
Efecto del consumo de *basuca* sobre la función fagocítica y microbicida de los polimorfonucleares neutrófilos

FABIOLA TORO, DIANA GARCIA, ABEL DIAZ, GABRIEL AGUDELO, LAVIVE REBAGE

Se investigó el efecto del consumo de *basuca* sobre la capacidad fagocítica y microbicida de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en individuos consumidores y ex-consumidores habituales de esta sustancia y se determinó, además, la capacidad opsonica de sus sueros. Los resultados mostraron una respuesta normal en todas estas actividades, en comparación con células y sueros de individuos controles sanos, no consumidores de drogas de ningún tipo.

Los promedios de los porcentajes de bacterias asociadas a los PMN de los consumidores y de sus controles, utilizando sueros de consumidores como fuente de opsoninas, fueron: 48.0 y 44.7 respectivamente; empleando sueros de ex-consumidores con células autólogas y controles, los datos fueron: 50.3 y 48.6. Al realizar el mismo ensayo, pero en presencia de suero normal, los valores fueron: 52.0 con los PMN de consumidores, 52.9 con los de ex-consumidores, 49.7 y 53.8 con los de los controles respectivos. Los porcentajes de destrucción de las

bacterias asociadas a los PMN utilizando suero normal fueron 47.2, 50.5, 44.5, y 51.6 en consumidores, ex-consumidores y controles, respectivamente.

Aunque el consumo habitual de *basuca* no afectó estas actividades en los PMN de sangre periférica, sería importante determinar los efectos secundarios de esta sustancia sobre los neutrófilos y los macrófagos presentes en las regiones broncoalveolares ya que tales células fagocíticas, por su localización anatómica, reciben la máxima exposición a esta droga durante el consumo.

MAG. EN INMUNOLOGIA FABIOLA TORO, Profesora Asistente, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; DRA. DIANA GARCIA de O, Profesora Titular, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; INGO. INDUSTRIAL ABEL DIAZ, Profesor Titular, Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia; MAG. EN ESTADISTICA GABRIEL AGUDELO, Profesor Asociado, Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia; QUIMICA FARMACEUTICA LAVIVE REBAGE, Jefe, Departamento de Toxicología, Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia.

PALABRAS CLAVES
BASUCA
FAGOCITOSIS
POLIMORFONUCLEAR NEUTROFILO

INTRODUCCION

Investigaciones previas han permitido concluir que las sustancias psicoactivas (morfina, heroína, marihuana, cocaína), modulan la respuesta inmunológica (1). Son pocos, sin embargo, los estudios realizados para evaluar su efecto sobre la funcionalidad de las células fagocíticas. A pesar de ello, se dispone de informes de una hipofunción por el consumo de marihuana y morfina en animales de experimentación (1).

La *basuca*, sustancia bastante utilizada en nuestro medio (2), es un derivado de las hojas de coca (3) y se postuló que, como tal, podría tener alguna acción moduladora directa sobre la funcionalidad de los PMN o, también, indirecta mediada por el sistema neuroendocrino; esa acción moduladora se podría detectar en la etapa de consumo o, como una secuela, con posterioridad a la suspensión del mismo.

Clínicamente, se conoce que la utilización crónica de *basuca* tiene efectos secundarios sobre el sistema nervioso central, con alteraciones en el comportamiento (3,4); afecta, además, otros órganos como el corazón, los pulmones y el hígado (4).

Las lesiones del cerebro, el miocardio y el pulmón son atribuibles a la vasoconstricción inducida por la droga; el daño hepático es causado, posiblemente, por la generación de agentes oxidantes, liberados durante el metabolismo de la cocaína (5).

Las graves alteraciones físicas y los delicados problemas sociales que genera la adicción a la *basuca*, así como el desconocimiento de los efectos que induce en el comportamiento de las células fagocíticas, estimularon la realización de esta investigación de los PMN (primera línea de defensa celular contra las infecciones); el objetivo fue estudiar la capacidad fagocítica y microbicida de estas

células y la actividad opsónica del suero, en individuos consumidores habituales y ex-consumidores de *basuca*.

