

Los polimorfonucleares humanos generan leucotrieno B4 y PAF-aceter en presencia de las membranas de hemodiálisis

M. Sánchez-Crespo, S. Fernández-Gallardo, M. L. Nieto y L. Hernando

Servicio de Nefrología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

RESUMEN

La activación de los granulocitos que ocurre durante los minutos iniciales de la hemodiálisis se ha puesto en relación con la activación del sistema del complemento por las membranas de celulosa o de cuprophán. Con el fin de tener un mejor conocimiento de este proceso, los polimorfonucleares neutrófilos se incubaron con diferentes adiciones y se midió la formación del mediador lipídico [3H] PAF-aceter mediante la valoración de la transformación radioquímica de su precursor metabólico, el [3H] liso-PAF-aceter. La incubación de los polimorfonucleares con acetato sódico 25 mM indujo una ligera generación de PAF-aceter, que a su vez se incrementó al doble en presencia de membranas de celulosa o de cuprophán. Cuando la mezcla de incubación se suplementó con suero fresco, como fuente de complemento, y fenilmetilsulfonil fluoruro, para inhibir el catabolismo del PAF-aceter, la formación de PAF-aceter fue máxima. En otros experimentos se midió la generación de leucotrieno B4 utilizando un radioinmunoensayo específico, encontrándose que fue óptima en presencia de suero fresco y membranas de hemodiálisis. La máxima formación de leucotrieno B4 se observó a los cinco minutos. Las membranas de poliacrilonitrilo fueron un estímulo pobre de los polimorfonucleares, tanto en presencia como en ausencia de suero fresco. En resumen, los presentes datos indican que dos potentes estimuladores de los polimorfonucleares: PAF-aceter y leucotrieno B4, se generan durante la incubación de estas células con el suero humano y algunas membranas de hemodiálisis y sugieren la participación de estos mediadores inflamatorios en la patogenia de la neutropenia de hemodiálisis.

Palabras clave: **Hemodiálisis. Leucotrieno B4. Neutropenia. PAF-aceter.**

HUMAN POLYMORPHONUCLEARS GENERATE LEUKOTRIENE B4 AND PAF-ACETHER IN PRESENCE OF HEMODIALYSIS MEMBRANES

SUMMARY

The activation of granulocytes that occurs during the initial minutes of haemodialysis has been related to the activation of the complement system by Cuprophán and cellulose membranes. In order to obtain a better understanding of this process, polymorphonuclear leukocytes were incubated with different additions and the formation of [3H] PAF-acether was assessed radiochemically from the conversion of its metabolic precursor [3H] lyso-PAF. Incubation of human PMN with 25 mM sodium acetate induced a slight generation of PAF-acether, and this

Correspondencia: Dr. M. Sánchez Crespo.
Servicio de Nefrología.
Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2.
28040 Madrid.

was enhanced about two-fold in the presence of Cuprophan or cellulose membranes. When the incubation mixture was supplemented with fresh human serum, as a source of complement, and PMSF to inhibit PAF-acether catabolism, optimum conditions for the generation of PAF-acether were observed. In other experiments the generation of LTB₄ was assessed by using a specific radioimmunoassay and it was found to be optimum in the presence of fresh serum and dialysis membranes. In a time-course experiment maximum generation of LTB₄ was observed at 5 min. Polyacrylonitrile membrane was found to be a poor stimulator of PMN both alone or in the presence of fresh human serum.

In short, the present data show that two potent stimulators of the PMN: PAF-acether and LTB₄, are generated during incubation of these cells with human serum and some haemodialysis membranes and suggest the involvement of these inflammatory mediators in the pathogenesis of haemodialysis-induced neutropenia.

Key words: Hemodialysis. Leukotriene B₄. Neutropenia. PAF-acether.

