana plasmática (MP), se produce la activación de una proteína G (G) asociada a R, mediante la hidrólisis del GTP a GDP y Pi. La proteína G activa la fosfolipasa C (PLC) que produce la hidrólisis de determinados lípidos de membrana dando lugar a inositol trifosfato (IP) y diacilglicerol (DAG). El IP3 puede interaccionar con receptores específicos (R-IP3) de los depósitos de calcio intracelulares (Ca²⁺) produciendo la liberación del mismo al citosol. El aumento Ca²⁺ citosólico puede activar dos lipasas más, la fosfolipasa A2 (PLA2) y la fosfolipasa D (PLD), que generan ácido araquidónico (AA) y ácido fosfatídico (AP) respectivamente a partir de lípidos de membrana. AA y AP activan la NADPH oxidasa. En el mecanismo sostenido, DAG y Ca²⁺ pueden activar la proteína Kinasa C (PKC), que en el concurso de otros factores citosólicos o por medio de mecanismos como la activación por PMA, puede activar la NADPH oxidasa en la membrana de la vacuola autofágica (VA) como muestra el esquema insertado.

	CD11a/CD18	CD11b/CD18	CD11c/CD18	CD11d/CD18
	$\alpha_L\beta_2$	$\beta_M\beta_2$	$\alpha_X\beta_2$	$\alpha_D\beta_2$
Otros nombres	LFA-1	Mac-1, Mo-1, receptor para C3bi, CR3	p150,95 CR4	
Distribución celular	Todos los leucocitos, (especialmente linfocitos)	Granulocitos (especialmente neutrófilos), Monocito-macrófagos, Células NK	Granulocitos, Monocito-macrófagos, Celulas NK células B	Monocitos y macrófagos

Ligandos	CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD50 (ICAM-3), ICAM-4,	ICAMs-1,2 y 3, C3bi, fibrinógeno,	ICAM-1?, C3bi, fibrinógeno	ICAM-3
	ICAM-5	lípidos IVa del lipopolisacárido (LPS), kininógeno, factor X de la coagulación		

Tabla 1. Subunidades que constituyen el complejo CD11/CD18 de la familia Integrinas $\beta 2$ de las moléculas de adhesión, su distribución celular y los ligandos a los que se unen.

	RODAMIENTO	ACTIVACION	ADHESION FIRME	MIGRACION TRANSENDOTELIAL (EXTRAVASACION)
<p>LEUCOCITOS</p> <p>ENDOTELIO</p>	<p>CD15s CD62L</p> <p>Selectinas</p> <p>CD62P CD62E</p> <p>Diriginas CD34 MadCAM-1 GlyCAM-1</p>	<p><i>Citoquinas, quimiocinas y</i></p> <p>Quimiocinas (IL-8...) CD62E Inmunoglobulinas CD54 CD102</p>	<p>Integrinas $\beta 2$ $\beta 7$</p> <p>Inmunoglobulinas CD54 CD102 CD106(VCAM-1)</p> <p>Diriginas MadCAM-1</p>	<p>Integrinas β</p> <p>Inmunoglobulinas CD54 CD102</p>
TEJIDO	Histamina Trombina Oxidantes Leucotrienos Citocinas (IL1, TNF α) Quimiocinas	Citocinas (GM-CSF, IL5,...) Quimiocinas (IL8...) Quimioatrayentes (C5a...)	Citocinas (TNF α , IL1, IFN γ , IL4)	IL8,... C5a,...

Figura 4. Esquema de implicación de las moléculas de adhesión en los procesos migratorios de los leucocitos.

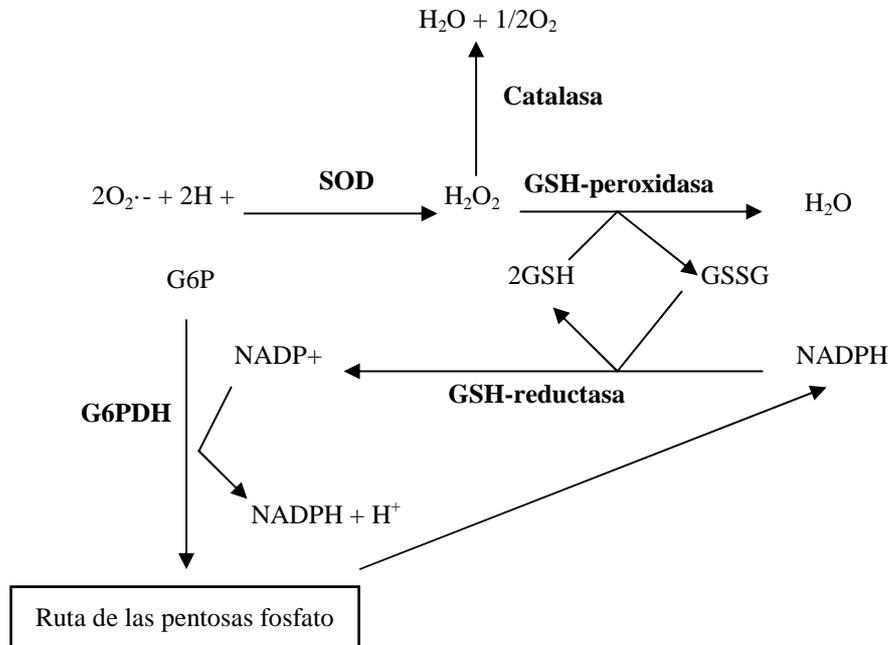


Figura 6 : Interrelación entre los distintos sistemas antioxidantes . La figura ilustra esquemáticamente las distintas etapas que participan en la eliminación de radicales libres del oxígeno y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En una primera etapa la superóxido dismutasa (SOD) se encarga de la eliminación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). El H_2O_2 resultante de esta reacción puede ser eliminado, bien por la catalasa o bien por la GSH-Prx. El glutatión oxidado (GSSG) resultante de esta reacción puede ser reducido (GSH) de nuevo por la acción de la glutatión-reductasa, que utiliza el poder reductor del NADPH proporcionado principalmente por la ruta metabólica de las pentosas-fosfato. Abreviaturas utilizadas: G6P glucosa-6-fosfato, G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

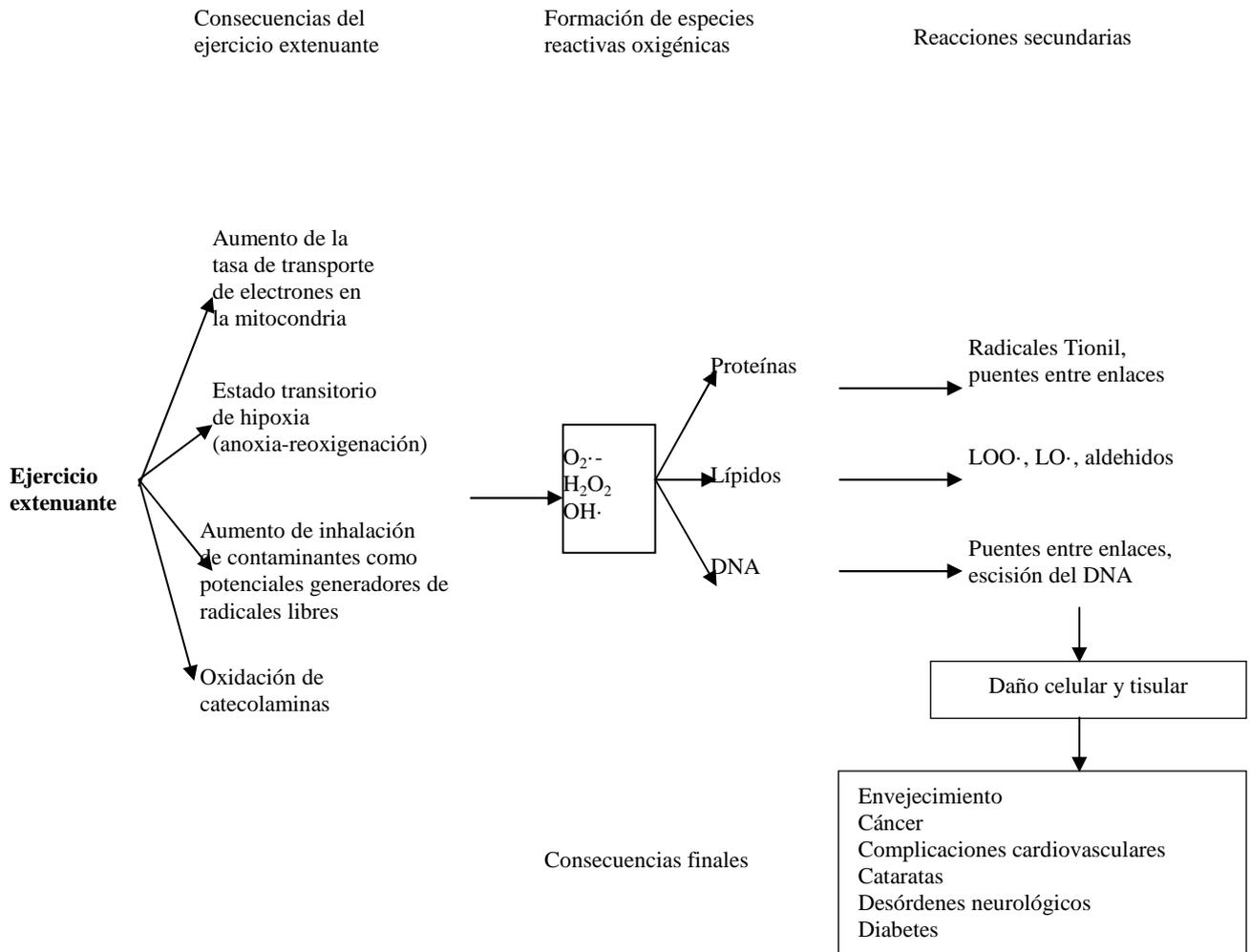


Figura 7. Esquema de la implicación de los radicales libres en los efectos del ejercicio extenuante. La figura muestra los aspectos metabólicos, celulares y tisulares que participan, y las consecuencias que se producen a corto y largo plazo.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar la utilidad de los granulocitos de sangre periférica como célula diana para el desarrollo de modelos de alteración funcional *in vitro*, que pudieran ser aplicados a la detección de efectos tóxicos, así como al estudio de los mecanismos funcionales implicados en situaciones fisiopatológicas que afecten al Sistema Inmunitario.
2. Aplicar la capacidad analítica de la citometría de flujo multiparamétrica para el análisis funcional de los granulocitos y la comparación de sus respuestas con la de otras células inmunitarias en los modelos de toxicidad a desarrollar.
3. Aplicar los aspectos metodológicos desarrollados al estudio del posible papel del estrés oxidativo en las alteraciones funcionales inducidas en los granulocitos y otras células inmunitarias por el ejercicio físico de alta intensidad.

Los objetivos planteados se han abordado a través de un estudio integrado, mediante citometría de flujo, de los efectos inducidos *in vivo* en la distribución, estado de activación, respuesta mitogénica y generación de especies reactivas de oxígeno en las diferentes subpoblaciones leucocitarias tras un esfuerzo físico de alta intensidad, determinados en leucocitos de sangre periférica de individuos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. El posible papel del estrés oxidativo en las alteraciones funcionales de los granulocitos observadas *in vivo* se ha estudiado utilizando la citometría de flujo multiparamétrica en un modelo *in vitro* de exposición controlada a concentraciones subletales de agentes prooxidantes, como el peróxido de hidrógeno y el peróxido de tert-butilo. En este

modelo se ha podido evaluar de forma simultánea la respuesta de los granulocitos y de los monocitos, células implicadas de forma esencial y, hasta cierto punto, comparable en los fenómenos de generación de especies oxidativas en condiciones fisiológicas o patológicas.

Los estudios citométricos sobre el modelo *in vitro* han abordado fundamentalmente los fenómenos de expresión de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas, en condiciones basales y tras estimulación quimiotáctica o activación de la protein kinasa C, por la especial relevancia de dichas moléculas en la funcionalidad de los granulocitos y su papel en los fenómenos de interacción de los mismos con otras células implicadas en las alteraciones funcionales inducidas por el ejercicio físico intenso.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL DE LABORATORIO.

1.1. Reactivos y productos.

1.1.1. Fluorocromos.

Se utilizaron las moléculas fluorescentes o precursores fluorogénicos siguientes: Rhodamina 123 (Rh 123) de Lambda Fluoreszenztechnologie GmbH, Graz (Austria); Hidroetidina (HE) y Naranja de mercurio de Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, EE.UU.; Diacetato de dihidroclorofluoresceína (DHDCF-DA) y Dihidrorhodamina 123 (DHRh123) de Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.

Las soluciones madre de los fluorocromos se conservaron a -20° C hasta su utilización y se empleó dimetilformamida para su preparación, excepto en el caso de la Rh123, diluída en agua bidestilada. En el momento del análisis se prepararon las soluciones de trabajo, utilizándose PBS como solvente.

1.1.2. Anticuerpos monoclonales.

Los siguientes anticuerpos monoclonales contra antígenos de diferenciación celular se obtuvieron de Coulter Immunology, Hialeah, FL, EE.UU. Los anticuerpos se utilizaron conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o con el fluorocromo ECD (Electronically Coupled Dye®):

- CD3-FITC, CD3-PE y CD3-ECD: marcador de células T circulantes maduras.
- CD2-FITC: marcador de células T circulantes maduras e inmaduras y células Natural Killer.
- CD19-PE: marcador de linfocitos B maduros e inmaduros.
- CD56-PE: marcador de células Natural Killer.

- CD4-PE: marcador de la subpoblación cooperadora (T helper) de células CD3+
- CD8-FITC: marcador de la subpoblación citotóxica-supresora de células CD3+
- CD29-PE: marcador de la subpoblación inductora de cooperación de los CD4+
- CD45RA-PE: marcador de linfocitos CD3 vírgenes y la subpoblación inductora de supresión de los CD4+.

Los siguientes anticuerpos monoclonales frente a moléculas indicadoras de activación celular se obtuvieron de Coulter Immunology o de Immunotech, Marsella, Francia:

- CD25-PE: dirigido contra el receptor de Interleukina 2, IL 2-R
- CD69-TetraChrome®: dirigido contra el receptor para el antígeno de activación temprana, EA-1.
- HLA-DR-FITC: dirigido contra una proteína del complejo MHC-II.

Los anticuerpos monoclonales contra las siguientes moléculas de adhesión fueron suministrados por Immunotech, Marsella, Francia:

- CD18-PE: reconoce la subunidad común de las integrinas β_2
- CD11a-FITC: reconoce la cadena α_L de las integrinas β_2 (molécula LFA-1)
- CD11b-FITC: marcador de la cadena α_M de las integrinas β_2 (subunidad Mac-1)
- CD11c-PE: reconoce la cadena α_X de las integrinas β_2 (molécula p150,95)

1.1.3. Estímulos para la activación celular.

Los activadores celulares, N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) y forbol 12-miristato,13-acetato (PMA), así como la interleukina-2 humana (IL-2), fueron suministrados por Sigma Chemical Co.

1.1.4. Mitógenos.

Concavalina A (ConA), Fitohemaglutinina P (PHA), y Pokeweed Mitogen (PWM), de Sigma Chemical Co.

1.1.5. Agentes oxidantes.

Como agentes oxidantes se utilizaron hidroperóxido de tert-butilo (tBOOH) de Schuchardt y Co., Hohenbrunn, Alemania, y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución acuosa al 30 % de Sigma Chemical Co.

1.1.6. Otros reactivos y productos.

Los siguientes productos, utilizados para la obtención y mantenimiento de suspensiones de leucocitos aislados se obtuvieron de Sigma Chemical Co.: Ficoll-Hypaque 1077, Tampón Fosfato Salino (PBS) y medio de cultivo RPMI 1640 con L-glutamina.

Para el alineamiento y comprobación de los citómetros de flujo se usaron fluoroesferas de látex ImmunoCheck y FlowCheck de Coulter Cytometry.

1.2. Instrumentación.

1.2.1. Obtención y procesamiento de muestras celulares.

Estación semiautomatizada de preparación de muestras, Sistema Epics Multi Q-Prep (Coulter Cytometry), que realiza el lisado eritrocitario, fija y estabiliza las muestras de sangre entera.

Centrífuga Jouan B 3.11.

Balanza Giralt ER-60 A.

Baño termostático regulable, Tectron 3473100.

1.2.2. Citometría de flujo.

Citómetro de flujo/separador celular, Epics ELITE (Coulter Cytometry), provisto de tres láseres refrigerados por aire: Argón, Helio-Neon y Helio-Cadmio, que emiten respectivamente a 488 nm, 633nm y en el ultravioleta. Posee seis detectores para recoger las señales de dispersión frontal y lateral de luz y cuatro fluorescencias.

Citómetro de flujo analítico Epics Profile II, (Coulter Cytometry), dotado de un láser de Argón a 488 nm y tres detectores de fluorescencia.

Citómetro de flujo analítico Epics XL-MCL, (Coulter Cytometry), dotado de un láser de Argón a 488 nm, seis detectores y un sistema automático de procesamiento de muestras.

1.3. Material de laboratorio.

Placas microtiter de 24 pocillos de fondo plano (Nunc).

Filtros de malla de nylon de 60 µm de poro (Maissa, Barcelona).

Tubos cónicos de centrífuga para la separación leucocitaria.

Tubos Eppendorf.

Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm.

1.4. Programas informáticos.

Programa de análisis de datos de citometría de flujo ELITE Workstation Stand Alone (Coulter Cytometry).

Programa de análisis de datos de citometría de flujo XL-System II Workstation Stand Alone (Coulter Cytometry).

Programa de análisis estadístico StatGraphics plus para entorno Windows.

2. SUJETOS Y PARÁMETROS DEL ESTUDIO.

2.1. Sujetos del estudio.

El grupo del estudio *in vivo* se compuso de un grupo de 15 ciclistas profesionales, pertenecientes a los equipos Paternina y Artiach y sirvieron como controles 11 varones jóvenes, sanos sin actividad deportiva significativa.

Para el conjunto de estudios *in vitro*, las muestras sanguíneas se obtuvieron de varones, de edad comprendida entre 20 y 40 años, donantes de sangre y controles sanos Hospital Universitario Dr. Peset y el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

2.2. Fases y parámetros del estudio.

En una primera fase se estudió el comportamiento de los leucocitos de sangre periférica de los dos grupos de ciclistas profesionales y del grupo control de sujetos sedentarios (estudio “*in vivo*”). Una segunda fase de experimentación “*in vitro*” se centró en el análisis de la respuesta a la acción de sustancias oxidantes (modelos experimentales de estrés oxidativo) de leucocitos en sangre entera y suspensiones de leucocitos aislados. En ambas fases se estudiaron mediante citometría de flujo los siguientes parámetros de la función leucocitaria:

1) Distribución de las subpoblaciones leucocitarias por inmunofenotipaje de superficie:

- a) Poblaciones linfocitarias: linfocitos T, linfocitos B y células NK
- b) Subpoblaciones de linfocitos T: linfocitos T colaboradores, linfocitos T citotóxicos/supresores
- c) Estado de activación temprana y tardía *in vivo* de linfocitos T y B

- 2) Metabolismo oxidativo y peroxidativo intracelular:
 - a) Potencial de membrana mitocondrial
 - b) Contenido intracelular en H₂O₂
- 3) Respuesta de los linfocitos a la estimulación mitogénica in vitro:
 - a) Medida de la respuesta de proliferación linfocitaria a la estimulación mitogénica
 - b) Capacidad de utilización de IL-2 exógena
- 4) Expresión *in vitro* de marcadores de activación en linfocitos:
 - a) Expresión del marcador de activación celular temprana CD69
 - b) Expresión del marcador de activación celular tardía CD25
- 5) Expresión de moléculas de adhesión en PMNs:
 - a) Expresión del complejo CD11/CD18 de la familia de las integrinas β_2 : CD18, CD11a, CD11b y CD11c.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.1. Extracción, manejo y conservación de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa y se conservaron hasta su análisis a temperatura ambiente en tubos con heparina de litio.

El estudio *in vivo* inicial se llevó a cabo tras una de las últimas etapas de montaña de la Vuelta Ciclista a España. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron antes de una hora tras finalizar la etapa. En algunos ciclistas, se realizó una extracción adicional antes del inicio de la siguiente etapa, tras doce horas de reposo, con el fin estudiar la reversibilidad de algunos cambios.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento antes de veinticuatro horas de la primera extracción. Se aplicó aproximadamente el mismo retraso para el análisis de las muestras de los sujetos controles.

En los estudios *in vitro*, las muestras de sangre de sujetos sanos se obtuvieron por punción venosa y se conservaron a temperatura ambiente en tubos con heparina de litio. El análisis citométrico se realizó antes de transcurridas 4 horas de la obtención de la muestra, o bien, y cuando la técnica citométrica lo permitía, las células fueron fijadas en ese lapso de tiempo y analizadas con posterioridad.

3.2. Obtención de la suspensión leucocitaria.

En algunos experimentos, se utilizaron suspensiones leucocitarias obtenidas a partir de sangre completa liberada de hematíes por agregación sobre Ficoll-Hypaque, siguiendo el método descrito por Robinson (1993). En un tubo cónico de centrífuga con 3 mL de Ficoll-Hypaque 1077 se depositaron cuidadosamente, evitando su mezcla, 3 mL de sangre anticoagulada con heparina de litio y se dejó sedimentar a temperatura ambiente durante 30 minutos. En la interfase Ficoll-Hypaque-sangre se produce la agregación de los eritrocitos que sedimentan por su propio peso en el fondo del tubo.

De la capa superior formada se obtuvo una suspensión celular enriquecida en leucocitos (concentración aproximada de 2×10^7 leucocitos/mL), que contiene plaquetas y carece prácticamente de eritrocitos. La parte superior de esta suspensión celular fue extraída, evitando la aspiración de Ficoll y de la capa celular en contacto con él, y fue transferida a un tubo eppendorf, donde se

mantuvo a 4° C hasta el momento de su procesamiento.

3.3 Inducción *in vitro* de estrés oxidativo en leucocitos.

Se realizó previamente una prueba de viabilidad mediante tinción con azul tripán y observación al microscopio óptico para la comprobación de las concentraciones no letales de agente oxidante a utilizar.

Tras determinar las concentraciones tóxicas de los agentes oxidantes, muestras de 1 mL de sangre completa heparinizada fueron tratadas con H₂O₂, en las siguientes concentraciones: 1 µM, 5 µM y 20 µM. En otra serie de experimentos, muestras de 1 mL de sangre entera heparinizada fueron incubadas con 0.1, 0.5 y 1 µM de tBOOH en un baño a 37 °C durante 1 hora, 3 horas ó 24 horas. Transcurrido este periodo se tomaron 50 µl de cada muestra y se incubaron con 5 µl del anticuerpo monoclonal apropiado, dejándose en oscuridad y a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos. A continuación, las muestras marcadas se procesaron con el sistema Epics Multi Q-Prep de Coulter para su posterior análisis citométrico. Cuando éste no fué inmediato, las muestras se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su estudio.

3.4. Inducción de estimulación celular *in vitro*.

Las soluciones madre de los activadores celulares fMLP y PMA se conservaron a -20°C hasta su uso y se utilizó dimetilformamida para su preparación. En el momento del análisis se prepararon las soluciones de trabajo, utilizándose PBS como solvente. Para el estudio de la respuesta a cada activador se tomaron alícuotas de 3 mL de sangre completa heparinizada, dejando una de ellas sin estímulo para valorar la activación espontánea. La concentración final de fMLP y

PMA en el ensayo fue de 0,1 μ M.

En el caso de la estimulación de suspensiones de células expuestas a estrés oxidativo, las muestras se incubaron previamente en el baño a 37°C, con sus correspondientes concentraciones de oxidante, y a diferentes tiempos según la prueba. Posteriormente, se añadió el activador y se mantuvieron durante otros 30 minutos después de los cuales se introdujeron en hielo 10 minutos para detener la acción del estímulo. En dicho momento, se distribuyó nuevamente cada muestra de sangre en alícuotas de 50 μ l y se procedió al marcaje con los diferentes anticuerpos monoclonales fluorescentes.

3.5. Procedimientos analíticos.

En cada una de las pruebas experimentales realizadas, se incluyeron dos tipos de controles: una determinación basal de la sangre de cada paciente y un control de la misma sin adición de estímulos y analizada a idénticos intervalos que las muestras a estudiar.

Tras el procesamiento, las suspensiones celulares se analizaron en un citómetro de flujo EPICS Profile II (inmunofenotipo de superficie), o en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (Coulter Cytometry), dotado de láser de argón a 488 nm. para medir la fluorescencia verde y/o roja de los diferentes anticuerpos conjugados o fluorocromos empleados. Por último, se cuantificaron los porcentajes de células positivas para un determinado antígeno de superficie así como la intensidad de la fluorescencia emitida, limitando el análisis a la población leucocitaria.

Para cada parámetro biológico se analizaron un mínimo de 10.000 células.

Se fijó una velocidad media de flujo de la muestra para analizar un máximo de células sin comprometer la sensibilidad del análisis. Los datos, recogidos en modo de lista, fueron referidos a la población celular de interés mediante el programa informático del citómetro.

3.5.1. Determinación de la distribución y estado funcional de las poblaciones leucocitarias y linfocitarias.

Se incubaron 100 µl de sangre entera con 10 µl de anticuerpo monoclonal fluorescente específico, durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-25° C) y en oscuridad. El marcaje se realizó utilizando un sólo anticuerpo monoclonal o la combinación adecuada de dos o tres anticuerpos monoclonales. Las muestras fueron procesadas a continuación en la Estación de Trabajo EPICS Q-Prep, en la que los eritrocitos son lisados y se estabiliza y fija la membrana de los leucocitos. Las suspensiones celulares así obtenidas, fueron analizadas en el citómetro de flujo para cuantificar los porcentajes de células positivas para los antígenos detectados por los anticuerpos utilizados así como la intensidad de la fluorescencia emitida, proporcional a la concentración de dichos antígenos. Mediante selección electrónica basada en la morfología celular o la expresión de antígenos específicos se pudo analizar de forma separada diferentes subpoblaciones de linfocitos, monocitos y PMNs.

3.5.2. Determinación de la expresión del receptor de activación temprana CD69.

La molécula CD69 (EA-1 o “early antigen”) se considera el primer antígeno en aparecer sobre la superficie celular de los leucocitos tras su activación (Cebrián et al., 1988). Su determinación se realizó mediante inmunofluorescencia

directa empleando el anticuerpo CD69-FITC y un citómetro de flujo.

Se incubaron muestras de 50 µl de sangre entera (procedentes de muestras control y sometidas a estrés oxidativo *in vitro*) con 5 µl del anticuerpo CD69-FITC, durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) y en la oscuridad. A continuación, fueron procesadas en la estación de trabajo EPICS Q-Prep y analizadas en el citómetro de flujo.

3.5.3. Determinación de la expresión del receptor de activación tardía CD25.

La molécula CD25 es el receptor para la interleukina-2 (IL-2 R) que puede detectarse sobre linfocitos T y B y macrófagos activados, siendo por tanto indicadora de activación celular.

Para estudiar la expresión de dicho receptor en subpoblaciones específicas de linfocitos T, se realizó inmunofluorescencia directa triple, con los anticuerpos monoclonales CD25-PE, CD3-ECD y CD8-FITC. Fueron incubadas muestras de 50 µl de sangre entera (procedentes de muestras control y sometidas a estrés oxidativo *in vitro*) con 5 µl de cada uno de los anticuerpos, durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) y en la oscuridad. A continuación, fueron procesadas en la estación de trabajo EPICS Q-Prep y analizadas en el citómetro de flujo.

3.5.4. Estimación del potencial de membrana mitocondrial.

Para el análisis se utilizó el fluorocromo catiónico específico Rhodamina-123 (Rh123), que es transportado a la matriz mitocondrial, siendo su captación proporcional al potencial de membrana mitocondrial (Juan et al., 1994). Se incubaron alícuotas de 100 µl de sangre entera en presencia de 1 µM de Rh123

durante 15 minutos a 37°C y en la oscuridad. A continuación, las muestras fueron procesadas por el sistema Epics-Q-Prep (lisis eritrocitaria y fijación) omitiendo el paso de fijación y manteniéndose a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.

3.5.5. Contenido intracelular en peróxidos.

Se determinó utilizando el precursor fluorogénico dihidro-diclorofluoresceína diacetato (DHDCF-DA). Para ello, alícuotas de 100 µl de sangre entera fueron incubadas con 1 µM de DHDCF-DA durante 15 minutos a 37°C y en la oscuridad. Al igual que en la determinación del potencial de membrana mitocondrial, las muestras fueron procesadas por el Epics-Q-Prep omitiendo el paso de fijación, por lo que se mantuvieron a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo.

3.5.6. Médida simultánea de los niveles intracelulares de ión superóxido y peróxido de hidrógeno.

La medida simultánea de la producción de O_2^- y H_2O_2 se llevó a cabo mediante la utilización de los fluorocromos Hidroetidina (HE) 1 mM y diclorofluoresceína diacetato (DHDCF-DA) 100 µM en PBS, que emiten a diferentes longitudes de onda y cuya característica más sobresaliente es su oxidación específica por O_2^- y H_2O_2 respectivamente.

La suspensión leucocitaria obtenida con Ficoll-Hypaque fue diluída 1:10 en RPMI a 37°C.

Para determinar la autofluorescencia se extrajo una alícuota de 500 µl y se determinaron las fluorescencias verde (525 nm) y roja (575 nm) con el citómetro de flujo. Para la determinación de la actividad oxidativa basal se añadieron 95 µl

de cada fluorocromo a 9.5 mL de la suspensión leucocitaria diluída en RPMI, obteniendo una concentración final de 10 μ M de HE y 1 μ M de DHDCF. Tras incubar durante 5 minutos a 37°C, se extrajeron alícuotas de 500 μ l para determinar su emisión de fluorescencia roja y verde, que fue medida a los 0,5, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se tomó la precaución de no emplear el vórtex y realizar cada determinación con una alícuota diferente para no provocar la activación inespecífica de los PMNs.

3.5.7. Medida de los niveles intracelulares de Glutathion reducido (GSH).

Se realizó su determinación utilizando el colorante naranja de mercurio, según el método de O'Connor et al., (1988). Para ello, las alícuotas de la suspensión leucocitaria fueron centrifugadas y el precipitado resuspendido en naranja de mercurio 100 μ M en acetona a 4°C. Tras 5 minutos de incubación en hielo, se centrifugaron de nuevo y el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS. Posteriormente se analizó en el citómetro de flujo determinando la intensidad de la expresión del naranja de mercurio.

3.5.8. Medida de la respuesta de proliferación linfocitaria a la estimulación mitogénica.

Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra. M^a Dolores Planelles, del Departamento de Inmunología del Centro de Investigación de La Fe.

Para la inducción de la proliferación linfocitaria se utilizaron los mitógenos Conavalina A (ConA), Fitohemaglutinina (PHA) y mitógeno de Pokeweed (PWM).

a) Procedimiento general:

Tras llevar a cabo un recuento, las suspensiones celulares se ajustaron a la concentración de 2×10^6 cél/mL utilizando medio de cultivo RPMI y se distribuyeron en las placas de microcultivo a razón de 0.2 mL de la suspensión por pocillo.

En el momento de su siembra, y para inducir la activación de los linfocitos, se adicionó a los microcultivos diferentes dosis de ConA (1, 3 ó 6 $\mu\text{g/mL}$), PHA (5, 10 ó 20 $\mu\text{g/mL}$), o PWM (0.1, 0.2 ó 0.4 mg/mL), en un volumen nunca superior al 5% del volumen total contenido en cada pocillo. Algunos de los pocillos no recibieron estímulo alguno para permitir la medida de la síntesis de DNA espontánea.

Los microcultivos se realizaron por duplicado y, tras su siembra, las placas se incubaron durante 48 horas en estufa a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad.

La síntesis de DNA se valoró por incorporación en el DNA de la timidina tritiada añadida 24 horas después del inicio del cultivo a razón de 0.5 μCi por microcultivo. Transcurridas 24 horas desde la adición de timidina tritiada, las células fueron recuperadas mediante un recolector de células semiautomático múltiple por lavado exhaustivo con PBS y aspiración simultánea sobre filtros individualizados de papel de fibra de vidrio. A continuación, se realizó una precipitación con ácido tricloroacético al 5% y un lavado posterior con PBS. Tras su secado, los filtros se transfirieron a viales que contenían 3 mL de líquido de centelleo y la radioactividad se midió en un contador β de centelleo líquido, expresándose los resultados como cuentas por minuto (cpm) medias de los microcultivos duplicados.

b) Ensayos de utilización de Interleukina 2:

Se prepararon diluciones seriadas de IL-2 humana en medio RPMI, ensayándose el efecto del factor puro (sin diluir) y hasta la dilución 1/32.

Para el ensayo, alícuotas de 0.1 mL de la suspensión de células mononucleares (concentración final en microcultivo, 2×10^6 cél/mL), fueron dispensadas en cada pocillo de las placas de microcultivo. A continuación, se distribuyó 0.1 mL de cada una de las diluciones de IL-2 o un volumen igual de medio de cultivo en cada pocillo. En una serie de pocillos se adicionó una concentración de ConA o PHA previamente demostrada como subóptima para la proliferación celular. Las placas se incubaron durante 2 días y la síntesis de DNA se valoró de la forma indicada previamente.

3.5.9. Determinación de la expresión de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas β_2 .

a) Procedimiento general:

Para este estudio se utilizaron anticuerpos monoclonales fluorescentes contra las diferentes subunidades del complejo CD18/CD11 de la familia de las integrinas β_2 : CD18-PE, CD11a-FITC, CD11b-FITC y CD11c-PE. El marcaje se realizó utilizando un sólo anticuerpo (CD11c-PE) o una combinación de dos (CD18-PE+CD11a-FITC; CD11c-PE+CD11b-FITC).

Para la determinación basal de integrinas β_2 se separaron alícuotas de 50 μ l de sangre entera y se incubaron con 5 μ l de los anticuerpos mencionados. Tras un periodo de incubación de 15 minutos en la oscuridad las muestras fueron lisadas y fijadas mediante el sistema Q-Prep.

b) Efecto de la adición de agentes prooxidantes:

Se prepararon alícuotas de sangre entera de 1 mL y se añadió a cada tubo la cantidad de oxidante necesaria para obtener una concentración de H₂O₂ de 1 μM, 5 μM y 20 μM, excepto al tubo en el que se debía estimar la expresión de integrinas β₂ debida a la activación espontánea, al que fueron añadidos 5 μl de PBS. Para el estudio de la oxidación por tBOOH se siguió el mismo procedimiento, añadiendo el oxidante en la cantidad necesaria para obtener concentraciones finales de 0.1, 0.5 y 1 μM. Tras un periodo de incubación de 1, 3 ó 24 horas a 37 °C, se marcaron 50 μl de cada muestra con 5 μl del anticuerpo monoclonal correspondiente incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) y en la oscuridad. Las muestras lisadas y fijadas mediante el sistema Q-Prep fueron posteriormente analizadas en el citómetro de flujo.

c) Efecto de los prooxidantes sobre la expresión de integrinas inducida por activación celular:

Se utilizaron como estímulo los siguientes activadores de la función celular: el péptido quimiotáctico N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) y el activador directo de la protein kinasa C, Forbol 12-miristato-13-acetato (PMA).

Se incubaron alícuotas de 1 mL de sangre completa heparinizada en presencia de los mismos prooxidantes: tBOOH 0.5 y 1 μM ó H₂O₂ 1, 5 y 20 μM. En una tercera alícuota (control) se añadieron 10 μl de PBS. Como en todos los experimentos realizados, se tomaron muestras para determinar los valores basales. Tras un periodo de incubación de 3 horas en un baño a 37°C, se añadió fMLP ó

PMA 0,1 μ M, respectivamente. Transcurridos 20 minutos para el fMLP y 30 minutos para el PMA , las muestras fueron introducidas en hielo para detener la acción de los estímulos. Se repartió nuevamente la sangre en alicuotas de 50 μ l y se procedió a determinar la expresión de integrinas β_2 tal como se ha descrito en el apartado anterior.

4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

La significación estadística se calculó mediante el programa informático STATGRAPHICS Plus para entorno Windows, a través del análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA) de los parámetros analizados para la comparación de poblaciones divididas en subgrupos definidos por las variables concentración de oxidante añadida ó tiempo al que se realizaron las determinaciones. Se aplicaron así mismo el análisis de rango múltiple (Multiple-range test) y el test de Kruskal-Wallis para valorar la homogeneidad o diferencia significativa entre los subgrupos. El nivel de significación estadística fue establecido para un valor de $p \leq 0.05$.

La tabulación y cálculo de los valores de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar) se realizaron con la hoja de cálculo EXCEL para Microsoft Office 97.

RESULTADOS

A) ESTUDIOS IN VIVO.

1. ESTIMACIÓN DE LAS ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS INDUCIDAS POR EJERCICIO FÍSICO INTENSO.

La citometría de flujo permite cuantificar la expresión de antígenos de la superficie celular utilizando anticuerpos monoclonales específicos, caracterizados mediante el sistema CD (Clusters of Differentiation) (Stockinger et al., 1996). La identificación de subtipos celulares, fundamentalmente linfocitos, por citometría de flujo basada en la información generada por los CDs se denomina inmunofenotipaje de superficie. En las preparaciones de sangre periférica analizadas coexisten tipos celulares que pueden unir inespecíficamente anticuerpos (granulocitos y monocitos a través de receptores para Fc) o que comparten algunos antígenos con los linfocitos (monocitos). Por ello, el inmunofenotipo linfocitario se realizó acotando previamente la población de linfocitos, reconocida morfológicamente por sus características de dispersión frontal y lateral de luz láser (Fig. 9 A). En la población seleccionada se determina la expresión de uno o múltiples antígenos de superficie, como muestra el ejemplo de la Fig. 9 B, C y D.

1.1. Efectos del ejercicio intenso sobre la distribución de poblaciones linfocitarias.

En la población de linfocitos, acotada morfológicamente, se estudió la expresión de marcadores de membrana que permiten cuantificar los linfocitos T totales (CD2+), linfocitos T maduros (CD3+), linfocitos B maduros (CD19+) y células

Natural Killer (células NK, también denominadas Linfocitos Grandes Granulares, CD3-CD56+).

La Fig. **10 A** muestra que no se observó diferencia significativa entre los sujetos sometidos a ejercicio intenso y los donantes control en cuanto al porcentaje de linfocitos T totales, linfocitos T maduros y linfocitos B maduros. Por el contrario, se observó un descenso significativo en el contenido de células NK en los deportistas.

1.2. Efectos del ejercicio intenso sobre la distribución de subpoblaciones funcionales de linfocitos T.

Los linfocitos T juegan un papel esencial en la regulación de las respuestas inmunitarias específicas y en la interacción entre el sistema inmunitario específico y el innato. La coexpresión de la molécula CD3 y otros antígenos de diferenciación permite distinguir por citometría de flujo varias subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) con implicaciones funcionales específicas.

Con respecto al porcentaje de linfocitos T inmunocompetentes totales (CD3+), no se encontraron diferencias significativas entre los ciclistas profesionales tras el sobreesfuerzo y los controles sedentarios (Fig. **10 B**). Sin embargo, sí se alteraron significativamente las proporciones de las distintas subpoblaciones de linfocitos T en los ciclistas tras el ejercicio intenso. Así, se produjo una disminución significativa de la frecuencia de linfocitos T citotóxicas (CD8+/CD3+), mientras permanecía inalterada la subpoblación de linfocitos T cooperadores (CD4+/CD3+), resultando en un aumento del cociente CD4/CD8 (Fig. **10 B**).

Dentro de la subpoblación de linfocitos T CD4+, la coexpresión de los antígenos CD29 o CD45RA define dos subconjuntos funcionalmente opuestos, de células inductoras de cooperación (CD4+/CD29+) y de células inductoras de supresión (CD4+/CD45RA+). Como se aprecia en la Fig. **10 B**, en los sujetos sometidos a ejercicio físico intenso disminuye significativamente el subconjunto de linfocitos T inductores de colaboración y aumenta significativamente el subconjunto de células T con capacidad inductora de supresión.

1.3. Efectos del ejercicio intenso sobre el estado de activación de subpoblaciones linfocitarias T.

La activación y subsiguiente diferenciación funcional de los linfocitos, como consecuencia de una compleja red de señalización mediada por factores solubles (citokinas) o contactos célula-célula, puede ser estimada gracias a la aparición en la superficie de antígenos específicos, que pueden ser cuantificados en subpoblaciones concretas identificadas por su inmunofenotipo.

Para determinar el estado de activación *in vivo* de los linfocitos T tras un esfuerzo físico de alta intensidad, se estudió la expresión de un antígeno MHC de clase II (antígeno I3, epitopo invariable común a las moléculas HLA-DR, -DP y -DQ) y del receptor de Interleukina-2 (CD25), dos moléculas que aparecen incrementadas en linfocitos T que han sido activados por diferentes estímulos.

Como muestra la Fig. **10 C**, tras el ejercicio intenso no se observó ningún incremento significativo del porcentaje de linfocitos totales o linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, que sobreexpresen el antígeno I3. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ que sobreexpresan el receptor de Interleukina-2

(CD4+/CD25+ y CD8+/CD25+), aumentó significativamente en los sujetos sometidos a ejercicio intenso, siendo especialmente marcado el incremento en el subconjunto de linfocitos CD4+.