MATERIALES Y METODOS

POBLACION EN ESTUDIO

Entre octubre de 1987 y julio de 1988, se estudiaron 24 individuos, de ambos sexos, consumidores habituales de *basuca*; su consumo promedio era de 26.2 gm/semana, la duración promedio del uso de la droga 5.6 años y la edad promedio 28 años. Además se investigaron 28 individuos ex-consumidores (antes consumidores habituales), de ambos sexos, cuyos datos correspondientes eran: consumo promedio 6.1 gm/semana; duración promedio de la adicción 1.7 años y edad promedio 30.8 años.

Los dos grupos fueron seleccionados al azar en la Consulta Externa del Servicio de Toxicología del Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Paralelamente se estudiaron, como controles, grupos de individuos sanos, de la misma edad y sexo que no consumían ningún tipo de droga. Todos los sujetos presentaban un estado nutricional normal y reflejaban las características de una población de clase social media.

OBTENCION DE LOS PMN

Estas células fueron obtenidas de sangre venosa periférica heparinizada, de acuerdo al método descrito por Yanat y col (6), utilizando Dextrán 70 al 6% para sedimentar los glóbulos rojos y luego un gradiente de Ficoll-Hipaque para separar los PMN de las células mononucleares. El sedimento de PMN fue sometido a lisis hipotónica con agua destilada y cloruro de sodio al 3.5%, para eliminar los glóbulos rojos contaminantes. Las células se suspendieron en solución de Hank ^{***}, a una concentración de 5×10^6 PMN/ml. La viabilidad y la pureza de los PMN fueron mayores de 95%, determinadas, respectivamente, por medio de la exclusión del azul de tripano y con violeta de genciana.

Laboratorios Travenol, Cali, Colombia
Pharmacia AB, Suecia
Gibco Laboratories, N.Y.

PREPARACION DE LAS BACTERIAS RADIOMARCADAS

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* aislada en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia; fue cultivada en caldo tripticasa soya a 37° C por 18 horas. Se mezclaron 0.3 ml de este cultivo con 0.3 ml de una solución de timidina tritiada (actividad específica 14.2 Ci/mmol) a una concentración final de 4µCi/ml del radioisótopo. La mezcla se incubó a 37° C con agitación continua. Las bacterias radiomarcadas se lavaron 3 veces con solución fría de Hank a 1600 x g / 15 min/ 4° C y luego, utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20), se preparó una suspensión cuya concentración aproximada era 250 x 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Esta medición se correlacionó con los cultivos realizados en agar Muller Hinton (7,8).

OPSONIZACION DE LAS BACTERIAS RADIOMARCADAS

Como fuente de opsoninas se utilizaron los sueros de individuos consumidores y ex-consumidores de *basuca* y una mezcla de sueros humanos normales; todos ellos a una concentración de 10% en solución de Hank. Cada suero se mezcló con la suspensión de bacterias y se incubó a 37° C por 20 minutos con agitación continua. Luego las bacterias opsonizadas y radiomarcadas se lavaron 3 veces con solución fría de Hank a 1600 x g / 15 minutos a 4° C y se resuspendieron en la misma solución tampón (7,8).

REACCION DE FAGOCITOSIS

Cada experimento se hizo por duplicado; se mezclaron aproximadamente 25 x 10⁶ bacterias opsonizadas y radiomarcadas con 2.5 x 10⁶ PMN en cada uno de 6 tubos plásticos para centelleo. Al tiempo cero se tomó una alícuota de cada uno de dos tubos y se sembró en agar Muller Hinton, para definir el número de UFC en ese momento. Los cuatro tubos restantes se incubaron a 37° C por 30

minutos con agitación continua; al finalizar este tiempo dos de ellos fueron lavados 3 veces con solución fría de Hank a 1600 x g / 5 minutos / 4° C, para eliminar las bacterias extracelulares y determinar el porcentaje de las que estaban asociadas a las células. Del sedimento obtenido en la última lavada se sembró una alícuota en el mismo agar y el resto se resuspendió en líquido de centelleo y tolueno, para hacer la lectura en un contador de centelleo beta +.