Introducción

Durante los minutos iniciales de las sesiones de hemodiálisis se producen leucopenia y activación del sistema del complemento^{1, 2}. Estos fenómenos se han relacionado causalmente, y la explicación más aceptada en el momento actual es que las membranas de hemodiálisis activan el complemento por la vía alternativa, produciendo anafilatoxinas que actúan como secretagogos y como factores quimiotácticos para los leucocitos polimorfonucleares³. El significado clínico real de la neutropenia asociada a la hemodiálisis es todavía materia de debate, pero se ha sugerido que la activación de los granulocitos podría jugar un papel en la patogenia de síntomas como la urticaria, el prurito y la disnea que se producen al comienzo de la hemodiálisis, y con más severidad en los pacientes previamente afectados de enfermedad cardiopulmonar⁴⁻⁶.

En los últimos años, el proceso de activación de los polimorfonucleares (PMN) se ha estudiado intensamente; de esa manera se ha podido delinear la secuencia de acontecimientos que siguen al contacto inicial de los estímulos con la membrana de los PMN. La evidencia más reciente sugiere que durante la activación de los PMN por agonistas tales como C5a, ionophoro A23187 o partículas de zimosán existe una remodelación de los fosfolípidos de la membrana que contribuye a la generación de secretagogos endógenos⁷⁻¹¹. Estos mediadores lipídicos, eicosanoides^{12, 13} y PAF-aceter (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicerol-3-fosfolina)¹⁴⁻¹⁶ son los estímulos más potentes de los PMN y son activos a concentraciones tan bajas como 1 nM^{8, 13}. Así, el compuesto 1-O-alkil-araquidonoil-sn-glicerol-3-fosfolina es un precursor común del PAF-aceter y del ácido araquidónico en los PMN humanos, y el PAF-aceter activa la liberación de ácido araquidónico y su conversión en leucotrieno B₄ (LTB₄) y 5-HETE, que son activadores de los PMN^{17, 18}. Además, los inhibidores de la lipoxigenasa bloquean tanto la producción de me-

tabolitos del ácido araquidónico como la respuesta de los PMN al PAF-aceter^{17, 18}.

El propósito de este trabajo ha sido determinar el papel de algunos mediadores endógenos en la activación de los PMN durante la hemodiálisis.

Materiales y métodos

Materiales: La membrana de hidrato de celulosa se obtuvo de Secon G.m.b. H., Göttingen (Alemania). La membrana de cuprophan se adquirió a Travenol Laboratories, Castebler (Irlanda). La membrana de poliácridonitrilo se obtuvo de Hospal Industrie, Meyzieu (Francia). Las membranas se esterilizaron, se lavaron con solución salina estéril y se cortaron en pequeños fragmentos, previamente a su empleo en los experimentos. El 1-O-[³H] alquil-2-liso-sn-glicerol-3-fosfolina (45 Ci/mmol.) se obtuvo de New England Nuclear, Boston (USA). Las placas de sílica gel y los solventes para cromatografía en capa fina se adquirieron a Merck, Darmstadt (Alemania). Los reactivos para la medida de leucotrieno B₄ fueron de Amersham Corp., Amersham (Inglaterra). El medio para la separación de leucocitos, Lymphoprep, se adquirió a Nyegard, Oslo (Noruega). Los tubos de polipropileno se adquirieron a Falcon Plastics, Oxnard, California (USA).

Aislamiento de PMN: Los PMN se aislaron, como se publicó anteriormente²⁰, según una pequeña modificación del procedimiento de Boyun²¹. Las células se suspendieron, finalmente, a la concentración de $3,5 \times 10^7$ /ml. para su empleo en las distintas incubaciones. Los PMN de un mismo donante se utilizaron para estudios comparativos de los efectos de las diferentes membranas.

