

Fisiología de los polimorfonucleares neutrófilos

PABLO PATIÑO, DIANA GARCIA

Las células fagocíticas, en particular los neutrófilos son una pieza fundamental en la respuesta del huésped contra la agresión por diversos agentes, infecciosos o no y están involucradas en la generación de daño tisular durante la inflamación. Las respuestas celulares de los PMN dependen de una serie de hechos íntimamente relacionados, como la adherencia al endotelio vascular, la diapedesis a través de las células endoteliales, la migración hacia los sitios de inflamación y la fagocitosis y ulterior destrucción de las partículas opsonizadas. Todo esto se logra mediante la integración perfecta entre los sistemas de activación celular y los mecanismos microbicidas, dependientes o no del oxígeno.

Se ha esclarecido una gran parte de los mecanismos bioquímicos, moleculares y genéticos que llevan a la respuesta fisiológica de los neutrófilos lo cual ha permitido identificar y entender la patogénesis de diferentes trastornos que los afectan.

PALABRAS CLAVE
POLIMORFONUCLEAR NEUTROFILO
FAGOCITOSIS

INTRODUCCION

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son un pilar fundamental en la respuesta efectiva contra las infecciones producidas por microorganismos extracelulares, como la mayoría de las bacterias y ciertos hongos. Su importancia en las reacciones inflamatorias, infecciosas o no, hace promisoría la investigación en la inmunobiología e inmunopatología de las células fagocíticas.

ONTOGENIA Y ESTRUCTURA SUBCELULAR

Los PMN se derivan de un progenitor mieloide en la médula ósea, a una tasa de 1.8×10^{10} células/kg/día en un hombre adulto (1,2). Después de entrar al torrente circulatorio, estas células se dividen en 2 grupos: uno circulante y otro marginal que se encuentra adherido al endotelio; estos compartimientos permanecen en un equilibrio dinámico que es importante en la respuesta ante cualquier lesión. Después de 6 a 7 horas en la circulación, los PMN pasan a los tejidos, donde tienen una vida media

DR. PABLO PATIÑO, Médico, Magíster en Inmunología. DRA. DIANA GARCIA DE O. Profesora Titular, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

aproximada de 2 a 3 días (2,3). Estos fagocitos, con un diámetro de 10 a 12 μm se caracterizan por un núcleo multilobulado, profusión de gránulos citoplasmáticos y acúmulos de glucógeno; tienen escaso retículo endoplásmico, pocos ribosomas y algunas mitocondrias (4).

Los gránulos citoplasmáticos de los PMN son de 3 tipos: primarios o azurófilos, secundarios o específicos y terciarios.

Los gránulos primarios aparecen durante la etapa de promielocito y comprenden un tercio de todos los gránulos de las células maduras. Contienen: mieloperoxidasa, proteínas catiónicas (defensinas, catepsina G), proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad, proteasas neutras (elastasa, colagenasa), hidrolasas ácidas y lisozima (1,4).

Los gránulos secundarios o específicos se sintetizan durante el estado de mielocito. Contienen la mayor parte de la lisozima celular, lactoferrina, proteína fijadora de la vitamina B12, un alto porcentaje de los componentes del complejo enzimático que produce los diferentes metabolitos reactivos del oxígeno (sistema NADPH-oxidasa), fosfolipasa A2, factor quimiotáctico para monocitos y activadores del complemento y del plasminógeno. Además, en su membrana hay receptores para el C3bi (C3b inactivado), FMLP (Formil Metionil Leucil Fenilalanina), laminina (proteína de la matriz extracelular relacionada con la adherencia, la migración y la opsonización) y muy posiblemente otras moléculas involucradas en la adherencia y la quimiotaxis. La liberación de los gránulos específicos es crucial para la generación de mediadores de la inflamación, por lo que durante la activación celular, son movilizados rápidamente, se unen a la membrana citoplasmática y excretan su contenido (1,4,5).

Los gránulos terciarios son morfológicamente similares a los específicos de los que se diferencian por su densidad levemente menor; contienen hidrolasas ácidas, gelatinasa y glicoproteínas de adherencia (6). Se movilizan hacia la superficie celular en respuesta a estímulos leves (7).