1.4. Efectos del ejercicio intenso sobre la capacidad proliferativa *in vitro* de linfocitos en cultivo.

La presencia de un porcentaje significativo de linfocitos que expresan de forma incrementada el receptor de superficie para IL-2 (CD25) sugiere la existencia de una mayor actividad proliferativa de estas células en los sujetos del estudio sometidos a un esfuerzo intenso y prolongado. De hecho, la IL-2 es un factor autocrino secretado por las células TH1 tras su estimulación por otras células inmunitarias y necesario para iniciar la expansión clonal de los linfocitos T. Para relacionar el posible estado de activación celular, sugerido por la expresión de CD25, con la capacidad real de proliferación de los linfocitos, se realizó una serie de experimentos de estimulación mitogénica *in vitro* (Test de Activación Linfocitaria, TAL) sobre cultivos de células mononucleares de los sujetos sometidos a esfuerzo intenso y de controles no entrenados, utilizando diferentes activadores mitogénicos policlonales de linfocitos T y B (PWM), linfocitos B (anticuerpos contra inmunoglobulina de superficie, anti-IgM) y linfocitos T (Con A y anticuerpos contra la subunidad CD3 del TCR)

1.4.1. Respuesta proliferativa *in vitro* mixta de linfocitos T y B.

El mitógeno PWM es una lectina que actúa sobre linfocitos T y B a través de residuos de di-N-acetil-quitobiosa (Kubin, 1994). La respuesta del conjunto de linfocitos T y B a la activación con el mitógeno PWM fue sólo ligeramente

superior, aunque de forma no significativa, en los cultivos procedentes de individuos sometidos a ejercicio intenso, como muestra la Fig. 11.

1.4.2. Respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos B.

Tras la estimulación selectiva de linfocitos B por entrecruzamiento de las inmunoglobulinas de superficie (IgM) con un anticuerpo específico, no se observó ninguna diferencia significativa en la respuesta de proliferación entre los cultivos de los sujetos controles y los deportistas analizados (Fig. 12).

1.4.3. Respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos T.

Las lectinas PHA y ConA son mitógenos específicos de células T y actúan, respectivamente, a través de residuos de N-acetil-galactosamina y de α -D-manosa + α -D-glucosa. La Fig. 13 muestra claramente que los linfocitos T procedentes de los sujetos sometidos a ejercicio intenso presentan de forma significativa una mayor capacidad proliferativa tras la estimulación, tanto con PHA (Fig. 13 A) como con ConA (Fig. 13 B).

Los datos de la Fig. 13 C muestran asimismo que la respuesta de proliferación celular inducida por la estimulación específica del receptor de células T, vía entrecruzamiento de la subunidad CD3, es significativamente mayor en los cultivos procedentes de los deportistas tras el esfuerzo de alta intensidad.

1.5. Efecto del ejercicio intenso sobre la capacidad de utilización *in vitro* de interleukinas exógenas por linfocitos en cultivo.

El conjunto de resultados presentados en el apartado anterior muestra una mayor capacidad de respuesta mitogénica *in vitro*, junto con un incremento de la expresión de algún receptor implicado en la transducción de las señales de

activación/proliferación (CD25), pero no de otro marcador de diferenciación inducida por la activación (antígeno MHC II). Para determinar la capacidad de respuesta de los linfocitos a factores esenciales en la vía de activación, se llevó a cabo un estudio de activación celular con dosis subóptimas de mitógeno y la adición de un factor de crecimiento de células B (Interleukina-4) o de células T (Interleukina-2).

1.5.1. Utilización de Interleukina-4 por células B.

Como muestra la Fig. **14 A**, la adición de IL-4 a baja concentración sobreestimuló de forma similar la proliferación submáxima (inducida por PWM) de los cultivos de sujetos controles o de deportistas tras esfuerzo. Sin embargo, a concentración superior, la sobreestimulación inducida por IL-4 fue significativamente menor en los cultivos procedentes de los individuos sometidos a ejercicio físico intenso.

1.5.2. Utilización de Interleukina-2 por células T.

La adición de IL-2 incrementó la actividad proliferativa en cultivos estimulados parcialmente con PHA, como se observa en la Fig. **14 B**. La respuesta de los cultivos obtenidos a partir de muestras de sujetos sometidos a ejercicio intenso fue notablemente inferior a la de los cultivos de control, para ambas concentraciones de IL-2 estudiadas.

Los datos presentados en esta sección muestran que los linfocitos T y B de los sujetos sometidos a ejercicio físico intenso utilizan en menor grado los estímulos de activación exógenos, como la IL-2, en condiciones *in vitro*. Estos resultados parecen en contradicción con los que muestran un incremento en la expresión de

receptores para dicha citokina en los linfocitos T y podrían indicar una alteración de funcionalidad en los receptores sobreexpresados.

2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO INTENSO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS PMNS.

El análisis citométrico de los fenómenos de activación de las células del sistema inmunitario inespecífico se puede realizar mediante la cuantificación de antígenos expresados en la superficie celular, de forma similar al procedimiento seguido con los linfocitos, o bien mediante el seguimiento de cambios bioquímicos intracelulares, mediante el uso de fluorocromos sensibles a distintas actividades enzimáticas o a cambios en el microambiente celular (Robinson, 1993).

Para relacionar los cambios observados en las poblaciones linfocitarias con posibles alteraciones causadas por el ejercicio físico intenso en las funciones de los granulocitos y comparar éstas con las inducidas en los monocitos, se estudiaron tres parámetros dinámicos que resumen las principales funciones del sistema inmunitario innato:

a) Expresión de moléculas de adhesión, como fenómeno de relevancia en la quimiotaxis, interacción célula-célula y motilidad celular. Se estimó a través de la cuantificación de una integrina, la molécula CD11b, mediante su marcaje inmunofluorescente con un anticuerpo monoclonal conjugado.

b) Niveles intracelulares de especies oxidantes, relacionado con la posible existencia de una fuente extracelular de especies reactivas del oxígeno, y con la función fisiológica de la explosión oxidativa (“burst”) como mecanismo de

defensa antimicrobiano y, en condiciones exacerbadas, de origen a moléculas reactivas vertidas al exterior de la célula y causantes de lesión celular. Se cuantificaron utilizando precursores fluorogénicos: el diacetato de dihidrodiclorofluoresceína (DHDCF-DA), cuya oxidación por H_2O_2 intracelular en presencia de peroxidasa lo convierte en una molécula que emite fluorescencia verde, y la hidroetidina (HE), que es oxidada por KO_2 , un dador de $O_2^{\cdot-}$, emitiendo fluorescencia roja (Rothe y Valet, 1990).

c) Actividad respiratoria mitocondrial, como origen de especies prooxidantes (anión superóxido) y como fuente de energía metabólica que responde a las demandas de la célula en curso de activación. Se estimó mediante el fluorocromo Rh123, que se acumula en la mitocondria en función de su potencial de membrana (Juan et al., 1994).

2.1. Efectos del ejercicio intenso sobre la expresión de la molécula de adhesión CD11b en granulocitos y monocitos.

La expresión basal de la molécula CD11b aumentó marcadamente en los monocitos y granulocitos de sangre periférica de los individuos sometidos a esfuerzo de alta intensidad, comparada con la expresión en controles sedentarios (Figs. **15 A** y **15 B**). Este aumento parece reversible, puesto que en una serie de deportistas a los que se pudo reanalizar transcurridas doce horas del esfuerzo anterior, la expresión de la molécula CD11b se encuentra en niveles similares a los observados en individuos de control (Fig. **15 A** y **15 B**).

Para estimar el efecto de las condiciones de ejercicio intenso sobre la capacidad

de respuesta a la estimulación quimiotáctica, se utilizó el péptido fMLP, que induce la expresión de diferentes moléculas de adhesión, incluyendo la familia de las integrinas, en granulocitos y monocitos.

Como se puede ver en las Figs. **16 A** y **16 B**, la estimulación con fMLP produjo, como cabía esperar, un incremento en la expresión de CD11b, tanto en granulocitos como, sobre todo, en monocitos. Sin embargo, el aumento relativo fue mucho menor en las células de los individuos tras ejercicio físico intenso, comparadas con las de los sujetos de control. Así, los granulocitos no modificaron su expresión de CD11b ya aumentada.

Al igual que ocurría con la expresión basal de CD11b, el efecto del ejercicio intenso fue reversible, puesto que la estimulación con fMLP de las células sanguíneas de los deportistas analizados doce horas después del esfuerzo, indujo una respuesta que fue prácticamente similar a la de los sujetos de control (Figuras **16 A** y **16 B**).

2.2. Efectos del ejercicio intenso sobre la respiración mitocondrial en granulocitos y monocitos.

La medida del potencial de membrana mitocondrial, mantenido fundamentalmente por la actividad de la cadena respiratoria, se determinó con el fluorocromo catiónico Rh123 (Juan et al., 1994). Como se aprecia en la Fig. **17 A**, y de acuerdo con la mayor intensidad de la función oxidativa en esas células, la actividad mitocondrial en reposo fue mayor en los granulocitos y monocitos que en los linfocitos.

En los leucocitos de los deportistas, la captación de Rh123 se incrementó

significativamente tras el ejercicio intenso, indicando una mayor actividad respiratoria mitocondrial en todas las poblaciones leucocitarias analizadas.

2.3. Efectos del ejercicio intenso sobre el contenido intracelular en especies reactivas del oxígeno.

Los datos anteriores sugieren que la posible activación celular en leucocitos tras un esfuerzo físico de alta intensidad se acompañan de una mayor actividad metabólica, evidenciada por una más intensa tasa de respiración celular y, por lo tanto, de consumo y manejo metabólico de oxígeno, con la posibilidad de incrementar la producción intracelular de especies prooxidantes.

La determinación de los niveles intracelulares de H_2O_2 con el precursor fluorogénico DHDCF-DA mostró un incremento significativo de esta especie prooxidante en todas las poblaciones leucocitarias analizadas en los deportistas, siendo el aumento de mayor magnitud en monocitos y granulocitos (Fig. **17 B**). Hay que destacar que, en consistencia con la prevalencia de los mecanismos prooxidativos en ellos, los monocitos y granulocitos, en condiciones basales o tras ejercicio intenso, presentan un nivel intracelular de H_2O_2 significativamente superior a los linfocitos.

B) ESTUDIOS IN VITRO.

Los estudios presentados en la sección anterior muestran que el ejercicio físico intenso puede provocar alteraciones en el contenido relativo de subconjuntos de linfocitos con diferente implicación funcional y también cambios en el estado de activación de dichas células, con datos que apuntan hacia una posible

interferencia con los mecanismos de señalización mediados, al menos, por IL-2. Los cambios observados en la población linfocitaria se acompañan de un incremento en la actividad metabólica, la expresión de una molécula de adhesión clave y un aumento significativo de los niveles de H₂O₂ intracelular en granulocitos y monocitos, sugiriendo la existencia de un posible estrés oxidativo en dichas células. Este desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes podría deberse a la presencia aumentada de especies reactivas de oxígeno en sangre, como se ha demostrado repetidamente en diferentes modelos de ejercicio físico.

Con el fin de evaluar la posible participación del estrés oxidativo en las alteraciones de la función inmunitaria específica e innata demostradas previamente, se planteó el desarrollo de un modelo de citotoxicidad in vitro que pudiera ser aplicado tanto a responder experimentalmente a la cuestión planteada como a mostrar la utilidad del granulocito de sangre periférica como modelo celular para el estudio de fenómenos de alteración metabólica y lesión celular.

El modelo consistió en la incubación breve o sostenida de muestras de sangre periférica y suspensiones leucocitarias desprovistas de eritrocitos, con diferentes concentraciones subletales de agentes prooxidantes solubles (H₂O₂) o que desencadenan peroxidación lipídica (tBOOH). Mediante la citometría de flujo multiparamétrica se pudo restringir el análisis específicamente a los granulocitos, caracterizados por su morfología, y comparar sus respuestas con las de otras células inmunitarias de la misma preparación.

1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE AGENTES OXIDANTES.

Inicialmente, se realizó un estudio para determinar las concentraciones de prooxidantes que no producían toxicidad celular apreciable. Para ello se incubaron las suspensiones celulares durante 1, 3 ó 24 horas con diferentes concentraciones de H₂O₂ o tBOOH. La viabilidad celular se estimó por microscopía óptica, mediante la incorporación de azul tripán, y por citometría de flujo, a través de los cambios característicos en la autofluorescencia y la morfología que acompañan a la muerte celular y permiten su cuantificación sensible (Fig. **18**).

La cuantificación citométrica del número relativo de células con un inmunofenotipo determinado permitió evaluar el posible efecto letal de los oxidantes sobre subpoblaciones específicas de linfocitos, para evitar alteraciones en las posibles interacciones entre células T y granulocitos (sobre todo, pérdida de citokinas), que alejarían el modelo experimental de las condiciones fisiopatológicas en estudio. Mediante esta aproximación, se pudo confirmar que las concentraciones usadas en el estudio no producen muerte de linfocitos T, que aparecen más resistentes que las células B frente a tBOOH y H₂O₂. En estudios con concentraciones tóxicas, se apreció que los linfocitos CD8 son los que sobreviven a concentraciones de oxidantes más elevadas.

2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EXTRACELULAR SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INTRACELULAR.

2.1. Efecto del estrés oxidativo extracelular sobre los niveles de oxidantes intracelulares.

Para el estudio se utilizaron los dos fluorocromos, HE y DHDCF-DA que, como hemos comentado, responden selectivamente a la oxidación mediada por O_2^- y por H_2O_2 respectivamente.

La Fig. **19** muestra el aumento de los niveles intracelulares de ambos oxidantes tras ser incubados con H_2O_2 a concentraciones 5 y 20 μM durante 30 minutos y 2 horas, aumento que resultó tiempo- y concentración-dependiente como puede observarse por el desplazamiento de la intensidad de fluorescencia en los sucesivos histogramas en los que, para mayor claridad, se presentan las proyecciones de cada parámetro estudiado. Similares resultados se obtuvieron al incubar las mismas muestras con tBOOH 0.5 y 1 μM (Fig. **20**), resultando la respuesta a este prooxidante más homogénea en cuanto a las subpoblaciones, pero igualmente significativa a medida que aumentó la concentración y el tiempo.

2.2. Efecto del estrés oxidativo extracelular sobre los niveles de GSH intracelulares.

Para confirmar la inducción de estrés oxidativo intracelular al añadir los prooxidantes extracelulares, se procedió a determinar el contenido intracelular de glutatión reducido (GSH) (Fig. **21**) en los leucocitos.

Tras la incubación de las suspensiones leucocitarias con H_2O_2 5 y 20 μM (Figs. **21 2** y **21 3**) y tBOOH 0.5 y 1 μM (Figs. **21 4** y **21 5**), se observó una

disminución de la expresión de la fluorescencia emitida por el naranja de mercurio, que es proporcional al contenido en GSH. Esta disminución fue dependiente de la dosis de exposición evidenciándose mayor respuesta en el caso del H₂O₂. La respuesta al tBOOH fue, como en el caso anterior, más homogénea.

2.3. Efecto del estrés oxidativo extracelular sobre el potencial de membrana mitocondrial.

Otro parámetro que proporciona información sobre la función oxidativa es la actividad respiratoria mitocondrial, que, como hemos visto, puede valorarse midiendo el potencial de membrana mitocondrial. Tras la exposición a los prooxidantes extracelulares, se evidenció un incremento de la captación de Rh123, proporcional al potencial de membrana mitocondrial, en todas las subpoblaciones leucocitarias, incremento que también resultó dependiente de la concentración y el tiempo de exposición (Fig. 22).

Estas figuras demuestran que la adición de oxidantes exógenos incrementa significativamente el nivel de especies oxidantes intracelulares en granulocitos, monocitos y también en linfocitos, y confirman que la presencia de agentes prooxidantes en el medio extracelular desencadena un proceso de estrés oxidativo intracelular.

3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN INDUCIDA *IN VITRO* SOBRE LOS NIVELES DE OXIDANTES INTRACELULARES.

Los niveles intracelulares incrementados de especies oxidantes, observados en leucocitos de sujetos sometidos a esfuerzo físico intenso, pueden resultar, como se

ha mostrado en el apartado anterior, de la presencia de niveles extracelulares incrementados. Por otra parte, la activación de los granulocitos por señales microbianas o por mediadores proinflamatorios desencadena la producción intracelular de especies reactivas oxidantes, a través del mecanismo de la explosión oxidativa.

Para evaluar la capacidad de respuesta oxidativa inducida por la activación de granulocitos, se determinó de forma cinética la concentración intracelular de O_2^- y H_2O_2 tras la estimulación in vitro con un activador quimiotáctico (fMLP) o con un éster de forbol (PMA), activador directo de la protein kinasa C.

Como muestra la Fig. 23, tanto el fMLP como, sobre todo, el PMA indujeron un rápido y significativo aumento de los niveles intracelulares de O_2^- en granulocitos. Los niveles de H_2O_2 también incrementaron de forma rápida y sostenida tras la estimulación de los granulocitos con cada uno de los agentes (Fig. 24).

4. EFECTO DE LOS PROOXIDANTES EXÓGENOS SOBRE LA ACTIVACIÓN CELULAR IN VITRO.

La adición de oxidantes exógenos y la activación, tanto quimiotáctica como por estimulación directa de la PKC, de los granulocitos conduce a marcados incrementos de los niveles intracelulares de especies oxidantes, como se ha mostrado en la anterior sección. Para comprobar si la exposición a niveles elevados de agentes prooxidantes puede desencadenar la activación de linfocitos, como podría ocurrir en el modelo de esfuerzo físico intenso estudiado, se planteó

determinar por citometría de flujo la expresión de moléculas indicadoras de activación celular, tanto temprana (CD69) como tardía (CD25), que pudieran poner de manifiesto respuestas inmediatas o prolongadas de activación celular. La coexpresión de los marcadores de activación con determinados antígenos de diferenciación permite, por citometría de flujo multiparamétrica, definir el estado de activación de subpoblaciones linfocitarias específicas, con posible participación en mecanismos de activación de otras células inmunitarias.

4.1. Expresión del marcador de activación temprana CD69.

Como muestra la Fig. 25 1, en el histograma de morfología (SS) frente a tamaño (FS) se definió la población linfocitaria, sobre la que fue estudiada simultáneamente la expresión de CD69 (Fig. 25 1). Sobre histogramas biparamétricos de la población previamente definida, se analizó la evolución de las subpoblaciones que lo expresaban en su superficie, medida a tiempo 0 y sin estímulo alguno (expresión basal) y tras estímulo oxidativo añadiendo distintas concentraciones de H₂O₂ (Fig. 25 3) ó tBOOH (Fig. 25 4). No se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos CD69+ ni en la media de intensidad de la fluorescencia, tanto respecto al grado de oxidación como respecto al tiempo de exposición a la misma, que fue de 1 y 3 horas.

Estos resultados sugieren que la exposición a agentes oxidantes exógenos no desencadena por sí misma la activación inmediata de células linfocitarias.

4.2. Expresión del marcador de activación celular tardía CD25.

La expresión del receptor para la IL-2 fue valorada por citometría de flujo mediante el anticuerpo monoclonal CD25-PE, que emite fluorescencia naranja.

Dado que el CD25 puede expresarse en células T y B activadas, su estudio se realizó mediante análisis citométrico de las subpoblaciones linfocitarias CD3+, seleccionadas por su morfología (como indican las Figs. **26 A 1 y B 1**) y su inmunofenotipo (Figs. **26 A 2 y B 2**). Sobre ellas se determinó la coexpresión de CD25 (Figs. **26 A 3 y B 3**) y de CD8 (Figs. **26 A 4 y B 4**): de esta forma se definen las poblaciones de células:

.-Células T8 activadas = (CD3+/CD8+/CD25+);

.-Células T8 no activadas = (CD3+/CD8+/CD25-);

.-Células T4 activadas = (CD3+/CD8-/CD25+);

.-Células T4 no activadas = (CD3+/CD8-/CD25-);

.-Células T8 totales = [(CD3+/CD8+/CD25+) + (CD3+/CD8+/CD25-)];

.-Células T4 totales = [(CD3+/CD8-/CD25+) + (CD3+/CD8-/CD25-)];

Para evitar errores debidos a la posible muerte específica de alguna población, se expresaron los resultados como porcentaje respecto a subpoblaciones totales, según las siguientes fórmulas:

.- % de células T8 activadas = (CD3+/CD8+/CD25+) / T8 totales;

.- % de células T4 activadas = (CD3+/CD8-/CD25+) / T4 totales.

Por exclusión del antígeno CD3 en la población linfocitaria se pueden estimar los linfocitos B activados (CD3- CD25+) o no activados (CD3- CD25-).

Los resultados indicaron que la exposición, hasta 24 horas, a los agentes oxidantes utilizados, no induce el estado de activación, determinado por la expresión de CD25, en ninguna de las subpoblaciones linfocitarias definidas por el inmunofenotipo citométrico. En la Fig. **26 B** se muestra el ejemplo de la

incubación con tBOOH a concentración 1 μ M y tiempo 4h.

5. EFECTO DE LOS PROOXIDANTES EXÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DE LA FAMILIA DE LAS INTEGRINAS β_2 .

En el estudio inicial *in vivo*, se mostró que los granulocitos de los individuos sometidos a esfuerzo físico intenso expresaban de forma significativamente incrementada el antígeno CD11b y que dicho incremento era reversible tras algunas horas. Igualmente, la activación quimiotáctica con fMLP inducía un rápido y significativo aumento de la expresión de la molécula CD11b. Estos resultados, junto con datos previos de nuestro laboratorio (Mascarell, 1997), sugerían que la expresión de integrinas podría ser un parámetro sensible para detectar fenómenos de inducción de activación celular o de interferencia con los mecanismos de transducción de señal de activación. Por dichas razones, se desarrolló un estudio en el que se evaluó por citometría de flujo multiparamétrica el efecto de los oxidantes exógenos sobre la expresión espontánea de distintas integrinas (posible efecto activador de los prooxidantes exógenos) y sobre la expresión inducida por fMLP y PMA (posible interferencia sobre el mecanismo de transducción de señales de activación).

En el estudio se cuantificó la expresión de la subunidad común a todas las integrinas β_2 (CD18) y las diferentes subunidades asociadas (CD11a, CD11b, CD11c), que tienen diferentes funciones biológicas, como se describió en la

Introducción de esta Tesis.

5.1. Efecto de los prooxidantes exógenos sobre la expresión espontánea de CD18, CD11a, CD11b y CD11c.

La determinación de la expresión de integrinas se realizó mediante citometría de flujo, identificando las poblaciones de granulocitos y de monocitos mediante sus características de dispersión lateral de luz (granularidad) que permiten distinguirlas perfectamente en el conjunto de la suspensión leucocitaria. Como muestra la Fig. **27**, con esta aproximación técnica se pueden definir a la vez subpoblaciones con distinto grado de expresión de la integrina, estimada por la intensidad de la fluorescencia emitida. De hecho, en los estudios de este apartado se observó una heterogeneidad de la expresión de integrinas como respuesta a los oxidantes exógenos, por lo que se pudieron definir, en algunos casos, hasta tres subpoblaciones en la población de granulocitos y dos en la de monocitos.

Las Figs. **28 a 35** presentan el análisis de la expresión espontánea de cada una de las cuatro subunidades del complejo CD18/CD11 en las subpoblaciones que se definieron en los distintos apartados. Debido a la variabilidad detectada, los datos de cada determinación fueron normalizados respecto a su valor basal (valor sin exposición a oxidante (concentración 0) y a tiempo 0).

Tras la incubación con H₂O₂ a concentraciones 1 a 20 µM (Figs **28 a 31**), se produjo un aumento de la intensidad de fluorescencia, generalmente dosis-dependiente, que fue significativo para las subunidades CD18, CD11b y CD11c. Se detectó ya en la primera hora de exposición y en las dos poblaciones definidas

por el análisis citométrico. Similares resultados se obtenían a las 3 horas.

La exposición al tBOOH (0.5 y 1 μM) (Figs 32 a 35) no indujo cambios significativos hasta las 3 horas, tiempo en el que se detectó un efecto opuesto al producido por el H_2O_2 . Aquí, la adición del oxidante inhibió significativamente la expresión espontánea de CD18, CD11b y CD11c. La expresión de CD11a no se modifica significativamente en dicho período por efecto del tBOOH, aunque sí se expresa de forma aumentada en los cultivos control. No se detectó heterogeneidad de respuesta, definiéndose una única población. En vista de estos resultados, se estudió el efecto de la exposición prolongada al tBOOH (24 horas) y se utilizaron concentraciones más bajas, 0.1-1 μM , observándose un efecto complejo. En los cultivos expuestos a la concentración más baja del oxidante, se produjo un incremento significativo de la expresión de todas las integrinas estudiadas, y en las dos subpoblaciones definidas por la expresión de las moléculas. Al aumentar la concentración, la expresión de las integrinas tendió a disminuir con respecto al valor máximo alcanzado. Es importante resaltar que estos resultados se refieren exclusivamente a células morfológicamente intactas, con las características citométricas de la población viable, por lo que deben descartarse fenómenos inespecíficos debidos a la lesión celular.

A pesar de estas variaciones, la exposición a los agentes oxidantes exógenos incrementa, en general, la expresión de las integrinas CD18/CD11 en los PMNs expuestos a la acción de los prooxidantes extracelulares.

El análisis del efecto de ambos prooxidantes sobre las poblaciones de monocitos sólo fue comparable al observado en granulocitos para la subunidad CD11b. En el

resto de las subunidades, la exposición sostenida al oxidante no afectó significativamente a la expresión espontánea (CD18), la incrementó (CD11a) o sólo la disminuyó ligeramente a la máxima concentración (CD11c).

5.2. Efecto de los prooxidantes exógenos sobre la expresión de CD18, CD11a, CD11b y CD11c inducida por fMLP o PMA.

Para estimar la posible interferencia de los prooxidantes sobre el mecanismo de transducción de señales de activación de granulocitos, se estudió la respuesta al péptido quimiotáctico fMLP o al éster de forbol PMA en cultivos de control o incubados con agentes oxidantes exógenos.

El estudio inicial, considerado como control de activación, mostró que la estimulación con fMLP (Figs. 36-39) y con PMA (Figs. 40-43) induce la sobreexpresión significativa de todas las integrinas estudiadas en los PMNs, y de casi todas (excepto CD11a) en los monocitos.

Una vez definida la capacidad de activación de los estímulos utilizados, para evaluar el efecto de los prooxidantes exógenos, se compararon los efectos inducidos por los estímulos en ausencia y presencia de los agentes prooxidantes, normalizando los valores de cada determinación respecto al valor control con estímulo. Como muestran las Figs. 44-47, el H₂O₂ sobre los granulocitos estimulados con fMLP indujo un efecto bifásico sobre la expresión de integrinas. A la más baja concentración disminuyó la sobreexpresión inducida por el fMLP, pero al aumentar la concentración se detectaba un incremento estadísticamente significativo de la intensidad de fluorescencia, llevando a una mayor sobreexpresión de todas las integrinas analizadas en granulocitos. En los

monocitos los resultados fueron más variables y sólo fue estadísticamente significativo el incremento en CD18. Cuando se analizó el efecto sobre la sobreexpresión inducida por PMA (Figs. **48-51**) se detectó una inhibición significativa de la misma a medida que aumentaba la dosis de H₂O₂, tanto para PMNs como para monocitos, excepto para CD11a en PMNs, en los que expresión incluso aumentó a las concentraciones superiores.

Los efectos de la exposición al tBOOH sobre la estimulación inducida por f-MLP se presentan en las Figs. **52-55**. En general, no se observan efectos claramente definidos en las poblaciones de monocitos, mientras que sobre granulocitos, la exposición al oxidante incrementa la sobreexpresión de CD18 y CD11a pero disminuye la de CD11b y c. Igualmente, la interacción de tBOOH con la estimulación inducida por PMA (Figs. **56-59**) no resultó en un patrón claro de cambios en la expresión de integrinas en monocitos. En granulocitos se observó una tendencia a disminuir la sobreexpresión de las integrinas CD18, CD11a y CD11b, aunque no fue estadísticamente significativa.

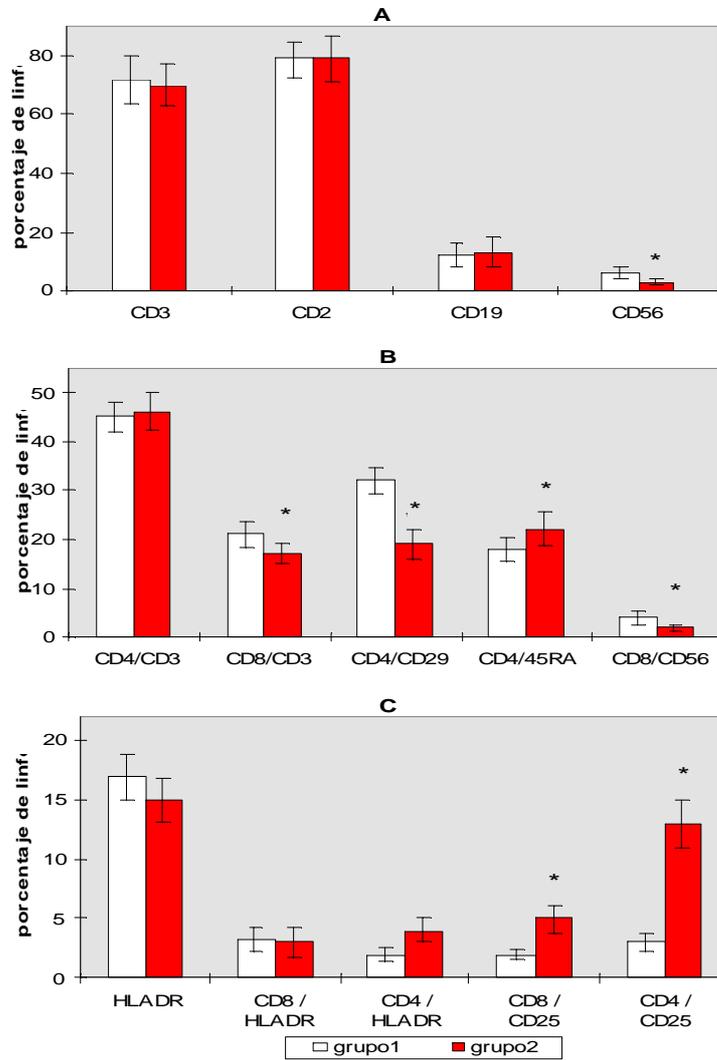


Figura 10: Efecto del ejercicio intenso sobre el porcentaje de distintas subpoblaciones linfocitarias (A), de subpoblaciones de linfocitos T (B) y sobre el estado de activación de los infocitos T ©. Grupo 1: sujetos control. Grupo 2: deportistas tras sobreesfuerzo. *:p< 0,05.

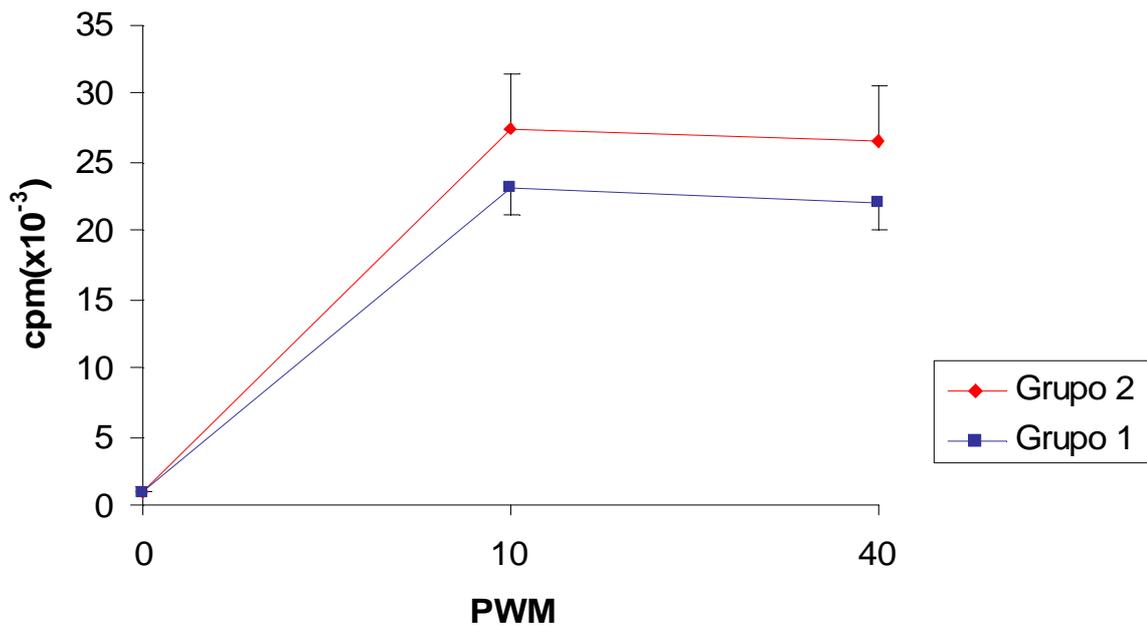


Figura 11: Respuesta proliferativa mixta in vitro de linfocitos T y B estimulados por mitógeno PWM. Los resultados muestran incorporación de rimidina tritiada por pocillo. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de tres pocillos. Grupo 1: controles. Grupo 2: deportistas tras sobre esfuerzo. Eje de abscisas: concentración de PWM ($\mu\text{g/ml}$) Eje de ordenadas: cuentas por minuto

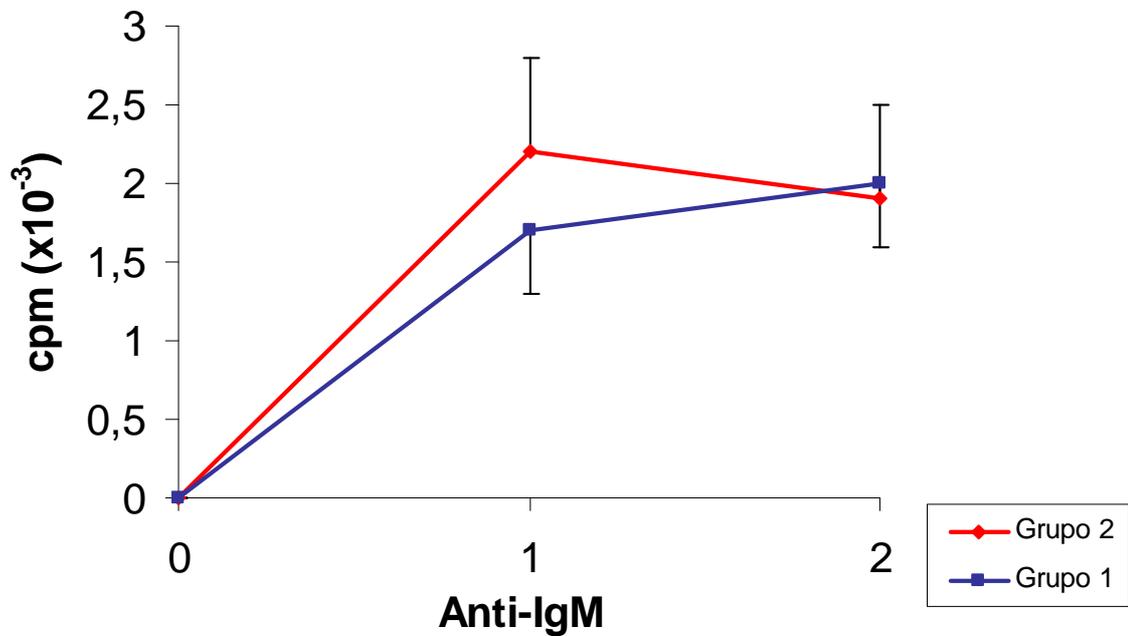


Figura 12. Respuesta proliferativa in vitro de linfocitos B estimulados por anticuerpo anti-IgM. Los resultados muestran la incorporación de timidina tritiada por pocillo. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de tres pocillos. Grupo 1: controles. Grupo 2: deportistas tras obreesfuerzo. Eje de abcisas: concentración de Anti-IgM ($\mu\text{g/ml}$). Eje de ordenadass: cuentas por minuto

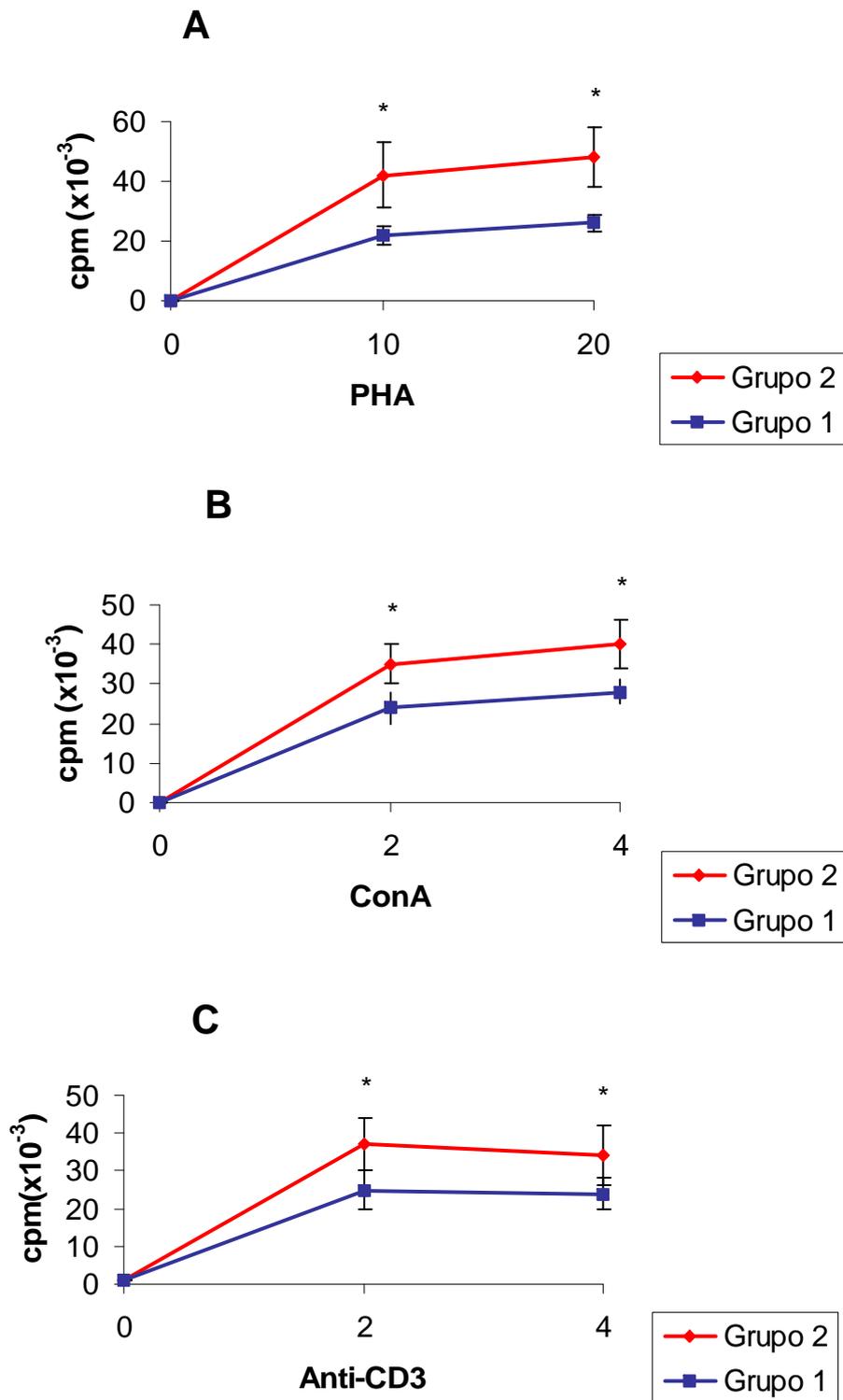


Figura 13: Respuesta proliferativa in vitro de linfocitos T estimulados por mitógenos PHA (A), con A (B) y anticuerpo anti-CD3 (C). Los resultados muestran la incorporación de timidita tritiada por pocillo. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de tres pocillos. Grupo 1: controles. Grupo 2: deportistas tras sobreesfuerzo. Eje de abcisas: concentración ($\mu\text{g/ml}$). Eje de ordenadas: cuentas por minuto (*): $p \leq 0,05$

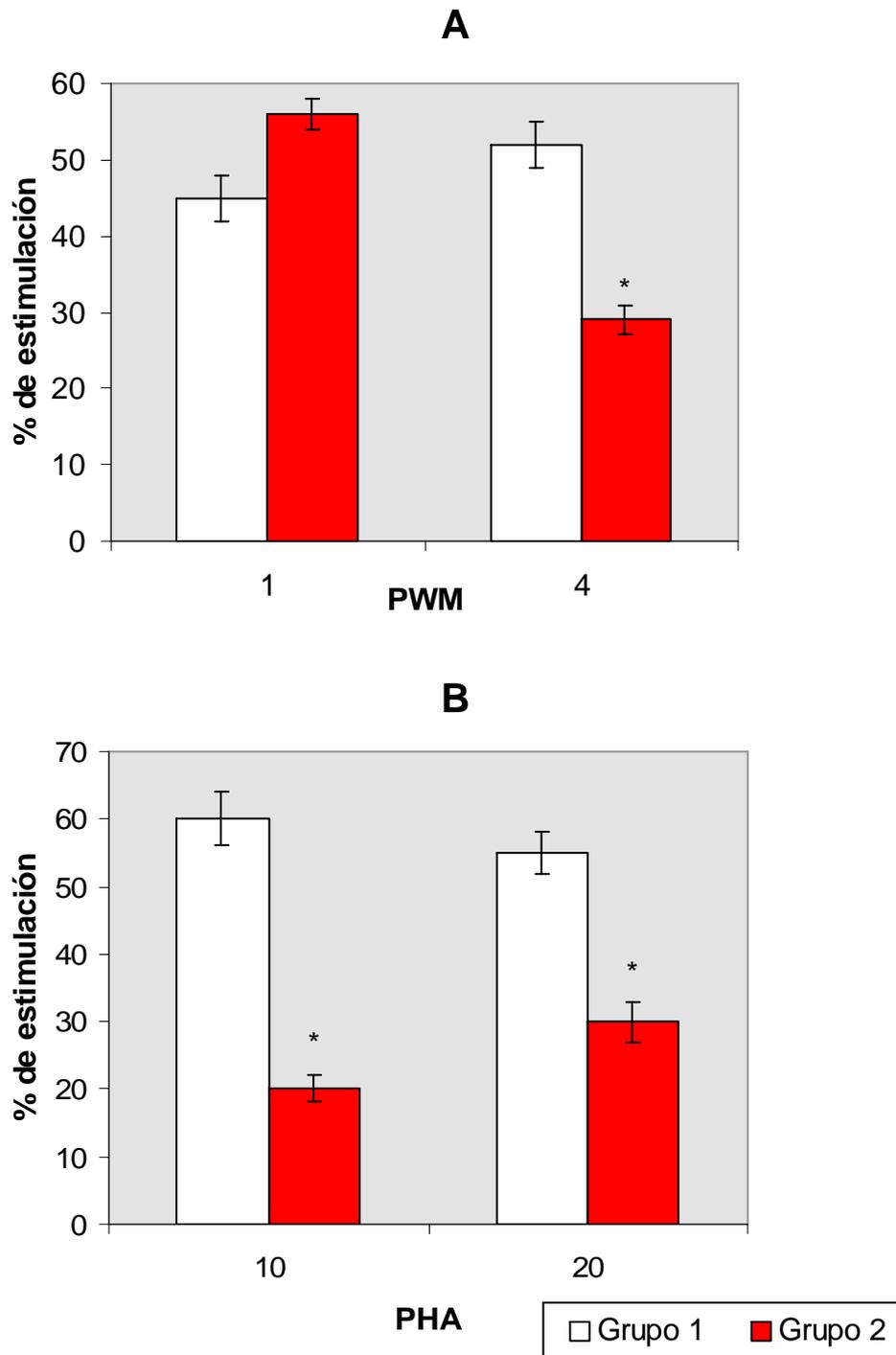


Figura 14: Efecto de la adición de interleukinas exógenas sobre la respuesta proliferativa in vitro de cultivos de linfocitos estimulados por mitógenos: (A) INterleukina-4 tras estímulo por PWM. (B) Interleukina-2 tras estímulo por PHA. Los resultados muestran el incremento de la incorporación de timidita tritiada por pocillo con respecto al control sin mitógeno. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de tres pocillos. Grupo 1: controles. Grupo 2: deportistas tras sobreesfuerzo. Eje de abscisas: concentración ($\mu\text{g/ml}$). Eje de ordenadas: porcentaje de estimulación. (*): $p \leq 0,05$.