Una vez concluida la incubación de la reacción fagocítica, se adicionó líquido de centelleo a los dos tubos restantes para hacer la lectura de la radioactividad total (asociada y no asociada a las células). Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de bacterias asociadas a los PMN y el de destrucción bacteriana, mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de bacterias asociadas a los PMN} = \frac{\text{Radioactividad asociada a PMN}}{\text{Radioactividad total}} \times 100$$

$$\% \text{ de destrucción bacteriana} = \frac{\text{UFC asociadas a PMN} \times 100}{\% \text{ de bacterias asociadas a los PMN} \times \text{UFC tiempo cero}} \times 100$$

METODOLOGIA ESTADISTICA

Para analizar los experimentos se compararon los 4 grupos (consumidores, ex-consumidores y sus respectivos controles) por medio de un análisis de varianza en una vía, con un nivel de significancia de 5% (9).

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, para las variables fagocitosis y destrucción bacteriana (10). El procesamiento de los datos se hizo en un microcomputador (NEC APC IV) utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS versión 2.6.

Los resultados se presentan en tablas que muestran los valores medios y los errores estándar para cada uno de los grupos.

* Merck
** Amersham Laboratories, Inglaterra
*** Merck
**** PPO, POPOP, Tritón X100; Sigma Chemical Co. St. Louis
+ Beckman LS 3801



RESULTADOS

EFFECTO DEL CONSUMO DE *BASUCA* SOBRE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LOS NEUTROFILOS

OPSONIZACION CON SUEROS DE INDIVIDUOS CONSUMIDORES Y NO CONSUMIDORES

Estos experimentos se realizaron con el objetivo de determinar si el consumo de *basuca* producía o no alteraciones en la capacidad opsónica del suero.

Las bacterias opsonizadas con estos sueros se colocaron en contacto con PMN autólogos y con células de sujetos controles. Los porcentajes promedio de bacterias asociadas (fagocitosis) fueron en los consumidores y ex-consumidores y en sus respectivos controles los siguientes: 48.0 ± 1.8 ; 50.3 ± 1.8 ; 44.7 ± 2.0 y 48.6 ± 2.3 (Tabla N° 1). El análisis de varianza de una vía no reveló diferencias significativas entre los grupos.

OPSONIZACION CON SUEROS NORMALES

Para definir si los resultados obtenidos en la prueba anterior eran normales o presentaban alguna alteración, se investigó el comportamiento de los PMN de todos los individuos estudiados frente a bacterias opsonizadas con una mezcla de sueros humanos normales. Los datos de fagocitosis obteni-

dos en consumidores, ex-consumidores y sus controles fueron, respectivamente: 52.0 ± 2.7 ; 52.9 ± 1.7 ; 49.7 ± 2.4 y 53.8 ± 2.0 (Tabla N° 1).

Estos valores no revelaron diferencias significativas entre ellos ni tampoco al compararlos con los obtenidos utilizando los sueros de consumidores y ex-consumidores como fuente de opsoninas.

EFFECTO DEL CONSUMO DE *BASUCA* SOBRE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS PMN

Como no se halló ninguna alteración de la capacidad opsónica de los sueros de los consumidores y ex-consumidores, se determinó la actividad microbicida opsonizando las bacterias con la mezcla de sueros normales. Los resultados obtenidos con células de consumidores y ex-consumidores y sus respectivos controles fueron: 47.2 ± 3.4 ; 50.5 ± 2.0 ; 44.5 ± 2.9 y 51.6 ± 2.3 (Tabla N° 2). No se encontró diferencia significativa entre estos valores lo cual indicó que la actividad microbicida tampoco estaba alterada.