ADHERENCIA Y QUIMIOTAXIS

Los hechos iniciales en el proceso de respuesta a la lesión son el incremento en la adherencia de los PMN al endotelio vascular (marginación) y su diapedesis a través de la pared de los vasos sanguíneos

pequeños de los tejidos afectados. La adherencia es un prerrequisito para la migración ulterior al compartimiento extravascular y su reversibilidad es crítica para la evolución normal de la respuesta inflamatoria. Se ha evidenciado que los factores quimiotácticos aumentan la adherencia provocando un traslado de los receptores para C3bi, laminina y fibronectina desde los gránulos específicos y terciarios a la superficie celular (5,8-10). En este fenómeno también interviene el endotelio pues bajo la influencia de la interleuquina 1 (IL-1), del factor necrosante de tumores y del interferón- γ , las células endoteliales se vuelven adhesivas específicamente para leucocitos y empiezan a producir una serie de moléculas que amplifican el fenómeno inflamatorio (8,11).

Las sustancias quimiotácticas más importantes desde el punto de vista biológico son C5a (fragmento del C5), C5a desarginizado, factor activador de plaquetas, formil péptidos bacterianos, diversos metabolitos del ácido araquidónico, leucotrieno B4 (LTB4), factor quimiotáctico para neutrófilos liberado de mastocitos y productos de la coagulación y la fibrinólisis (1,8,12,13); los PMN perciben concentraciones extremadamente bajas de estas sustancias.

La quimiotaxis o movimiento dirigido de los neutrófilos en respuesta a factores quimiotácticos, requiere la unión reversible de la célula a una superficie, lo que le permite arrastrarse hacia el foco inflamatorio. La respuesta morfológica inicial de los PMN expuestos a estos factores es una elongación polarizada de la célula; en su parte anterior se desarrolla un amplio pseudópodo (*lamellipodium*) y en la posterior un urópodo delgado con arborización terminal. El núcleo tiende a permanecer en la parte posterior del cuerpo celular y los centríolos se colocan delante de él (1,12,19).

La migración y orientación de las células fagocíticas se deben a una integración perfecta entre microfilamentos y microtúbulos. Los primeros son críticos para la locomoción dirigida y los cambios en la forma celular; se requiere la polimerización de los segundos para iniciar y estabilizar la orientación celular hacia el sitio de mayor concentración de sustancias quimiotácticas. Las señales transmembrana originadas por la interacción del factor quimiotáctico y su receptor, inducen la polimerización inmediata de la actina y la formación de microfilamentos en contacto estrecho con la membrana plasmática.

Además de permitir la migración dirigida, incrementar la adhesividad, inducir la degranulación lisosómica e iniciar la producción de radicales de oxígeno, los factores quimiotácticos inducen otras respuestas en los PMN, necesarias para que el proceso fagocítico sea adecuado; éstas incluyen hiperpolarización de la membrana citoplasmática, activación de la bomba Na-K, activación del flujo de calcio, oxidación del ácido araquidónico por medio de la fosfolipasa A2, transmetilación de la membrana celular y aumento del ingreso de glucosa al interior de la célula (1).

MECANISMOS DE ACTIVACION CELULAR

La interacción de un factor quimiotáctico con su receptor en la membrana celular o la ingestión de partículas desencadena el proceso de activación de los fagocitos. Las proteínas unidoras de nucleótidos de guanina o proteínas G, actúan como intermediarias entre los diferentes receptores y ciertas fosfolipasas. Estas se localizan en el lado citoplasmático de la membrana celular y su activación ocurre en respuesta a la interacción entre ligando y receptor, lo cual conduce a estimular la fosfolipasa C que, una vez activa, hidroliza el fosfatidilinositol difosfato (PIP2) para generar dos segundos mensajeros: el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG) (14-18). El IP3 es trasladado al citoplasma, donde desencadena un aumento de los niveles de Ca^{2+} , por liberación de éste, especialmente del retículo endoplásmico. Además, se ha demostrado que el IP3, puede promover la entrada de calcio a la célula (27). El aumento del Ca^{2+} citoplasmático desencadena varios procesos, entre ellos la activación de la fosfolipasa A2 y la fosforilación de proteínas dependientes de calmodulina (proteína que, por acción del calcio, actúa como segundo mensajero).