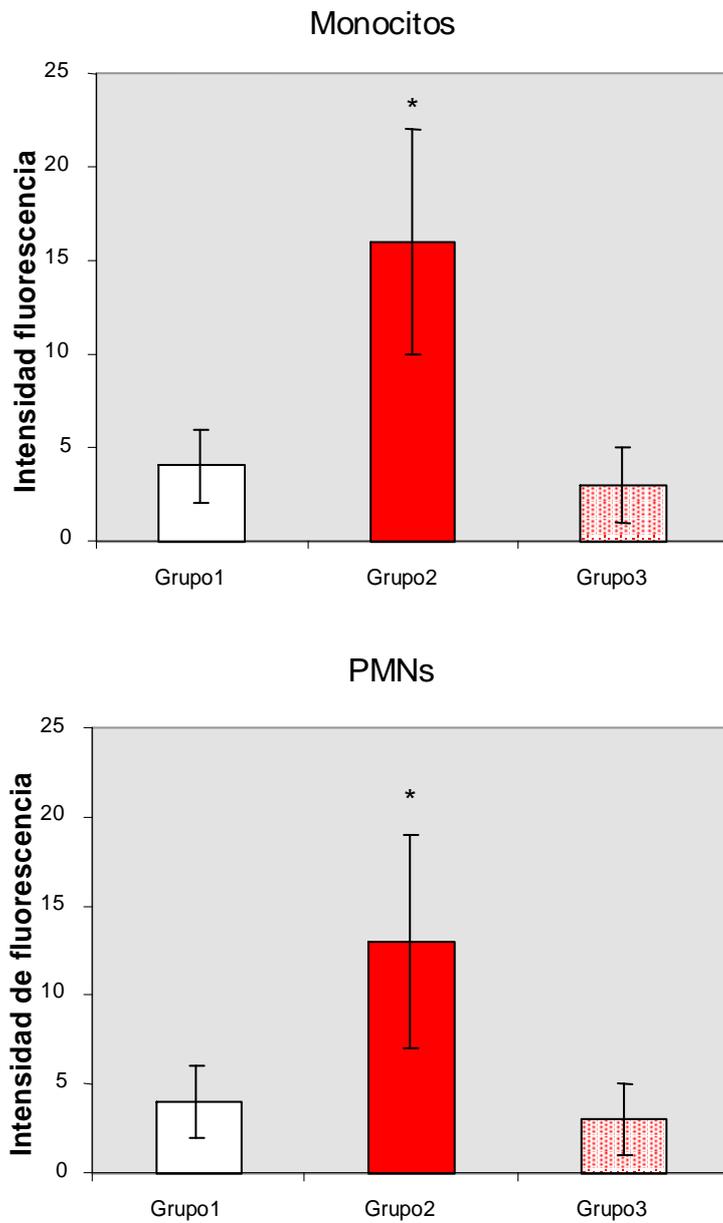


Figura 15. Efecto del ejercicio intenso sobre la expresión basal de la subunidad CD11b de la familia de las integrinas β_2 . En monocitos (A) y PMNs (B) se muestran valores medios \pm desviación estándar de la intensidad de fluorescencia emitida en sujetos control (grupo 1). Deportistas tras ejercicio intenso (grupo 2) y deportistas después de reposo (grupo 3) (*): $p \leq 0,05$.

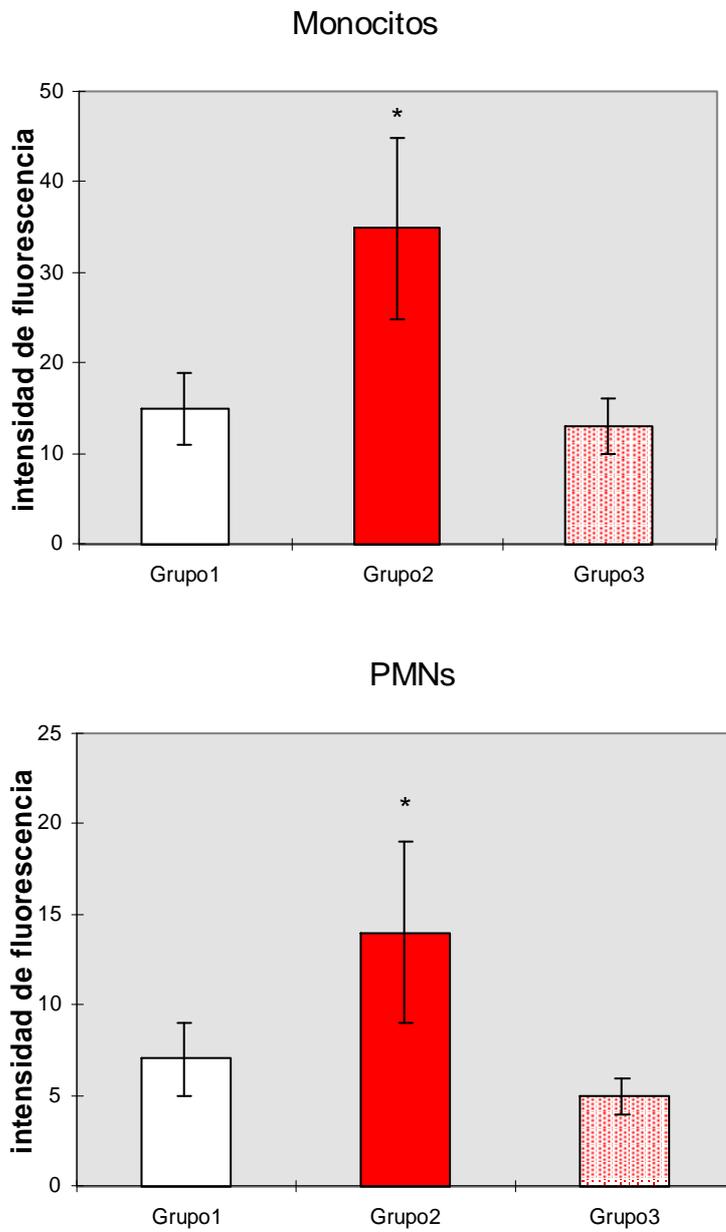


Figura 16. Efecto del ejercicio intenso sobre la expresión basal de la subunidad CD11b de la familia de las integrinas β_2 tras estímulo con fMLP. En monocitos (A) y PMNs (B) se muestran valores medios \pm desviación estándar de la intensidad de fluorescencia emitida en sujetos control (grupo 1). Deportistas tras ejercicio intenso (grupo 2) y deportistas después de reposo (grupo 3) (*): $p \leq 0,05$.

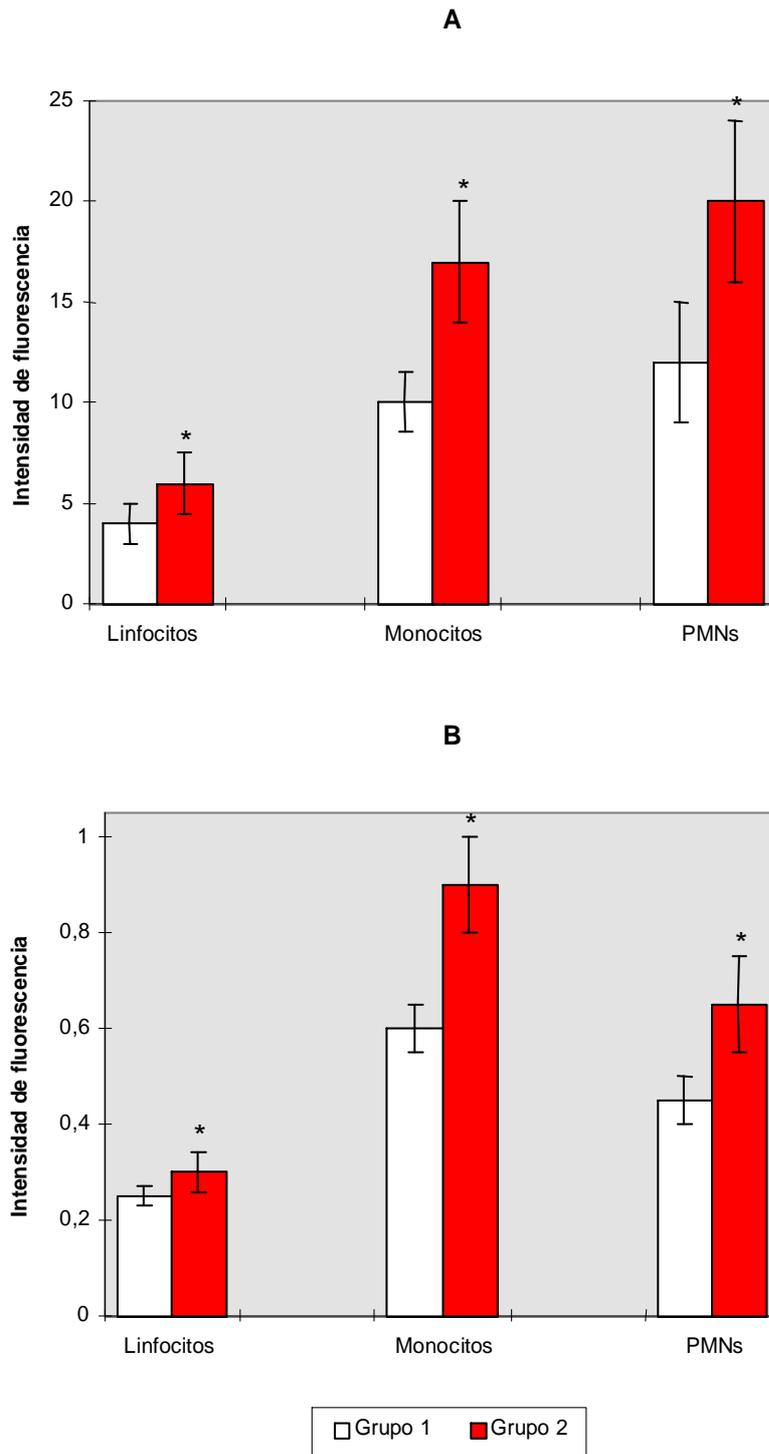


Figura 17. Efecto del ejercicio físico sobre el potencial de membrana mitocondrial (A) y sobre el contenido en peróxidos (B) en distintas subpoblaciones leucocitarias: Linfocitos, monolitos, PMNs presentan los valores de la media \pm desviación estándar de series de sujetos control (grupo 1) y deportistas tras sobreesfuerzo (grupo 2). El eje de ordenadas muestra en (A) la intensidad de fluorescencia de la rhodamina 123, proporcional al potencial de membrana mitocondrial y en (B) la intensidad de fluorescencia de la diclorodihidrofluoresceína, proporcional al contenido en peróxidos.

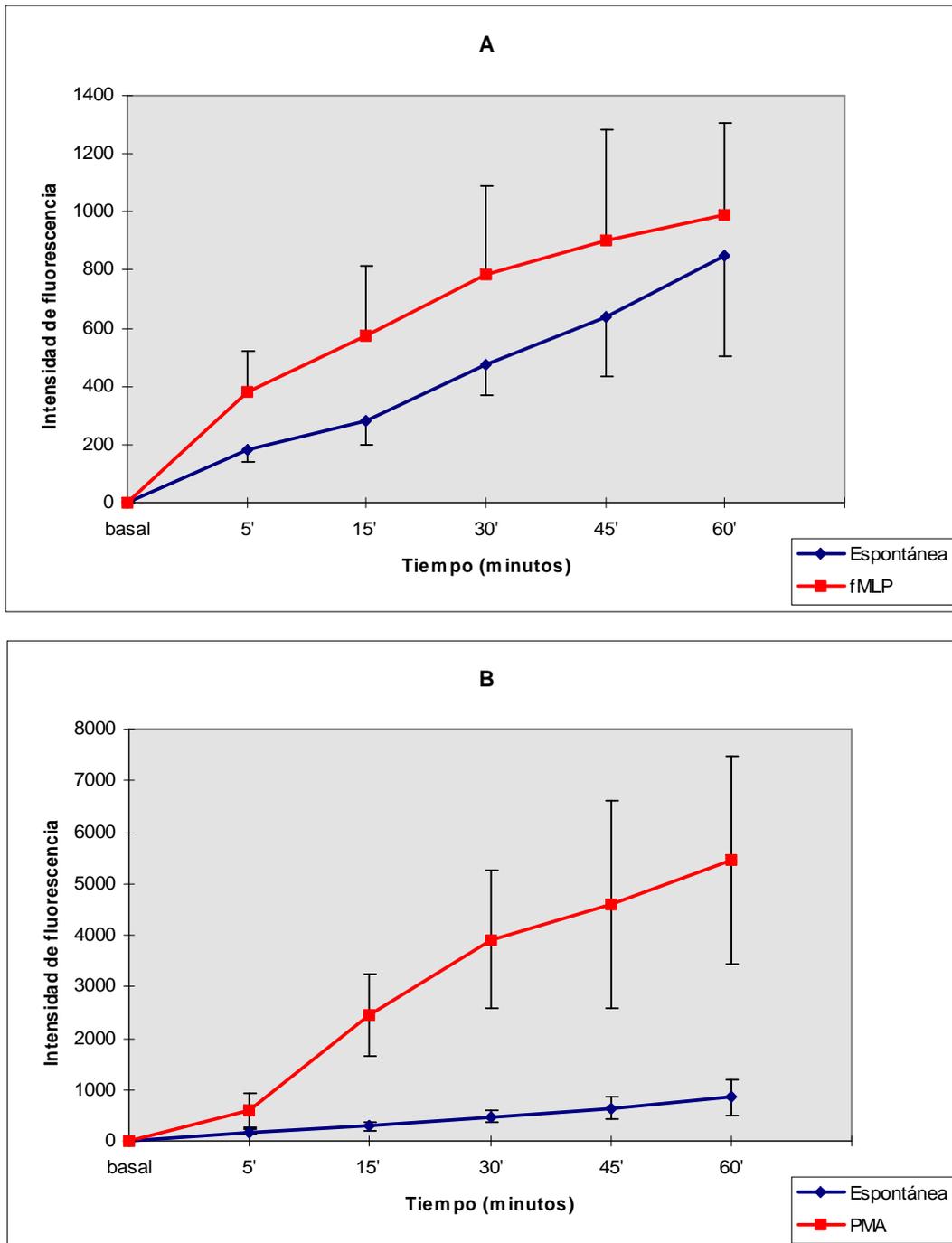


Figura 23. **Cinética de la producción de anión superóxido (O_2^-) en PMNs activados.** En (A) se muestra la activación espontánea y tras estímulo con fMLP. En (B) se muestra la activación espontánea y tras estímulo con PMA. Los datos corresponden al porcentaje de la fluorescencia roja de la hidrotidina, considerando como 100% la fluorescencia en el tiempo 0 para cada condición.

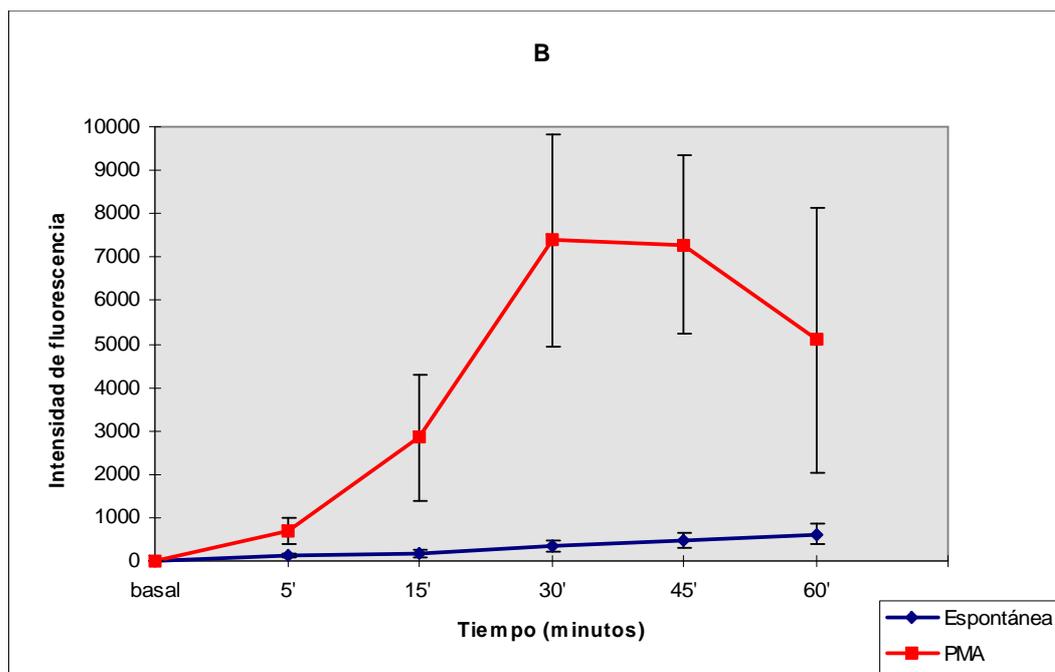
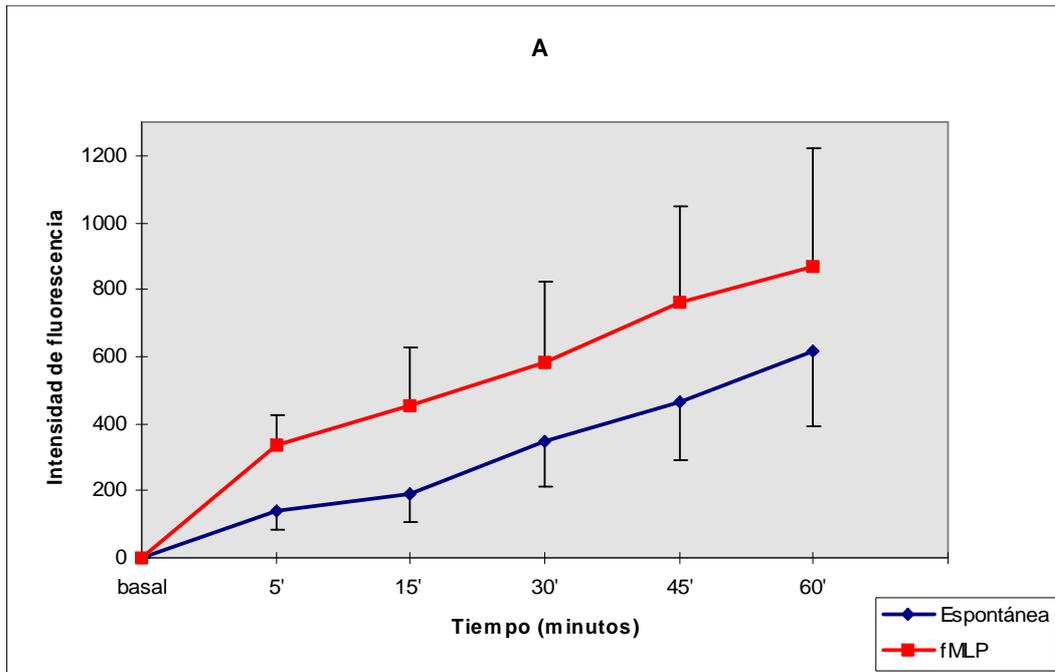


Figura 24. **Cinética de la producción de anión del peróxido de hidrógeno H_2O_2 en PMNs activados.** En (A) se muestra la activación espontánea y tras estímulo con fMLP. En (B) se muestra la activación espontánea y tras estímulo con PMA. Los datos corresponden al porcentaje de la fluorescencia roja de la hidrotidina, considerando como 100% la fluorescencia en el tiempo 0 para cada condición.

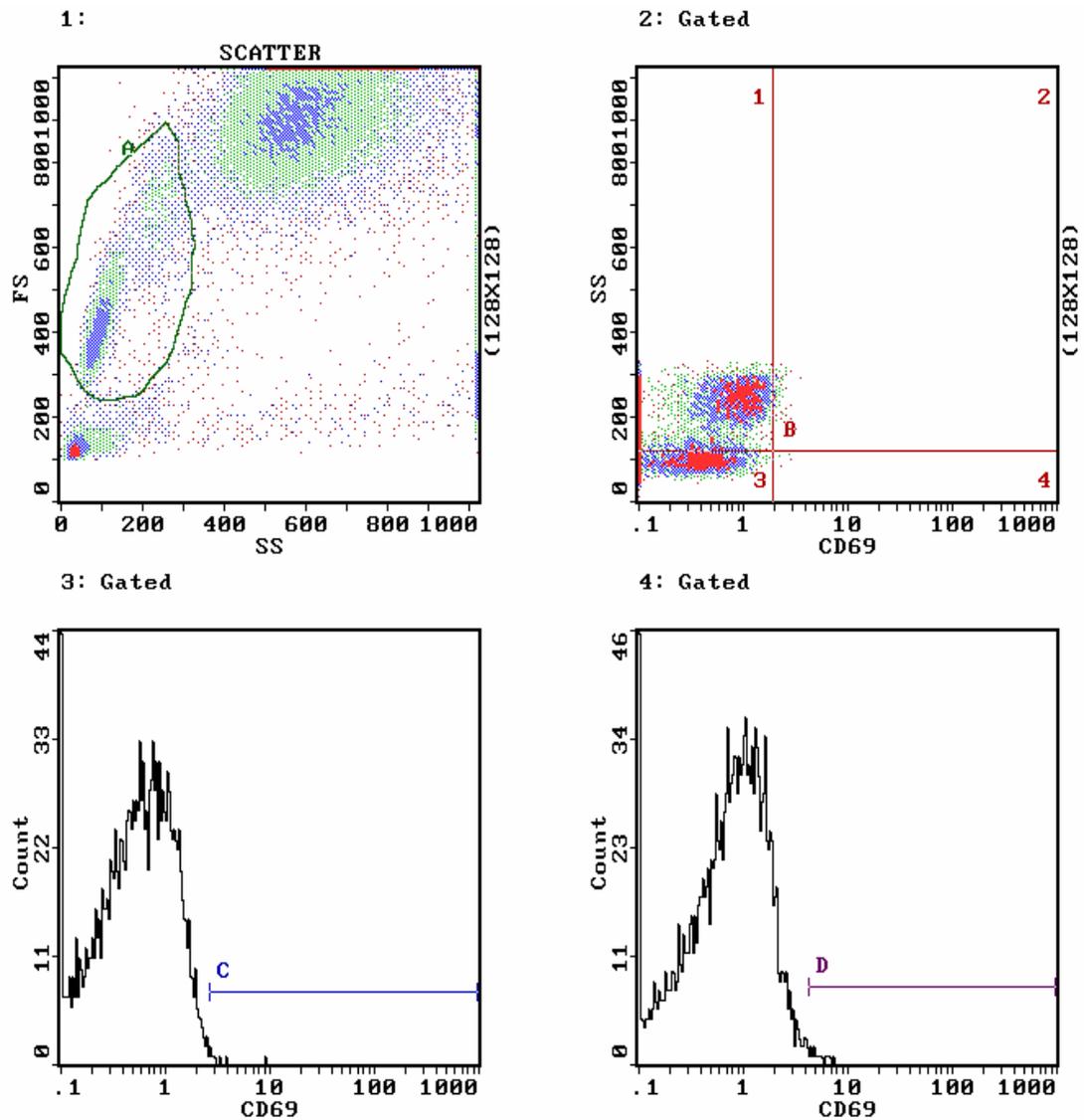


Figura 25. Ejemplo representativo de la determinación por citometría de flujo de la expresión del antígeno de activación temprana CD69. (1) Histograma biparamétrico que muestra la población de células mononuclear (para incluir la población linfocitos activados) seleccionada por su morfología. (2) Histograma de expresión de CD69 en el control y tratados durante 3 horas con 5 μ L de H₂O₂ (3) ò 0.5 μ L de tBOOH

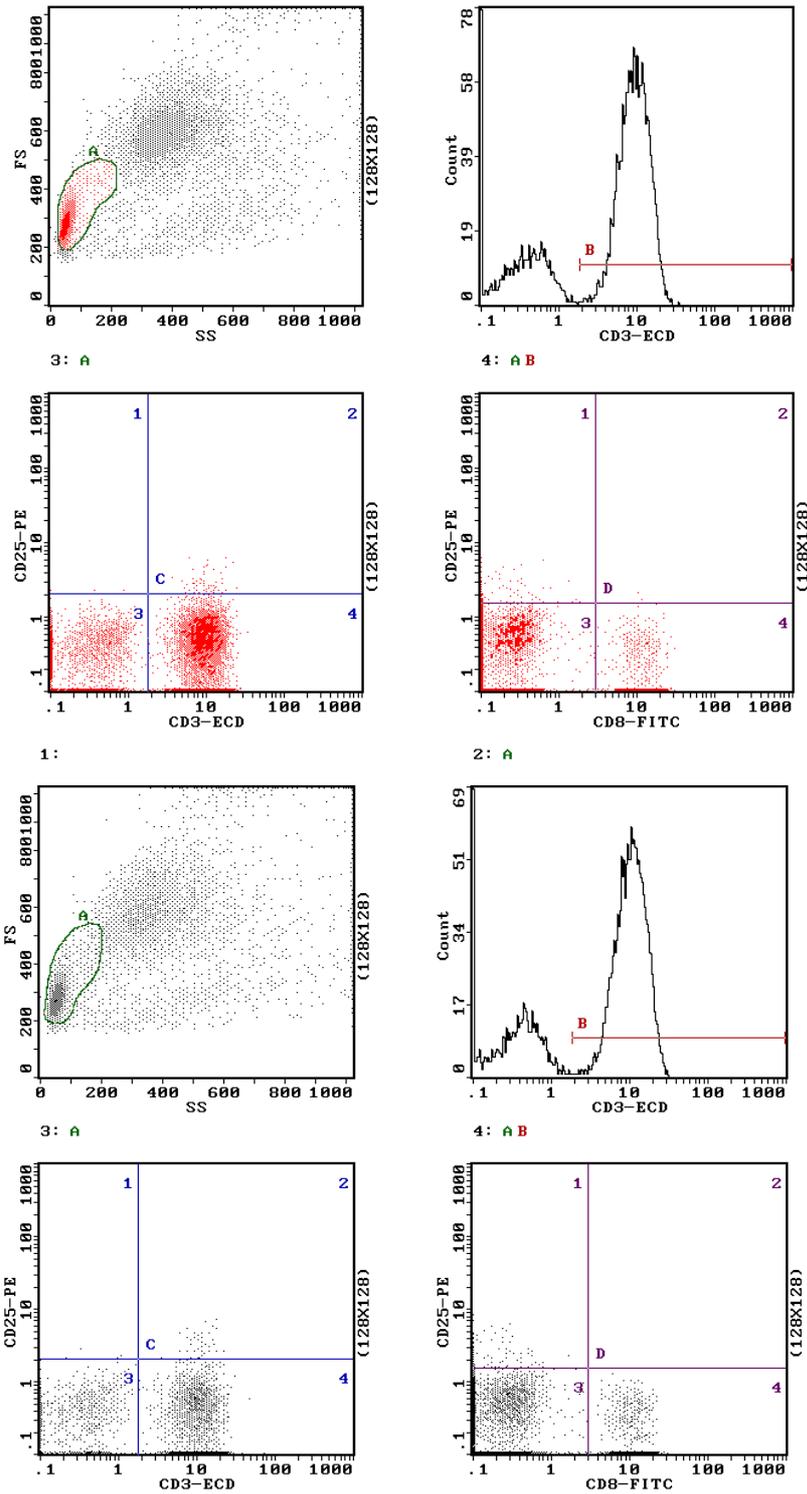


Figura 26. Ejemplo representativo de la determinación por citometría de flujo de la expresión del antígeno de activación CD25. Los histogramas muestran la población de linfocitos CD3+ seleccionados por su morfología (1) e inmunofenotipo (2). Los histogramas 3 y 4 muestran la coexpresión de CD3, CD25 y CD8 en las regiones así definidas, en cultivos control (A) y tratados con tBOOH 1µM durante 3 horas (B).

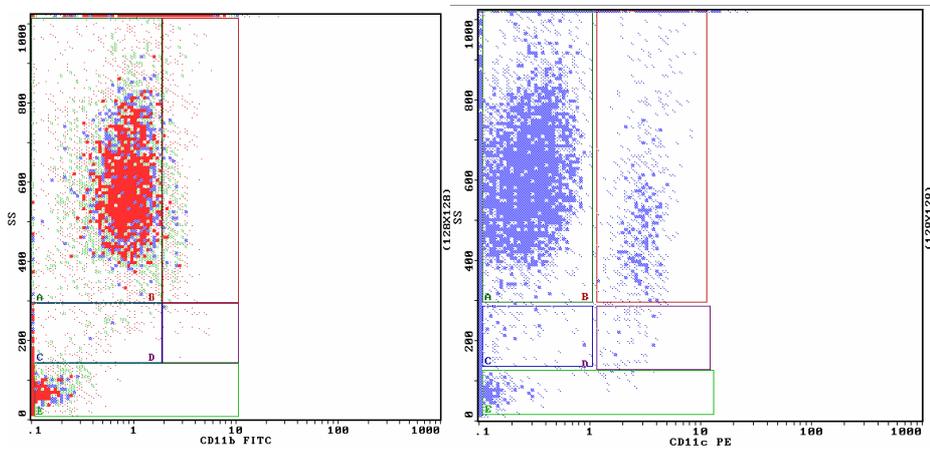
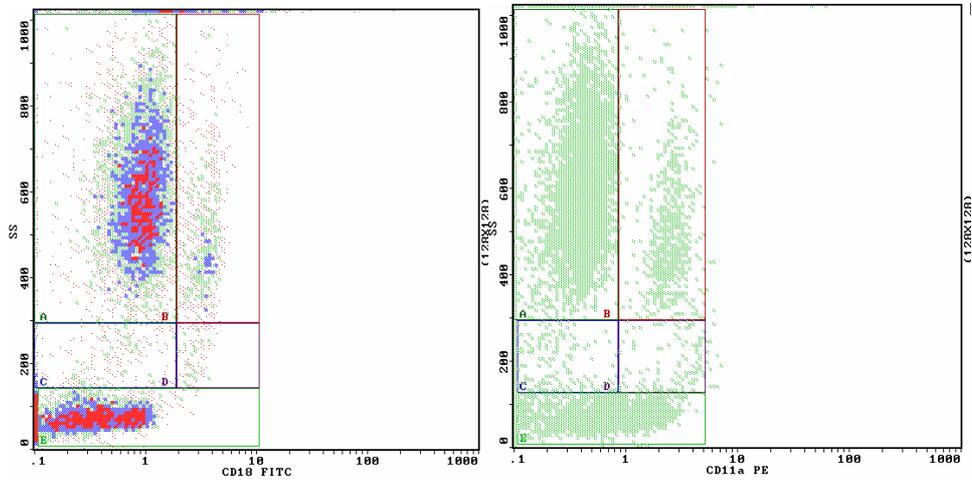


Figura 27. Ejemplo representativo de la estrategia citométrica para el estudio de la expresión de moléculas de adhesión en granulocitos y monocitos. Los histogramas muestran la representación de la granularidad frente a la intensidad de fluorescencia tras el marcaje con un anticuerpo específico para una determinada integrina: A:CD18, B:CD11a, C:CD11b y D:CD11c, respectivamente. En los histogramas se observan regiones correspondientes a poblaciones celulares con diferente intensidad de expresión de la molécula determinada, que se analizan de forma independiente.

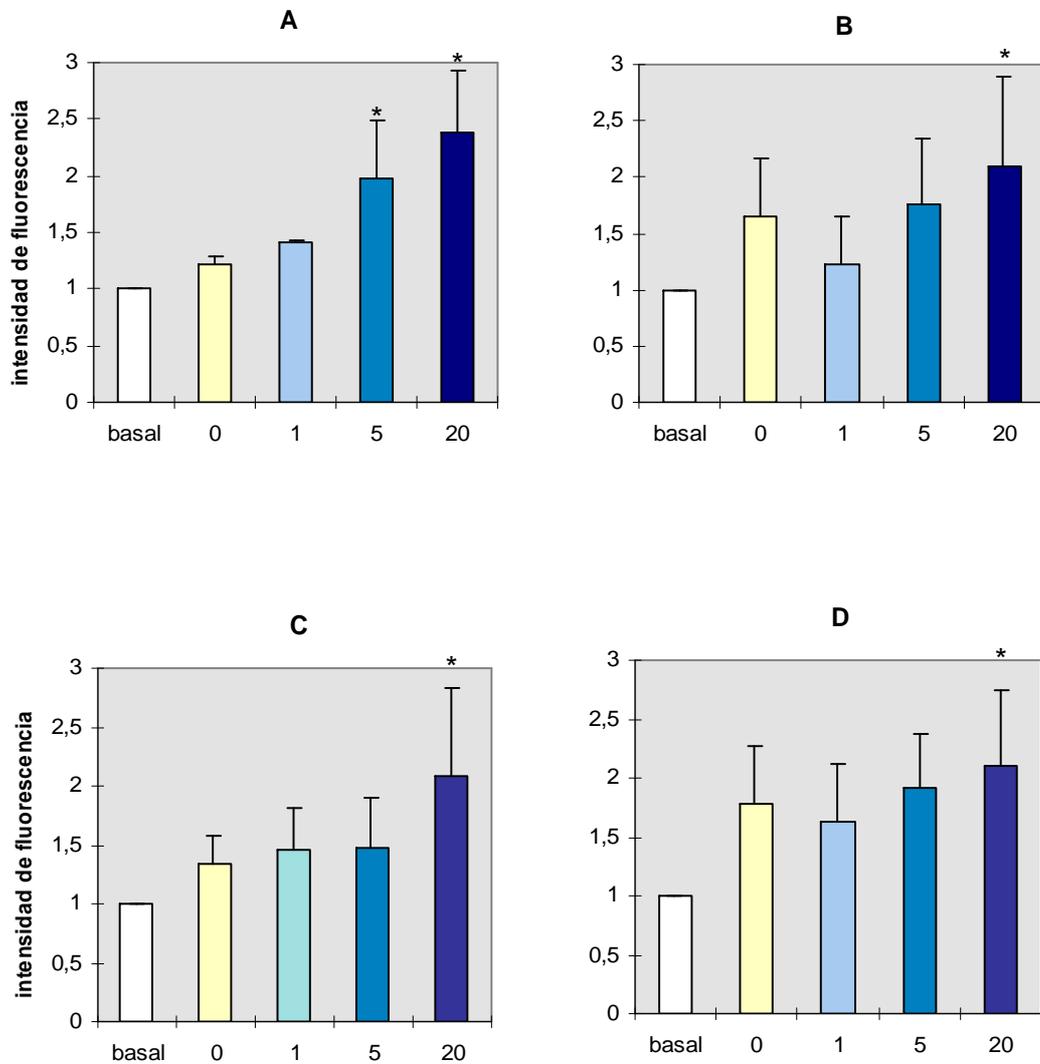


Figura 28. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD18 en granulocitos de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora (A y C) y 3 horas (B y D), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de granulocitos con baja (A y B) y elevada (C y D) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones y están normalizadas respecto al valor basal (t= 0 y concentración 0) de cada una de ellas. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂ (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) p≤0,05.

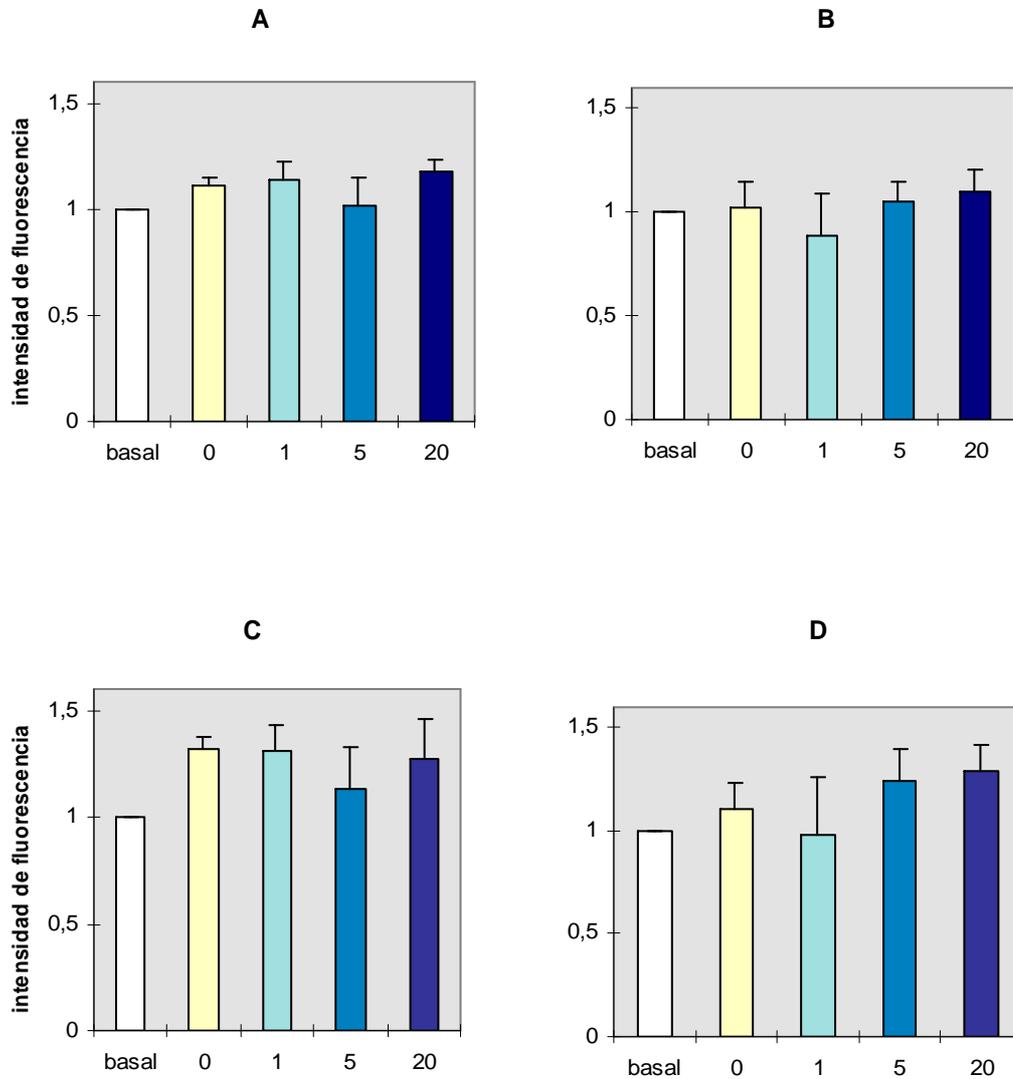


Figura 29. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11a en granulocitos de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora (A y C) y 3 horas (B y D), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de granulocitos con baja (A y B) y elevada (C y D) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones y están normalizadas respecto al valor basal (t= 0 y concentración 0) de cada una de ellas. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂ (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) p≤0,05.