CORRELACION DE LA FAGOCITOSIS CON LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El estudio comparativo de la fagocitosis y de la acción bactericida de los PMN de los individuos de los cuatro grupos, utilizando la mezcla de sueros humanos normales como fuente de opsoninas, reveló una correlación positiva alta. Los coeficientes de

TABLA N° 1

PROMEDIO DE LOS PORCENTAJES DE BACTERIAS ASOCIADAS A LOS PMN HACIENDO LA OPSONIZACION CON LOS DIFERENTES TIPOS DE SUEROS

SUEROS	POLIMORFONUCLEARES	No	$\bar{X} \pm E.E.$
MEZCLA DE SUEROS NORMALES	CONSUMIDORES	24	52.0 ± 2.7
SUERO DE COSUMIDORES	CONSUMIDORES	15	48.0 ± 1.8
MEZCLA DE SUEROS NORMALES	CONTROL CONSUMIDORES	24	49.7 ± 2.4
SUERO DE CONSUMIDORES	CONTROL CONSUMIDORES	15	44.7 ± 2.0
MEZCLA DE SUEROS NORMALES	EX-CONSUMIDORES	28	52.9 ± 1.7
SUERO DE EX-CONSUMIDORES	EX-CONSUMIDORES	15	50.3 ± 1.8
MEZCLA DE SUEROS NORMALES	CONTROL EX-CONSUMIDORES	28	53.8 ± 2.0
SUERO DE EX-CONSUMIDORES	CONTROL EX-CONSUMIDORES	15	48.6 ± 2.3

*ERROR ESTANDAR

TABLA N° 2

PROMEDIO DE LOS PORCENTAJES DE DESTRUCCION DE BACTERIAS ASOCIADAS A LOS PMN EN PRESENCIA DE UNA MEZCLA DE SUEROS HUMANOS NORMALES

POLIMORFONUCLEARES	Nº	$\bar{X} \pm E.E^*$
CONSUMIDORES	24	47.2 ± 3.4
CONTROL CONSUMIDORES	24	44.5 ± 2.9
EX-CONSUMIDORES	28	50.5 ± 2.0
CONTROL EX-CONSUMIDORES	28	51.6 ± 2.3

* ERROR ESTANDAR

correlación en los consumidores y sus controles fueron $r = 0.96$ (GL=22) y $r = 0.95$ (GL=22). En los ex-consumidores y sus controles fueron $r = 0.99$ (GL=26) y $r = 0.98$ (GL=26).

DISCUSION

Los resultados de esta investigación demostraron que el consumo de *basuca* no afecta la capacidad opsonica del suero ni la funcionalidad de las células fagocíticas PMN en lo que respecta al proceso fagocítico en sí. De igual manera, tampoco se encontró que deje secuelas una vez cesa el consumo de la droga.

Estos resultados son interesantes porque, como ya se mencionó, el componente sicoactivo de la *basuca* es la cocaína que tiene un efecto modulador positivo *in vivo* sobre la actividad de las células asesinas naturales (NK) (11) y negativo *in vitro* sobre estas mismas células y sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T (11,12). El efecto *in vitro* parece estar dado por un contacto permanente de las células con la droga y se ha postulado que el efecto *in vivo* está mediado por un acción rápida de la cocaína sobre el sistema neuroendocrino, estimulando la liberación de catecolaminas que mejoran la actividad NK.

La información que aportó este estudio es relevante si se tiene en cuenta que es el primero realizado sobre el tema, no sólo a nivel nacional sino también internacional; aunque no se hayan encontrado efectos secundarios en los neutrófilos de la sangre periférica, es importante continuar esta línea de investigación para tratar de definir los aspectos bio-

químico-moleculares del efecto de la *basuca* sobre el comportamiento de los neutrófilos y los macrófagos de las áreas broncoalveolares; en tales sitios anatómicos, en efecto, las células fagocíticas están en contacto más íntimo con la droga. De esta manera sería factible llegar a conocer algunas de las causas por las cuales se presenta daño tisular en los sujetos adictos a esta sustancia (13,14).