Incorporación de [³H] liso-PAF-aceter: El procedimiento se desarrolló de acuerdo con el protocolo de Chilton y cols.¹⁹. Se tomaron 50 µl. de una solución acuosa suplementada con albúmina bovina del compuesto marcado y se añadieron 0,95 ml. de suspen-

sión de PMN para obtener una concentración final de 10^{-8} M. La mezcla de incubación se agitó a 37° C durante treinta minutos y finalmente se diluyó a la concentración de 10^7 PMN/ml. Los PMN se estimularon en estas condiciones durante distintos tiempos en un baño con agitación a 200 ciclos por minuto y, finalmente, las incubaciones se finalizaron por adición de 3 ml. de cloroformo/metanol (1:2; v:v) a la suspensión celular.

Extracción y análisis de los lípidos: Los lípidos se extrajeron por formación de fase tras adición de cloroformo y agua para alcanzar una composición final de cloroformo:metanol:agua (1:1:0,9; v:v:v). La capa cloroformica se recogió y la fase acuosa se lavó tres veces con 2 ml. de metanol:cloroformo (1:1; v:v) para obtener una extracción completa de los fosfolípidos. La fracción orgánica se evaporó a sequedad y la cantidad de $[3H]$ PAF-aceter formado se cuantificó por espectrometría de centelleo líquido tras separación por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel en la mezcla de solventes cloroformo:metanol:ácido acético:agua (50:25:8:6; v:v:v:v).

Medida de leucotrieno B4 (LTB4): El LTB4 se midió por radioinmunoensayo según el procedimiento descrito por Palmer y Salmon^{11, 22, 23}. La preparación de las muestras para el radioinmunoensayo se realizó previa precipitación de las proteínas con acetona fría y extracción a pH alcalino en acetato de etilo según la descripción de Simmonds y cols.²⁴

Resultados

Efecto del acetato, las membranas de hemodiálisis y el suero fresco sobre la formación del PAF-aceter por los PMN humanos: Dado que el acetato es un componente habitual de las soluciones empleadas en hemodiálisis, y a su vez este compuesto se puede incorporar en la molécula de liso-PAF-aceter para generar PAF-aceter^{25, 28}, se realizaron estudios preliminares para determinar el efecto del acetato sobre la formación de PAF-aceter. La incubación de los PMN con acetato sódico 25 mM en un baño con agitación indujo la formación de una pequeña cantidad de PAF-aceter, a juzgar por la conversión del precursor marcado $[3H]$ liso-PAF-aceter en $[3H]$ PAF-aceter. Esta conversión fue tiempo y dosis dependiente, como se muestra en la figura 1. La adición de cloruro sódico 25 mM, en lugar del acetato de sodio, no modificó la formación de PAF-aceter, lo que indica que el efecto del acetato no se debe solamente al aumento de la tonicidad del medio. Cuando los PMN se incubaron en presencia de diferentes cantidades de membranas de hemodiálisis, se observó también la generación de $[3H]$ PAF-aceter, obteniéndose la máxima respuesta con 50 mg. de membrana por ml. de suspensión de PMN. Como se muestra en la figura 2, no se observaron diferencias significativas entre las respuestas inducidas por el hidrato de celulosa y el