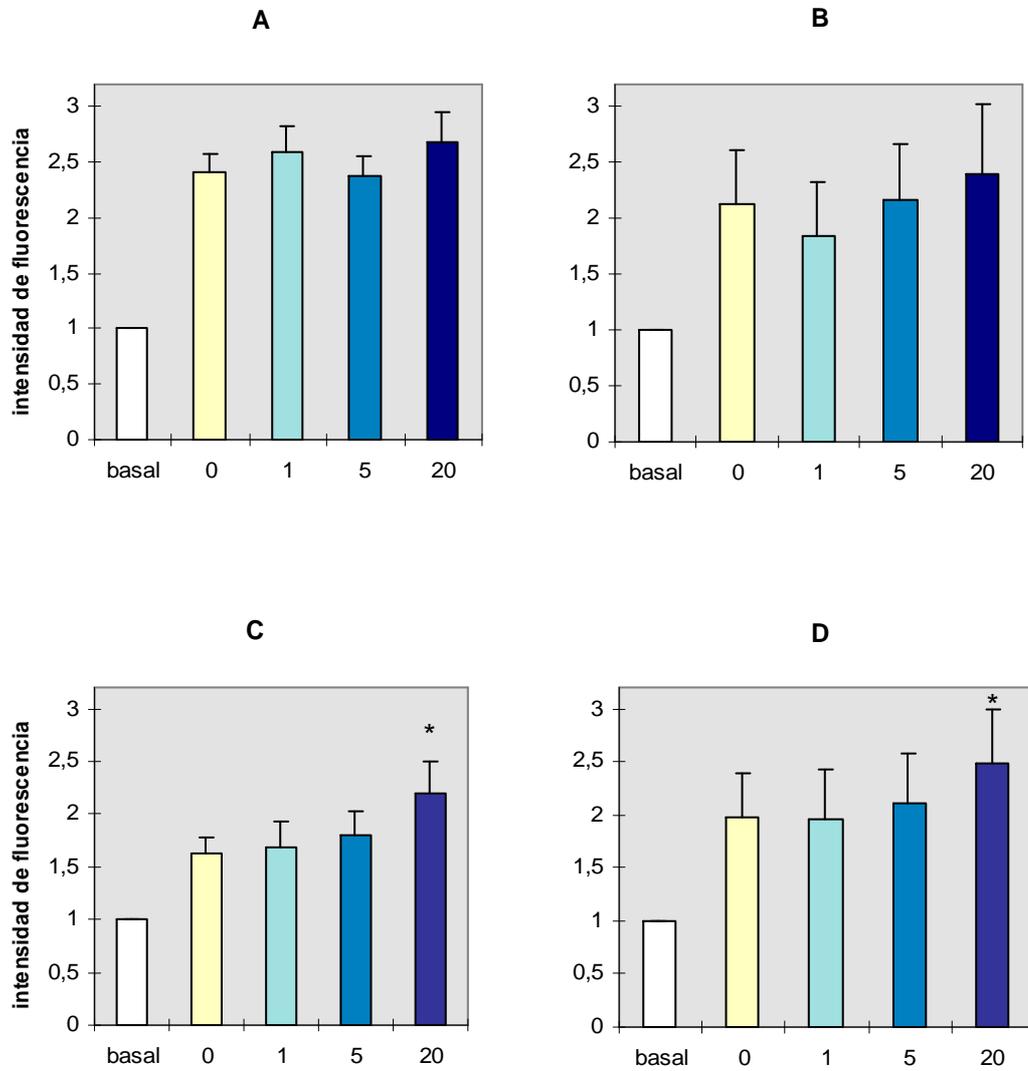


Figura 30. Efecto de la adición *in vitro* de H_2O_2 sobre la expresión espontánea de CD11b en granulocitos de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora (A y C) y 3 horas (B y D), a $37^\circ C$. Se muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de granulocitos con baja (A y B) y elevada (C y D) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media \pm desviación estándar de 10 determinaciones y están normalizadas respecto al valor basal ($t=0$ y concentración 0) de cada una de ellas. Eje de abscisas, concentración de H_2O_2 (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

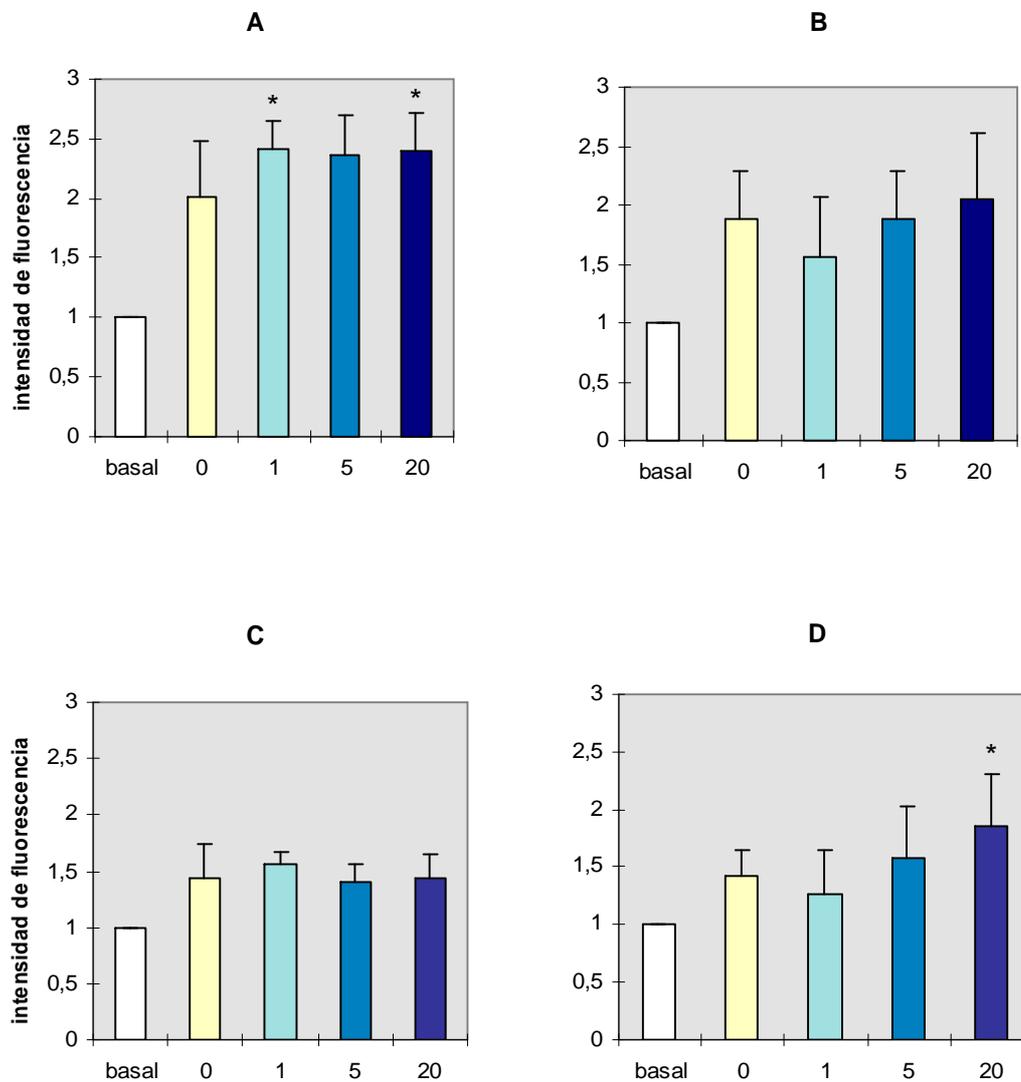


Figura 31. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11c en granulocitos de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora (A y C) y 3 horas (B y D), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de granulocitos con baja (A y B) y elevada (C y D) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones y están normalizadas respecto al valor basal (t= 0 y concentración 0) de cada una de ellas. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂ (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) p≤0,05.

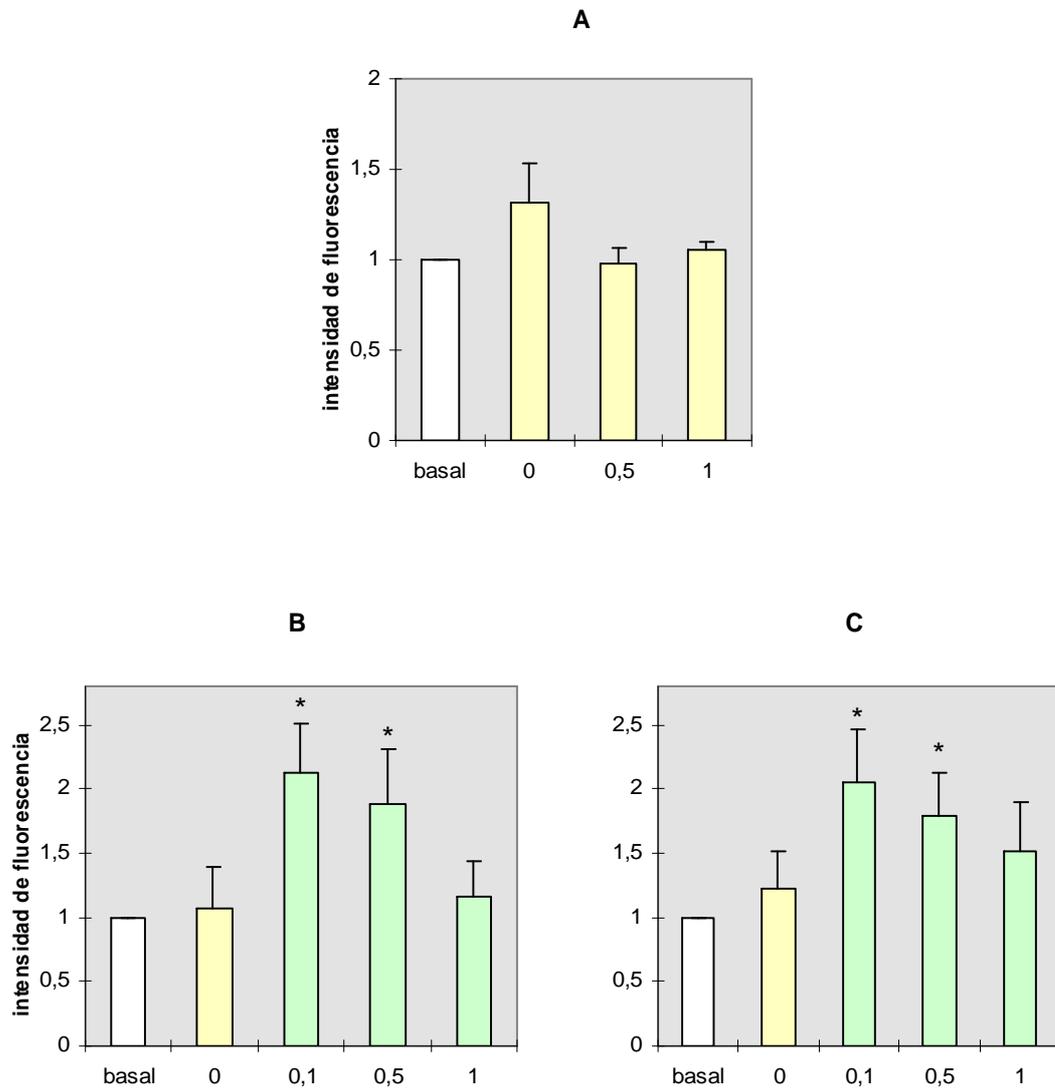


Figura 32. **Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD18 en granulocitos de sangre periférica.** Las muestras fueron incubadas durante 3 horas (A) y 24 horas (B y C), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos a las 24 h. en las subpoblaciones de granulocitos con baja (B) y elevada (C) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia, normalizada respecto al valor basal (t= 0 y concentración 0) de cada una de ellas. (*) $p \leq 0,05$.

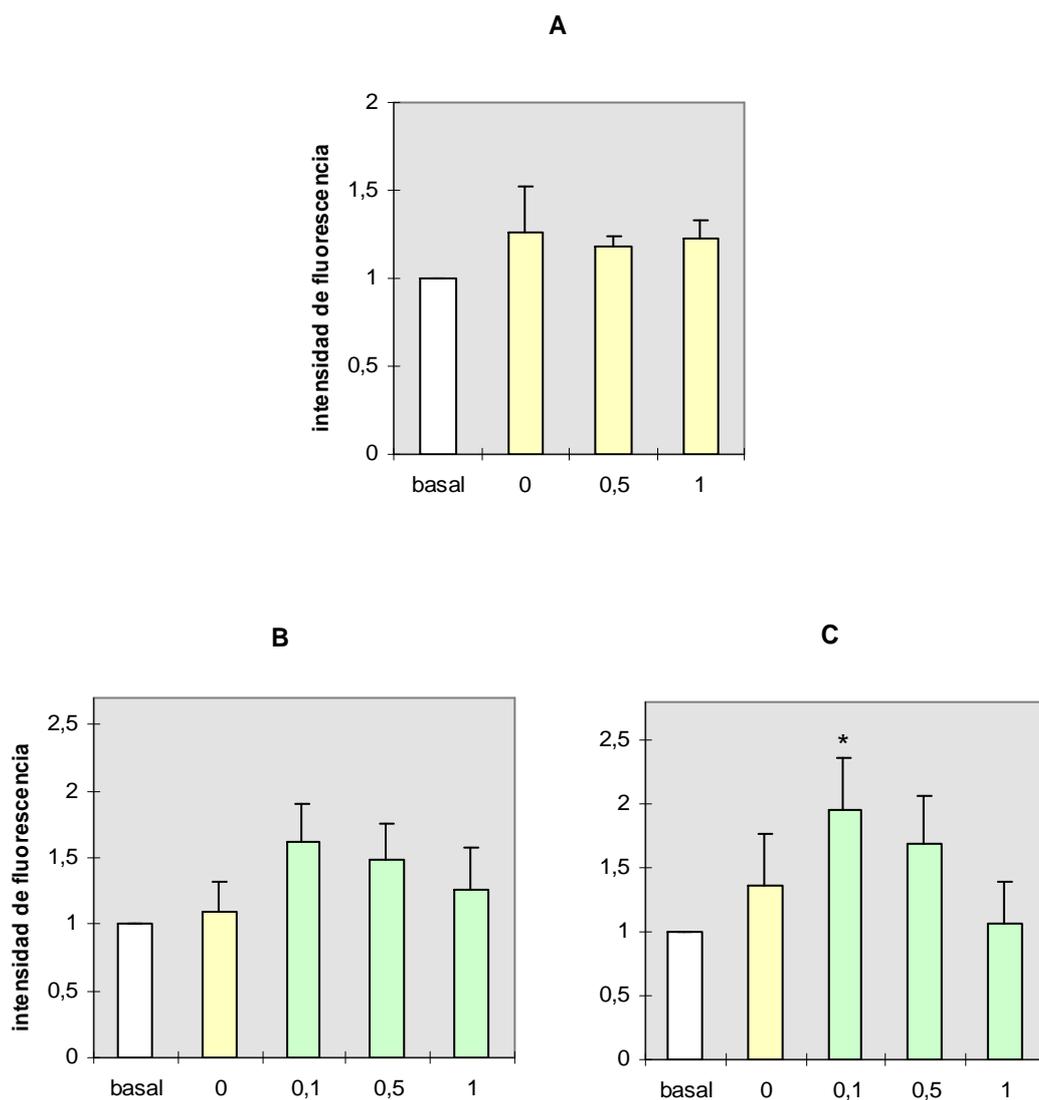


Figura 33. **Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11a en granulocitos de sangre periférica.** Las muestras fueron incubadas durante 3 horas (A) y 24 horas (B y C), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos a las 24 h. en las subpoblaciones de granulocitos con baja (B) y elevada (C) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia, normalizada respecto al valor basal (t= 0 y concentración 0) de cada una de ellas.

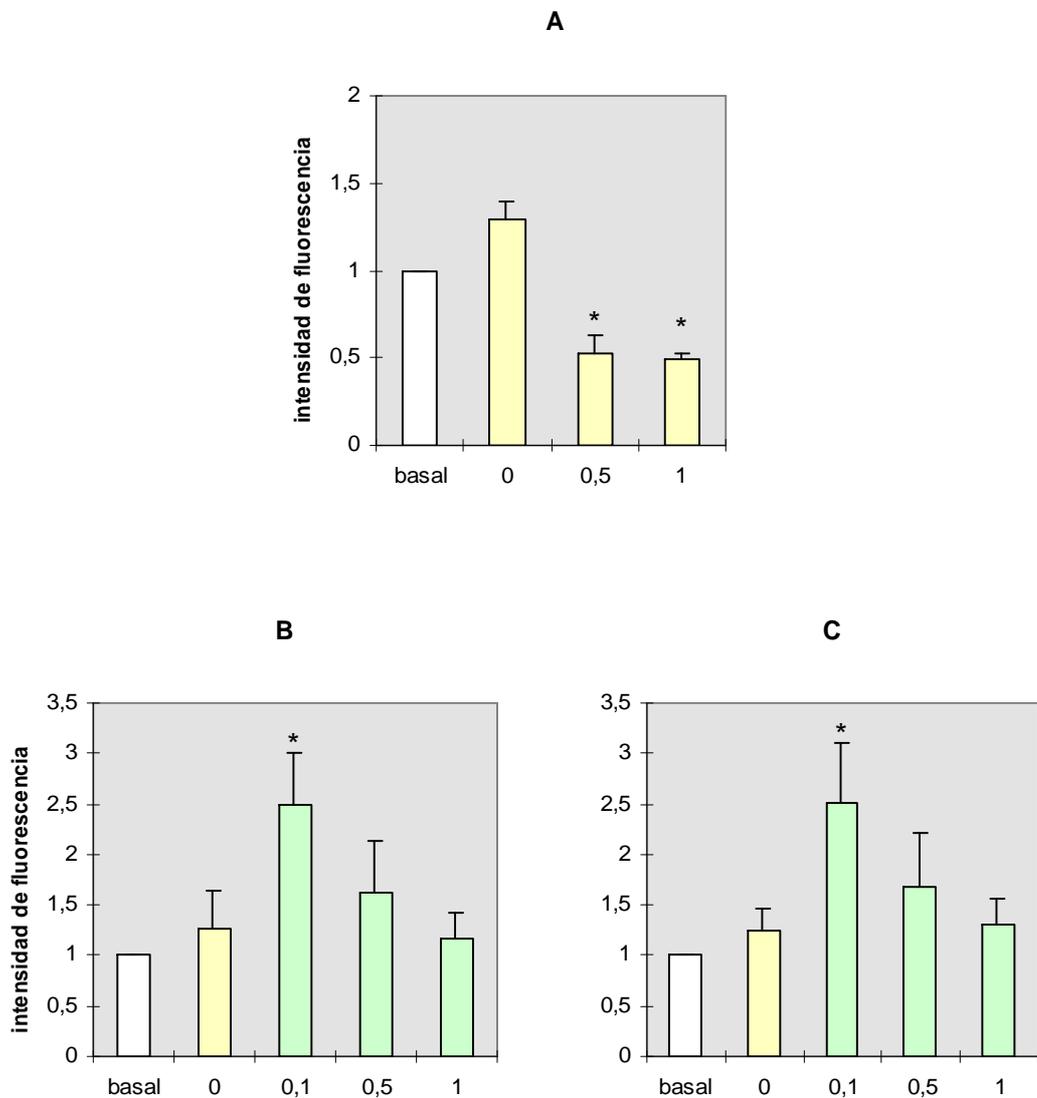


Figura 34. **Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11b en granulocitos de sangre periférica.** Las muestras fueron incubadas durante 3 horas (A) y 24 horas (B y C), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos a las 24 h. en las subpoblaciones de granulocitos con baja (B) y elevada (C) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia, normalizada respecto al valor basal ($t=0$ y concentración 0) de cada una de ellas. (*) $p \leq 0,05$.

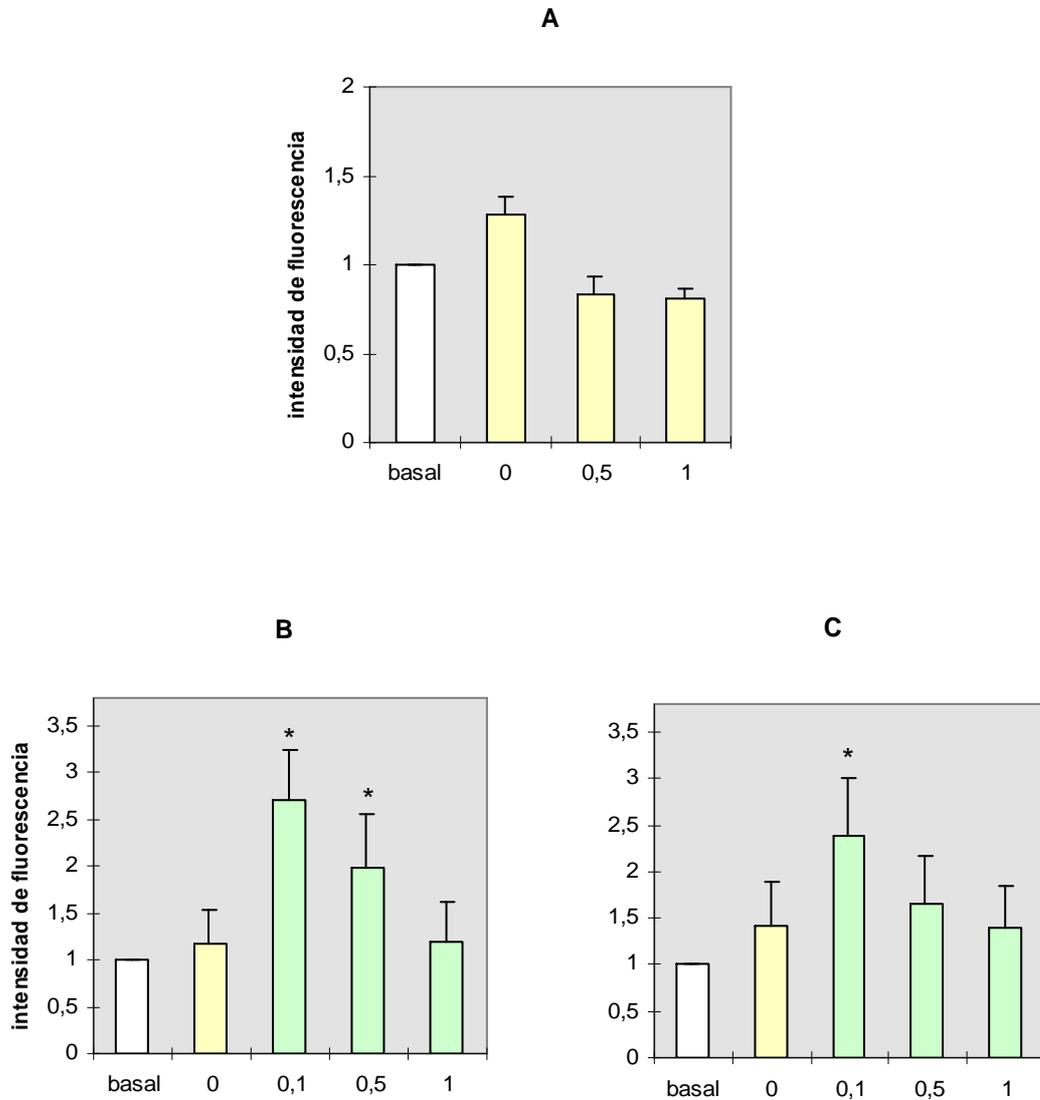


Figura 35. **Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11c en granulocitos de sangre periférica.** Las muestras fueron incubadas durante 3 horas (A) y 24 horas (B y C), a 37°C. Se muestran los valores obtenidos a las 24 h. en las subpoblaciones de granulocitos con baja (B) y elevada (C) expresión, como se indica en la Figura 20. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia, normalizada respecto al valor basal ($t=0$ y concentración 0) de cada una de ellas. (*) $p \leq 0,05$.

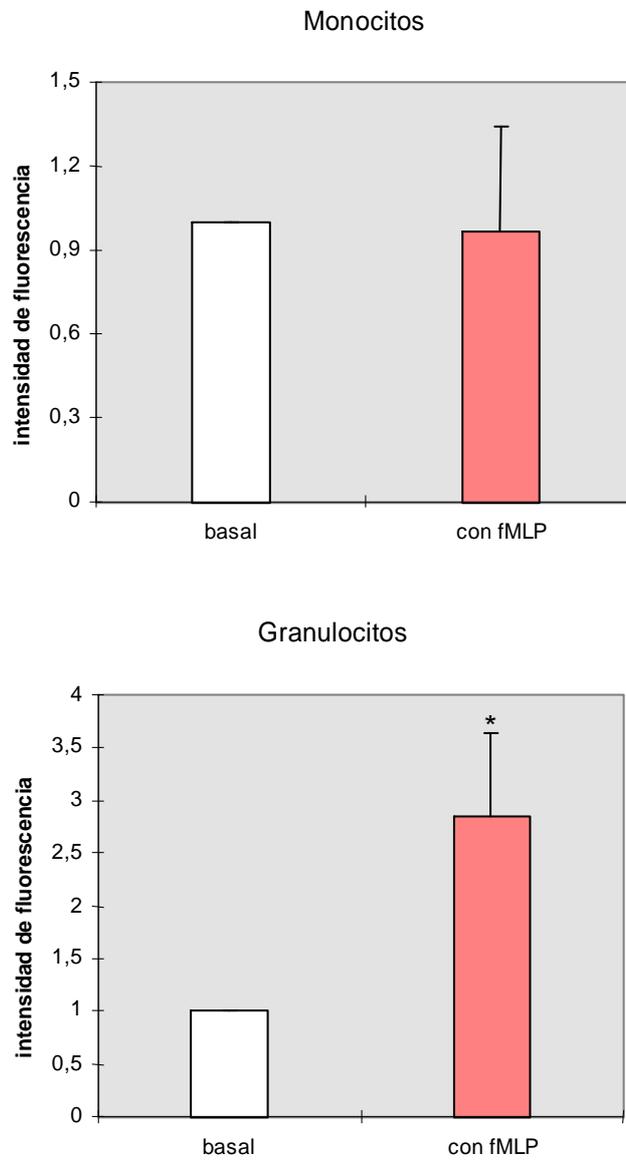


Figura 36. Efecto de la adición *in vitro* de fMLP sobre la expresión espontánea de CD18 en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 11 determinaciones, normalizadas respecto a su valor basal. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con fMLP. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$

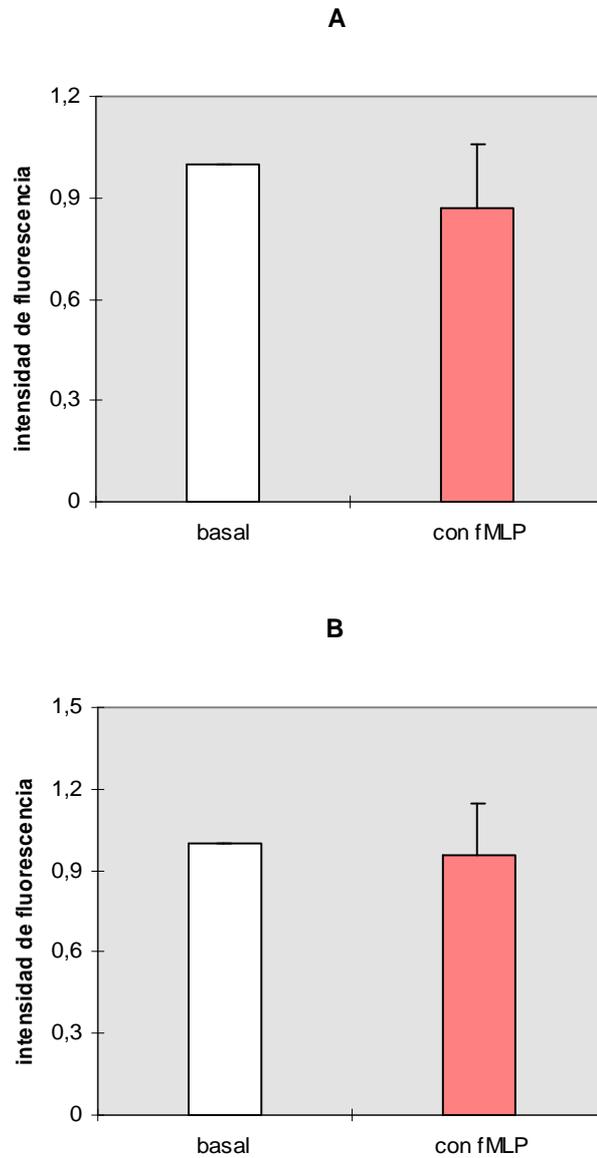


Figura 37. Efecto de la adición *in vitro* de fMLP sobre la expresión espontánea de CD11a en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 11 determinaciones, normalizadas respecto a su valor basal. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con fMLP. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

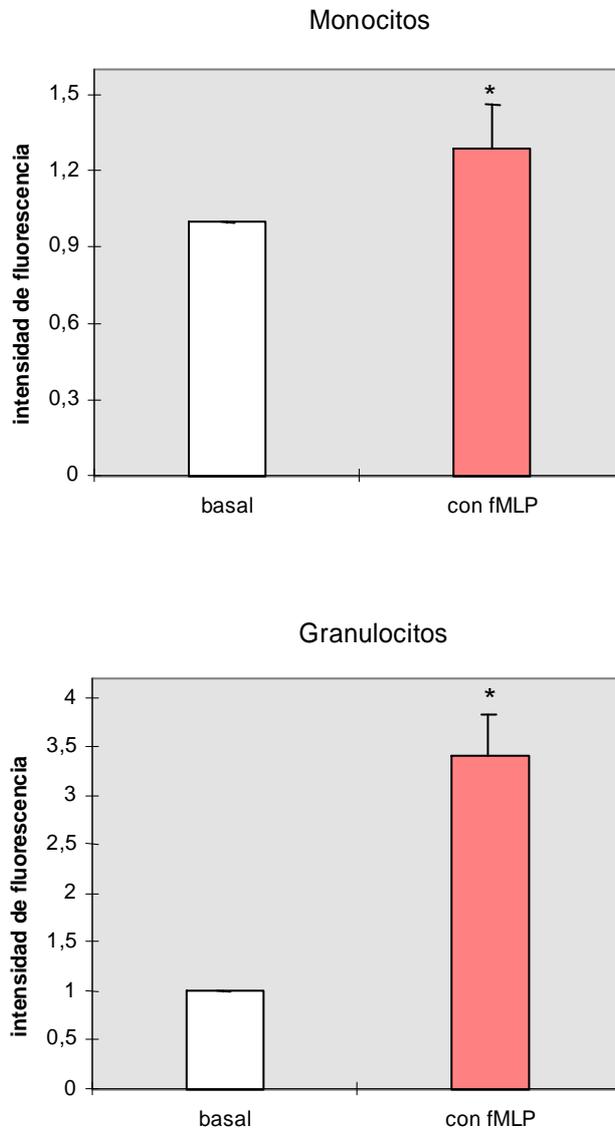


Figura 38. Efecto de la adición *in vitro* de fMLP sobre la expresión espontánea de CD11b en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 11 determinaciones, normalizadas respecto a su valor basal. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con fMLP. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

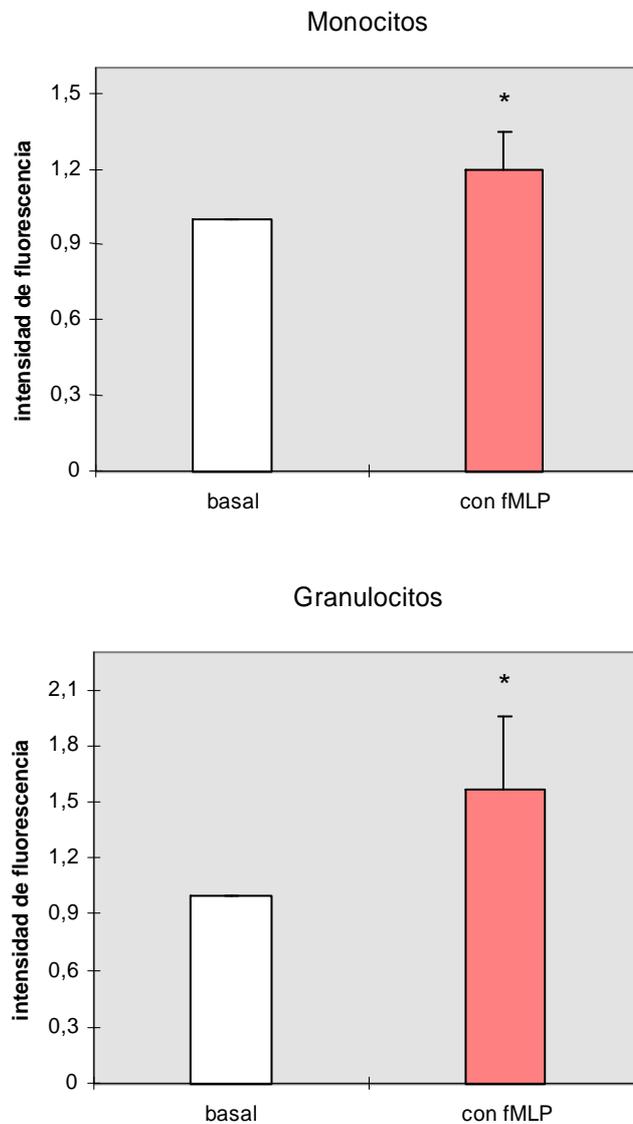


Figura 39. Efecto de la adición *in vitro* de fMLP sobre la expresión espontánea de CD11c en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 11 determinaciones, normalizadas respecto a su valor basal. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con fMLP. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

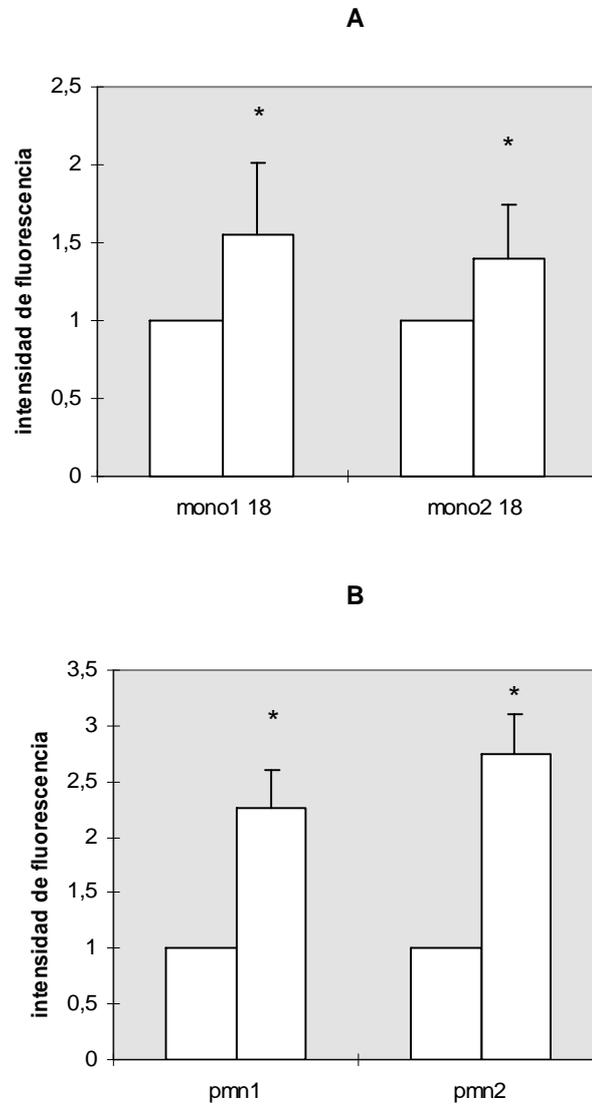


Figura 40. Efecto de la adición *in vitro* de PMA sobre la expresión espontánea de CD18 en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica. Las subpoblaciones 1 y 2 muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de monocitos y granulocitos con baja y elevada expresión, como se indica en la Figura 20. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con PMA (valores normalizados respecto a sus basal). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

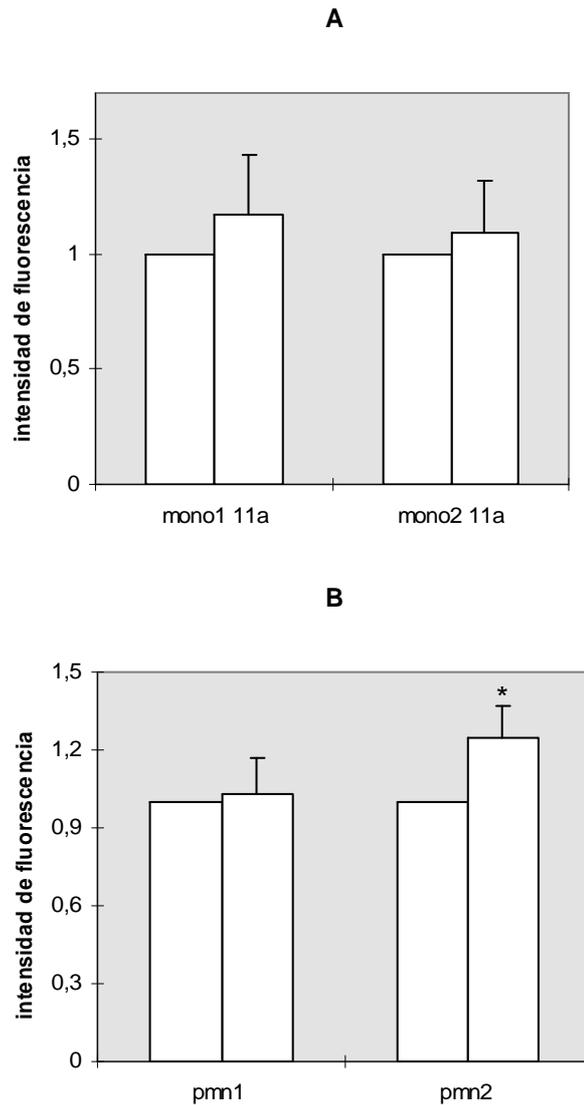


Figura 41. **Efecto de la adición *in vitro* de PMA sobre la expresión espontánea de CD11a en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica.** Las subpoblaciones 1 y 2 muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de monocitos y granulocitos con baja y elevada expresión, como se indica en la Figura 20. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con PMA (valores normalizados respecto a su basal). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

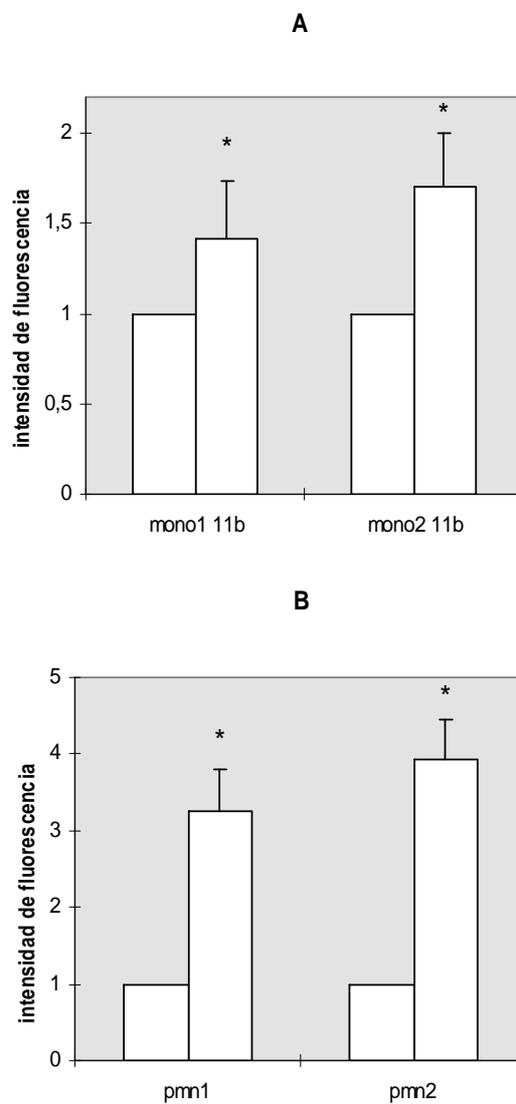


Figura 42. **Efecto de la adición *in vitro* de PMA sobre la expresión espontánea de CD11b en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica.** Las subpoblaciones 1 y 2 muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de monocitos y granulocitos con baja y elevada expresión, como se indica en la Figura 20. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con PMA (valores normalizados respecto a su basal). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

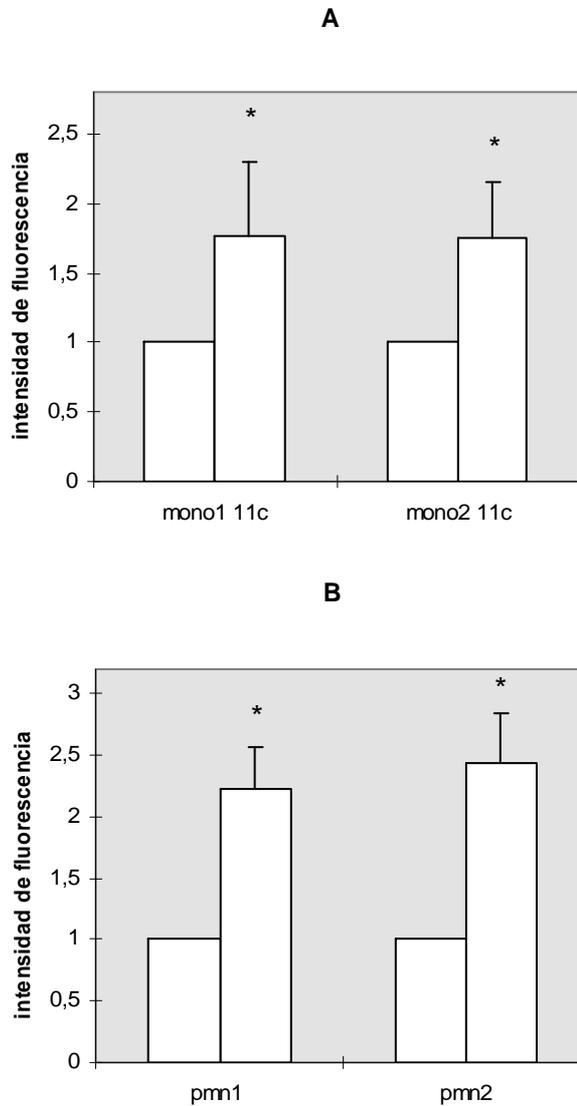


Figura 43. Efecto de la adición *in vitro* de PMA sobre la expresión espontánea de CD11c en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica. Las subpoblaciones 1 y 2 muestran los valores obtenidos en las subpoblaciones de monocitos y granulocitos con baja y elevada expresión, como se indica en la Figura 20. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, serie basal y serie estimulada con PMA (valores normalizados respecto a su basal). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia. (*) $p \leq 0,05$.