AGRADECIMIENTOS

A la Bióloga María Elena Giraldo por su decidido apoyo a la realización de este trabajo; al Dr. Luis Fernando García por sus valiosas sugerencias; a la Sra. Jane Almond por la traducción del resumen al inglés.

SUMMARY EFFECT OF FREE-BASE COCAINE CONSUMPTION (*BASUCA*) ON PHAGOCYtic AND MICROBICIDAL FUNCTIONS OF POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS

The effect of free-base cocaine consumption on the phagocytic and microbicidal capabilities of polymorphonuclear neutrophils (PMN) was studied in habitual users and in ex-users of this substance. The opsonic capability of their sera was also determined. Results showed a normal response in all these activities when compared with cells and sera of healthy non-users. Mean percentages of bacteria associated with PMNs of users and controls, using sera of

with PMNs of users, 52.9 with those of ex-users, and 49.7 and 53.8 with cells of the respective controls. Percentages of destruction of bacteria associated with PMNs in normal serum were as follows: 47.2 for users; 50.5 for ex-users, and 44.5 and 51.6 for their respective controls.

Although the habitual consumption of free-base cocaine did not affect the phagocytic and microbicidal capabilities of peripheral blood PMNs, it is important to determine the effects of this substance on neutrophils and macrophages of the bronchoalveolar region, since these are the cells that receive maximum exposure to the drug during consumption.

BIBLIOGRAFIA

1. TORO F. La drogadicción y el sistema inmunológico. *Iatreia* 1989; 2: 122-127.
2. TORRES Y, MURELLE L. Estudio nacional sobre alcoholismo y consumo de sustancias que producen dependencia, Colombia, 1987. Medellín: Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública, 1988: 216p.
3. VELASQUEZ E. La *basuca*, qué se sabe hasta el momento. Medellín, 1984: 13p.
4. Foro sobre basuco, Bogotá, junio 24, 1983. Resumen de ponencias. Bogotá: Asociación Colombiana de Toxicología y Farmacodependencia, 1983, 8p.
5. KLOSS MW, ROSEN GM, RAUCKMAN EJ. Cocaine mediated hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 169-173.
6. YANAT M, QUIE PG. Chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes adhering to surfaces. *Infect Immun* 1981; 33: 1181-1186.
7. VERHOEF J, PETERSON PK, QUIE PG. Kinetics of Staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes. A quantitative assay using ³H thymidine labelled bacteria. *J Immunol Methods* 1977; 14: 303-311.
8. ROZENBERG- ARSKA M, VAN STRIJP JA, HOEKSTRA WP, VERHOEF J. Effect of human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes on chromosomal and plasmid DNA of *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 1984; 73: 1254-1262.
9. SNEDECOR G, COCHRAN W. Clasificación en un sentido. Análisis de varianza. En:——. Métodos estadísticos. México: Compañía Editorial Continental, 1978: 321-369.
10. ANDERSON V, McLEAN R. Review of some basic statistical concepts. En:——. Design of experiments. A realistic approach. New York: Marcel Dekker, 1974: 25.
11. VANDYKE C, STESIN A, JONES R, CHUNTHARAPAI A, SEAMAN W. Cocaine increases natural killer cell activity. *J Clin Invest* 1986; 77: 1387-1390.
12. KLEIN TW, NEWTON CA, FRIEDMAN H. Suppression of human and mouse lymphocyte proliferation by cocaine. En: BRIDGE TP, et al. Psychological, neuropsychiatric and substance abuse aspects of AIDS. New York: Raven Press, 1988: 139-143.
13. ITKONSEN J, SCHNOLL S, GLASSROTH J. Pulmonary dysfunction in free base cocaine users. *Arch Intern Med* 1984; 144: 2195-2197.
14. HAMMERSCHMIOT DE, JACOBS HS. The stimulated granulocytes as a source of toxic oxygen compounds in tissue injury. En: AUTOR AP, ed. Pathology of oxygen. New York: Academic Press, 1982: 59-74.