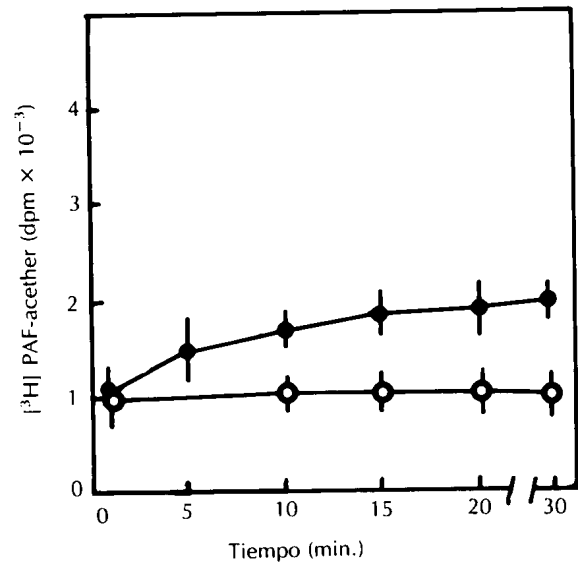


Fig. 1.—Conversión del $[3H]$ liso-PAF-aceter en $[3H]$ PAF-aceter: Efecto del acetato de sodio. Los PMN se incubaron en presencia de $[3H]$ liso-PAF-aceter durante treinta minutos a 37° C en un baño con agitación a 200 ciclos por minuto. Al final de este período se añadió acetato de sodio 25 mM (●) o cloruro de sodio 25 mM (○). A los tiempos indicados se extrajeron los lípidos mediante adición de solventes y se cuantificó el $[3H]$ PAF-aceter formado previa separación por cromatografía en capa fina, raspado zonal y espectrometría líquida. Los datos representan $M \pm DS$ de tres experimentos con muestras duplicadas.

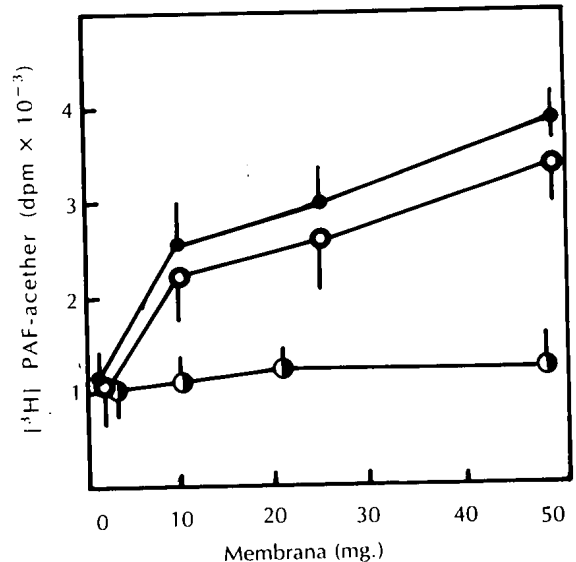


Fig. 2.—Conversión del $[3H]$ liso-PAF-aceter en $[3H]$ PAF-aceter: Efecto de las membranas de hemodiálisis. Los PMN se incubaron en las condiciones de la figura 1 durante treinta minutos y posteriormente se añadieron distintas concentraciones de fragmentos de membrana de celulosa (●) o de cuprophan (○) o de poliácridonitrilo (○) y se incubaron durante otro período de treinta minutos. Tras este período se cuantificó el $[3H]$ PAF-aceter formado. Los datos representan tres experimentos en duplicado. * Indica un valor de $p < 0,05$ comparado con el poliácridonitrilo.

cuprophan, mientras que el poliacrilonitrilo mostró la menor capacidad para estimular la generación de PAF-aceter. Con el fin de reproducir las condiciones de la hemodiálisis se realizaron experimentos adicionales en un medio suplementado con suero humano fresco, membranas de hemodiálisis y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) para disminuir el catabolismo del PAF-aceter por la acetilhidrolasa presente en el suero humano^{29, 30}. Los controles incluían suero calentado a 65° C durante treinta minutos para inactivar el complemento y la acetilhidrolasa, y suero fresco en ausencia de membranas de hemodiálisis. Como se muestra en la figura 3, la generación de PAF-aceter por los PMN en presencia de membrana de hidrato de celulosa se aumentó significativamente por la adición de suero fresco. Al contrario, esto no ocurrió con la membrana de poliacrilonitrilo. El suero inactivado por el calor no reprodujo la acción del suero fresco en presencia de membrana de celulosa, y el suero fresco sólo no estimuló en absoluto la formación de [3H] PAF-aceter. Se produjo un significativo catabolismo del [3H] PAF-aceter en presencia de suero tras diez minutos de incubación, lo que sugiere que no existe una completa inhibición de la acetilhidrolasa por el PMSF a las concentraciones utilizadas.