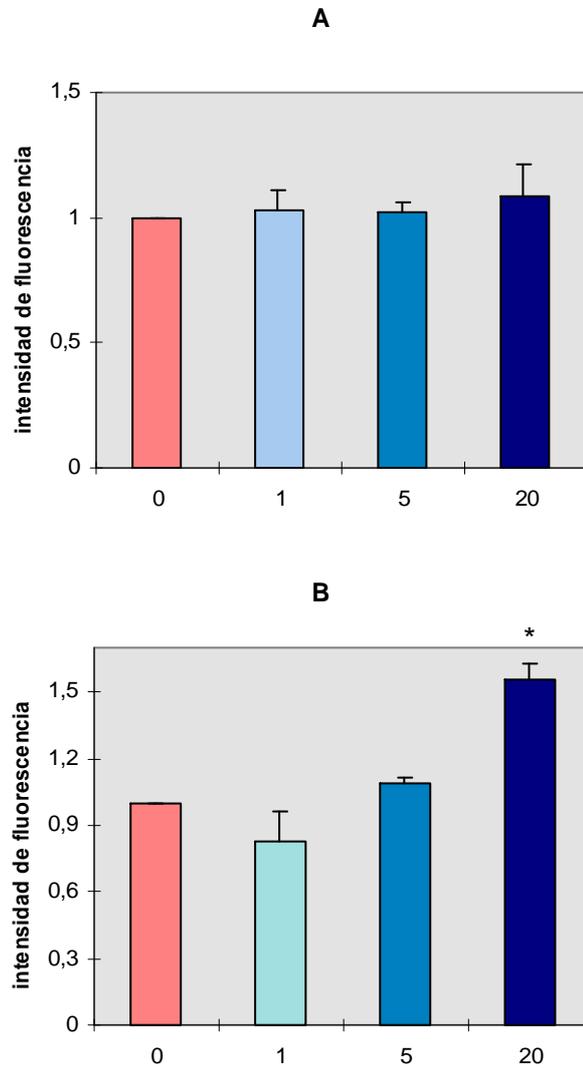


Figura 44. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD18 en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP). (*) p≤0,05

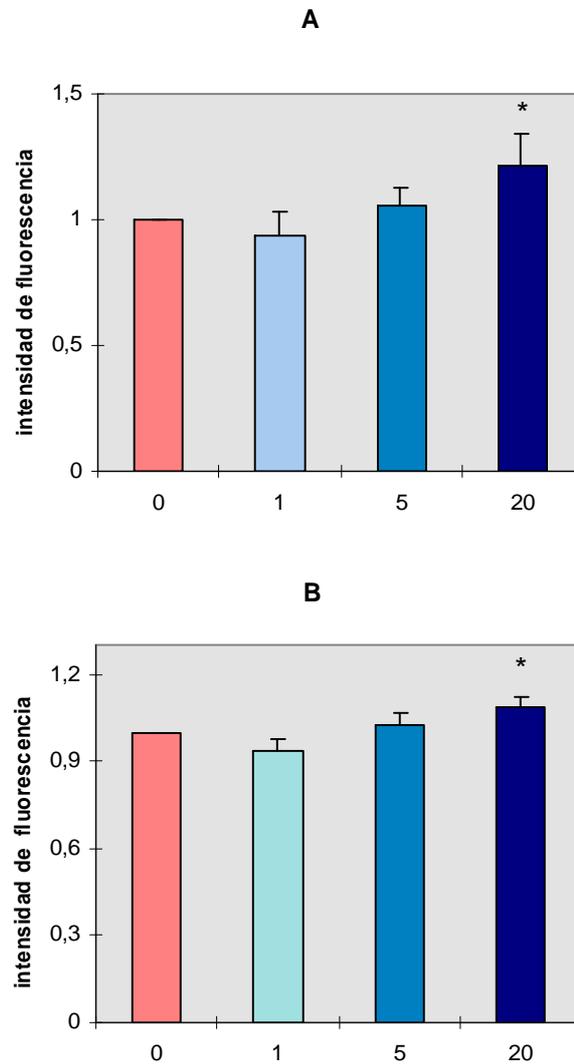


Figura 45. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11a en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP). (*) p≤0,05.

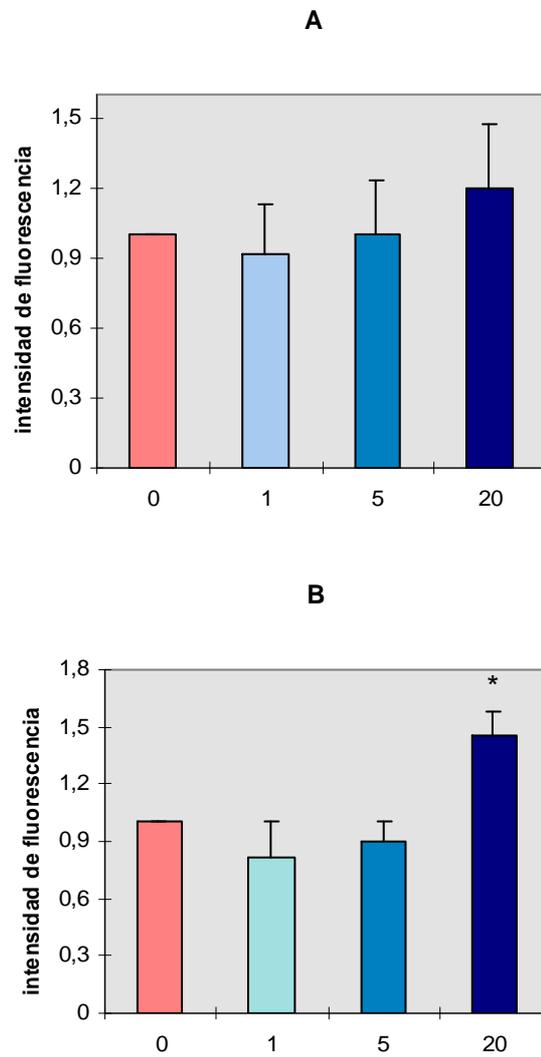


Figura 46. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11b en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP). (*) p≤0,05.

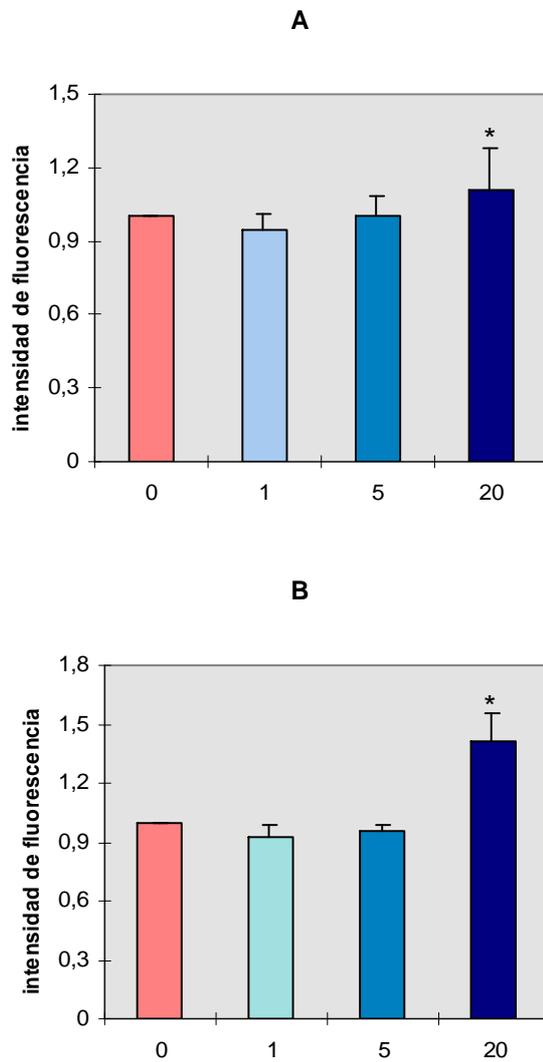


Figura 47. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11c en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 10 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP). (*) p≤0,05.

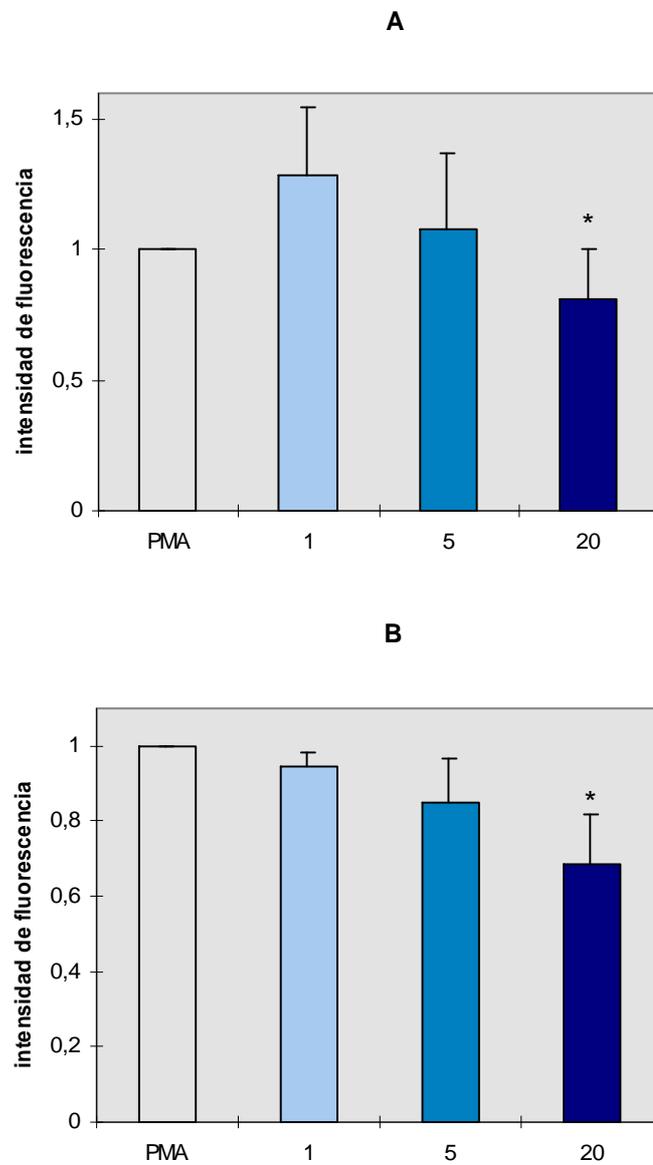


Figura 48. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD18 en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂ (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 tiempo 3 horas (controles con PMA). (*) p≤0,05

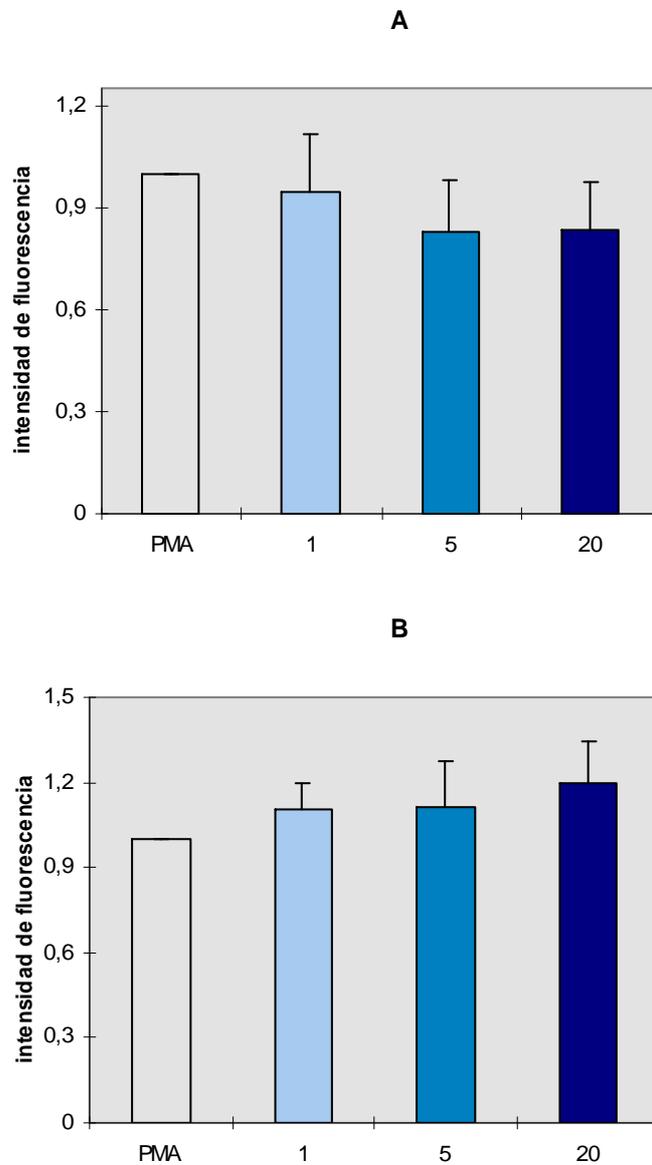


Figura 49. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11a en monolitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, , concentración de H₂O₂ (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 tiempo 3 horas (controles con PMA). (*) p≤0,05.

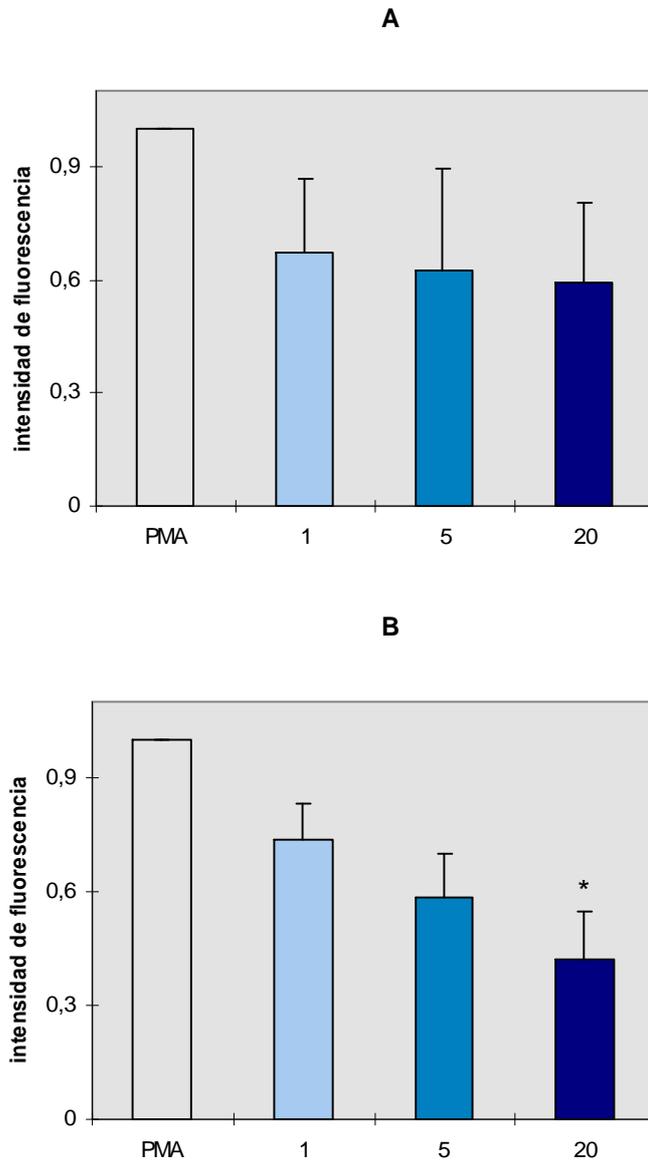


Figura 50. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11b en monolitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂ (µM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 tiempo 3 horas (controles con PMA). (*) p≤0,05.

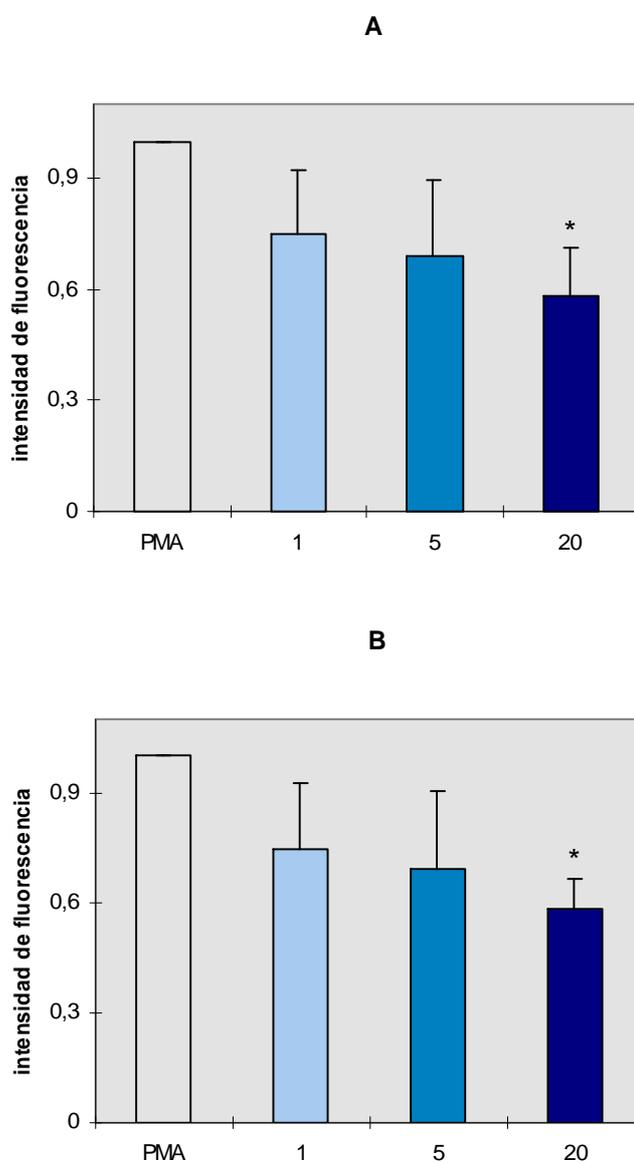


Figura 51. Efecto de la adición *in vitro* de H₂O₂ sobre la expresión espontánea de CD11c en monolitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media ± desviación estándar de 8 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de H₂O₂ (µM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 tiempo 3 horas (controles con PMA). (*) p≤0,05.

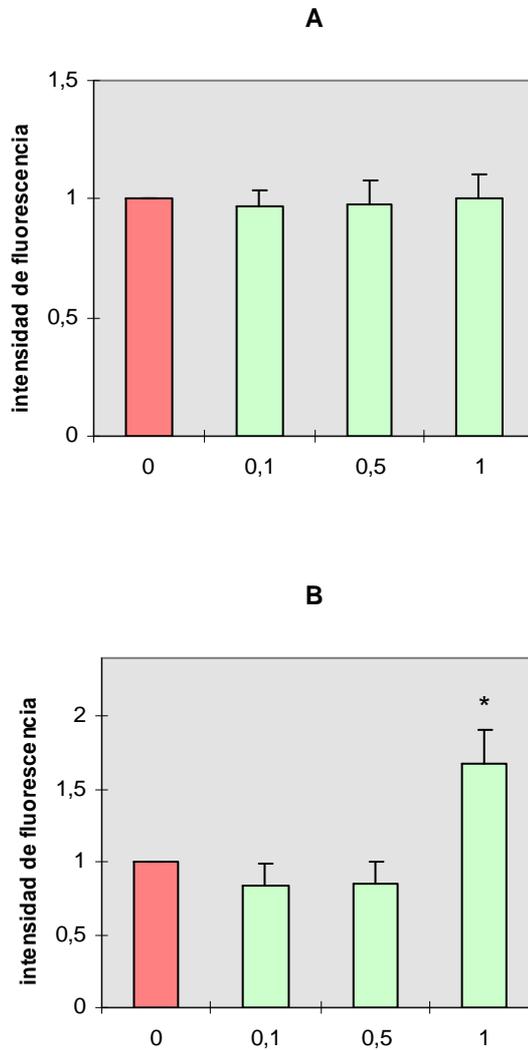


Figura 52. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD18 en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP).(*) $p \leq 0,05$

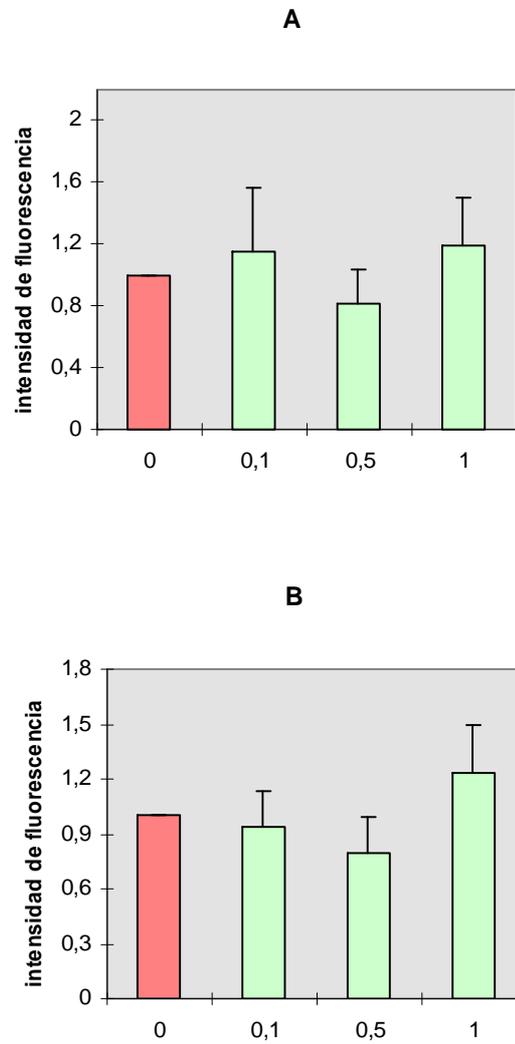


Figura 53. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11a en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP).

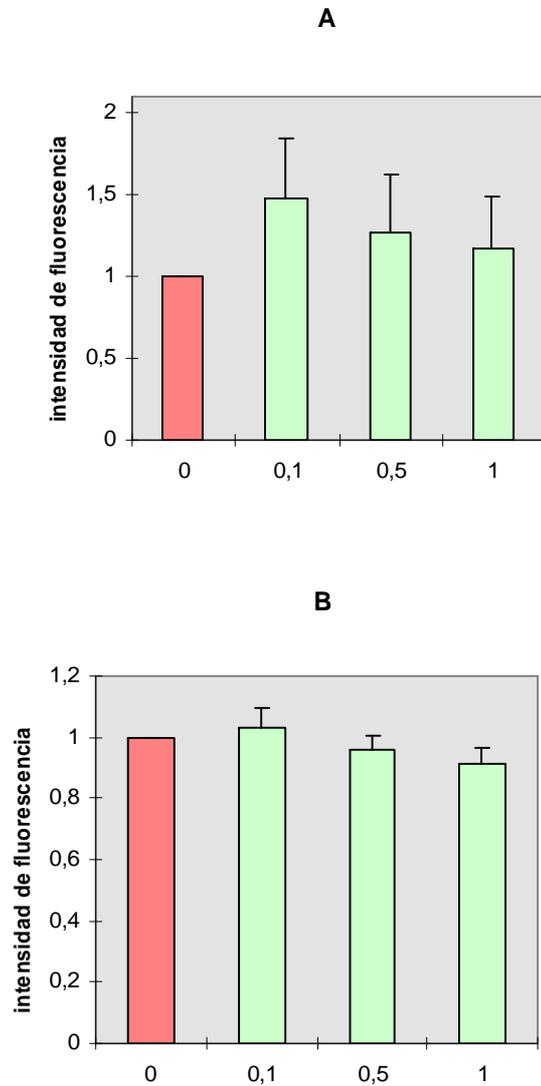


Figura 54. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11b en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP).

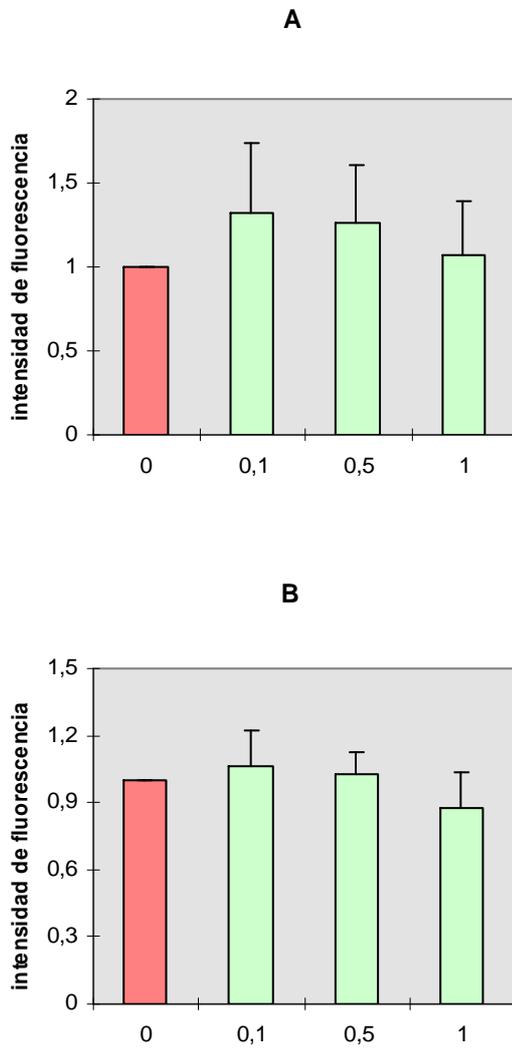


Figura 55. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11c en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con fMLP. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH. Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con fMLP).

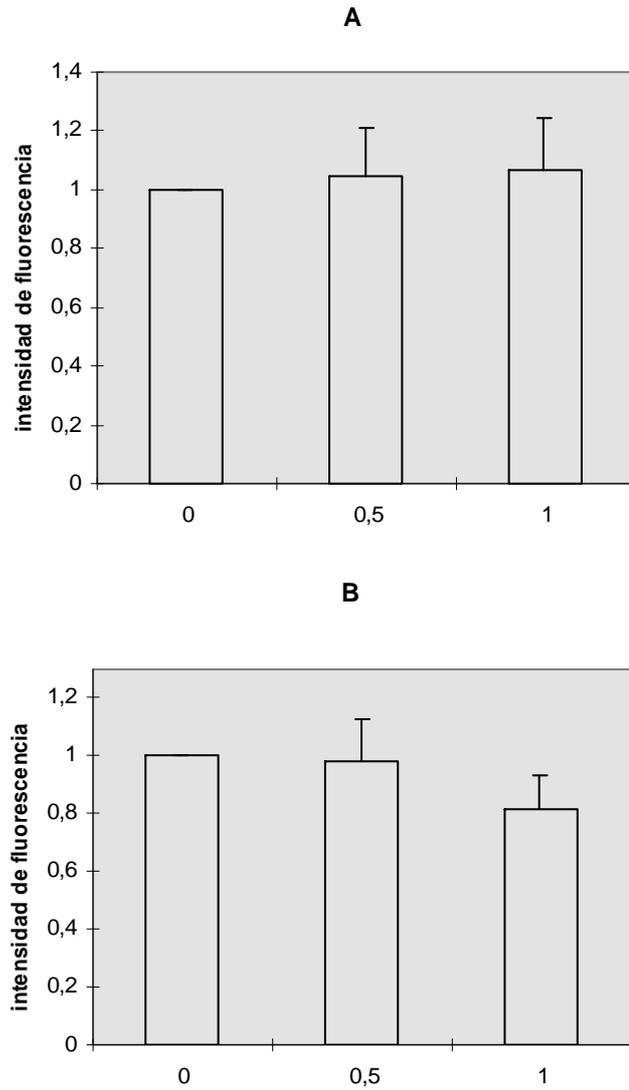


Figura 56. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD18 en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con PMA).

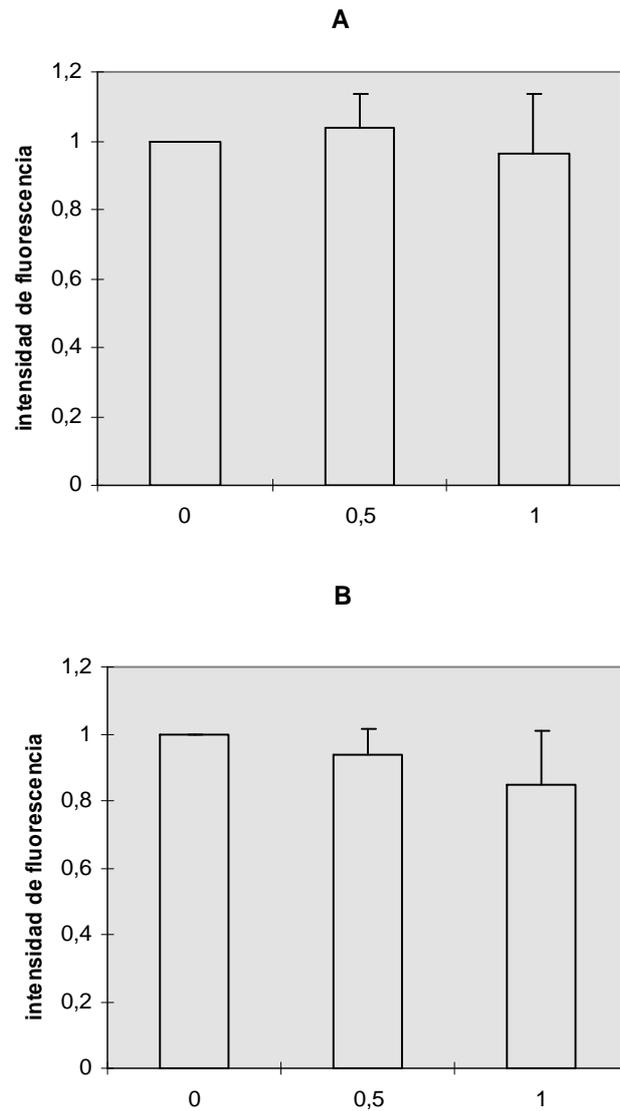


Figura 57. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11a en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con PMA).

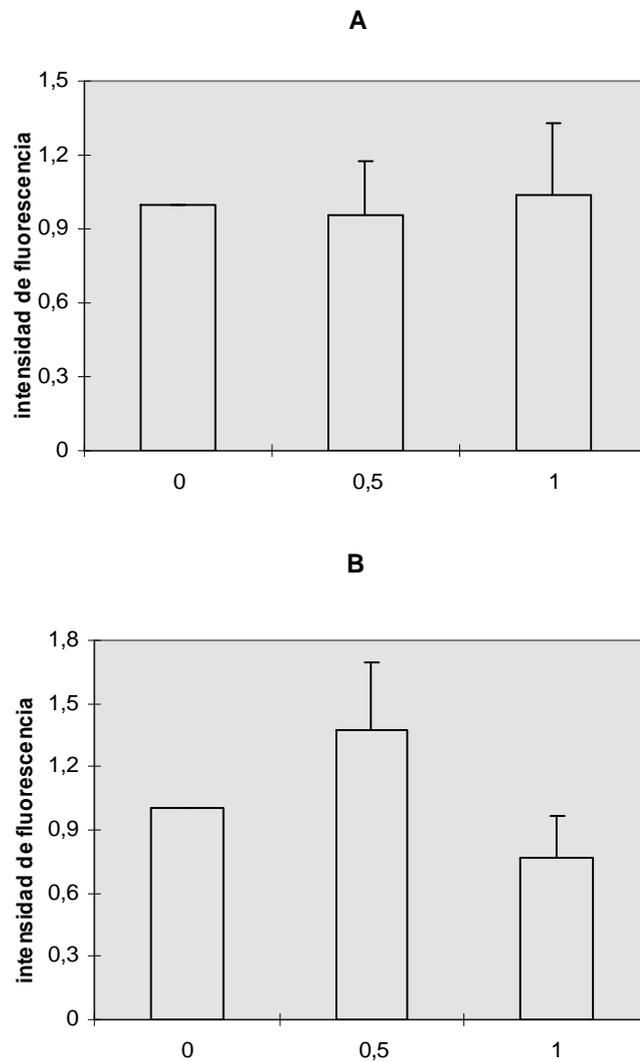


Figura 58. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11b en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μ M). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con PMA).

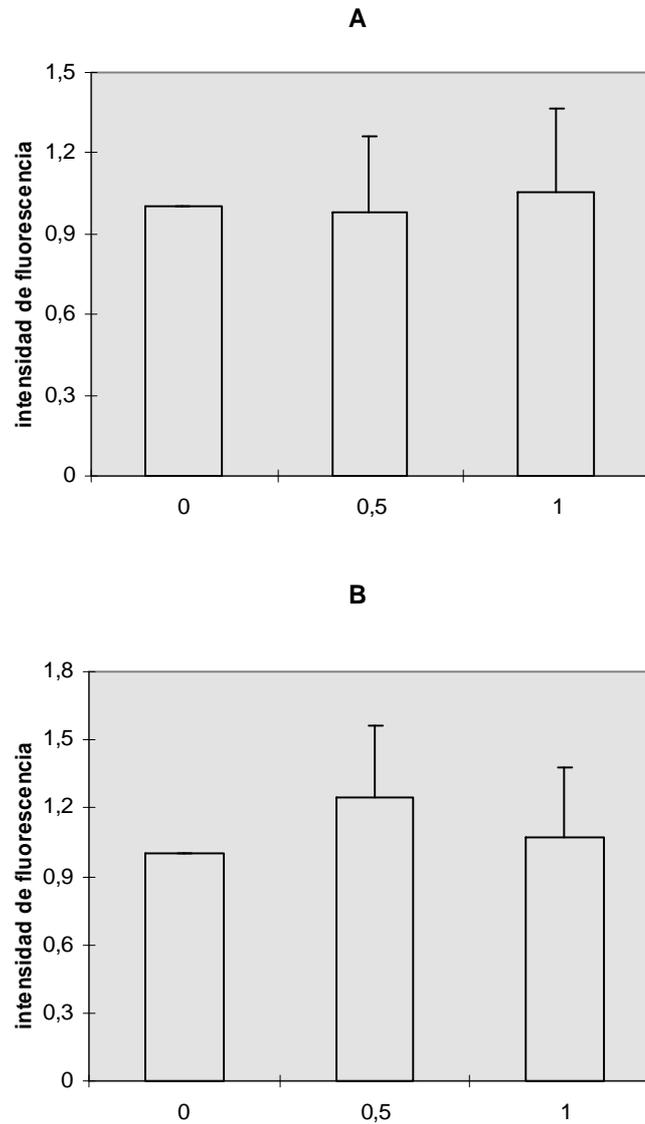


Figura 59. Efecto de la adición *in vitro* de tBOOH sobre la expresión espontánea de CD11c en monocitos (A) y granulocitos (B) de sangre periférica previamente estimulados con PMA. Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 37°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de 6 determinaciones. Eje de abscisas, concentración de tBOOH (μM). Eje de ordenadas, intensidad de fluorescencia normalizada respecto a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con PMA).

DISCUSSION

1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA DE ESTUDIO.

Puesto que los neutrófilos constituyen aproximadamente el 95% de los granulocitos circulantes, el conteo neutrofilico se utiliza a menudo para representar la población granulocitaria (Pyne et al., 1995). Aunque se han realizado muchos estudios funcionales con linfocitos y células NK aislados (como mitogénesis linfocitaria y citotoxicidad de células NK), sólo recientemente se han utilizado neutrófilos para ese tipo de estudios y se han examinado un amplio conjunto de funciones efectoras de los neutrófilos, aunque con resultados un tanto conflictivos (Smith y Weidemann, 1993; Smith, 1995; Pyne et al., 1995). La capacidad multiparamétrica de la citometría de flujo, su requerimiento de volúmenes pequeños de muestra biológica y la escasa manipulación de la misma, la convierten en una técnica de elección para el estudio funcional de células como los granulocitos, en condiciones cercanas a las fisiológicas y sin aislarlas del contexto de interacción con otras células, como se desenvuelve su fisiología (Pyne, 1994a).

En el presente trabajo, se ha podido abordar mediante citometría de flujo el estudio de diferentes funciones de los granulocitos, en relación con su actividad oxidativa y la expresión de moléculas de adhesión, esenciales para la interacción de éstos con otras células del organismo y para la ejecución de sus funciones de reconocimiento y eliminación de patógenos microbianos. Estas moléculas, además, están relacionadas con los fenómenos patológicos de la inflamación mediada por la actividad extracelular de las especies reactivas liberadas por los granulocitos en áreas del organismo hacia las que han sido dirigidos

quimiotácticamente (Gahmberg et al., 1998).

En nuestro estudio, las ventajas de la citometría de flujo y del modelo celular elegido, se han visto acompañadas de determinados problemas metodológicos que ha sido preciso evaluar previamente.

1.1. Mantenimiento de condiciones fisiológicas en el material celular.

El neutrófilo se activa inespecíficamente con facilidad, lo que hay que tener en cuenta en todo estudio que conlleve su manejo. Por otra parte, su capacidad de activación espontánea puede proporcionar información muy útil. Por todo ello, es fundamental la selección de una técnica adecuada de aislamiento leucocitario. En la bibliografía se observan datos muy controvertidos, pues se han descrito desde cambios que indican tanto aumentos como disminuciones, hasta ausencia de variaciones. Esta discordancia de resultados podría ser explicada, en parte, por los problemas metodológicos debidos a la facilidad de activación de los PMNs, que también pudimos observar en nuestro estudio.

Las técnicas utilizadas tradicionalmente provocan gran activación inespecífica, ya que incluyen centrifugaciones (como la separación con Ficoll-Hypaque según el método de Boyum, o el aislamiento mediante gradiente de densidad de Percoll) o proporcionan estímulos fagocitarios (lisis de eritrocitos con cloruro amónico). En este trabajo se utilizó la técnica descrita por Robinson y Carter (1993), que es una técnica de aislamiento leucocitario que conlleva una activación celular mínima. Es una técnica de gran simplicidad y rapidez y proporciona una población de neutrófilos con el menor grado de activación inespecífica. Consiste en un método de separación por agregación y precipitación

selectiva de eritrocitos. La sedimentación se realiza a gravedad normal, con lo que se evita el efecto negativo de la centrifugación. Por otra parte, se minimiza la exposición de las poblaciones leucocitarias a estímulos inespecíficos y se garantiza que los leucocitos a analizar no han estado en contacto con el Ficoll subyacente, que es una fuente posible de estimulación del PMN (Rothe y Valet, 1990). Además, se ha valorado en un mismo experimento la activación y/o expresión basal, la debida a activación espontánea y la inducida por estímulos específicos. Cada valor se determinó en una alícuota individual de muestra para evitar la activación mecánica por el sistema de agitación del citómetro.

Una desventaja de este método de selección es la presencia de plaquetas, que pueden sufrir activación y agregación por determinados estímulos quimiotácticos, sobre todo si existen concentraciones relativamente elevadas de calcio extracelular (Ault, 1993). La activación de las plaquetas podría llevar a la formación de agregados celulares, imposibilitando el análisis por CMF, que requiere células o partículas individuales en suspensión y con un diámetro inferior al de la cámara de flujo del citómetro. El uso de tampones libres de calcio y el tipo de estímulos utilizados en este estudio han evitado la aparición de agregados de plaquetas.

Otro aspecto a tener en cuenta es la capacidad de los leucocitos de interactuar con los componentes del medio que les rodea. En este estudio se intentó mantener un ambiente celular lo más parecido posible al fisiológico, por lo que se dejó la suspensión leucocitaria en presencia de su propio plasma. Esto puede producir la activación por algunos estímulos quimiotácticos, lo que podría

evitarse utilizando medios totalmente sintéticos (McCarthy y Macey, 1996), pero refleja mucho mejor la realidad fisiológica, en la que los estímulos pueden competir con otras moléculas estructuralmente relacionadas del propio huésped.

El ambiente fisiológico se puede reproducir aún más sin aislar la suspensión leucocitaria, realizando el análisis citométrico a partir de sangre entera (en condiciones basales, en la incubación con agentes prooxidantes y tras la activación con estímulos quimiotácticos) y aplicando sistemas automáticos de lisis eritrocitaria e inmediata fijación y estabilización de las membranas leucocitarias con paraformaldehído. En este estudio se analizó de esta forma la expresión de las distintas subunidades del complejo CD18/CD11 de las integrinas β_2 , así como la expresión de marcadores de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y los receptores linfocitarios de activación temprana (CD69) y tardía (CD25), en las diversas condiciones, del mismo modo que se realiza actualmente en la rutina clínica para el inmunofenotipado de superficie en linfocitos. Con este procedimiento, la estimulación y detección de la expresión de moléculas de adhesión y otros marcadores de superficie, puede realizarse con gran similitud a las condiciones fisiológicas y el posterior procesado permite acumular un gran número de muestras para su análisis en el citómetro de flujo, facilitando así el experimento (Lewis, 1993).

1.2. Variabilidad interindividual e intercelular.

En general, la literatura consultada muestra amplias variaciones interindividuales en las respuestas funcionales de los leucocitos durante el reposo y en el ejercicio (Gabriel y Kindermann, 1997; Smith, 1997b). En el presente

estudio, todas las medidas realizadas se vieron sujetas a un cierto grado de variabilidad individual, en las características y respuestas de linfocitos, monocitos y granulocitos. Esta observación es consistente con estudios previos que también han presentado un significativo grado de variabilidad biológica en varios tipos celulares: amplias variaciones interindividuales en aspectos de la actividad oxidativa neutrofílica (Pyne et al., 1995; Smith et al., 1990; Smith y Weidemann, 1993) y de las series linfocitarias (Verde et al., 1992).

Las respuestas de las células inmunes al ejercicio pueden variar mucho de un individuo a otro debido a diferencias dietéticas u otros factores del estilo de vida (estrés psicológico, falta de sueño, etc.) que no pueden controlarse completamente en un diseño experimental. Por otra parte, las comparaciones entre protocolos de ejercicio son difíciles por las diferencias en la intensidad, la duración y el tipo de ejercicio. En algunos trabajos, las características de los protocolos y de los sujetos están poco descritas. Más aún, el ejercicio moderado de larga duración que lleva al agotamiento es distinto a los cortos episodios de ejercicio realizado a máxima capacidad. Otras posibles fuentes de variabilidad son: los distintos niveles de lactato sanguíneo, la frecuencia cardíaca, la ingesta de oxígeno, los anticoagulantes sanguíneos utilizados, los procedimientos para aislar neutrófilos de la sangre entera, el tipo y la duración del experimento y la naturaleza de los estímulos en los experimentos de inducción de fagocitosis, respuesta oxidativa y capacidad microbicida.