De otro lado, el DAG se une y activa a una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} , la PKC, que fosforila proteínas en los residuos treonina o serina. Cuando la célula se encuentra en reposo, esta enzima se localiza en el citoplasma, pero el proceso de activación permite su contacto estrecho con la superficie citoplasmática de la membrana celular, donde queda cerca a su cofactor, la fosfatidilserina. La PKC cataliza la fosforilación de una serie de proteínas, entre las cuales se encuentra uno de los componentes del

complejo enzimático responsable de la generación de radicales de oxígeno o NADPH-oxidasa (5).

FAGOCITOSIS Y EXOCITOSIS

Para ser ingeridas por los PMN la mayoría de las partículas deben estar cubiertas por opsoninas; éstas disminuyen la capacidad antifagocítica de bacterias, hongos y otros elementos extraños. Existen dos sistemas de opsonización, uno termoestable y otro termolábil. El primero corresponde a la inmunoglobulina G, en especial a las subclases IgG1 e IgG3. A través de los receptores Fc las células fagocíticas reconocen las porciones Fc de las moléculas de inmunoglobulina que están sobre los microorganismos que van a ser ingeridos. La IgM también participa en el proceso de opsonización aunque en forma indirecta, pues antes debe unirse a la superficie del microorganismo y activar el complemento.

La actividad opsónica termolábil la realizan fragmentos del tercer componente del complemento, especialmente el C3b y el C3bi, que se fijan a la superficie de células, microorganismos y otras partículas, lo que permite que sean reconocidas por las células fagocíticas, al interactuar con los respectivos receptores específicos: el CR1 para el C3b y el CR3 para el C3bi; este último hace parte de la familia de las integrinas leucocitarias que son fundamentales no sólo en la opsonización sino también en los procesos de adherencia, quimiotaxis e interacción celular (5,7,8,10). La presencia de C3b unido a una molécula es capaz de reducir hasta 100 veces la cantidad de IgG necesaria para promover la fagocitosis (2,16).

Cuando los microorganismos opsonizados o los complejos inmunes se ponen en contacto con la membrana plasmática de los neutrófilos, ésta se invagina formando una vacuola; inmediatamente los gránulos específicos y luego los azurófilos se unen a ésta y descargan en ella su contenido. Tal degranulación también se hace hacia el medio extracelular.

ACTIVACION DE LOS MECANISMOS BACTERICIDAS

Segundos después de ingerir una partícula o ser activados por algún estímulo soluble los PMN sufren una serie de cambios en el metabolismo oxidativo que, en conjunto, se llaman "explosión respiratoria"

(4,8,20-24). Esta se caracteriza por: a) Incremento en el consumo de O₂ a través de un mecanismo independiente del metabolismo mitocondrial. b) Aumento en el metabolismo de la glucosa a través de la vía de la hexosa monofosfato; cada molécula de glucosa así metabolizada reduce dos moléculas de NADP a NADPH y suministra de ese modo el agente reductor necesario para la operación continua de la explosión respiratoria. c) Se inicia la producción de O₂⁻ y H₂O₂ y su liberación hacia los alrededores de la célula (21,25).

Los cambios en el metabolismo del oxígeno resultan de la activación del complejo enzimático conocido como oxidasa de la explosión respiratoria o NADPH-oxidasa, que funciona como una cadena transportadora de electrones, que se interpone entre el sustrato, NADPH en el citoplasma, y la luz de la vacuola fagocítica. Este complejo está constituido por un tipo poco frecuente de citocromo b, por una flavoproteína y por una fosfoproteína; puede tener, además, otros componentes (23).