Efecto de las membranas de hemodiálisis y del suero fresco sobre la generación de LTB₄ por los PMN humanos: La incubación de los PMN con fragmentos de membranas de celulosa o de cuprophan en presencia de suero fresco humano produjo la formación de LTB₄; al contrario, el poliacrilonitrilo no estimuló la formación de este compuesto (fig. 4). El LTB₄ se detectó únicamente durante los minutos iniciales de incubación y cayó a los niveles iniciales tras cinco minutos de incubación. La adición de acetato, en ausencia de fragmentos de membranas, no produjo la formación de LTB₄.

Discusión

Nuestros datos muestran que la incubación de PMN en condiciones similares a las que ocurren durante la hemodiálisis conduce a la generación de dos mediadores inflamatorios: LTB₄ y PAF-aceter, que son dos potentes estimuladores de los PMN. Estos datos no están en contradicción con las explicaciones habituales de la participación del sistema del complemento en la patogenia de la neutropenia inducida durante la hemodiálisis, pues las anafilatoxinas (C3a y C5a) generadas durante la activación del sistema del complemento actúan a través de la formación por el propio PMN de mediadores lipídicos, que son los verdaderos agonistas endógenos de la activación celular⁷⁻¹¹. Esto se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* con numerosos agonistas tales como inmunocomplejos^{9, 31}, C5a desArg y ionophoro A23187^{7, 32}. De acuerdo con los presentes datos, este mecanismo se aplica también a la neutropenia de la hemodiálisis.

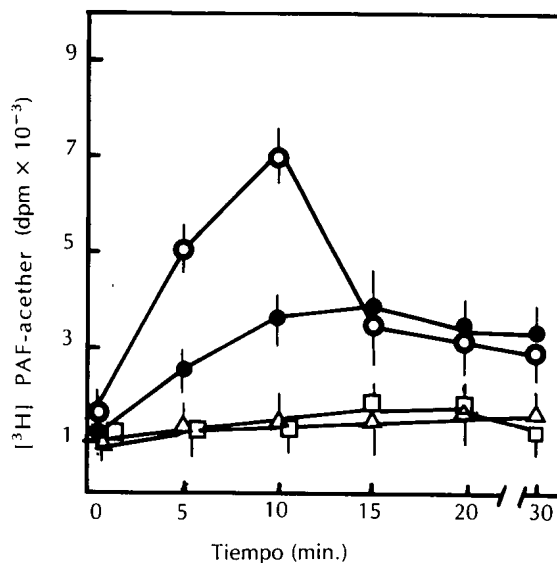


Fig. 3.—Conversión del [3H] liso-PAF-aceter en [3H] PAF-aceter: Efecto del acetato de sodio. Las membranas de hemodiálisis y el suero humano. Los PMN se preincubaron con [3H] liso-PAF-aceter durante treinta minutos en las condiciones habituales. Al final de este período las células se suplementaron con acetato de sodio 25 mM, 50 mg. de fragmentos de membrana de hidrato de celulosa (○, ●) o de poliacrilonitrilo (△, ◻), PMSF 1 μM y 100 μl. de suero inactivado (●) o de suero fresco (△, ◻, ○). A los tiempos señalados se terminaron las incubaciones mediante adición de solventes orgánicos y se midió la cantidad de [3H] PAF-aceter formado. Los datos representan M ± DS de tres experimentos en duplicado. * Representa un valor de p < 0,05 comparado a los valores obtenidos en presencia de suero inactivado por el calor.

Tetta y cols.³⁵ han demostrado recientemente que los PMN pueden activarse durante la hemodiálisis por interacción directa con la membrana en ausencia de factores del complemento. Para ello utilizaron un modelo que permite la circulación de los PMN en un sistema de diálisis en medio de Hank's, en lugar de suero. Nuestro estudio se ha realizado sustituyendo el paso por el circuito de hemodiálisis por una agitación fuerte; sin embargo, nuestros datos están de acuerdo con los de Tetta y cols. al mostrar la formación de PAF-aceter en un medio sin suero.