En el presente trabajo, y debido a la existencia de dicha variabilidad interindividual en los datos obtenidos que dificultaba el análisis de los resultados, se normalizaron los valores de las medias de intensidad de fluorescencia y los de los contajes de cada región definida en los histogramas. La normalización se realizó a dos niveles: en el estudio del efecto de la adición de prooxidantes extracelulares, se pudo obviar la variabilidad tomando como la unidad el dato obtenido a concentración 0 de oxidante y tiempo 0 (determinación basal) y el resto de valores en función de éste. En el análisis del efecto de los estímulos sobre células previamente sometidas a la acción de los prooxidantes se normalizaron los valores tomados a concentración 0 y tiempo 3 horas (controles con estímulo).

1.3. Valor del análisis multiparamétrico.

Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, una de las ventajas de la citometría de flujo es el análisis simultáneo de varios parámetros de la misma célula (análisis multiparamétrico) permitiendo así correlacionar aspectos morfológicos y funcionales sobre la misma célula y distinguir subpoblaciones en el seno de una población celular heterogénea (Shapiro, 1995).

La posibilidad de combinar diferentes marcadores fluorescentes nos ha permitido estudiar simultáneamente los niveles intracelulares de H_2O_2 y $O_2\cdot^-$ en células tratadas con oxidantes exógenos, así como la expresión simultánea de varios receptores. Las características morfológicas de las diferentes subpoblaciones leucocitarias, que dota a cada grupo celular de propiedades distintas de dispersión frontal y lateral de luz láser, nos ha permitido su análisis específico por citometría de flujo sin necesidad de proceder al aislamiento y, por

tanto, la comparación de la respuesta de linfocitos, monocitos y PMNs dentro de la misma suspensión celular (Stewart, 1995).

Por último, los cambios morfológicos y de permeabilidad de membrana que sufren las células al entrar en apoptosis o en necrosis llevan a una disminución marcada de la dispersión frontal de la luz, sobre todo en el caso de células muertas de la población de PMNs (Homburg y Ross, 1996). Una disminución de la intensidad de la dispersión frontal de la luz unida a una, aún mayor, disminución de la dispersión lateral, nos proporciona una estimación de la desgranulación de los PMNs en caso de producirse (Bartoleschi, 1994). Esto permite detectar y eliminar a dichas células para evitar su interferencia en el análisis citométrico.

1.4. Detección de heterogeneidad de respuesta.

Se ha publicado que existen subpoblaciones dentro de los leucocitos circulantes que responden de forma diferente al estímulo fisiológico y/o químico (Smith y Weideman, 1993). Parece también que la estimulación inducida por el ejercicio conlleva un desplazamiento hacia un aumento del porcentaje de células de alta actividad en una población que contenía, en reposo, dos subpoblaciones distintas, con respecto a parámetros como la desgranulación *in vivo* y la respuesta oxidativa de los PMNs a determinados estímulos. El grupo de Smith (Smith et al., 1990 y 1992; Smith y Weidemann, 1993) utilizó el análisis por CMF para cuantificar el número de células que respondía positivamente a la estimulación *in vitro* con PMA y OZ (Zymosán opsonizado), analizar los neutrófilos célula a célula, e identificar las células de la subpoblación positiva que cambiaba su

actividad funcional. Sus resultados mostrando que muy pocos (menos que los controles) PMNs aislados en el estudio respondieron positivamente al estímulo *in vitro* pueden ser la evidencia de la liberación de neutrófilos recién madurados, con una actividad funcional intrínseca más baja, o alternativamente, la evidencia de que un entrenamiento intenso y prolongado puede, de forma crónica, reducir la capacidad de algunos neutrófilos de responder a los desafíos patogénicos. Todos estos resultados muestran claramente que el ejercicio desencadena entre la población neutrofílica una serie de cambios que pueden afectar de forma distinta a ciertas subpoblaciones.

En nuestro estudio, la aplicación de la citometría de flujo ha podido evidenciar la presencia de subpoblaciones de PMNs y de monocitos que, aún respondiendo de forma cualitativamente similar frente a los mismos estímulos, se comportaban de forma distinta desde el punto de vista cuantitativo, tanto en la respuesta oxidativa como en la expresión de diferentes moléculas de adhesión.

2. RELEVANCIA DEL EJERCICIO INTENSO COMO MODELO DE ESTRÉS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA: PAPEL DEL PMN Y DEL ESTRES OXIDATIVO.

Es bien conocida la influencia del estrés tanto físico como psíquico sobre el sistema inmunitario (Nieman, 1997; Perna et al., 1997). Como se ha comentado en la introducción, el ejercicio intenso puede considerarse una forma de estrés, tanto físico como psíquico, sobre todo en el aspecto competitivo.

Existe, como también comentamos, una base epidemiológica que, aún sin

haber podido ser confirmada, refiere por medio de numerosas publicaciones la existencia de relación entre sobreesfuerzo e infección, principalmente de tipo vírico, del tracto respiratorio superior (IRS), como es el caso del Síndrome de Sobreentrenamiento (Kajiura et al., 1995; Mackinnon y Hooper, 1994 y 1996; Nieman, 1995; Verde et al., 1992; Viru, 1994).

Todo esto hace del ejercicio físico un modelo adecuado para estudiar la adaptación del sistema inmunitario al estrés, proporcionando, además, un parámetro fisiológico para cuantificar la intensidad del mismo y mejorar la comprensión de la relación entre grado de estrés y respuesta inmunológica.

2.1. Ejercicio físico y estrés oxidativo.

El ejercicio aeróbico extenuante se ha asociado con estrés oxidativo y daño tisular en el organismo. Aunque la cadena respiratoria mitocondrial en células musculares parece ser la principal fuente de radicales libres durante el ejercicio físico, se han propuesto otras vías como la reacción catalizada por la xantina oxidasa (XO) y la activación de los neutrófilos. La activación de la XO se produce en el citosol de las células musculares y parece estar implicada en el mecanismo del daño por isquemia y reperfusión (Meydani y Evans, 1993). Los sustratos para esta vía de generación de $O_2^{\cdot-}$, hipoxantina y xantina, pueden derivar de la degradación de nucleótidos de adenina que presumiblemente ocurre durante el ejercicio intenso de tipo agudo por un desequilibrio entre la síntesis y la utilización de ATP (Sahlin et al., 1991; Sjodin et al., 1990).

Los PMNs activados que lleva el torrente sanguíneo producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 cuando son atraídos hacia los miocitos o las células endoteliales del lecho

vascular como resultado del daño celular muscular (Meydani y Evans, 1993). Sin embargo, dado el tiempo requerido para la infiltración neutrofílica, esta vía serviría de fuente secundaria importante de producción de radicales libres y contribuiría al daño oxidativo durante esfuerzos físicos de resistencia (Zerba et al., 1990).

Nuestros resultados muestran que todas las células leucocitarias estudiadas en los sujetos sometidos a ejercicio intenso presentan un incremento de las funciones metabólicas generales que desembocarían en una producción de especies oxidantes. Por una parte, se observa un incremento en el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos, monocitos y PMNs, compatible con un incremento en la actividad respiratoria celular (Juan et al., 1994). Por otra parte, la medida citométrica de los niveles intracelulares de H_2O_2 muestra de forma objetiva un incremento intracelular de dicho prooxidante en todas las poblaciones leucocitarias. Este resultado, sugiere lógicamente un aumento de la actividad peroxidativa en monocitos y macrófagos, células oxidativas profesionales, que puede relacionarse con un proceso de activación celular. Sin embargo, los linfocitos presentan niveles significativamente elevados de H_2O_2 , cuando estas células no poseen la función defensiva mediada por oxidantes. Este dato apunta, más bien, a que los linfocitos estarían incorporando agentes oxidantes procedentes del exterior celular, hipotéticamente enriquecido en especies oxidativas. Consistente con esta posibilidad, la incubación *in vitro* de suspensiones leucocitarias con oxidantes exógenos (H_2O_2 y tBOOH) incrementó significativamente los niveles intracelulares de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ y disminuyó, por el

contrario, los niveles intracelulares de GSH. Igualmente, hay que resaltar que la incubación con los oxidantes exógenos incrementó el potencial de membrana mitocondrial, determinado con Rh123, dato que sugiere la posibilidad de que la respiración mitocondrial acelerada no sea sólo origen de especies oxidantes sino una consecuencia de la acción intracelular de los mismos.

Nuestros datos experimentales apoyan, por tanto, la existencia de un estrés oxidativo extracelular en el modelo de ejercicio físico intenso estudiado y, además, sugieren que las especies oxidantes extracelulares pueden producir alteraciones en la funcionalidad de las células leucocitarias.

2.2. Alteraciones inmunitarias en el ejercicio intenso.

En los últimos años, ha crecido el interés por los estudios que abordan específicamente la caracterización inmunológica del ejercicio físico. Así, de los cerca de 700 artículos recogidos en distintos repertorios en el momento de la redacción de éste trabajo, más del 60% han sido publicados en la década de los 90 (Nieman, 1997b). De ellos, la mayor parte se centra en el estudio de la respuesta frente al ejercicio agudo. En general, los resultados obtenidos en los estudios muestran una serie de fenómenos, con mayor o menor consistencia:

a) En el ejercicio agudo se produce un rápido intercambio de células inmunitarias entre los tejidos linfoides periféricos y la circulación. La respuesta es variable y depende de varios factores, como la intensidad, duración y modo de ejercicio, la concentración de hormonas y citokinas, los cambios en la temperatura corporal, flujo sanguíneo e hidratación (Nieman y Nehlsen-Cannarella, 1994).

Las células del sistema inmunitario innato (NK, monocitos/macrófagos y PMNs)

son las que responden más intensamente en el ejercicio agudo, tanto en cambios numéricos como de función específica. Por lo general, los episodios de ejercicio breve o poco intenso se asocian con alteraciones menores de la función inmunitaria.

b) En el ejercicio de larga duración, el único resultado objetivado consistentemente ha sido una elevación de la actividad NK, aunque se han descrito, de forma menos consistente, alteraciones funcionales en PMNs, macrófagos, linfocitos T y B. Hay que destacar que los modelos más intensos de ejercicio prolongado se asocian consistentemente con la inhibición de las funciones de los PMNs (Nieman, 1997a ; Smith, 1997).

c) Los episodios de ejercicio excepcionalmente intenso (de corta o de larga duración) parecen incrementar el riesgo de infecciones respiratorias, mientras que la actividad física moderada podría atenuar dicho riesgo.

2.3. Alteraciones *in vivo* en células linfoides de sujetos sometidos a ejercicio intenso: Relación con el modelo *in vitro* de estrés oxidativo.

Los resultados de nuestro estudio muestran que en el modelo de ejercicio intenso elegido no se aprecian diferencias significativas, con respecto a sujetos sedentarios, en los porcentajes de linfocitos T (totales y maduros) y linfocitos B en sujetos sometidos a ejercicio intenso. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en la mayor parte de modelos agudos y sostenidos de ejercicio, en los que los cambios en las poblaciones linfocitarias se refieren a cambios en el recuento y la compartimentación, más que en redistribuciones de las distintas subpoblaciones (Nieman, 1997b).

La población de células NK (CD56+) y la subpoblación de linfocitos CD8 con actividad citotóxica natural (CD8+CD56+) se encuentra significativamente disminuída en los sujetos ejercitados. Precisamente es la población de células NK la más afectada entre las células inmunitarias mononucleares en los estudios disponibles en la literatura (Brahmi et al., 1985; Mackinnon, 1989; Mackinnon y Tomasi, 1988). En general, la actividad citotóxica natural (determinada como unidades líticas por 10^7 células mononucleares) disminuye marcada, aunque reversiblemente, tras un episodio de ejercicio intenso, mientras que un ejercicio sostenido en condiciones adecuadas de entrenamiento parece incrementar la actividad NK (Nieman, 1997b; Pedersen y Ullum, 1994; Peters et al., 1994). Las técnicas de estudio de la actividad NK utilizadas en los trabajos disponibles no distinguen entre una disminución del número relativo de células NK o una disminución en la actividad citotóxica por célula, a igualdad de número de células. Nuestros datos muestran que la disminución de la actividad total NK en el ejercicio intenso podría deberse a una reducción en el número de células NK circulantes. Si a ello se añade la disminución de la subpoblación CD8+CD56+ que hemos observado, se plantea una situación de disminución de las respuestas de citotoxicidad natural, no restringida por moléculas MHC, que podría estar relacionada con la mayor susceptibilidad, mostrada en modelos experimentales, al desarrollo de tumores en animales sometidos a ejercicio exhaustivo (Mackinnon y Tomasi, 1988).

La adición de oxidantes exógenos no tuvo efecto significativo *per se* en la

distribución de subpoblaciones linfocitarias y sólo a concentraciones tóxicas de los mismos se observó una disminución relativa de los linfocitos B y los linfocitos T CD4+, indicando una mayor susceptibilidad a la toxicidad.

Cambios como los descritos *in vivo* han sido atribuidos al incremento de los niveles de cortisol durante el ejercicio de alta intensidad (Ahlborg y Ahlborg, 1970; Nieman y Nehlsen-Cannarella, 1994; Robertson et al., 1981; Steel et al., 1974). La administración de glucocorticoides *in vivo* produce, por ejemplo, neutrofilia, linfocitopenia y supresión de las actividades de las células NK y los linfocitos T (Munck et al., 1984).

En nuestro estudio se han observado profundas alteraciones en la distribución de subpoblaciones funcionales de células T en los sujetos sometidos a esfuerzo intenso. Así, mientras que la subpoblación total de linfocitos CD4+ no se altera, la subpoblación de linfocitos inductores de cooperación (CD4+CD29+) disminuye significativamente, a la vez que aumenta la población de las células inductoras de supresión (CD4+CD45RA+). Esta subpoblación incluye las células T vírgenes (CD45RO-), que no han tenido contacto previo con un antígeno foráneo.

Aunque son escasos los estudios que determinan las subpoblaciones funcionales de células T, hay datos que indican que el ejercicio agudo induce un incremento rápido y transitorio de células T vírgenes CD45RO-, mientras que el ejercicio sostenido conduciría a un aumento ligero de células T activadas y de memoria, incluídas en la población CD45RO+ (Gabriel y Kindermann, 1997). Los resultados del estudio sobre subpoblaciones linfocitarias de sujetos sometidos a ejercicio intenso sugieren una alteración en los mecanismos que regulan la

respuesta de activación, especialmente en la subpoblación de linfocitos T cooperadores, CD4+, aunque también se observan cambios de menor intensidad en los linfocitos T citotóxicos, CD8+. Teniendo en cuenta, además, el papel esencial de la activación de linfocitos CD4+ en la regulación de la respuesta humoral y celular mediada por otros componentes del Sistema Inmunitario, las alteraciones mostradas, pueden estar implicadas en el desarrollo de las anomalías inmunitarias observadas en muchos modelos de ejercicio intenso.

Los linfocitos T de los sujetos ejercitados expresan en un mayor porcentaje el receptor de IL-2, o molécula CD25, considerado como un marcador específico de activación celular. La activación fisiológica de los linfocitos CD4+ requiere el reconocimiento de un antígeno foráneo, presentado en unión a una molécula MHC propia, y una serie de señales coestimuladoras generadas por las células presentadoras del antígeno. La ausencia de infecciones bacterianas o virales manifiestas en los sujetos de nuestro estudio sugiere que la activación observada en las células T no es de origen microbiano, por lo que podrían estar implicados mecanismos alternativos, independientes de antígenos foráneos. En este sentido, Bacon et al. (1994) describieron un mecanismo antígeno-independiente de activación de linfocitos T mediado por la quimioquina Rantes. Más recientemente, y con mayor relación con nuestro modelo experimental *in vitro*, se ha postulado que el estrés oxidativo podría jugar un papel en la inducción de estimulación antigénica no fisiológica: Zwacka y cols. (Zwacka et al., 1997) proponen que la activación linfocitaria observada en un modelo inflamatorio hepático de isquemia-reperfusión puede estar inducida por antígenos propios que

hayan sido modificados por especies reactivas de oxígeno, escapando al mecanismo normal de regulación de la autotolerancia. Por otra parte, la oxidación de proteínas se ha asociado con respuestas inflamatorias en modelos de cirrosis hepática (Nieemela et al., 1994).

Aunque se ha descrito de forma consistente la mayor generación de especies oxidativas circulantes en el ejercicio intenso (Alessio, 1992; Ji, 1994), nuestros resultados *in vitro* no apoyan un papel directo de la oxidación proteica en la activación de linfocitos T, al menos a corto y medio plazo. Así, la adición de oxidantes exógenos no indujo la activación inmediata ni diferida de las células T, como muestra la falta de sobreexpresión de los marcadores de activación CD69 y CD25. Por lo tanto, la activación celular observada *in vivo* podría resultar de una generación lenta de autoantígenos por acumulación en el tiempo de proteínas oxidadas o estar mediada por mecanismos no oxidativos, antígeno-independientes, como los descritos por Bacon (Bacon et al., 1994).

Con independencia del estímulo que desencadena *in vivo* la activación de los linfocitos T, nuestros datos muestran una mayor capacidad de respuesta *in vitro* a la activación por mitógenos. En los últimos años se han descrito tres importantes y ubícuas vías de transducción de señal, compuestas por cascadas de proteína kinasas (Kieran y Zon, 1996). La vía de las llamadas MAP kinasas (MAPK, Mitogen-activated Protein Kinase) está implicada en las respuestas proliferativas de numerosos tipos celulares, incluyendo los linfocitos T coestimulados con CD3/PMA (Witehurst et al., 1992). Las dos vías divergentes de las denominadas SAP kinasas (SAPK, Stress-Activated Protein Kinase) se activan por acción de

numerosos agentes que causan estrés, como citokinas, toxinas, luz ultravioleta, hipertermia e inhibidores de la síntesis de proteínas (Kieran y Zon, 1996). Las MAPK y las SAPK activan a sustratos diferentes y sus vías son esencialmente independientes, aunque ambas pueden ser estimuladas por Ras (Gotoh et al., 1994). Es importante destacar, en el contexto de nuestros resultados, que las MAPK de linfocitos T son activadas, por ejemplo, por coestimulación con CD3/éster de forbol y se mantienen inalteradas en las células T activadas (Kieran y Zon, 1996), mientras que la activación coestimulada de las SAPK (pero no de MAPK) se correlaciona con la producción de IL-2 (Hibi et al., 1993). Dado que la secreción y acción autocrina de IL-2 es uno de los eventos iniciales en la activación de las células T, que induce la sobreexpresión de receptores para la propia IL-2, cabe suponer que las vías MAPK y SAPK pueden estar actuando de forma simultánea en las condiciones de ejercicio intenso, explicando así la mayor activación celular y capacidad de respuesta a la estimulación mitogénica. Sin embargo, en las condiciones de los experimentos *in vitro*, el estrés oxidativo exógeno no parece suficiente para estimular (o, al menos, permitir la manifestación fenotípica) dichas vías de activación, hecho que no apoya una acción activadora directa sobre los linfocitos de los prooxidantes, elevados en el ejercicio intenso.

En los últimos años, se vislumbra un posible y complejo papel para las especies prooxidantes y antioxidantes en la regulación de la proliferación celular. Así, mientras en la mayor parte de los modelos celulares estudiados, el estrés oxidativo suele inducir fenómenos de muerte celular, mediante apoptosis o necrosis, según

la intensidad y duración del estímulo (O'Connor et al., 1988), en algunos modelos, la exposición a bajas concentraciones de prooxidantes, como el H_2O_2 ó el $O_2^{\cdot-}$, es un estímulo proliferativo, posiblemente mediado por la activación de genes de respuesta rápida (Burdon, 1995). Un efecto similar se ha descrito *in vitro* en linfocitos T, aunque a concentraciones relativamente altas de H_2O_2 (150 mM), mientras que la exposición a agentes antioxidantes inhibe la proliferación de células T (Burdon, 1995).

Más consistentes son los datos que muestran que los niveles de glutatión (GSH) y el equilibrio entre sus formas reducida y oxidada (GSH/GSSG) regulan aspectos esenciales de la activación, proliferación y diferenciación de las células linfoides. Por una parte, los niveles de GSH disminuyen (y el cociente GSH/GSSG, aumenta) en células linfoides diferenciadas (pero no en timocitos) cuando son estimuladas al crecimiento (Burdon, 1995). Por otra parte, los linfocitos requieren niveles intracelulares de GSH relativamente altos para el mantenimiento de funciones que incluyen: la proliferación dependiente de IL-2, el desarrollo de precursores de células CD8+ y el mantenimiento de la actividad de las células T citotóxicas (Burdon, 1995). Nuestros resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* muestran que estas funciones se encuentran alteradas en los linfocitos de sujetos sometidos a ejercicio intenso. Así, el porcentaje de linfocitos T CD8+ es significativamente menor que en sujetos sedentarios y, por otra parte, es especialmente sugerente el hecho de que los linfocitos T de los sujetos ejercitados respondan de forma mucho menos intensa a la activación mediada por IL-2 exógena, a pesar de presentar una mayor expresión de los receptores para esta

citokina.

Ambos fenómenos apuntan a que una posible deficiencia intracelular de GSH esté implicada, al menos, en estas alteraciones específicas de los linfocitos T. Aunque no se han determinado los niveles intracelulares de GSH en leucocitos de los sujetos sometidos a ejercicio intenso, cabe suponer que la presencia de un nivel elevado de prooxidantes intracelulares (procedentes del exterior o, como luego se discutirá, de la propia actividad metabólica leucocitaria), puede disminuir significativamente los niveles de GSH. Nuestros datos muestran que la exposición *in vitro* a niveles no tóxicos de oxidantes exógenos, que incrementan moderadamente los niveles intracelulares de especies oxidantes, a niveles similares detectados en leucocitos de sujetos tras ejercicio intenso, provocan una disminución significativa de los niveles intracelulares de GSH. En este sentido, hay que destacar, por ejemplo, que la apoptosis de linfocitos CD4+ y CD8+ está asociada con un descenso de los niveles intracelulares de GSH en pacientes infectados con VIH (Burdon, 1995).

La coexistencia de una sobreexpresión de receptor de IL-2 y una reducida capacidad de respuesta a la estimulación por IL-2 sugiere la posibilidad de un fenómeno de anergia en los linfocitos de los sujetos sometidos a ejercicio intenso. La anergia o tolerancia desempeña un papel fisiológico en la respuesta inmunitaria evitando la activación de linfocitos T y B por antígenos propios y también limitando la amplitud de las respuestas frente a antígenos foráneos, para inducir su terminación. En la anergia de éste último tipo, la reestimulación de linfocitos activados induce su muerte por apoptosis y disminuye, por tanto, la

proliferación de la población clonal en expansión (Kuby, 1994). El mismo efecto se puede observar en la estimulación *in vitro* de cultivos de linfocitos. En este sentido, hay que destacar que en los sujetos sometidos a ejercicio intenso, aumenta el porcentaje relativo de linfocitos vírgenes, es decir, no activados. Aunque no se han determinado los contajes absolutos de las subpoblaciones linfocitarias, este dato es compatible con una desaparición selectiva de la subpoblación de linfocitos T activados, como cabría esperar en un proceso de anergia.

En relación con el fenómeno anterior, el factor de transcripción antioxidante AP-1 se ha relacionado con la inducción de anergia en células T (Kang et al., 1992). Se ha visto que sustancias antioxidantes como la N-acetil-L-cisteína (NAC) incrementan la unión al ADN y la transactivación de la AP-1 en respuesta al PMA, mientras que el H₂O₂ suprime dicha activación. El H₂O₂ por sí mismo es un débil inductor de la AP-1 y además potencia la activación del NF-κB por el PMA (Meyer et al., 1993). Como se muestra en nuestro estudio, los linfocitos de sujetos sometidos a ejercicio físico, presentan niveles intracelulares de H₂O₂ incrementados con respecto a los sujetos de control.

2.4. Alteraciones en la función de los PMNs: Relación con el estrés oxidativo exógeno.

Las células del Sistema Inmunitario Innato, a diferencia de los linfocitos B y T, responden a las fluctuaciones del medio ambiente local (Pyne, 1994).

De entre todas las células inmunitarias, específicas o innatas, los datos más consistentes en los estudios sobre el ejercicio físico agudo o sostenido se refieren

al PMN (Smith, 1997). La mayor parte de los resultados publicados muestran una disminución en la capacidad funcional de estas células que, paradójicamente, se ve acompañada por un incremento en la actividad de muchas de las funciones específicas de estas células (Gabriel y Kindermann, 1997; Mackinnon, 1997; Nieman, 1997b; Smith, 1997).

Esta paradoja se ha observado en otros modelos de estrés sobre el sistema inmunitario innato (por ejemplo, en el Síndrome del Distrés Respiratorio del Adulto o en pacientes que desarrollan sepsis en las UCIs (Smith, 1994)) y refleja, en el fondo, una profunda disfunción del PMN: dicha célula es incapaz de dirigir adecuadamente su respuesta hacia la célula diana (microorganismo) o bien su activación excesiva e inespecífica agota sus reservas funcionales, dejándola ineficaz frente a dicha diana. De esta forma, en el ejercicio físico intenso se han descrito, simultáneamente incrementos en la actividad peroxidativa de los PMNS, o de la expresión de moléculas receptoras de su superficie, junto con una disminución de la capacidad fagocítica o microbicida de los mismos (Gabriel y Kinderman, 1997; Nieman, 1997a).

Nuestros datos obtenidos *in vivo* muestran, en parte, un patrón similar de alteración funcional. Así, los PMNs (y monocitos) de sujetos sometidos a ejercicio intenso muestran un mayor contenido basal de especies oxidativas intracelulares, sugerentes de una mayor capacidad oxidativa y, a la vez, una sobreexpresión (aunque reversible) de la integrina CD11b, molécula de adhesión que es, además, receptora del fragmento C3bi del complemento y está relacionada con el reconocimiento y fagocitosis de partículas microbianas opsonizadas. Por

otra parte, la estimulación quimiotáctica potente (utilizando fMLP, un análogo de péptido de la pared bacteriana) de estas células no incrementa adicionalmente la expresión de CD11b: es más, la expresión basal de ésta molécula en PMNs y monocitos de deportistas es superior a la inducida por fMLP en células de sujetos de control. Este resultado sugiere que, en ausencia de una infección microbiana demostrable (no se incrementan el número de linfocitos B ni T activados), el exceso de expresión de CD11b y de actividad oxidativa, desencadenados por mecanismos no defensivos, podría agotar la capacidad de respuesta a un verdadero estímulo antigénico foráneo (mimetizado aquí por la acción del fMLP), dejando a la célula inerte frente a un patógeno.

Mecanismos como el propuesto se han sugerido para explicar la mayor incidencia aparente de infecciones, sobre todo del tracto respiratorio superior, en deportistas de élite, especialmente en aquellos que experimentan ciclos sucesivos de agotamiento (Nieman, 1997a; Gabriel y Kindermann, 1997)

Debido al incremento del estrés oxidativo descrito tras el ejercicio extenuante, se han propuesto distintos mecanismos por los que aumenta la generación de radicales libres, fundamentalmente a partir de la mayor actividad oxidativa del tejido muscular, de la liberación de Fe reactivo por microlesiones de las células que contienen mioglobina o hemoglobina y por el incremento de la liberación de radicales libres por parte de macrófagos y PMNs activados (Mackinnon y Tomasi, 1985; Eichner, 1993). Sin embargo, no existen estudios sobre la relación entre la exposición a agentes prooxidantes exógenos y el funcionalismo de los PMNs.

Nuestro trabajo muestra que los PMNs de sujetos que han realizado un

esfuerzo importante, presentan signos de activación celular junto con una mayor generación endógena de especies oxidantes, como se observa en los PMNs expuestos *in vitro* a sustancias prooxidantes extracelulares. Estos datos sugieren que la producción de radicales libres por PMNs activados puede contribuir al estado oxidativo generalizado descrito en estos deportistas y desempeñar un papel en el desarrollo de las alteraciones observadas. Por otra parte, la capacidad aumentada de generación de superóxido y peróxido de hidrógeno por los PMNs de los deportistas y por los PMNs incubados con prooxidantes podría ser considerada como indicadora de un estado de preactivación celular, resultante de la exposición de las células circulantes a un ambiente intra y extracelular oxidativo, que podría coexistir *in vivo* con la presencia de mediadores relacionados con la inflamación y la lesión muscular. Así, diferentes estudios (Leung, 1994; Reddy et al., 1995; Retnes et al., 1994) muestran que la activación de distintos receptores puede preactivar la célula, incrementando la intensidad de la respuesta a concentraciones subóptimas de otros activadores. En la mayoría de los casos, la preactivación supone un moderado incremento de los niveles de Ca^{++} intracelular y la respuesta secundaria obtenida es, a menudo, más intensa que la que induce una concentración óptima de activador sobre una célula no preactivada. Por ejemplo, el tratamiento con interferón g resulta en un incremento ligero de Ca^{++} intracelular basal y en un aumento mucho más importante tras el subsiguiente estímulo con FMLP (Retnes et al., 1994). Por otra parte, se ha descrito recientemente una vía de activación por fMLP y PAF (pero no por interferón g ni LPS) en macrófagos que implica la liberación de Ca^{++} intracelular

mediada por el superóxido exógeno (Gamalev et al., 1997).

Aunque los datos del presente estudio son insuficientes para proponer un papel de la preactivación dependiente de Ca^{++} en la respuesta oxidativa incrementada en leucocitos de sujetos sometidos a ejercicio intenso, una posible participación de este mecanismo sería merecedora de una mayor atención experimental, pues podría aportar datos para una posible atenuación farmacológica de la producción inespecífica de especies oxidantes y reactivas leucocitarias. Así, muy recientemente, se ha demostrado que el tratamiento con nifedipina, un agente bloqueante de los canales de Ca^{++} , reducía significativamente la generación de superóxido y la respuesta quimiotáctica en PMNs estimulados de sujetos humanos (Levy et al., 1996), aunque otros bloqueantes de los canales de Ca^{++} , como el verapamil o diltiazem, no lo hacían.

Desde el punto de vista del efecto sobre la inmunodepresión a largo plazo, los resultados de nuestro estudio podrían relacionarse, por otra parte, con el efecto del estrés oxidativo sobre receptores de la superficie de membrana de células inmunitarias como las moléculas de adhesión, especialmente las integrinas β_2 . Hay pocos estudios que establezcan la alteración directa de su expresión por mecanismos oxidativos (), aunque sí existen publicaciones que demuestran que en la regulación de los receptores de superficie intervienen la membrana celular y el citoesqueleto y se ha demostrado que la oxidación de éste provoca una defectuosa expresión de receptores en la superficie celular (Marloni et al., 1994; Mascarell, 1997).

Nuestros resultados acerca del efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de

integrinas muestran que éstas moléculas son afectadas por el estrés oxidativo exógeno en forma que concuerda con el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de la subunidad CD11b en sujetos sometidos a ejercicio intenso. Hay que resaltar una cierta heterogeneidad en la respuesta observada, dependiendo de las diferentes integrinas y del oxidante (tipo y forma de la exposición al mismo), aunque se pueden establecer ciertos patrones generales de comportamiento.

En una primera serie de experimentos, se determinó el efecto de un oxidante soluble y rápido, cómo es el H_2O_2 , y de un agente capaz de desencadenar fenómenos de peroxidación de membranas, como es el tBOOH, sobre la expresión basal de integrinas. Esta experiencia se dirigía a evaluar la posibilidad de que un estrés oxidativo exógeno indujera por sí mismo la activación rápida de los PMNs (H_2O_2) y, por otra parte, determinar el efecto activador de la oxidación de lípidos de membrana (tBOOH) en una exposición temporal que cubra la mayor parte de la vida media de los PMNs circulantes. Los resultados muestran que, consistentemente con la sobreexpresión de CD11b en deportistas tras esfuerzo intenso, la exposición breve al H_2O_2 incrementó la expresión espontánea de CD18, CD11b y CD11c, integrinas de mayor relevancia en PMNs, mientras que no se observó un efecto significativo en CD11a, integrina de mayor implicación funcional en linfocitos. Mientras que la acción a corto plazo del tBOOH no produjo cambios consistentes en las integrinas analizadas, de acuerdo con la mayor lentitud de los fenómenos oxidativos que desencadena, la exposición durante 24 horas provocó cambios significativos. De forma interesante, las concentraciones bajas del prooxidante inducen un incremento en la expresión de

integrinas, mientras que a concentraciones crecientes se produce una tendencia a la disminución. Este conjunto de datos se asemejan al comportamiento bifásico *in vivo* del CD11b en sujetos ejercitados, cuya expresión aumenta inmediatamente, pero se normaliza tras varias horas de reposo, sugiriendo que el estrés oxidativo inmediato, mediado por moléculas solubles, podría estar implicado en la sobreexpresión de moléculas de adhesión, mientras que una peroxidación de la membrana podría participar en la disminución de la expresión de estas integrinas.

En otra serie de experimentos se evaluó la posible interferencia de los oxidantes exógenos, en las mismas condiciones *in vitro* descritas previamente, sobre la expresión de integrinas inducida por estimulación quimiotáctica (fMLP) o por activación directa de la protein kinasa C (PMA). Esta experiencia tenía como objetivo evaluar el posible papel del estrés oxidativo exógeno sobre las vías de transducción de señal implicadas en la activación celular en PMNs, en relación con la falta de respuesta adicional observada en las células de los sujetos sometidos a ejercicio intenso, cuando eran estimuladas quimiotácticamente, en ausencia y presencia de los agentes prooxidantes. La incubación con H₂O₂ indujo un efecto bifásico sobre la expresión de integrinas inducida por fMLP o PMA. A la más baja concentración disminuyó significativamente la sobreexpresión inducida de todas las integrinas analizadas en PMNs, con la excepción de CD11a, mientras que a concentraciones superiores, incrementó la sobreexpresión. Estos resultados son consistentes, en parte con el comportamiento *in vivo* de CD11b, cuya expresión no se incrementa adicionalmente, por encima de los niveles ya elevados basalmente, cuando las células son estimuladas con fMLP.

El efecto del tBOOH es de más compleja interpretación, puesto que el efecto es diferente según la molécula considerada y el tipo de estímulo. La estimulación con fMLP en presencia de tBOOH resulta en una menor sobreexpresión de CD11b y CD11c, mientras que la estimulación con PMA en esas condiciones tiende a disminuir la sobreexpresión de todas las subunidades de integrinas. El efecto complejo del tBOOH puede estar influido por su doble papel de agente que desencadena estrés oxidativo intracelular (su adición provoca un incremento intracelular de H₂O₂ y superóxido), cuya acción podría ser comparable a la del H₂O₂ soluble, y de agente inductor de cambios físico-químicos en las membranas celulares, afectando a la estructura de receptores, como fMLP, o del anclaje de las propias integrinas (CD18 es transmembranal y el resto son proteínas integrales de membrana). Cuando se comparan los efectos de ambos prooxidantes, los datos más consistentes se obtienen al considerar su interferencia con la estimulación mediada por PMA, un agente que actúa directamente sobre la protein kinasa C, obviando, en principio, los efectos inducidos sobre la membrana celular. En este caso, ambos oxidantes se comportan, en general, inhibiendo la sobreexpresión inducida por dicho estímulo.

En general, los datos encontrados en la literatura sobre posibles alteraciones en la función de las moléculas de adhesión de PMNs de deportistas profesionales son escasos e indirectos, pues provienen de experimentos en los que se ha valorado la adhesión a superficies y no se ha cuantificado la expresión de moléculas de adhesión.

Los resultados de un aumento de la expresión de las distintas subunidades de las

moléculas de adhesión de la familia de las integrinas β_2 en PMNs y monocitos, tanto en estado basal como activado tras un ejercicio severo, y la disminución de dicha sobreexpresión al añadir el estímulo con PMA y fMLP, sugieren que la mayor susceptibilidad a los procesos infecciosos, descrita en estas condiciones de sobreesfuerzo puede estar relacionada con alteraciones de los fenómenos de quimiotaxis, más que con una deficiente acción de los mecanismos bactericidas oxidativos. Estas alteraciones se han descrito en varios modelos de ejercicio a máxima intensidad o duración prolongada, en el síndrome de sobreentrenamiento y para distintos deportes y una deficiente adhesividad dificulta la quimiotaxis y la migración a través del endotelio y, en último término, impide una eficiente acción bactericida. La deficiente expresión de integrinas β_2 dificultaría también el proceso de fagocitosis, debido a que las subunidades CD11b y CD11c son los receptores de C3ib, factor del complemento encargado, de la opsonización de microorganismos. Por su parte, la subunidad común CD18 también está implicada en el reconocimiento no opsónico de los microorganismos Gram(-) y, concretamente, de lipopolisacáridos bacterianos, como el LPS utilizado en algunos estudios. Sin embargo, CD18 no desempeña un papel importante en la activación celular por LPS, puesto que los anticuerpos monoclonales contra CD18, que bloquean la unión de bacterias Gram(-) a la superficie de los macrófagos no inhiben la liberación de citokinas por éstos y, por otra parte, los monocitos de pacientes con deficiencia de CD18 son capaces de responder al LPS (Lynn y Golenbock, 1992).

Es importante tener en cuenta que nuestro estudio implica el análisis en

leucocitos obtenidos de sangre periférica, es decir, libremente circulantes y no en interacción con el lecho endotelial, utilizando estímulos quimiotácticos, relacionados con la presencia de agentes infecciosos exógenos.

La alteración de la expresión de moléculas de adhesión por PMNs y monocitos en deportistas sobreentrenados sugiere, por otra parte, un posible mecanismo compensatorio, integrado en la alteración inmunológica general presente en las respuestas de intenso estrés en las que se ha descrito una hiperexpresión endotelial de la molécula de adhesión ICAM-1, ligando de las integrinas β_2 . La mayor expresión de moléculas de adhesión complementarias de ICAM-1 por los PMNs y monocitos en modelos de ejercicio moderado o submáximo (o en su reproducción de nuestro modelo con prooxidantes extracelulares) podría ser, más que una consecuencia de la alteración metabólica, un mecanismo destinado a aumentar la adhesión a células endoteliales que presentan una adhesividad aumentada y, en general, a aumentar el tráfico leucocitario hacia la zona muscular inflamada para su regeneración.

En cambio, la disminución de la sobreexpresión de integrinas β_2 en los leucocitos de estos deportistas tras ejercicio severo o sobreesfuerzo, tanto en condiciones basales como tras estimulación quimiotáctica con fMLP y con PMA, podría significar un mecanismo de “autodefensa” para evitar el aflujo masivo de leucocitos a una zona doblemente afectada por inflamación e infección. Una explicación alternativa sería el resultado del agotamiento de los leucocitos que, estando previamente activados en respuesta al ambiente oxidativo generalizado, serían incapaces de expresar más receptores, o habrían recibido el nuevo estímulo

en un “periodo refractario” caracterizado por la falta de respuesta.

Los datos anteriores podrían reflejar alteraciones mucho más profundas de la fisiología de los PMNs que las puramente adhesivas o quimiotácticas, a la vista de los hallazgos que describen vías bidireccionales de transducción de señales, dependientes de integrinas β_2 y asociadas a cambios en la concentración intracelular de Ca^{++} (Larson y Springer, 1990; Mandeville y Maxfield, 1996). Las integrinas desempeñan un papel dual como receptores de adhesión y transductores de señales, a través de la formación de complejos focales de adhesión (Gahmberg et al., 1998). Las señales intracelulares generadas por la unión de ligandos se conocen como señales exteriores (“Outside-in”), mientras que las señales intracelulares que afectan a la unión de ligandos se denominan señales interiores (“Inside-out”). Tales señales están mediadas por múltiples kinasas, interacción de dominios SH2 y SH3, GTPasas de bajo peso molecular y, finalmente, por la liberación de mediadores fosfolipídicos, como muestra la intensa investigación sobre el papel señalizador de integrinas llevada a cabo en los últimos años (Clark y Brugge, 1995; Clezardin, 1998; Gahmberg et al., 1998; Longhurst y Jennings, 1998; Mackay e Imhoff, 1993; Rosales y Juliano, 1995).

A) Señales exteriores:

La adherencia de los PMNs a través de las integrinas β_2 genera múltiples aumentos transitorios de la concentración intracelular de Ca^{++} , que se han visualizado por técnicas de análisis de imagen como nubes localizadas (Jaconi et al., 1991). Esta señalización implica una proteína tirosina kinasa, posiblemente del tipo Src, por lo que también resulta en cambios del estado de fosforilación de

proteínas, entre ellas la propia subunidad CD18, como lo demuestran los datos obtenidos en un paciente con deficiencia de adhesión leucocitaria (Berton et al., 1994).

A) Señales interiores:

Las células pueden cambiar con rapidez la función de integrina alterando la afinidad de unión de la integrina por el ligando, pero como generalmente están en un estado de baja afinidad, no pueden unirse al ligando sin la energía aportada por el proceso de señalización “inside-out” (Longhurst y Jennins, 1998). El aumento de los niveles intracelulares de Ca^{++} puede activar la subunidad CD18 de las integrinas β_2 (van Kooyk et al., 1993), que puede, a su vez, incrementar la concentración intracelular de Ca^{++} y generar señalización dependiente de este mensajero. El establecimiento de este ciclo de eventos conduciría a la amplificación de la señal transducida y su alteración por cambios inducidos en los niveles de integrinas o de Ca^{++} podrían tener, además efectos muy definidos sobre diferentes procesos funcionales de los PMNs:

a) Motilidad celular:

Recientemente se ha propuesto que los aumentos transitorios de Ca^{++} , como los inducidos por activación de moléculas de adhesión regulan el reciclaje y distribución de las integrinas en los PMNs en migración (Mandeville y Maxfield, 1996). En presencia de bajas concentraciones de Ca^{++} intracelular, las integrinas se fosforilan y se mantienen unidas a sus ligandos de la superficie endotelial. Sobre este punto de anclaje, se generarían fuerzas de tracción basadas en la interacción entre actina F y miosina II, desplazando la célula en la dirección de su

movimiento. El aumento del Ca^{++} intracelular activaría la calcineurina y, posiblemente, otras fosfatasas, provocando la desfosforilación de la integrina, su liberación del ligando y su endocitosis y reciclaje hacia la zona anterior del PMN polarizado direccionalmente.