El citocromo b de la NADPH-oxidasa tiene a 245 mV el potencial de punto medio (entre sus capacidades de oxidación y reducción) más bajo (Em 7.0) de los citocromos b de células de mamíferos conocidos hasta ahora, lo que le da la capacidad de reducir directamente el O₂ a O₂⁻; así se constituye en el componente terminal de la cadena transportadora de electrones (21).

En humanos este citocromo se ha encontrado en neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos. Se localiza en la membrana citoplasmática y se incorpora a la pared de la vacuola fagocítica, a medida que ésta se forma por invaginación de la membrana celular. En la membrana de los gránulos específicos de los PMN se encuentra una reserva adicional de citocromo, el cual también se traslada a la pared de la vacuola (23).

Recientemente se logró purificar este citocromo: está formado por dos péptidos y tiene 21.0% de carbohidratos (26). La clonación y el secuenciamiento de los genes de los dos péptidos han permitido demostrar que no existe homología con ninguna otra proteína descrita (23,26).

La flavoproteína que hace parte de la NADPH-oxidasa es, muy probablemente, el único componente capaz de unir el NADPH, haciendo un puente entre éste y el citocromo b.

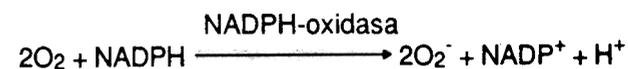
En cuanto a la fosfoproteína parece ser el blanco de la fosforilación por parte de la PKC, fenómeno que llevaría a la activación del sistema oxidasa. Se localiza predominantemente en el citoplasma y se traslada a las membranas para la activación de la oxidasa (23).

MECANISMOS BACTERICIDAS DEPENDIENTES DEL OXIGENO

El oxígeno y sus productos reducidos son fundamentales para la actividad microbida de los neutrófilos; por eso la destrucción bacteriana disminuye significativamente en condiciones anaerobias y los trastornos genéticos que suprimen la explosión respiratoria post-fagocítica impiden la capacidad bactericida. Los productos del oxígeno generados durante la activación metabólica pueden ser directamente tóxicos para los microorganismos ingeridos pero no se ha definido su importancia en la destrucción microbiana por parte de las células fagocíticas (21,27).

Después de la formación del fagosoma hay una elevación inicial del pH a 8.0 y una caída posterior a alrededor de 6.5 en 30 minutos. El O₂⁻ producido por la reducción del O₂ consume protones para formar H₂O₂, lo que aumenta el pH intravacuolar y permite la activación de las proteínas catiónicas, que son uno de los principales mecanismos microbicidas de los PMN (8,21). Se considera que las bacterias mueren dentro del fagolisosoma antes de que el pH disminuya por debajo de 7.0.

El anión superóxido se forma según la siguiente reacción:



La mayor parte del O₂⁻ (anión superóxido) se convierte rápidamente en H₂O₂ por medio de una reacción de dismutación catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) en el citoplasma celular o se produce espontáneamente dentro de la vacuola fagocítica a una velocidad relativamente baja; sin embargo, el pH ácido aumenta en forma sustancial la dismutación espontánea.

El H₂O₂ generado durante la explosión respiratoria es detoxificado por 2 mecanismos, uno dependiente del sistema glutatión y otro del sistema de la catalasa.

El O_2^- y el H_2O_2 no pueden considerarse como agentes microbicidas directos, debido a que el O_2^- difícilmente penetra las envolturas microbianas y porque, además, muchos de los microorganismos contienen SOD y enzimas que neutralizan el H_2O_2 . Sin embargo, a partir del O_2^- y del H_2O_2 , en presencia de los catalizadores apropiados, se originan agentes oxidantes con capacidad bactericida.

El O_2^- reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} , que es reoxidado a Fe^{3+} por acción del H_2O_2 , con producción de radicales hidroxilo: OH^\cdot y OH^- . Estos son oxidantes potentes que reaccionan rápidamente con enlaces químicos de todo tipo, produciendo daño en el sitio en que se generan. Sin embargo, en los fagolisosomas, se requiere una cantidad enorme para destruir el microorganismo ingerido, porque la mayoría de estos radicales se consume en la oxidación de las proteínas del lisosoma y de componentes de la superficie microbiana, no esenciales para la viabilidad del agente. Esto ha llevado a dudar de su significado en la actividad antimicrobiana (21,30).