El acetato podría jugar también un papel cooperativo en la formación de PAF-aceter, puesto que se convierte rápidamente en acetil-CoA y después puede incorporarse en la molécula de liso-PAF-aceter²⁵⁻²⁸. Sin embargo, los datos aquí mostrados sugieren que las membranas de hemodiálisis y los factores del complemento son estímulos más importantes para la formación de PAF-aceter que el acetato de sodio.

Es difícil determinar cuáles son las cantidades de PAF-aceter generadas durante estos experimentos. De hecho, el trazador isotópico añadido se mezcla con el «pool» endógeno del compuesto, y ello produce una variación de la actividad específica. Sin embargo, y de acuerdo con la actividad específica inicial, la cantidad de PAF-aceter formado debe ser

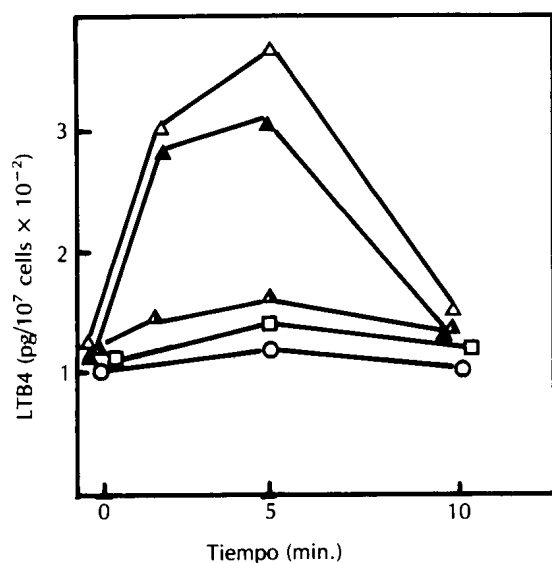


Fig. 4.—Generación de LTB4 por los PMN en presencia de diferentes adiciones. Los PMN se incubaron en presencia de acetato de sodio 25 mM (○), 100 μ l. de suero fresco (□) o la misma cantidad de suero más 50 mg. de membrana de celulosa (▲), cuprophane (△) o poliacrilonitrilo (△). A los tiempos indicados se paró la incubación por inmersión en un baño de hielo y centrifugación a 1.000 \times g. durante cinco minutos a 4° C. El LTB4 se midió en los sobrenadantes por radioinmunoensayo, como se indica en la sección de Materiales y métodos. Los datos representan los valores medios de dos experimentos en duplicado.

superior a 10^{-8} M, que es una concentración activa sobre los PMN.

Las respuestas del PMN a los diferentes secretagogos no son iguales. Así, el LTB4 es un agonista incompleto en el PMN³⁶ y no reproduce los efectos del ionophoro A23187, del FMLP o del C5a. La generación simultánea de LTB4 y PAF-aceter por el PMN estimulado por las membranas de hemodiálisis subraya la interrelación entre estos mediadores e indica que la neutropenia de diálisis es el resultado de una acción coordinada sobre los PMN de al menos dos efectores complementarios. Esto puede explicar por qué la neutropenia es el principal efecto de la generación de estos mediadores, mientras que otras acciones de estos compuestos no se observan.

Puesto que el PAF-aceter es un potente agonista de las plaquetas humanas y no se observa trombocitopenia durante la hemodiálisis, debe tratar de conciliarse este hecho con nuestra sugerencia de un papel del PAF-aceter en la neutropenia de diálisis. Varias explicaciones serían posibles. En primer lugar, el PAF-aceter se genera por los PMN, y muy posiblemente la concentración de este compuesto en la membrana del PMN debe ser superior a la existente en la membrana plaquetaria. En segundo lugar, la acción del PAF-aceter en el PMN se refuerza por la presencia de otro agonista sinérgico. En tercer lugar, los PMN

humanos son al menos tan sensibles como las plaquetas a la activación por el PAF-aceter^{8, 37}.