Una alteración en la capacidad de señalización exterior por parte de las integrinas podría resultar no sólo en una menor capacidad de reconocimiento de ligandos externos sino también en una incapacidad de separación de los mismos una vez reconocidos, conduciendo a una hipotética inmovilización del PMN sobre un punto concreto de la superficie endotelial. De hecho, el tamponamiento intracelular de Ca^{++} libre con quelantes permeables (como el Quin-2) induce la adhesión permanente de PMNs a superficies de vitronectina o fibronectina (Marks et al., 1991).

b) Fagocitosis:

Durante la fagocitosis en PMNs se produce un aumento de Ca^{++} localizado en la región perifagosómica, mediante una redistribución de los depósitos intracelulares de Ca^{++} desde una localización difusa hasta una próxima al fagosoma (Mandeville y Maxfield, 1996). El mecanismo de esta redistribución se desconoce todavía, aunque probablemente implique la asociación de receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) a elementos del citoesqueleto, como la ankirina (Bourguignon y Jin, 1995).

El aumento de Ca^{++} intracelular se ha relacionado con la generación de superóxido, la fusión de gránulos específicos con el fagosoma y la despolimerización de la barrera de actina que rodea al fagosoma previamente a su

fusión con el lisosoma (Mandeville y Maxfield, 1996), por lo que una interferencia con la señalización mediada por integrinas podría conducir a una disfunción en estos fenómenos de captación y destrucción de microorganismos mediados por Ca^{++} intracelular. En el presente estudio, se ha demostrado en PMNs un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y un incremento en la respuesta de generación de superóxido en las mismas condiciones experimentales, lo que parece apoyar un papel común primario del Ca^{++} intracelular para ambos fenómenos. Sin embargo, el aumento relativo es menor cuando se asocian los estímulos. En este sentido hay que tener en cuenta que, por una parte, las vías de transducción de señal que modulan la generación de superóxido y la motilidad celular divergen tras la activación de proteína tirosina kinasas por las proteínas G, siendo la primera de ambas vías dependiente de fosfolipasa D (Yasui et al., 1994). Por otra parte, el Ca^{++} es requerido para la fagocitosis de partículas mediada por el receptor Fc de los PMNs pero no por la fagocitosis mediada por el receptor del fragmento iC3b del complemento, la subunidad CD11b de la familia de integrinas β_2 contemplada en el presente estudio (Lew et al., 1985).

c) Apoptosis:

La apoptosis o muerte celular programada se compone de una serie de pasos secuencialmente controlados que dan como resultado la destrucción celular en ausencia de respuesta inflamatoria. Estos acontecimientos genéticos y bioquímicos producen: condensación del material citoplasmático y nuclear; encogimiento-arrugamiento celular; excisión del ADN cromosómico y aumento

del reconocimiento de las células agonizantes por los fagocitos. La capacidad de inducir selectivamente apoptosis en los neutrófilos, con pérdida de las funciones del citoesqueleto, de la fagocitosis, de la desgranulación, etc., puede ser un mecanismo fisiológico importante en el control de la acumulación de estas células en las lesiones inflamatorias, permitiendo también su reconocimiento e ingestión por macrófagos. La capacidad de la regulación terapéutica de la apoptosis de dichas células tiene un gran potencial en el tratamiento de procesos inflamatorios crónicos (Mangan et al., 1993; Whyte et al., 1993).

La activación indirecta de las células fagocíticas en la inflamación da como resultado la liberación de radicales libres que pueden ser los responsables del inicio de la apoptosis (Manuel et al., 1992)

Hay datos recientes que indican que la vía de transducción de señales interviene en la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y las respuestas fisiológicas a los cambios en el medio ambiente extracelular que desencadenan la situación antiproliferativa característica de la apoptosis (Cleardin, 1998; Lee et al., 1993; Longhurst y Jennings, 1998). Además, al igual que la depleción de determinadas hormonas y de factores de crecimiento, la matriz extracelular juega un papel crucial en la supervivencia, pues se ha comprobado que, la alteración de las interacciones célula-matriz mediadas por integrinas inducen apoptosis (fenómeno denominado “anoikis”) (Frisch y Ruoshlati, 1997). Aunque parece que las integrinas regulan la anoikis a través de múltiples vías de transducción de señales, se está realzando el papel de la kinasa de adhesión focal (FAK) en la resistencia a anoikis y en el crecimiento tumoral

independiente de anclaje (Cleazardin, 1998).

2.5. Posibles interacciones entre PMNs y linfocitos en los efectos observados.

La mayoría de los estudios sobre ejercicio físico e inmunidad han utilizado cargas de trabajo de diferente intensidad, tipo y duración. Como hemos comentado, intensidad y duración no son las únicas variables que pueden afectar a las respuestas de los neutrófilos al ejercicio. Varios estudios concluyen que el ejercicio excéntrico induce un incremento retardado en la producción basal (no estimulada) de anión superóxido (Babior et al., 1973; Smith et al., 1989b; Zerba et al., 1990). Estos últimos y no se detectan cambios significativos durante cinco días después del ejercicio en células estimuladas con PMA y, además, la producción basal de superóxido 24 horas después del ejercicio se correlacionó con un pico plasmático de la concentración de creatin kinasa. Así, los neutrófilos activados pueden contribuir al daño muscular causado por las contracciones excéntricas (Fielding y Evans, 1997). Otros estudio han demostrado tras el ejercicio excéntrico, incrementos en las concentraciones plasmáticas de MPO y elastasa que no se vieron al realizar ejercicios concéntricos de idéntica intensidad (Cannon et al., 1993). El hecho de que se hayan demostrado estos cambios entre el ejercicio concéntrico y el excéntrico hace pensar que puede que el daño tisular muscular sea el principal factor en la activación de los neutrófilos durante el ejercicio.

Los neutrófilos pueden actuar como “vectores” para liberar moléculas esenciales como las proteasas en los sitios de remodelación tisular (por ej. adaptación del músculo al entrenamiento físico). La elastasa libre puede activar

algunas cascadas proteolíticas incluyendo las de los sistemas del complemento, coagulación y fibrinolítico. Estos sistemas son activados por el ejercicio y se ha demostrado que muchas citokinas, incluyendo factores de crecimiento hematopoyéticos y pirógenos, como los liberados en la inflamación son potentes agentes estimuladores de los PMNs *in vitro* (Steinbeck y Roth, 1989). Entre los que actúan sobre los precursores celulares mieloides, IL-3 y factores estimulantes de colonia granulocito-macrófago, sólo las últimas actúan sobre los PMNs maduros y los estimulan para producir una potente respuesta de burst a los péptidos quimitácticos y fagocitosis. Las citokinas inflamatorias clásicas, IL-1 α y 1 β y TNF- α también estimulan a los PMNs para producir burst. A diferencia de la IL-1, el TNF- α induce directamente la formación de O₂^{·-} y H₂O₂.

Se ha demostrado que los oxidantes estimulan la expresión génica por mecanismos de oxidación-reducción sobre numerosas moléculas reguladoras, desde receptores de superficie celular a factores de transcripción nuclear. Así, oxidantes exógenos pueden usurpar las vías normales de transducción de señales por modificaciones redox de múltiples dianas, como la señalización por MAP quinasa. Mecanismos redox y fosforilación mediados por proteína quinasa C están entre los factores que contribuyen a estabilizar el RNAm que parece modular la expresión génica tras la exposición a oxidantes: la vida media de estos transcritos, que no llega a una hora en las células en reposo, puede aumentar dramáticamente

tras la exposición a oxidantes (Standart y Jackson, 1994).

Al igual que por activación de receptores de superficie, la oxidación de las proteínas de los canales iónicos y los efectos indirectos de la peroxidación lipídica de la membrana celular también pueden contribuir a la iniciación de la señalización celular por oxidantes. Dicha peroxidación lipídica puede afectar a la densidad de los receptores y la viscosidad de la membrana, estimulando o bloqueando indirectamente las interacciones entre ligando y receptor, así como incrementando la permeabilidad a moléculas de señalización como el calcio y las especies reactivas oxigénicas y nitrogénicas (van der Vliet y Bast, 1992).

Los mecanismos de señalización que involucran a las especies reactivas oxigénicas son esenciales en procesos tan diversos como el control del tono vascular, función del cuerpo carotídeo, trombosis y proliferación, en respuesta a estímulos tales como niveles de O_2 , inflamación, isquemia-reperfusión y función de receptores. Parece que especies reactivas oxigénicas específicas, cuyos niveles cambian en respuesta a estímulos fisiológicos, interaccionan con mecanismos de control presentes en las células, permitiendo a estas especies funcionar dentro de las células como segundos mensajeros y en la señalización de tipo hormonal de célula a célula tisular.

Ciertos sistemas de señalización son muy sensibles a niveles bajos de especies normalmente producidas por las células, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que parecen participar en los procesos de regulación fisiológica. Los sistemas de señalización muy sensibles al estrés oxidativo generalmente se asocian a la función de las vías metabólicas. Otros

sistemas de señalización que se activan a niveles más altos de oxidantes parecen estar relacionados con procesos fisiopatológicos y respuestas celulares al estrés oxidativo.

La mayoría de las fuentes de radicales libres potencialmente involucrados en la señalización parecen generar inicialmente $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 se forma como resultado de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$. Los niveles intracelulares de $O_2^{\cdot-}$ parecen mantenerse en concentraciones picomolares como resultado de la función de la enzima superóxido dismutasa (Fridovich, 1985). Ciertos tipos celulares como las células fagocíticas, generan cantidades apreciables de $O_2^{\cdot-}$ extracelular, que llegan a alcanzar niveles micromolares bajo condiciones extremas. Las concentraciones de $O_2^{\cdot-}$ que superan niveles nanomolares atenúan la regulación por catecolaminas y óxido nítrico (Pryor y Squadrito, 1995). Los niveles intracelulares de H_2O_2 parecen mantenerse alrededor de 1 nM (Chance et al., 1989) como resultado de su metabolismo por la GSH peroxidasa y catalasa. Los niveles extracelulares de H_2O_2 en eventos de señalización transcelular pueden llegar al rango de 0.1 mM.

En cuanto a la protein kinasa C, se han detectado procesos de señalización activados por oxidantes en varios tejidos que parecen involucrar la actividad de la protein kinasa C. Se ha publicado que ésta puede ser directamente estimulada por niveles posiblemente tóxicos de H_2O_2 (Gopalakrishna y Anderson, 1989), pero parece que la estimulación de la actividad de la protein kinasa C en células y tejidos intactos involucra a procesos más sensibles a las especies oxigénicas.

El ejercicio es un estresante reproducible y cuantificable que evoca respuestas hormonales definidas que son dependientes de su intensidad y

duración. Basándose principalmente en esta definida respuesta hormonal al ejercicio, se propuso un modelo citokina/neuroendocrino que puede explicar cómo los efectos intensidad-dependientes del ejercicio están mediados por algunas funciones de los neutrófilos. Mientras que hormonas como la GH y la prolactina son potentes agentes de estimulación *in vitro*, la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la β -endorfina y el cortisol suprimen algunas funciones neutrofílicas. La GH es la candidata humoral más probable para la estimulación de los neutrófilos inducida por ejercicio porque su concentración aumenta al menos 10 veces después de ejercicio moderado. Por el contrario, altas concentraciones de hormonas inmunosupresoras, como la ACTH, la adrenalina y el cortisol, pueden mantener suprimidas las funciones neutrofílicas. Estas hormonas son liberadas a la circulación sólo si la intensidad del ejercicio excede el 60 % VO_2 máx. Un modesto aumento de la concentración plasmática de GH se ha asociado al estímulo neutrofílico para generar H_2O_2 intracelularmente en respuesta al estímulo con PMA *in vitro*. El péptido atrial natriurético, por ejemplo, es un potente agente de estimulación para la liberación de $O_2\cdot^-$ *in vitro*. Al igual que la GH, esta hormona es secretada rápidamente a la circulación en respuesta al ejercicio de baja intensidad y permanece elevada hasta que cesa el trabajo. Debido a su rápida secreción a la circulación una vez la intensidad del ejercicio excede el 60 % VO_2 máx., la adrenalina es la candidata más probable para la supresión de la actividad microbicida de los neutrófilos inmediatamente después de ejercicio máximo: la adrenalina y el cortisol pueden mantener una inmunosupresión durante algunas horas después del ejercicio.

Debido al probable periodo de inducción necesario para que se produzca una respuesta hormonal (periodo de latencia entre la aplicación del estímulo y la reacción resultante), las cinéticas de la secreción hormonal y de la generación del cambio funcional en los neutrófilos, inducidos por el ejercicio, pueden no coincidir. Esto enfatiza la necesidad de analizar las respuestas de los neutrófilos al ejercicio algunas horas después de finalizado el test de ejercicio. Las diferencias cinéticas también pueden explicar por qué los efectos del entrenamiento son más consistentes que los cambios tras episodios simples de ejercicio.

Por todo lo anterior, y en función de los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede hipotetizar que en el ejercicio físico intenso, la liberación de especies oxidantes a partir de la actividad respiratoria acelerada de las fibras musculares y el efecto catalítico de las moléculas conteniendo Fe reactivo, procedentes de las microlesiones musculares y de los eritrocitos, generarían un estrés oxidativo en las células circulantes, especialmente en los PMNs y monocitos. A la activación de éstas células contribuirían las citokinas inflamatorias liberadas a medio plazo, aumentando la producción de especies oxidativas. La oxidación de proteínas propias podría generar a medio y largo plazo neoantígenos capaces de activar inespecíficamente a los linfocitos T, induciendo la sobreexpresión de receptores para citokinas, como la IL-2. Los radicales libres generados, que por sí mismos no serían capaces de inducir la activación de los linfocitos, podrían interferir con los mecanismos de transducción de señal implicados en la funcionalidad de los mismos. De esta forma, el estrés oxidativo generado en el ejercicio físico podría interferir potenciando o

antagonizando los mecanismos reguladores dependientes de señales fisiológicas, fundamentalmente hormonas, citokinas y neurotransmisores, involucrados en la homeostasis de poblaciones y funciones inmunitarias.

2.6. Relacion de los resultados obtenidos con la frecuencia de infecciones en sujetos sometidos a ejercicio intenso.

Aunque se han encontrado algunos cambios consistentes en la función de los neutrófilos en respuesta al ejercicio y entrenamiento de resistencia, su significado fisiológico y clínico permanece desconocido. Incluso cambios absolutamente extensos de estas actividades pueden no ser biológicamente significativos. Por ejemplo, la producción de radicales libres puede tener que caer por debajo de un umbral crítico antes de que se incremente la vulnerabilidad a las infecciones. La situación es aún más complicada pues no se ha establecido una referencia normal que se extienda a todas las funciones de los neutrófilos. Los déficits son diagnosticados por la ausencia de ciertas funciones más que por una perturbación dentro de los límites homeostáticos.

A pesar de estas consideraciones, nuestros resultados son consistentes con la evidencia epidemiológica de que los atletas sometidos a programas de entrenamiento intensivo son más vulnerables a la infección. Por una parte, la capacidad microbicida de los PMNs activados en el ejercicio físico muestra una baja capacidad de respuesta adicional frente a estímulos quimiotácticos similares a los que proporcionan los patógenos microbianos. La expresión espontánea de las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas, esenciales para la respuesta de motilidad celular y reconocimiento e ingestión de partículas foráneas se

encuentra interferida por moléculas oxidantes, como las que se pueden acumular en el ejercicio intenso.

Por otra parte, el compartimento de células linfoides presenta alteraciones funcionales y numéricas que apuntan a una inmunodisfunción por defecto. Así, encontramos disminuida la población de células de carácter citotóxico (células NK y linfocitos CD8 con capacidad citotóxica natural) y la subpoblación de linfocitos CD4+ (CD4+CD29+) capaces de estimular la cooperación con las células B. Por el contrario, está aumentada la subpoblación de naturaleza inmunosupresora (CD4+CD45RA+). Los datos también sugieren la existencia de fenómenos de anergia linfocitaria, inducida tras una posible activación inespecífica de las células T.

A pesar de nuestros resultados y de la literatura con la que, en mayor o menor grado coinciden, la complejidad y redundancia del Sistema Inmunitario, no permite por el momento establecer de forma fehaciente una relación directa causa-efecto. Un aspecto esencial, en este sentido, es el del establecimiento de los intervalos de normalidad para las medidas funcionales de las células inmunitarias, puesto que, con frecuencia una inmunodeficiencia congénita o adquirida es diagnosticada generalmente por la ausencia total de una actividad funcional, más que por alguna alteración dentro de los límites homeostáticos (Ader, 1992) y por ello es comprensible que no se hayan establecido para deportistas, lo que por otro lado, abre nuevas expectativas de investigación.

Los datos obtenidos en este estudio demuestran el interés de aplicar la citometría de flujo multiparamétrica al estudio funcional del Sistema Inmunitario,

más que a la simple enumeración de subpoblaciones fenotípicas y, al mismo tiempo, apoyan la validez del granulocito de sangre periférica como célula modelo de estudio dinámico, una vez definidas las áreas funcionales de interés e identificados los problemas metodológicos de su manejo en condiciones lo más cercanas posibles a las de su entorno fisiológico.

CONCLUSIONES

1. El efecto del ejercicio físico intenso, en las condiciones del estudio inicial de este trabajo, induce una disminución en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos, linfocitos T inductores de cooperación y células Natural Killer, aumentando el porcentaje de linfocitos T inductores de supresión.
2. En este modelo se produce un incremento de las células T que expresan el receptor de Interleukina-2, acompañado de una mayor capacidad de respuesta a la activación mitogénica *in vitro*. Sin embargo, dichas células utilizan con menos eficacia la Interleukina-2 exógena, sugiriendo la existencia de interferencias con el mecanismo de transducción de la señal de activación.
3. En el ejercicio físico intenso se producen cambios funcionales en los granulocitos que se evidencian por un incremento de la actividad mitocondrial y de la expresión de moléculas de adhesión y se acompañan de un incremento de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno.
4. La incubación *in vitro* con dosis no letales de prooxidantes exógenos induce un estrés oxidativo intracelular en los leucocitos, pero no provoca la activación de los linfocitos.
5. Los prooxidantes exógenos incrementan, en general, la expresión espontánea de moléculas de adhesión y modifican la sobreexpresión inducida por estímulos quimiotácticos o activadores de la protein kinasa C.
6. Los granulocitos responden de forma más sensible y consistente que los monocitos a la acción *in vitro* de los oxidantes exógenos
7. La utilización de la citometría de flujo multiparamétrica para determinar la funcionalidad de los granulocitos, células fáciles de estudiar selectivamente,

podría representar una aproximación de interés para la detección y análisis de fenómenos de citotoxicidad que afecten al Sistema Inmunitario.

BIBLIOGRAFIA

Acevedo (1993). Distribution of ICAM-3 bearing cells in normal human tissues. expression of a novel counter-receptor for LFA- 1 in Langerhans cells. *Am. J. Pathol.* 143: 774-783.

Adams D.H. y Shaw S. (1994). Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lacent* 343: 831-836.

Ader R. (1992). On the clinical relevance of psychoneuroimmunology. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64: 6-8.

Ader R., Felten D. y Cohen N. (1990). Interactions between the brain and the immune system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 561-602.

Aesbacher M., Reinhardt C.A. y Zbiden G. (1986). A rapid cytotoxicity assay using dye retention and exclusion in two parameters flow cytometry. *Int. Conf. Pract. Tox.* 24: 467-476.

Ahlborg B. y Ahlborg G. (1970). Exercise leucokytosis with and without beta-adrenergic blockade. *Acta Med. Scand.* 187: 241-246.

Akard L.P., English D., y Gabig T.G. (1988). Rapid deactivation of NADPH oxidase in Neutrophils: Continuous replacement by newly activated enzyme sustains the respiratory burst. *Blood* 72: 322-327.

Albelda S.M. y Buck C.A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-2880.

Allen R.C. (1986). Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: A kinetic approach to analysis. In: DeLuca M.A. y McElroy W.D., eds. *Methods in Enzymology*. Vol 133. New York: Academic Press: 449-493.

Alessio H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports. Exer.* 25: 218-224.

Altieri D.C. (1991). Occupancy of CD11B/CD18 (mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 147: 1891-1898.

Anderson D.C., Schmalstein F.C. y Finegold M.J. (1985). The severe and moderate phenotypes heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: Their quantitative definition and relation to leucocyte dysfunction and clinical features. *J. Inf. Dis.* 152: 668-672.

Anderson D.C., Miller C.L., Schmalstieg F.C. y Springer T.A. (1986). Contributions of Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-functions assesment employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 137: 15-22.

Anderson D.C. y Springer T.A. (1987). Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. *Ann. Rev. Med.* 38: 175-194.

Anderson M.T., Staal F.J.T., Gitler C. y Herzenberg L.A. (1994). Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- κ B signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 11527-11531.

Arnout M.A., Lanier L.L. y Faller D.V. (1988). Relative contribution of the leukocyte molecules Mo-1, LFA-1 y p150,95 (leuM5) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium in tissue- and stimulus-specific. *J. Cell. Physiol.* 137: 305-309.

Arnaout M.A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1044.

Ault K.A. (1993). Flow cytometric analysis of platelets. En: *Clinical Flow Cytometry. Principles and Applications* (KD Bauer et al., eds.) Williams y Wilkins, Baltimore: 387-404.

Babior B.M., Kipnes R.S. y Curnutte J.T. (1973). The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52: 741-744.

Babior G.L., Rosin R.E., McMurrich B.J., Peters W.A. y Babior B.M. (1981). Arrangement of the respiratory burst oxidase in the plasma membrane of the neutrophil. *J. Clinical Invest.* 67: 1724-1728.

Badwey J.A., Curnutte J.T., Robinson J.M., Berde C.B., Karnovsky M.J. y Karnovsky M.L. (1984). Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils: Reversibility by albumin. *J. Biol. Chem.* 259: 7870-7877.

Baggiolini M., Dewald B. y Thelen M. (1988). Effects of PAF on neutrophils and mononuclear phagocytes. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 22: 90-105.

Baggiolini M., Walz A. y Kunkel S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukine 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clinical Invest.* 84(4): 1045-1049.

Bailey G.H. (1925). The effect of fatigue upon the susceptibility of rabbits to intratracheal injections of type I pneumococcus. *Am. J. Hygiene* 5: 175-195.

Balnave C.D. y Thompson M.W. (1993). Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol* 75: 1545-1551.

Bartoleschi C. (1994). Flow cytometric analysis of cell function: cytosolic Ca⁺⁺ modulation in human polymorphonuclear leukocytes and T lymphocytes. *Eur J. Histochem.* 38 suppl. 1: 47-52.

Bassoe C.F., Laerum O.D. y Glette J. (1983). Simultaneous measurement of phagocytosis and phagosomal pH by flow cytometry: role of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte granules in phagosome acidification. *Cytometry* 4: 254-262.

Bassoe C.F., Laerum O.D. y Solberg C.O. (1983). Phagocytosis of bacteria by human leukocytes measured by flow cytometry. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 174: 182-186.

Bassoe C.F. y Solberg C.O. (1984). Phagocytosis of *S. aureus* by human leukocytes: quantitation by a flow cytometric and a microbiological method. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C]* 92: 43-50.

Bassoe C.F., Laerum O.D. y Solberg C.O. (1985). Human peripheral blood phagocyte functions in malignant haematological disorders. *Cytometry Suppl. [Abstract]. Int. Conf. Analytical Cytology XI, Hilton Head, SC.*

Bauer K.D., Duque R.E. y Shankey T.V. (1993). *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications.* William y Wilkins, Baltimore.

Baum M., Liesen H. y Enneper J. (1994). Leukocytes, lymphocytes, activation parameters and cell adhesion molecules in middle-distance runners under different training conditions. *Int. Sports Med.* 15: S122-S126.

Behrens J. (1994). Cell contact, differentiation, and invasiveness of epithelial cells. *Invasion metastasis* 14: 61-81.

Belloc F., Vincendau Ph. y Freyburger G. (1990). Flow cytometric study of the activation of polymorphonuclear cells. *J. Leukocyte Biol.* 48: 353-358.

Benoni G., bellavite P., Adami A., Chirumbolo S., Lippi G., Brocco G., Giulini G.M. y Cuzzolin L. (1995a). Effect of acute exercise on some haematological parameters and neutrophil functions in active and inactive subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 70: 187-191.

Benoni G., bellavite P., Adami A., Chirumbolo S., Lippi G., Brocco G., Giulini G.M. y Cuzzolin L. (1995b). Changes in several neutrophil functions in basketball players before, during and after the sports season. *Int. J. Sports Med.* 16: 34-37.

Berglund B. y Hemmingsson P. (1990). Infectious disease in elite cross-country skiers: a one-year incidence study. *Clin. Sports Med.* 2: 19-23.

Berlin C., Berg E.L., Briskin M.J. et al. (1993). $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressing MAdCAM-1.

Bertoleschi C. (1994). Flow cytometric analysis of cell function: cytosolic Ca^{++} modulation in

human polymorphonuclear leukocytes and T lymphocytes. *Eur. J. Histochem.* 38 suppl.1: 47-52.

Berton G, Fumagalli L, Laudanna C et al. (1994) β_2 integrin dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. *J Cell Biol* 126:1111-1121.

Billah M.M., Eckel S., Mullmann T.J., Egan R.W. y Siegel M.I. (1989). Regulation of phospholipase D in HL-60 granulocytes. Activation by phorbol esters, diglyceride and calcium ionophore via protein kinase-independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 264(15): 9069-9076.

Biselli R., Matricardi P.M., D'Amelio R. y Fattorossi A. (1992). Multiparametric flow cytometry analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 35: 439-447.

Bjerknes R., Bassoe C.F. y Sjensen H. (1989). Flow Cytometry for the study of phagocyte functions. *Rev. Infect. Dis.* 11: 16-33.

Bourguignon LYW y Jin H.(1995) Identification of the ankyrin binding domain of the mouse T lymphoma cell inositol 1,4,5, triphosphate (IP_3) receptor and its role in the regulation of IP_3 - mediated internal Ca^{2+} release. *J Cell Biochem* 270:7257-7260.

Brahmi Z., Thomas E. y Park M. (1985). The effects of acute exercise on natural killer cell activity of trained and sedentary human subjects. *J. Clin. Immunol.* 5: 321-328.

Brown L.A. (1994). Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am. J. Physiol.* 266: L172-L176

Brunsgaard H., Hartkopp A. y Mohr T. (1997). In vivo cell-mediated immunity and vaccination response following prolonged, intense exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(9): 1176-81.

Burdon R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biol. Med.* 18: 775-794.

Buss J.E., Mumby S.M., Casey P.J., Gilman A.G. y Sefton B.M. (1987). Myristoylate alpha subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(21): 7493-7497.

Butler J. y O'Brien M. (1982). Relationship of β -adrenoreceptor density to fitness in athletes. *Nature* 298: 60-62.

Buyon J.P., Slade S.G., Reibman J., Abramson S.B., Philips M.R. y Weissmann G. (1990). Constitutive and induced phosphorylation of the α - and β - chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. *J. Immunol.* 144: 191-197.

Calvelli T., Denny T.N., Paxton H., Gelman R. y Kagan J. (1993). Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. *Cytometry* 14: 702-715.

Campanero M.R. (1993). ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J. Cell Biol.* 123: 1007-1016.

Cannon J.G. (1993). Exercise and resistance to infection. *J. Appl. Physiol.* 74: 973-981.

Cannon J.G. y Kluger M.J. (1983). Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. *Science* 220: 617-619.

Cannon J.G. y Dinarello C. (1984). Interleukin-1 activity in human plasma. *Fed. Proc.* 43: 462-467.

Cannon J.G., Meydani S.N., Fielding R.A., Fiatarone M.A., Meydani M. Farhangmehr M., Orencole S.F., Blumberg J.B. y Evans W.J. (1993). Acute phase response in exercise. II. Associations between vitamin E, cytokins and muscle proteolysis. *Am. J. Physiol.* 260: R1235-R1240.

Carey P.D. (1997). Neutrophil activation, vascular leak toxicity, and cytolysis during interleukin-2 infusion in human cancer.

Carlos T.M. y Harlan J.M. (1990). Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol. Rev.* 114: 5-11.

Carlos T.M. y Harlan J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.

Chance B., Sies H. y Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.

Chatila T.A., Geha R.S. y Arnaout M.A. (1989). Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 Leukocyte adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 109: 3435-3444.

Cheeseman K.H. y Slater T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49: 481-493.

Cherry P.D., Omar H.A., Farrell K.A., Stuart J.S. y Wolin M.S. (1990). Superoxide anion inhibits cGMP-associated bovine pulmonary arterial relaxation. *Am. J. Physiol.* 259: H1056-H1062.

Clancy J.Jr. (1998) Basic concepts in immunology. A student's survival guide. McGraw-Hill Inc. J.

Morgan y P. Touboul, eds. New York.

Clark R.A. (1990). The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 161: 1140-1147.

Clark EA y Brugge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239.

Clezardin P. (1998). Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 541-548.

Colditz I., Zwahlen R., Dewald B. y Baggiolini M. (1989). In vivo inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am. J. Pathol.* 134: 755-760.

Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.M., Shevach E.M. y Strober W. (1991). *Current Protocols in Immunology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 2.0.1-7.27.8.

Combadiere C., El Benna J., Pedruzzi E., Hakim J. y Perianin A. (1993). Stimulation of the human neutrophil respiratory burst by formyl peptides is primed by protein kinase inhibitor, staurosporine. *Blood* 82: 2890-2898.

Croft M. (1994). Activation of naive, memory and effector T-cells. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 431-437.

Cronstein B.N. y Weissmann G. (1993). The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis and Rheumatism* 36: 147-157.

Cross A.R. y Jones O.T.G. (1991). Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys. Acta* 1057: 291-298.

Curnutte J.T. (1991). Disorders of phagocyte function. En *Hematology: Basic Principles and Practice*. (R. Hoffman ed.) Churchill Livingstone Inc, New York: 571-589.

Curnutte J.T. y Babior B.M. y Karnovsky M.L. (1979). Fluoride-mediated activation of the respiratory burst in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 63: 637-647

Curnutte J.T. y Babior B.M. (1990a). Composition of neutrophils. En: *Williams' Hematology* (E. Beutler ed.) McGraw-Hill Inc, New York: 770-774.

Curnutte J.T. y Babior B.M. (1990b). Metabolism of neutrophils. En: *Williams' Hematology* (E. Beutler ed.) McGraw-Hill Inc, New York: 775-779.

Darzynkiewicz Z. y Crissman H.A. (1990). *Flow Cytometry, Vol.33: Methods in Cell Biology*. Academic Press, Inc. New York.

Davies K.J.A., Quintanilla A.T., Brooks G.A. y Packer L. (1982). Free Radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.

Davignon D., Martz E., Reynolds T., Kurzinger K. y Springer T.A. (1981a). Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4535-4539.

Davignon D., Martz E., Reynolds T., Kurzinger K. y Springer T.A. (1981b). Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): mechanism of blocking of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J. Immunol.* 127: 590-595.

Davis B.H., McCabe E. y Langweiler M. (1986). Characterization of f-Met-Leu-Phe-stimulated fluid pinocytosis in human polymorphonuclear leukocytes by flow cytometry. *Cytometry* 7: 251-262.

Del Prete G.E., Maggi E. y Romagnani S. (1994). Human Th1 y Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab. Invest.* 70: 299-306.

Dewald B., Pyne T.G. y Baggiolini N. (1984). *Biochem Biophys. Res. Commun.* 125: 367-373.

Dewald B., Thelen M. y Baggiolini N. (1988). Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J. Biol. Chem.* 263(31): 16179-16184.

Dewald B., Thelen M., Wyman, M.P. y Baggiolini N. (1989). Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils. *Biochem. J.* 264(3): 879-884.

Dillard C.J., Litov R.E. y Savin W.M. (1978). Effects of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45: 927-932.

Dinarello C.A. (1985). An update on human interleukin-1: From molecular biology to clinical relevance. *J. Clin. Immunol.* 5: 287-297.

Dransfield I., Cabañas C., Craig A. y Hogg N. (1992). Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* 116: 219-226.

Dufaux B. y Order U. (1984). C-reactive protein serum concentrations in well-trained athletes. *Int. J. Sports Med.* 5: 102-106.

Dupuy D., Virion A., Ohayon R., Kanieswski J., Deme D., y Pommier J. (1991). Mechanism of

hydrogen peroxide formation catalized by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 2739-2743.

Dustin M.L. y Springer T.A. (1988). Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanism for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* 107, 321.

Eichmann K. (1991). The immune system: cells and molecules for the integration of self and non-self. *Int. J. Sports Med.* 12: s2-s4.

Eichner E.R. (1993). Physical activity and free radicals. En: *Physical activity, Fitness, and Health. International Proceedings and Consensus Statement.* (C. Bouchard, R.J. Shephard y T. Stephens, eds.). Human Kinetics Publishers.

El Benna J., Ruedi J.M. y Babior B.M. (1994b). Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47^{phox} and p67^{phox} to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 269: 6729-6734.

Eliakim A., Wolach B. y Kodesh E. (1997) Cellular and humoral immune response to exercise among gymnasts and untrained girls. *Int. J. Sports Med.* 18(3): 208-212.

Elices M.J., Osborn L. y Takada Y. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leucocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577.

Eskola J., Ruuskanen O., Soppi E., Vilijanen M.K., Jarvinen M., Toivonen H. y Kouvalainen K. (1978). Effect of sport stress on lymphocyte transformation and antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.* 32: 339-345.

Evans W.J., Cannon J.G. (1991). The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. En: *Exercise and Sport Sciences Reviews* (J.O. Holloszy, ed.). Williams y Wilkins, Baltimore: 99-125.

Farber J.L., Kyle M.E. y Coleman J.B. (1990). Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 61: 670-679.

Fattorossi A., Nisini R. y Pizzolo J.G. (1989). New simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane bound particles in phagocytosis. *Cytometry* 10: 320-325.

Fernandez, H.N., Henson P.M., Otani, A. y Hugli, T.E. (1978). Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. *J. Immunol.* 120: 109-115.

Ferry A., Weill B.L. y Rieu M. (1990). Immunomodulations induced in rats by exercise on

treadmill. *J. Appl. Physiol.* 69: 1921-1915.

Fialkow L., Chan C.K., Grinstein S. y Downey G.P. (1993). Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reaction oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* 268: 17131-17137.

Fielding R.A. y Evans W.J. (1997). Aging and the acute phase response to exercise: implications for the role of systemic factors on skeletal muscle protein turnover. *Int. J. Sports Med.* 18(Supl 1): s22-7.

Fitzgerald L. (1988). Exercise and the immune system. *Immunol. Today* 11: 337-346.

Forsyth K.D. y Levinsky R.J. (1989). Role of the LFA-1 adhesion glycoprotein in neutrophil adhesion to endothelium and plastic surfaces. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 265-269.

Fridovich I. (1985). Superoxide dismutase, regularities and irregularities. *Harvey Lect.* 79: 51-75.

Frisch S.M. y Ruoshlati E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 701-706.

Fry R.W., Morton A.R., Crawford G.P. y Keast D. (1992). Cell numbers and in vitro responses of leukocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur. J. Appl. Physiol.* 64: 218-227.

Fukatsu A., Sato N. y Shimizu H. (1996). 50-mile walking race suppresses neutrophil bactericidal function by inducing increases in cortisol and ketone bodies. *Life Sci.* 58(25): 2337-2343.

Gabriel H., Urhausen A. y Kindermann W. (1992). Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 65: 164-170.

Gabriel H., Bretschel L., Urhausen A. y Kindermann W. (1994). Recruitment and recirculation of leukocytes after an ultramarathon run: preferential homing of cells expressing high levels of the adhesion molecule LFA-1. *Int. J. Sports Med.* 15: s148-s153.

Gabriel H. y Kindermann W. (1995). Flow Cytometry. Principles and Applications in Exercise Immunology. *Sports Med.* 20 (5): 302-320.

Gabriel H. y Kindermann W. (1997). The acute immune response to exercise: what does it mean?. *Int. J. Sports Med.* 18 (Supl 1): s28-s45.

Gabriel H., Urhausen A., Valet G., Heidelbach V. y Kindermann W. (1998). Overtraining and the immune system: A prospective longitudinal study in endurance athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.*

30(7): 1151-1157.

Gahmberg C.G. (1997). Leukocyte adhesion. CD11/CD18 integrins and intracellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 643-650.

Gahmberg C.G., Nortamo P., Kotovuori P., Tontti F., Li R. y Valmu L. (1992). Activation and binding of leukocyte integrins to their ligands. En: *Leukocyte Adhesion. Basic and Clinical Aspects*, Excerpta Médica, International Congress Series 1010. (C.G.

Gahmberg, T. Mandrup-Poulsen., L. Wogensen Bach y B. Hökfelt, eds.). Elsevier, Amsterdam: 205-219.

Gahmberg C.G., Tolvanen M., Nortamo P., Li R., Kantor C. y Xie J. (1995). The intracellular adhesion molecules (ICAMs). En: *Adhesion Receptors as Therapeutical Targets*. (M.A. Horton, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL: 37-59.

Gahmberg C.G., Tolvanen M. y Kotovuori P. (1997). Leukocyte adhesion. Structure and function of human leukocyte β_2 -integrins and their cellular ligands. *Eur. J. Biochem.* 245: 215-232.

Gahmberg C.G., Valmu L., Fagerholm S., Kotovuori P., Ihanus E., Tian L. y Pessa-Morikawa T. (1998). Leukocyte integrins and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 549-555.

Gailit J. y Ruoslahti E. (1988). Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cation. *J. Biol. Chem.* 263: 12927-12932.

Galbo H. y Gollnick P.D. (1984). Hormonal changes during and after exercise. En: *Medicine and Sports Science Vol. 17: Physiological Chemistry of training and detraining*. (P. Marconnet, J. Poortmans, et al., eds.) S. Karger, Basel, Switzerland: 97-110.

Gearing A.J.H. (1992). Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-Selectin, ICAM-1 y VCAM-1: pathological significance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667: 324-331.

Gearing A.J.H. y Newman W.(1993). Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today* 14: 506-512.

Geng J.G., Bevilacqua M.P., Moore K.L., McIntyre T.M., Prescott S.M., Kim J.M., Bliss G.A., Zimmerman G.A. y McEver R.P. (1990). Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature.* 343757-760.

Giuliani A. y Cestaro B. (1997). Exercise, free radical generation and vitamins. *Eur. J. Cancer Prev.* 6 (supl 1): s55-s67.

Gleeson M., McDonald W.A., Cripps A.W., Pyne D.B., Clancy R.L., Fricker P.A. y Wlodarczyk

J.H. (1995). Exercise, stress and mucosal immunity in elite swimmers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371A: 571-574.

Gmunder F.K., Joller P.W., Joller-Jemelka H.I., Bechler B., Cogoli M., Ziegler W.H., Muller J., Aeppli R.E. y Cogoli A. (1990). Effect of a herbal yeast food supplements and long-distance running of immunological parameters. *Br. J. Sports Med.* 24: 103-112.

Gopalakrishna R. y Anderson W.B. (1989). Ca²⁺ and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc. Natl Acad. Sci.* 86: 6758-6762.

Gotoh Y., Matsuda S., Takenaka K., Hattori S., Iwamatsu A., Ishikawa M., Kosako H. y Nishida E., (1994). Characterization of recombinant xenopus MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. *Oncogene* 9: 1891-1898.

Green R.L., Kaplan S.S., Rabin B.S., Stanitski C.L. y Zdziarski U. (1981). Immune function in marathon runners. *Ann. Allergy* 47: 73-75.

Gregory R.L., Wallace J.P., Gfell L.E., Marks J y King B.A. (1997). Effect of exercise on milk immunoglobulin A. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(12): 1596-1601.

Griffioen A.W., Rijkers G.T. y Keij J. (1989). Measurement of cytoplasmic calcium in lymphocytes using flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 120: 23-27.

Günthert U. (1995). Are CD44 variant isoforms involved in human tumor progression ?. *Cancer Surveys* 24: 19-42.

Haas T.A. y Plow E.F. (1994). Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 656-662.

Hack V., Strobel G., rau J.P. y Weicker H. (1992). The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. *Eur. J. Appl. Physiol.* 65: 520-524.

Hack V., Strobel G., Weiss M. y Weicker H. (1994). PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J. Appl. Physiol.* 77: 1731-1735.

Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, Biochemistry, and role in human disease. *Proceedings of a symposium: Oxidant and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents.* *Am. J. Med.* 91(supl 3C): 14-22.

Halliwell, B. y Gutteridge J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 196: 1-88.

Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford UK: Clarendon Press.

Hanson P.G. y Flaherty D.K. (1981). Immunological responses to training in conditioned runners. *Clin. Sci.* 60: 225-228.

Hara T. y Fu S.M. (1986). Phosphorylation of α , β subunits of 180/100 Kda polypeptides (LFA-1) and related antigens. En: *Leukocyte Typing II*, vol. 3. (E.L. Reinherz, B.F. Haynes, L.M. Nadler. y I.D. Bernstein, eds.), Springer, New York: 77-84

Harlan J.M., Killen P.D. y Senecal F.M. (1985). The role of neutrophil membrane glycoprotein GP150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Blood*, 66: 167-176.

Heath G.W., Ford E.S., Craven T.E., Macera K.L. y Jackson-Pate R.E. (1991). Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Med. Sci. Sports Exerc.* 21: 152-257.

Hedfors E. (1976). Lymphocyte mobilization in response to physical work in sarcoidosis. Influence on lymphocyte subpopulations, DNA synthesis and cytotoxicity. *Scand. J. Respir. Dis.* 57: 151-159.