Otro de los metabolitos del O_2 que ha sido involucrado en los mecanismos microbicidas es el oxígeno simple (1O_2) esta especie excitada de oxígeno tiene la capacidad de atacar puentes insaturados de carbono; sin embargo, hasta ahora no hay demostración convincente de su papel en la destrucción de microorganismos en PMN intactos.

MECANISMOS MICROBICIDAS INDEPENDIENTES DEL OXIGENO

Aunque es clara la importancia de la explosión respiratoria en la destrucción microbiana por parte de los PMN, hay amplia evidencia de que los fagocitos son capaces de inactivar microorganismos a través de mecanismos no oxidativos; por ejemplo: pueden matar varios organismos en condiciones anaerobias y los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica sólo sufren infecciones por ciertos gérmenes (4,23,26). Todos los mecanismos microbicidas independientes del oxígeno, descritos hasta el momento, se localizan en los gránulos lisosómicos de las células fagocíticas, e incluyen:

Lisozima: enzima catiónica termoestable que hidroliza específicamente el enlace β -1,4-glucosídico, en el esqueleto de mureína de la pared de las bacterias gram positivas. Se considera que no inactiva

bacterias gram negativas a menos que se traten simultáneamente con otro sistema microbicida. Su principal papel puede ser actuar en concordancia con otros factores granulocíticos, probablemente las proteasas neutras (1,4,8).

Lactoferrina: es una glicoproteína con capacidad de fijar hierro. Se le han descrito tres posibles mecanismos microbicidas: el primero propone que el efecto bactericida resulta de la quelación de los compuestos de hierro, necesarios para el metabolismo bacteriano. Otros han mostrado que la lactoferrina tiene un efecto bactericida directo e irreversible sobre ciertas especies. El tercer mecanismo explica que es activa por su participación en la formación del radical hidroxilo durante la explosión respiratoria (4,8,30).

Catepsina G: es una proteasa-serina, que posee especificidad hidrolítica similar a la de la quimiotripsina. Son susceptibles a su acción tanto microorganismos gram positivos como gram negativos. Su actividad bactericida es independiente de la función enzimática, pues persiste cuando la actividad de proteasa es inhibida por el calor o por inhibidores del sitio activo (8,31).

Proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad (BPI): es una proteína catiónica que ejerce su actividad bactericida selectiva contra bacterias gram negativas a través de un mecanismo no enzimático. La pérdida de la viabilidad bacteriana se acompaña de alteraciones funcionales restringidas a la membrana externa, como incremento en la permeabilidad a moléculas hidrofóbicas y activación selectiva de enzimas que degradan el peptidoglicano y los fosfolípidos de la membrana externa (8,30).

Defensinas: son péptidos antimicrobianos ricos en arginina y cisteína; su actividad microbicida posiblemente se realiza en la membrana. Un evento inicial es la pérdida en la integridad de la permeabilidad para iones intracelulares como el potasio. Su acción está dirigida contra bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y ciertos virus envueltos (Herpes simplex 1 y 2, Influenza A, Estomatitis vesicular). Además, las defensinas humanas han demostrado actividad citolítica contra una serie de líneas celulares tumorales; esto puede relacionarse con los efectos tumoricidas que se han observado en los neutrófilos así como con parte del daño tisular secundario, que se presenta en los sitios de inflamación (8,32).

SUMMARY

PHYSIOLOGY OF POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS

Phagocytic cells, particularly neutrophils, are a fundamental part of the host response against aggression by infectious as well as non-infectious agents, and they are involved in the generation of tissue damage during inflammatory response.

Cell responses of neutrophils depend on a series of closely related events like adherence to and diapedesis through endothelial cells, migration toward the sites of inflammation, phagocytosis and destruction of opsonized particles. All these actions are performed through the perfect integration between the systems of cellular activation and microbicidal mechanisms, both oxygen-dependent and independent. A large portion of the biochemical, molecular and genetic mechanisms that lead to the physiologic response of neutrophils has been elucidated which permits the identification and understanding of the pathogenesis of disorders affecting these cells.