En resumen, nuestros datos sugieren que el PAF-aceter y el LTB4 están implicados en la activación de los PMN durante la hemodiálisis; sin embargo, se precisan más estudios para determinar el posible papel de estos compuestos en la patogenia de los síntomas que algunos pacientes sufren durante la hemodiálisis y que han sido relacionados con la activación del complemento y de los granulocitos.

Agradecimientos

S. Fernández-Gallardo es becario de la Fundación Conchita Rábago; M. L. Nieto es becario del Fondo de Investigaciones Sanitarias. Este trabajo se ha realizado con ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias, CAICYT y Fundación Alvarez de Toledo para la Investigación sobre las Enfermedades Renales.

Bibliografía

- Kaplow LS y Goffinet JA: Profound neutropenia during the early phase of haemodialysis. *JAMA* 203:1135-1137, 1968.
- Craddock PR, Feha J, Dalmaso AP, Brigham KL y Jacob HS: Hemodialysis leukopenia and pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyser cellophane membrane. *J Clin Invest* 59:879-888, 1977.
- Chenoweth DE y Hugli TE: The C5a receptor of human polymorphonuclear leukocytes. I. Demonstration of a specific C5a receptor on intact cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 75:3943-3947, 1978.
- Aljama P, Brown P, Turner P, Ward MK y Kerr DN: Haemodialysis-triggered asthma. *Br Med J* 2:251-252 1978.
- Ogden DA: New-dialyzer syndrome. *New Engl J Med* 302:1262, 1982.
- Kants KS, Pollack VE, Cathey M, Goetz D y Berlin R: Multiple use of dialyzers: safety and efficacy. *Kidney Int* 19:728-738, 1981.
- Stimler NP, Bach MK, Bloor CM y Hugli TE: Release of leukotrienes from Guinea pig lung stimulated by C5a desArg anaphylotoxin. *J Immunol* 128:2247-2252, 1982.
- Shaw JO, Pinckard RN, Ferrini KS, McManus L y Hanahan DJ: Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (platelet-activating factor). *J Immunol* 127:1250-1255, 1981.
- Camussi G, Tetta C, Bussofino F, Caligaris-Capio F, Coda R, Masera C y Segoloni C: Mediators of immune-complex induced aggregation of polymorphonuclear neutrophils. II. Platelet-activating factor as the effector substance of immune-induced aggregation. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 64:25-35, 1981.
- O'Flaherty JT, Showell JH, Ward PA y Becker EL: A possible role of arachidonic acid in human neutrophil aggregation and degranulation. *Am J Pathol* 96:799-805, 1979.
- Palmer RMJ y Salmon JA: Release of leukotriene B4 from human neutrophils and its relationship to degranulation induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, serum treated zymosan and the ionophore A23187. *Immunology* 50:65-73, 1983.
- Ford-Hutchinson M: Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-270, 1980.
- Goetzl EJ y Pickett WC: The human PMN leukocyte chemotactic activity of the complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* 125:1786-1789, 1980.
- Demopoulos CA, Pinckard RN y Hanahan DJ: Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-