Hibbs M.L., Jakes S., Stacker S.A., Wallace R.W. y Springer T.A. (1991a). The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 β subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J. Exp. Med.* 174: 1227-1238.

Hibbs M.L., Xu H., Stacker S.A. y Springer T.A. (1991b). Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-A integrin α_L subunit. *Science* 251: 1611-1613.

Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A. y Karin M. (1993). Identification of an oncoprotein and UV-responsive protein-kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7: 2135-2148.

Hoffman-Goetz L. y Pedersen B.K. (1994). Exercise and the immune system: a model of the stress response. *Immunol. Today* 15: 382-387.

Hogg N. (1989). The leukocyte integrins. *Immunol. Today* 10: 111-114.

Holness C. (1995). Analysis of the binding site on ICAM-3 for the leukocyte integrin LFA-1. *J. Biol. Chem.* 220: 877-884.

Holness C. y Simmons D.L. (1994). Structural motifs for recognition and adhesion in members of the Immunoglobulin superfamily. *J. Cell Sci.* 107: 2065-2070.

- Homburg C.H.E. y Ross D. (1996). Apoptosis of neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.* 3: 94-96.
- Hooper S.L., Mackinnon L.T., Howard A., Gordon R.D. y Bachmann A.W. (1995). Markers for monitoring overtraining and recovery. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 106-112.
- Horstmann D.M. (1950). Acute poliomyelitis: relation of physical activity at the time of onset to the course of the disease. *JAMA* 142: 236-241.
- Huupponen M.R.H., Makinen L.H., Hyvonen P.M., Sen C.K., Rankinen T., Vaisanen S. y Rauramaa R. The effect of N-acetyl-cysteine on exercise-induced priming of human neutrophils: a chemiluminescence study. *Int. J. Sports. Med.* 16: 399-403.
- Inoue T., Mu Z., Sumikawa K., Adachi K. y Okochi T. (1993). Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn. J. Cancer Res.* 84(7): 720-5.
- Jaconi ME, Theler JM, Schlegel W et al. (1991) Multiple elevations of cytosolic free Ca²⁺ in human neutrophils: initiation by adherence receptors of the integrin family. *J Cell Biol* 112:1249-1257.
- Jackson M.J., Edwards R.H.T., Symons M.C.R. (1985). Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. (1985). *Biochim. Biophys. Acta.* 847: 185-190.
- Jenkins R.R. (1988). Free radical chemistry: Relationship to exercise: *Sport Med.* 5: 156-170.
- Jenkins R.R., Krause K. y Schofield L.S. (1993). Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25: 213-217.
- Jenkins C.S., Ali Briggs E.F., Zonneveld G.T., Sturk A. y Clemetson K.J. (1980). Human blood platelet membrane glycoprotein: resolution in different polyacrylamide gel electrophoretic systems. *Thrombos. Haemostas.* 42: 1490-1502.
- Ji L.L. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25: 225-231.
- Ji L.L., Fu R.G. y Mitchell E. (1992). Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle: Effect of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 73: 1854_1859.
- Ji L.L. y Fu R.G. (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J. Appl. Physiol.* 72: 549-554.
- Jones T.L.Z., Simonds W.F., Merendino Jr. J.J., Brann M.R. y Spieger A.M. (1990). Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein alpha subunit is essential for its membrane attachment. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA. 87(2): 568-572.

Juan G., Cavazonni M. y Sáez G. (1994). A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with rhodamine 123 and Flow Cytometry. *Cytometry* 15: 334-342.

Kajiura J.S., MacDougall J.D., Ernst P.B. y Younglai E.V. (1995). Immune response to changes in training intensity and volume in runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27(8): 1111-7.

Kang S.M., Beberly B., Tran A.C., Brorson K., Schwartz R.H. y Leonardo M.J., (1992). Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 257: 1134-1138.

Kantar A, Giorgi P.L. y Curatola G. (1991) Alterations in membrane fluidity of diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 46: 422-426.

Kanter M.M., Nolte L.A. y Holloszy J.O. (1993). Effect of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J. Appl. Physiol.* 74: 965: 969.

Kappel M., Tvede N., Galbo H., Haahr P.M., Kjaier M., Linstouw M., Klarlund K. y Pedersen B. (1992). Evidence that the effect of physical exercise on natural killer cell activity is mediated by adrenaline. *J. Appl. Physiol.* 70: 2530-2534.

Kay A.B., Glass E. y Salter D.M. (1979). Leucoattractans enhance complement receptors on human phagocytic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 38: 294-.

Keast D., Cameron K. y Morton A.R. (1988). Exercise and the immune response. *Sports Med.* 5: 248-267.

Keast D., Arstein D., Harper W., Fry R.W. y Morton A.R. (1995). Depression of plasma glutamine concentration after exercise stress and its possible influence on the immune system. *Med. J. Australia* 162:15-18.

Kieran M.W. y Zon L.I. (1996). Stress-and mitogen-activated signal transduction in hematopoietic cells. *Curr. Opin. Haematol.* 3: 27-34.

Kim J.A., Berliner J.A. y Natarajan R.D. (1994). Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes* 43: 1103-1107.

Kishimoto T.K. y Anderson D.C. (1992). The role of integrins in inflammation. En: Gallin J.I., Goldstein I.M., Synderman R. (eds). New York, NY, Raven: 353.

Kokot K., Schaefer R.M., Teschner M., Gilge U., Plass R. y Heidland A. (1988). Activation of

leukocytes during prolonged physical exercise. *Adv. Exp. Biol. Med.* 240: 57-63.

Korchak H.M., Rich A.M. y Wilkenfeld C. (1982). A carbocyanine dye, DiOC₆₍₃₎, acts as a mitochondrial probe for human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8: 1495-1501.

Kuby J. (1994). *Immunology*. 2nd Edition. W.H. Freeman and Co., (eds). New York.

Kumar S., Rabson A.B. y Gelinac C. (1992). The RxxRxRxxC motif conserved in all Rel/kappaB proteins is essential for the DNA-binding activity and redox regulation of the v-Rel oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3094-3106.

Kuriyama T., Machida K. y Suzuki K. (1996). Importance of correlations between phagocytic activity and superoxide production of neutrophils under conditions of voluntary exercise and stress. *J. Clin. Lab. Anal.* 10(6): 458-64.

Kurose I., Wolf R., Grisham M.B., Aw T.Y., Specian R.D. y Granger D.N. (1995). Microvascular responses to inhibition of nitric acid production. Role of active oxidants. *Circ. Res.* 76: 30-39.

Kuypers T.W. y Ross D. (1989). Leukocyte membrane adhesion proteins LFA-1, CR3 and p150,95: a review of functional and regulatory aspects. *Res. Immunol.* 140: 461-467.

Landay A.L. y Muirhead K.A. (1989). Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52: 48-60.

Landman R.M., Muller F.B., Perini C.H., Wesp M., Erne P. y Buhler F.R. (1984). Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to catecholamines. *Clin. Exp. Immunol.* 58: 127-135.

LaPerriere A.R., Antoni M.H. y Schneiderman N. (1990). Exercise intervention attenuates emotional distress and natural killer decrements following notification of positive serologic status for HIV-1. *Biofeedback Self-Regul.* 15: 229-242.

Larson R.S. y Springer T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114: 181-217.

Lee S., Christakos S. y Saml M.B., (1993). Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5(2): 286-291.

Lehmann M., Dickhuth H.H., Gendrisch G., Lazar W., Thum M., Kaminsky R., Aramendi J.F., Peterke E., Wieland W. y Keul J. (1991). Training-overtraining. A prospective, experimental study with experienced middle- and long-distance runners. *Int. J. Sports Med.* 12: 444-452.

Leung Y.M. (1994). Cytosolic calcium pre-elevation amplifies agonist induced calcium release in

human leukemic HL-60 cell. *Biochem. J.* 302: 87-94.

Levy R., Nagauker-Shriker O. y Schlaeffer F. (1996). Inhibited neutrophil functions in patients treated with nifedipine but not with verapamil or diltiazem. *Eur. J. Clin. Invest.* 26: 376-381.

Lewicki R., Tchorzewski H., Denys A., Kowalska M. y Golinska A. (1987). Effect of physical exercise on some parameters of immunity in conditioned sportsmen. *Int. J. Sports. Med.* 8: 309-314.

Lew D.P., Anderson T. y Hed J. (1985). Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature* 315: 509-511.

Lewis D.E. (1993). *Cytochemistry I: Cell surface immunofluorescence*. En: *Clinical Flow Cytometry. Principles and Applications* (K.D. Bauer, ed.). Williams y Wilkins, Baltimore: 143-156.

Li R., Nortamo P., Kantor C., Kovanen P., Timonen T. y Gahmberg C.G. (1993). A leukocyte integrin binding peptide from intercellular adhesion molecule-2 stimulates T cell adhesion and natural killer cell activity. *J. Biol. Chem.* 268: 21474-21477.

Li R., Xie J., Kantor C., Koistinen V., Altieri D.C. y Nortamo P. (1993). A peptide derived from the intercellular adhesion molecule-2 regulates the avidity of the leukocyte integrins CD11b/CD18 and CD11c/CD18. *J. Cell Biol.* 129: 1143-1153.

Lloyd A.R. y Oppenheim J.J. (1992). Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today* 13: 169-172.

Lo Y.Y.C. y Cruz T.F. (1995). Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 11727-11730.

Lo S.K., Van Sevebter G.A., Levin S.M. y Wright S.D. (1989). Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 y CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding two different ligands. *J. Immunol.* 143: 3325-3334.

Lobb R.R. (1992). *Integrin-immunoglobulin superfamily interactions in endothelial-leukocyte adhesion*. En: *Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease* (J.M. Harlan y D.Y.Liu, eds.). W.H. Freeman, New York.

Longhurst C.M. y Jennings L.K. (1998). Integrin-mediated signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 514-526.

Lowe D.A., Warren G.L., Ingalls C.P. Boorstein D.B. y Armstrong R.B. (1995). Muscle function and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury. *J. Appl. Physiol.*

79: 1260-1270.

Lu D.J., Takai A., Leto T.L. y Grinstein S. (1992). Modulation of neutrophil activation by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 262: C39-C49.

Lunec J. y Blake D. (1990). Oxygen free radicals: their relevance to disease processes. En: *The metabolic and molecular basis of acquired diseases (Vol. I)*; (R.D. Cohen, B. Lewis, K.G. Alberti y A.M. Denman, eds.). Baillière Tindall. London: 189-212.

Lynn WA y Golenbock DT (1992) Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 13:271-276.

Machlin L.J. y Bendich A. (1987). Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1: 441-445.

Mackay C.R. y Imhof B.A. (1993). Cell adhesion to the immune system. *Immunol. Today* 14: 99-102.

Mackinnon L.T. (1989). Exercise and natural killer cells: What is the relationship?. *Sports Med.* 7: 141-147.

Mackinnon L.T. (1992). *Exercise and Immunology*. Champaign, Illinois, Human Kinetics Publishing 36-39, 69-75, 89-90.

Mackinnon L.T. (1997). Immunity in athletes. *Int. J. Sports Med.* 18 (Supl. 1): s62-8.

Mackinnon L.T. y Jenkins D.G. (1993). Decreased salivary immunoglobulins after intensive interval exercise before and after training. *Med. Sports. Exerc.* 25: 678-683.

Mackinnon L.T. y Tomasi T.B. (1986). Immunology of exercise. *Ann. Sports Med.* 3: 1-4.

Mackinnon L.T. y Tomasi T.B. (1988). Immunology of exercise. En: *Sports Medicine: Fitness, Training, Injuries*. (O. Appenzeller, ed.) Urban y Schwarzenberg, Baltimore: 273-290.

Mackinnon L.T. y Hooper S.L. (1996). Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during overtraining in elite swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: 285-290.

Mackinnon L.T., Chick T.W., van As A. y Tomasi T.B. (1988). Effects of prolonged exercise on natural killer cell number and function. En: *Exercise physiology: current selected research, Vol 3*. (C.O. Dotson y J.H. Humphrey, eds.). AMS Press, New York: 77-89.

Mandeville JTH y Maxfield F.R. (1996) Calcium and signal transduction in granulocytes. *Curr*

Opin Hematol 3:63-70.

Mangan D.F., Mergenhagen S.F. y Wahl S.M. (1993). Apoptosis in human monocytes: possible role in chronic inflammatory diseases. *J. Periodontol.* 64(Suppl): 461-466.

Manuel Y., Thomas Y. y Pellegrini O. (1992). Metallothionein and tissue damage. *IARC Sci. Publi.* 118: 231-237.

Malomi W., Rainaldi G. y Rivabene R. (1994). Cytoskeletal oxidative changes lead to alterations of specific cell surface receptors. *Eur. J. Histochem.* 38 (supl.1): 91-100.

Marini M., Frabetti F., Musiani D. y Franceschi C. (1996). Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 70 (3): 337-50.

Marks P.W., Hendey B. y Mansfield F.R. (1991). Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. *J. Cell. Biol.* 112: 149-158.

Marlin S.D. y Springer T.A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51: 813-819.

Mascarell E. (1997), Valencia. Estudio del metabolismo oxidativo y de la respuesta funcional de los leucocitos en la Diabetes Mellitus tipo-I.

Mason R.F. y Chignell C.F. (1981). Free radicals in pharmacology and toxicology. *Select topics. Pharmacol. Rev.* 33: 189-212.

McCarthy D.A. y Dale M.M. (1988). The leukocytosis of exercise: a review and model. *Sports Med.* 6: 333-363.

McCarthy D.A. y Macey M.G. (1996). Novel anticoagulants for flow cytometric analysis of live leukocytes in whole blood. *Cytometry* 23: 196-204.

McCord J.M. (1987). Oxygen derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.* 46: 2402-2406.

McDowell S.L., Chaloa K., Housh T.J., Tharp G.D. y Johnson G.O. (1991). The effect of exercise intensity and duration on salivary immunoglobulin. *A. Eur. J. Appl. Physiol* 63: 108-111.

Meydani M. y Evans W.J. (1993). Free radicals, exercise, and aging. En: Yu B.P., de. *Free Radicals in Aging.* Boca Raton, FL: CRC Press: 183-204.

- Meier B., Cross A.R., Hancock J.T., Kaup F.J. y Jones O.T.G. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem. J.* 275: 241-245.
- Meister A. y Anderson M.E. (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Melamed M.R., Lindmo T. y Mendelsohn M.L. (1990). *Flow Cytometry and Sorting*, 2^a ed., Wiley-Liss, Inc. New York.
- Mentzer S.J., Crimmins M.A.V., Burakoff S.J. y Faller D.V. (1987). Alpha and beta subunits of the LFA-1 membrane molecule are involved in human monocyte-endothelial cell adhesion. *J. Cell Physiol.* 130: 410-416.
- Messadi D.V., Pober J.S., Fiers W., Gimbrone M.A.Jr. y Murphy G.F. (1987). Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J. Immunol.* 139: 1557-1562.
- Meyer M., Schreck R. y Baeuerle P.A. (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12(5): 2005-2015.
- Montoya M.C., Luscinskas F.W., del Pozo M.A., Aragonés J y de Landazuri M.O. (1997). Reduced intracellular oxidative metabolism promotes firm adhesion of human polymorphonuclear leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Eur. J. Immunol.* 27(8): 1942-1951.
- Moorthy A.V. y Zimmerman S.V. (1978). Human leukocyte response to an endurance race. *Eur. J. Appl. Physiol.* 38: 271-276.
- Moser B., Clark-Lewis J., Zwahlen R. y Baggiolini M. (1990). Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J. Exp. Med.* 171 (5): 1797-1802.
- Mujika I., Chatard J.C. y Geysant A. (1996). Effects of training and taper on blood leucocyte populations in competitive swimmers: relationships with cortisol and performance. *Int. J. Sports Med.* 17(3): 213-217.
- Müller A. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178: 449-460.
- Mulligan S.P. y Wills E.J. (1990). Exercise induced CD8 lymphocytosis: a phenomenon associated with a large....
- Munck A., Guyre P.M. y Holbrook N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5: 25-44.

- Naqui A., Britton C. y Cadenas E. (1986). Reactive oxygen intermediates in Biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 137-166.
- Nasmith P., Mills G.B. y Grenstein S. (1989). Guanine nucleotides induce tyrosine phosphorylation and activation of the respiratory burst in neutrophils. *Biochem. J.* 257(3): 893-897.
- Nathan C.F. (1987). Secretory products products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
- Nehlsen-Cannarella S.L., Nieman D.C. y Balk-Lamberton A.J. (1991). The effects of moderate exercise on immune response. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 64-70.
- Newburger P.E. y Palmer R.T. (1991). Neutrophil structure and function. En: *Hematology: Basic Principles and Practice.* (R. Hoffman, ed.) Churchill Livingstone Inc, New York: 522-533.
- Newham D.J., Jones D.A. y Clarkson P.M. (1987). Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. *J. Appl. Physiol.* 63: 1381-1386.
- Nicholls E.E. y Spaeth R.A. (1922). The relation between fatigue and the susceptibility of guinea pigs to infections of type I pneumococcus. *Am. J. Hygiene* 2: 527-535.
- Nicola N.A. (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 45-77.
- Nieman D.C. (1995). Upper respiratory tract infections and exercise [editorial] *Thorax.* 50(12): 1229-31.
- Nieman D.C. (1997a). Immune response to heavy exertion. *J. Appl. Physiol.* 82(5): 1385-1394.
- Nieman D.C. (1997b). Exercise immunology: practical applications. *Int. J. Sports Med.* 18 (Supl.1): s91-s100.
- Nieman D.C. y Nehlsen-Cannarella S.L. (1992). Exercise and infection. En: *Exercise and Disease* (Watson R.R., Eisinger M., eds.). Boca Raton, CRC Press; Florida,; 122-148.
- Nieman D.C. y Nehlsen-Cannarella S.L. (1994). The immune response to exercise. *Semin. Hematol.* 31: 166-179.
- Nieman D.C., Johanssen L.M. y Lee J.W. (1989a). Infectious episodes in runners before and after a roadrace. *J. Sports Med. Physical Fitness* 29: 289-296.
- Nieman D.C., Tan S.A., Lee J.W. y Berk L.S. (1989b). Complement and immunoglobulin levels in

athletes and sedentary controls. *Int. J. Sports Med.* 10: 124-128.

Nieman D.C., Johanssen L.M., Lee J.W. y Arabatzis K. (1990a). Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J. Sports Med. Physical Fitness* 30: 316-328.

Nieman D.C., Nehlsen-Cannarella S.L., Markoff P.A., Balk-Lamberton A.J., Yang H., Chritton D.B.W., Lee J.W. y Arabatzis A. (1990b). The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int. J. Sports Med.* 11: 467-473.

Nieman D.C., Henson D.A., Gusewitch G., Warren B.J., Dotson R.C., Butterworth D.E. y Nehlsen-Cannarella S.L. (1993a). Physical activity and immune function in elderly women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25(7): 823-31.

Nieman D.C., Miller A.R., Henson D.A., Warren B.J., Gusewitch G., Johnson R.L., Davies J.M., Butterworth D.E. y Nehlsen-Cannarella S.L. (1993b). The effects of high versus moderate-intensity exercise on natural killer cell cytotoxic activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 1126-1135.

Nieman D.C., Buckley K.S., Henson D.A., Warren B.J., Suttles J., Ahle J.C., Simandle S., Fagoaga O.R. y Nehlsen-Cannarella S.L. (1995). Immune function in marathon runners versus sedentary controls. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 986-992.

Norgauer J., Eberle M., Fay S.P., Lemk H.D., y Sklar L.A. (1991). Kinetics of N-formyl peptide receptor up-regulation during stimulation in human neutrophils. *J. Immunol.* 146: 975-983.

Northoff H., Weinstock C. y Berg A. (1994). The cytokine response to strenuous exercise. *Int. J. Sports. Med.* 15: S167-S171.

O'Connor J.E., Kimler B.F., Morgan M.C. y Tempos K.J. (1988). A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange. *Cytometry* 9: 529-532.

O'Gorman M.R.G. y Corrochano V. (1995). Rapid whole blood flow cytometry assay for the diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2: 227-232.

O'Gorman M.R.G., Corrochano V. y Myones B. (1993). Flow cytometry-based neutrophil functions assays: diagnosis of leukocyte-adhesion deficiency type 1 (LAD-1) and chronic granulomatous disease (CGD) in whole blood. *Clin. Immunol. Newsletter* 13: 77-82.

Oh-Ishi S. (1997). Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress.....

Ohno Y.I., Hirai K.I., Kanoh T., Uchino H. y Ogawa K. (1982). Subcellular localization of H₂O₂ production in human neutrophils stimulated with particles and effect of cytochalasin-B on the cells. *Blood* 60: 253-260.

- Okumura M., Fujii Y., Takeuchi Y., Inada K., Nakahara K. y Matsuda H. (1993). Aged-related accumulation of LFA-1 high cells in a CD8+CD45RA high T-cell population. *Eur. J. Immunol.* 23: 1057-1063.
- Oppenheimer E.H. y Spaeth R.A. (1922). The relation between fatigue and the susceptibility of rats towards a toxin and an infection. *Am. J. Hygiene* 2: 51-66.
- Ortega E., Barriga C. y De la Fuente M. (1993). Study of the phagocytic process in neutrophils from elite sportswomen. *Eur. J. Appl. Physiol.* 66(1): 37-42.
- Ortega J.J. (1994). Introducción al estudio del funcionalismo leucocitario. Granulocitopatías funcionales. Anomalías constitucionales de los leucocitos. En: *Hematología Clínica* 3ª ed. (J. Sanz, ed.) Doyma-Mosby. Barcelona: 291-532.
- Packer L. (1985). Oxygen radicals and antioxidants in endurance exercise. En: *Biochemical Aspects of Physical exercise*. (G. Benzi, L. Packer y N. Siliprandi, eds.). Elsevier Sci., Amsterdam: 73-92.
- Papa S., Vitale M., Mazzotti G., Neri L.M., Monti G. y Manzoli F.A. (1989). Impaired lymphocyte stimulation induced by long-term training. *Immunol. Letters* 22: 29-33.
- Parker J.W., Adelsberg B. y Azen S.P. (1990). Leukocyte immunophenotyping by flow cytometry in a multisite study: standardization, quality control and normal values in the transfusion safety study. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 55: 187-220.
- Parry-Billings M., Budgett R., Koutedakis Y., Blomstrand E., Brooks S., Williams C., Calder P.C., Pilling S., Baigrie R. y Newsholme E.A. (1992). Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 1353-1358.
- Patel K.D., Zimmerman G.A., Prescott S.M., McEver R.P. y McIntyre T.M. (1991). Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J. Cell. Biol.* 112: 749-754.
- Paulson J.C. (1992). Selectin/carbohydrate-mediated adhesion of leukocytes, Adhesion: Its role in inflammatory disease. (J.M. Harlan y D.Y. Liu, eds) W.H. Freeman, New York.
- Pedersen B.K., Tverde N., Christensen L.D., Klarlund K., Kragbak S. y Halkjaer-Kristensen J. (1989). Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int. J. Sports Med.* 10: 129-131.
- Pedersen B.K. y Ullum H. (1994). NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 140-146.

Perna F.M., Schneiderman N. y LaPerriere A. (1997). Psychological stress, exercise and immunity. *Int. J. Sports Med.* 18 (Suppl 1): s78-s83.

Peters C., Lotzerich H., Niemeier B., Schule K. y Uhlenbruck G. (1994). Influence of moderate exercise training on natural killer cytotoxicity and personality traits in cancer patients. *Anticancer Research* 14: 1033-1036.

Peters E.M. y Bateman E.D. (1983). Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. *S. Afr. Med. J.* 64: 582-584.

Peters E.M., Goetzsche J.M., Grobbelaar B. y Noakes T.D. (1993). Vitamin C supplementation reduces the incidence of posttrace symptoms of upper respiratory tract infections in ultramarathon runners. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 170-174.

Peters-Futre E.M. (1997). Vitamin C, neutrophil function, and upper respiratory tract infection risk in distance runners: the missing link. *Exerc. Immunol. Rev.* 3: 32-52.

Pigott R. y Power C. (1993). *The Adhesion Molecules Facts Book*, Academic Press, London: 89-92, 135-139.

Pochet R. y Delespesse G. (1979). Distribution of beta-adrenergic receptors on human lymphocyte subpopulations. *Clin. Exp. Immunol.* 38: 578-584.

Poortmans J.R. (1984). Protein turnover and amino acid oxidation during and after exercise. En: *Medicine and Sports Science Vol. 17: Physiological Chemistry of training and detraining.* (P. Marconnet, J. Poortmans, et al., eds.) S. Karger, Basel, Switzerland: 130-147.

Pryor W.A. y Squadrito G.L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268: L699-L722.

Pyne D.B. (1994a). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med.* 17: 245-258.

Pyne D.B. (1994b). Exercise, training and the immune system. *Sports Med. Tr. Rehab.* 5: 47-64.

Pyne B.P., Baker P., Fricker P.A., McDonald W.A., Telford R.D. y Weidemann M.J. (1995). Effects of an intensive 12 week training program by elite swimmers on neutrophil oxidative activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27 (4): 536-542.

Raadbruch A. (1992). *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer-Verlag, Berlin.

Ramón J.R. (1988). Papel de los Radicales Libres en Medicina. En: *Anuario'87, Tiempos Médicos*. Madrid: 214-217.

- Ramón J.R. (1993). *Protocolos: Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. IDEPSA, eds. Madrid.
- Reddy S., Bose R. y Rao G.H. (1995). Phospholipase A₂ activation in human neutrophils requires influx of extracellular Ca²⁺ and leukotriene B₄. *Am. J. Physiol.* 268: c138-c146.
- Reichlin S. (1993). Neuroendocrine immune interactions. *New Eng. J. Med.* 329: 1246-1253.
- Reid M.B., Haack K.E., Franchek K.M., Valberg P.A., Kobzik L y West M.S. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* 73: 1797-1804.
- Repine J.E., White J.G., Clawson C.C. y Holmes B.M. (1974). The influence of phorbol-myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 83: 911-920.
- Retnes J.S., Aas V. e Iversen J.G. (1994). Interferon gamma modulates cytosolic free calcium in human neutrophilic granulocytes. *Eur. J. Hematol.* 53: 65-73.
- Ricevutti G, Mazzone A. y Notario A. (1989). Definition of CD11a, b, c and CD18 glycoproteins on chemotactically deficient granulocyte membranes in patients affected by myeloid disorders. *Acta Haematol.* 81:126-130.
- Robinson J.P. (1993). *Handbook of Flow Cytometry Methods*. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Robinson J.P. y Carter N.O. (1993). Flow cytometric analysis of granulocytes. En: *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*. (K.D. Bauer et al., eds.), William y Wilkins, Baltimore: 405-433.
- Romero D. y Roche E. (1996). *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. Ene ediciones, eds., Zaragoza.
- Rosales C y Juliano RL (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol* 57:189-198.
- Rosen S.D. y Bertozzi C.R. (1994). The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 663-673.
- Rossi F. (1986). The O₂⁻-forming NADPH oxidase of human neutrophils. Potentiation of chemotactic peptide by a diacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta.* 853 (1): 65-89.
- Rothe G. y Valet G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes

with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukocyte Biol.* 47: 440-448.

Rothe G. y Valet G. (1993). Simultaneous measurement of NADPH oxidase activity and phagosomal oxidation with hydroethidine and 2'-7'-dichlorofluorescein-diacetate. En: *Handbook of Flow Cytometric Methods*, (J.P. Robinson et al., eds.), Wiley-Liss Inc. New York: 157-158.

Ruiz P. (1995). CD44 isoforms during differentiation and development. *BioEssays* 17: 17-24

Ruoslahti E. (1990). Integrins. *J. Clin. Invest.* 87: 1-5.

Sahlin K., Ekberg K. y Cizinsky S. (1991). Changes in plasma hypoxanthin and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol. Scand.* 142: 273-281.

Sanchez-Madrid F., Nagy J.A., Robbins E., Simon P. y Springer T.A. (1983). A human leukocyte differentiation antigen family with distinct α -subunits and a common β -subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM/Mac-1) and the p150,95 molecule. *J. Exp. Med.*: 1785-1803.

Sansonetti P.J. (1994). Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. *Cell* 76: 829-839.

Sawka M.N., Young A.J., Dennis R.C., Gonzalez T.R., Pandolf K.B. y Valeri C.R. (1989). Human intravascular immunoglobulin responses to exercise-heat and hypohydration. *Aviat. Space. Environ. Med.* 60: 634-638.

Schenker E.L., Hultin L.E., Bauer K.D., Ferbas J., Margolick J.B. y Giorgi J.V. (1993). Evaluation of a dual-color flow cytometry immunophenotyping panel in a multicenter quality assurance program. *Cytometry* 14: 307-317.

Schiffmann E., Corcoran B.A. y Wahl S.M. (1975). N-formylmethionyl peptides chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 1059-1062.

Schmid-Schönbein G.W. (1993). The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculación. *Angiology* 23: 45-56.

Schmidt A.M., Yan S.D. y Brett J. (1993) Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J. Clin. Invest.* 92: 2115-2168.

Seth R., Salcedo R., Patarroyo M. y Makgobe M.W. (1991). ICAM-2 peptides mediate lymphocyte adhesion by binding to CD11a/CD18 and CD49d/CD29 integrins. *FEBS* 282: 193-196.

- Shapiro H.M. (1995). *Practical Flow Cytometry*, 3^a ed., Wiley-Liss Inc., New York.
- Sharar S.R., Winer R.K. y Harlan J.M. (1995). The adhesion cascade and anti-adhesion therapy: an overview. *Springer Semin. Immunopathol.* 16: 359-378.
- Shi M.M., Kugelman A., Iwamoto T., Tian L. y Forman H.J. (1994). Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 26512-26517.
- Shimizu Y. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today* 13: 106-112.
- Shimizu Y., Newman W. y Gopal T.V. (1991). Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: Roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J. Cell Biol.* 113: 1203-1211.
- Shinkai S., Kurokawa Y., Hino S., Hirose M., Torii J., Watanabe S., Shiraisi S., Oka K. y Watanabe T. (1993). Triathlon competition induced a transient immunosuppressive change in the peripheral blood of athletes. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 33(1): 70-8.
- Shinkai S., Konishi M. y Shephard R.J. (1997). Aging, exercise, training, and the immune system. *Exerc. Immunol. Rev.* 3: 68-95.
- Sies H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chem. Int. De. Engl.* 25: 1058-1071.
- Sjodin B., Westing H. y Apple S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical markers during exercise. *Sports Med.* 10: 236-254.
- Sklar L.A., Hyslop P.A., Oades Z.G., Omann G.M., Jesaitis A.J., Painter R.G. y Cochrane C.G. (1985). Signal transduction and ligand-receptor dynamics in the human neutrophil. Transient responses and occupancy-response relations at the formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 260: 11461-11468.
- Simon H.B. (1984). The immunology of exercise. *JAMA* 252: 2735-2738.
- Smith C.D., Cox C.C. y Snyderman R. (1986). Receptor-coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein. *Science* 232 (4746): 97-100.
- Smith C.W., Martin S.D. y Rothlein R. (1989a). Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intracellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* 83: 1008-1014.
- Smith J.A. (1994). Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc.*

Biol. 56: 672-689.

Smith J.A. (1995). Guidelines, standards and perspectives in exercise immunology. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27(4): 497-506.

Smith J.A. (1997). Exercise Immunology and Neutrophils. *Int. J. Sports Med.* 18 (supl. 1): s46-s55.

Smith J.A. y Weidemann M.J. (1990). The exercise and immunity paradox: a neuroendocrine/cytokine hypothesis. *Med. Sci. Res.* 18: 749-754.

Smith J.A. y Weidemann M.J. (1993). Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 162: 261-268.

Smith J.A., Telford R.D., Mason I.B. y Weidemann M.J. (1990). Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int. J. Sports Med.* 11: 179-187.

Smith J.A., Telford R.D., Baker M.S., Hapel A.J., Weidemann M.J. (1992). Cytokine immunoreactivity in plasma does not change after moderate endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* 73: 1396-1401.

Smith J.A., Bon Gray A. y Pyne D.B. (1996). Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. *Am. J. Physiol.*: 270-274.

Smith L.L., McCammon M., Smith S., Chamness M., Israel R.G. y O'Brien K.F. (1989b). White blood cell response to uphill walking and downhill jogging at similar metabolic loads. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58: 833-837.

Sparling P.B., Nieman D.C. y O'Connor P.J. (1993). Selected scientific aspects of marathon racing. An update on fluid replacement, immune function, psychological factors and the gender difference. *Sports Med.* 15(2): 116-32.

Spitz D.R., Kinter M.T. y Roberts R.J. (1995). The contribution of increased glutathione content to mechanisms oxidative stress resistance in hydrogen peroxide-resistant hamster fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 165: 600-609.

Sprenger H., Jacobs C., Main M., Gressner A.M. Prinz H., Wesemann W. y Gemsa D. (1992). Enhanced released of cytokines, interleukin 2 receptors, and neopterin after long distance running. *Clin. Immunol. Immunopath.* 63: 188-194.

Springer T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.

Springer T.A. (1997). Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α -subunits into

a β -propeller domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 65-72.

Springer T.A. y Anderson D.C. (1986). Antibodies specific for the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoproteins or their family or for other granulocyte proteins. En: 2nd Int. Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Leucocyte Typing II, Vol. 3: Human Myeloid and Hematopoietic Cells. (E.L. Reinherz, B.F. Haynes, L.M. Nadler, I.D. Bernstein, eds.). Springer-Verlag. New York.

Standart N. y Jackson R.J. (1994). Regulation of translation by specific protein/mRNA interactions. *Biochimie* 76: 867-879.

Steerenberg P.A., Van Asperen I.A. y Van Nieuw Amerongen A. (1997). Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *Eur. J. Oral Sci.* 105(4): 305-309.

Steinbeck M.J. y Roth J.A. (1989). Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev. Inf. Dis.* 11: 549-568.

Sternweis P.C. (1986). The purified alpha subunits of Go and Gi from bovine brain require beta gamma for association with phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 261 (2): 631-637.

Stewart M.P., Cabañas C. y Hogg N. (1996). T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J. Immunol.* 156: 1810-1817.

Stockinger H., Majdic O. y Knapp W. (1996). 1995 directory for the human leukocyte clusters of differentiation. *Transfusion* 36: 268-285.

Tang D.G. y Honn K.V. (1995). Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* 14: 109-122.

Tedder T. F. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9: 866-873.

Teunenberg S.D., Zemlan F.P. y Solemkin J.S. (1988). Characterization of N-formyl-methionyl-leucil-phenylalanina in receptors in human neutrophils: effects of isolation and temperature on receptor expression and functional activity. *J. Immunol.* 141: 3937-44.

Tevede A.A., Keizer G.D. y Figdor C.G. (1987). Differential function of LFA-1 family molecules (CD11 and CD18) in adhesion of human monocytes to melanoma and endothelial cells. *Immunol.* 61: 261-269

Thelen M., Wolf M. y Baggiolini M. (1988). Activation of monocytes by interferon-gamma has no effect on the level or affinity of the nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate oxidase and on agonist-dependent superoxide formation. *J. Clin. Invest.* 81(6): 1889-1895.

Thelen M., Dewald B. y Baggiolini M. (1993). Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.* 73: 797-821.

Tomasi T.B., Trudeau F.B., Czerwinski D. y Erredge S. (1982). Immune parameters in athletes before and after strenuous exercise. *J. Clin. Immunol.* 2: 173-178.

Tvede N., Kappel M., Halkjaer-Kristensen J. y Galbo H. (1993). The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin-2 production. *Int. J. Sports Med.* 14(5): 275-82.

Urhausen A. y Kindermann W. (1992). Biochemical monitoring of training. *Clin. J. Sports. Med.* 2: 52-61.

Valmu L. y Gahmberg C. (1995). Treatment with okadaic acid reveals strong threonine phosphorylation of CD18 after activation of CD11/CD18 leukocyte integrins with phorbol esters or CD3 antibodies. *J. Immunol.* 155: 1175-1183.

Van der Vieren M. (1995). A novel leukointegrin $\alpha_d\beta_2$ binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 3: 683-690.

Van der Vliet A. y Bast A. (1992). Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *Chem. Biol. Interact.* 85: 95-116.

van Kooyck Y, Weder P, Heije K, et al. (1993) Role of intracellular Ca^{2+} levels in the regulation of CD11a/CD18 mediated cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 1:21-32.

Varios autores: Symposium (2nd) of the International Society of Exercise and Immunology. Exercise and Immunology: Practical Applications Brussels, November 17-18, 1995. Proceedings and abstracts. *Int. J. Sports Med.* (1997).18 (Supl. 1): s1-s118.

Varki A. (1994). Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7390-7397.

Venjatraman J.T. y Fernandes G. (1997). Exercise, immunity and aging. *Aging-Milano.* 9(1-2): 42-56.

Venjatraman J.T., Rowland J.A. y Denardin E. (1997). Influence of the level of dietary lipid intake and maximal exercise on the immune status in runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(3): 333-344.

Verde T.J., Thomas S.G., Moore R.W. y Shephard R.J. (1992) Immune responses and increased training of the elite athlete. *J. Appl. Physiol.* 73: 1494-1499.

Vikingsson A., Pederson K. y Muller D. (1994). Enumeration of IFN-gamma producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN -gamma. *J.*

Immunol. Methods 173: 219-228.

Viru A. (1994). Molecular cellular mechanisms of training effects. *J. Sports Med. Physiol. Fitness* 34: 309-314.

Volpe P., Krause K.H., Hashimoto S., Zorzato F., Pozzan T., Meldolesi J. y Lew D.P. (1988). "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca⁺⁺ store of non-muscle cells?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 (4): 1091-1095.

von Adrian V.H. (1993). In vivo behaviour of neutrophils from two patients with distinct inherited LAD syndromes. *J. Clin. Invest.* 91: 2893-2897.

Waggoner A.S. (1990). Fluorescent probes for cytometry. En: *Flow Cytometry and Sorting* (Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M., et al., eds.) Wiley-Liss, New York: 209-225.

Walcheck B. (1996). Neutrophil rolling altered by inhibition of L-Selectin shedding in vitro. *Nature* 380: 720-723.

Walz A., Dewald B., von Tschärner V. y Baggiolini M. (1989). Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *J. Exp. Med.* 170: 1745-1750.

Watson J.V. (1991). *Introduction to Flow Cytometry*. Cambridge University Press, Cambridge.

Weinstein L. (1973). Poliomyelitis: A persistent problem. *N. Engl. J. Med.* 288: 370-372.

Weiss S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376

Weisz P.B. (1982). *La ciencia de la Biología*. Omega S.A. Barcelona: 153-155.

Westermann J. y Pabst R. (1990). Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system. *Immunol. Today* 11: 406-410.

Westphal J.R. y De Waal R.M.W. (1992). The role of adhesion molecules in endothelial cell accessory function. *Mol. Biol. Reports* 17: 47-59.

Wiese A.G., Pacifici R.E. y Davies K.J.A. (1995). Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 231-240.

Wilson R.L. (1979). Hydroxyl radicals and biological damage in vitro; What relevance in vivo?. En: *Oxygen free radicals and tissue damage*. Ciba Foundation Symposium 65, new series.

Excerpta. Medica, Amsterdam: 19-35.

Wilson E., Olcott M.C., Bell R.M., Merrill A.H. y Lambeth J.D. (1986). Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. Role of protein kinase C in activation of the burst. *J. Biol. Chem.* 261 (27): 12616-12623.

Winn R.K. y Harlan J.M. (1993). CD18-independent neutrophil and mononuclear emigration into the peritoneum of rabbits. *J. Clin. Invest.* 92: 1168-1174.

Whitehurst C.E., Boulton T.G., Cobb M.H. y Geppert T.D., (1992). Extracellular signal-regulated kinases in T cells: anti-CD3 and 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate-induced phosphorylation and activation. *J. Immunol.* 148: 3230-3237.

Whyte M.K., Meagher L.C., MacDermot J. y Haslett C., (1993). Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* 150: 5124-5134.

Wolin M.S., Burke-Wolin T.M., Kaminski P.M. y Mohazzab-H K.M. (1996). Reactive oxygen species and vascular oxygen sensors. En: Nitric oxide and radicals in the pulmonary vasculature (E.K. Weir et al., Eds.) Future Publishing Armonk, New York, 245-263.

Wright S.D. y Jong M.T.C. (1986). Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *E. coli* by binding to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 164: 1876-1882.

Wymann M.P., von Tscherner V., Deranleau D.A. y Baggiolini M. (1987a). Chemoluminescence detection of H₂O₂ produced by human neutrophils during the respiratory burst. *Anal. Biochem.* 165 (2): 371-378.

Wymann M.P., von Tscherner V., Deranleau D.A. y Baggiolini M. (1987b). The onset of the respiratory burst in human neutrophils. Real-time studies of H₂O₂ formation reveal a rapid agonist-induced transduction process. *J. Biol. Chem* 262 (25): 12048-12053.

Wysocki H. (1998). Plasma chemotactic activity during dipyridamole induced myocardial ischemia.

Yasui K, Yamakazi M, Miyabayashi M, et al. (1994) Signal transduction pathways in human polymorphonuclear leukocytes for chemotaxis induced by a chemotactic factor; distinct pathway for superoxide anion production. *J Immunol* 152: 5922-5929.

Zahler S. (1997). Effects of ACE-inhibition on Redox and Expression of P-selectin of Endothelial Cell Subjected to Oxidative Stress.

Zerba E., Komorowski P.E. y Faulkner J.A. (1990). Free radical injury to skeletal muscle of young, adult and old mice. *Am. J. Physiol.* 258: c429-c435.

Zhou M., y Brown E.J. (1993). Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J. Exp. Med.* 178: 1165-1174.

Zigmond S.H., Sullivan S.J. y Lauffenburger D.A. (1982). Kinetic analysis of chemotactic peptide receptor modulation. *J. Cell Biol.* 92: 34-41.

Zimmerman G.A. (1992). Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signalling molecules. *Immunol. Today* 13: 93-99.