BIBLIOGRAFIA

1. ROITT IM. Cells involved in the immune response. In:----- Immunology. London: Gower Medical Publishing, 1985: 2.1-2.16.
2. ATHENS JW, MAAB OP. Leukokinetic studies. IV. The blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 1961; 40: 989-999.
3. DANCEY JT, DEUBELBEISS KA, HARKER LA, FINCH CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 1976; 58: 705-715.
4. ROOT RK, COHEN MS. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 565-598.
5. MALECH HL, GALLIN JI. Neutrophils in human disease. *N Engl J Med* 1987; 317: 687-694.
6. DEWALD B, BRETZ U, BAGGIOLINI M. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J Clin Invest* 1982; 70: 518-525.
7. PETREQUIN PR, TODD TF III, DEVAL L, BOXER LA, CURNUTTE JT. Association between gelatinase release and increased plasma membrane expression of the Mo1 glycoprotein. *Blood* 1987; 69: 606-610.
8. LEHRER RI, GANZ T, SELSTED ME, BABIOR BM, CURNUTTE JT. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med* 1988; 102: 127-142.
9. YOON PS, BOXER LA, MAYO LA, YANG AY, WICHA MS. Human neutrophil laminin receptors: activation-dependent receptor expression. *J Immunol* 1987; 138: 259-265.
10. TODD TF III, ARNOUT MA, ROSIN RE, CROWLEY CA, PETERS WA, et al. Subcellular localization of the large subunit Mo1 (Mo1 alpha, formerly, sp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1984; 74: 1280-1290.
11. SHALABY MR, AGGARWAL BB, RINDERKNECHT E, SVEDERSKY LP, FINKLE BS, et al. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol* 1985; 135: 2069-2073.
12. SNYDERMAN R, GOETZL EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 1981; 213: 830-837.
13. SKLAR LA. Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil. *Adv Immunol* 1986; 39: 95-143.
14. DILLON SB, VERGHESE MW, SNYDERMAN R. Signal transduction in cells following binding of chemoattractants to membrane receptors. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1988; 55: 65-80.
15. GILMAN AG. G proteins: transducer of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 615-649.
16. NEER EJ, CLAPHAM DE. Roles of G proteins subunits in transmembrane signalling. *Nature* 1988; 333: 129-134.
17. HURST NP. Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burst. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 265-272.
18. SADLERT KL, BADWY JA. Second messengers involved in superoxide production by neutrophils: function and metabolism. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2: 185-200.
19. MALECH HL, ROOT RK, GALLIN JI. Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. *J Cell Biol* 1977; 75: 666-693.
20. TAUBER AI. Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood* 1987; 69: 711-720.
21. SEGAL AW. Superoxide generation, cytochrome b-245, and chronic granulomatous disease. In: WEISSMANN G. ed. Advances in inflammation research. New York: Raven Press, 1984: 55-82.
22. BOXER LA, SMOLEN JE. Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2: 101-134.
23. SEGAL AW. The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocyte cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1989; 83: 1785-1793.
24. BABIOR BM. The respiratory burst oxidase. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2: 201-212.
25. BABIOR BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 1984; 64: 959-966.
26. DINAUER MC, ORKIN SH. Chronic granulomatous disease. Molecular genetics. *Hematol Oncol Clin North Am* 1988; 2: 225-240.
27. THOMAS EL, LEHRER RI, REST RF. Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 1988; 10: S450-S456.
28. KLEBANOFF SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 1980; 93: 480-489.
29. KLEBANOFF SJ. Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. *Adv Host Defense Mechanis* 1982; 1: 111-162.

30. COHEN MS, BRITIGAN BE, HASSETT DJ, ROSEN GM. Phagocytes O₂ reduction, and hydroxyl radical. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 1088-1096.

31. TRAVIS J. Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am J Med* 1988; 84: 37-42.

32. DAHERKA, SELSTED ME, LEHRER RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 1986; 60: 1068-1074.