- 3-phosphocholine as the active component (A new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 254:9355-9358, 1979.
15. Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Boullet C y Polonski J: Semisynthese et structure proposée du facteur activant les plaquettes (PAF) PAF-acether, un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine. *C R Acad Sci (Paris)* 289:1037-1040, 1979.
 16. Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks M y Muirhead EE: Antihypertensive activity of an alkyl ether analogue of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 90:1194-1200, 1979.
 17. Chilton FH, O'Flaherty JT, Walsh CE, Thomas MJ, Wykle RL, DeChatelet LR y Waite M: Platelet-activating-factor stimulation of the lipoxygenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem* 257:5402-5407, 1982.
 18. Lim AH, Morton DR y Gorman RR: Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B4 synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 70:1058-1065, 1982.
 19. Chilton FH, Marshal Ellis J, Olson SC y Wykle RL: 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine a common source of platelet-activating factor and arachidonate in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 259:12014-12019, 1984.
 20. Sánchez Crespo M, Alonso F y Egido J: Platelet-activating factor in anaphylaxis and phagocytosis. I. Release from human polymorphonuclear leukocytes by ionophore A23187 and phagocytosis, but not from degranulating basophils. *Immunology* 40:645-655, 1980.
 21. Boyum A: A one-step procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1 g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest (Suppl)* 21:51-59, 1968.
 22. Salmon J, Simmonds PM y Palmer RMJ: A radioimmunoassay for leukotriene B4. *Prostaglandins* 24:225-230, 1982.
 23. Salmon J, Simmonds PM y Palmer RMJ: Synthesis and metabolism of leukotriene B4 in human neutrophils measured for specific radioimmunoassay. *FEBS Lett* 146:18-26, 1982.
 24. Simmonds J, Salmon PM y Moncada S: The release of leukotriene B4 during experimental inflammation. *Biochem Pharmacol* 32:1353-1359, 1983.
 25. Wykle RL, Malone B y Snyder F: Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-activating lipid. *J Biol Chem* 255:10256-10260, 1980.
 26. Alonso F, García-Gil M, Sánchez Crespo M y Mato JM: Activation of 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine-acetyltransferase during phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 257:3376-3378, 1982.
 27. Mueller HW, O'Flaherty JT y Wykle RL: Biosynthesis of platelet-activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 258:6213-6218, 1982.
 28. Chap H, Mauco G, Simon MF, Benveniste J y Douste-Blazy L: Biosynthetic labelling of platelet-activating factor from radioactive acetate by stimulated platelets. *Nature* 289:312-314, 1981.
 29. Farr RS, Cox CP, Wardlow ML y Jorgensen R: Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin Immunol Immunopathol* 15:318-323, 1980.
 30. Touqui L, Jacquemin C, Dumarey C y Vargaftig BB: 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine is the precursor of platelet-activating factor in stimulated rabbit platelets. Evidence for an alkylacetyl-glycero-phosphorylcholine cycle. *Biochim Biophys Acta* 833:111-118, 1985.
 31. Camussi G, Bussolino F, Tetta C, Caligaris Capio F, Coda R, Machiorlatti E, Albertoni M, Roffinello C y Segoloni G: Effect of prostacyclin (PG I2) on immune-complex induced neutropenia. *Immunology* 48:625-633, 1983.
 32. Camussi G, Tetta C, Bussolino F, Caligaris Capio F, Coda R, Masera C y Segoloni G: Mediators of immune-complex induced aggregation of polymorphonuclear leukocytes. I. C5a anaphylatoxins, neutrophil cationic proteins and their cleavage fragments. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 62:1-12, 1980.
 33. Camussi G, Segoloni G, Rotunno M y Vercellone A: Mechanisms involved in acute granulocytopenia in haemodialysis. Cell-membrane direct interactions. *Int J Artif Organs* 3:123, 1978.
 34. Camussi G, Positi A, Tetta C, Bellone G, Mangiarotti G, Canavese C, Segoloni G y Vercellone A: Mechanisms of neutropenia in haemodialysis (HD). *Trans Am Soc Artif Intern Organs* XXX:364-369, 1984.
 35. Tetta C, Jeantet A, Camussi G, Thea A, Gremo L, Martin PF, Ragni R y Vercellone A: Direct interaction between polymorphonuclear leukocytes (PMN) and cuprophane membranes in a plasma free model of dialysis. *Kidney Int* 26:602 Abstract, 1984.
 36. Prescott SM, Zimmerman GA y Seeger AR: Leukotriene B4 is an incomplete agonist for the activation of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 122:535-541, 1984.
 37. McManus LM, Hanahan DJ y Pinckard RN: Human platelet stimulation by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC). *J Clin Invest* 67:903-906, 1981.