



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ZARAGOZA

CORRELACION DE LA CONCENTRACION SERICA
DE IgE TOTAL Y ACTIVIDAD FUNCIONAL DE
QUIMIOTAXIS, FAGOCITOSIS Y DESTRUCCION
INTRACELULAR DE S. aureus, EN PACIENTES CON
ASMA BRONQUIAL ALERGICA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA DEL PILAR GARCIA MARTINEZ



Mexico, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CONTENIDO	Pag. No.
Introducción	1
Tipos de desencadenantes del asma	2
I Específicos	2
II Inespecíficos	3
Anticuerpos en el asma bronquial atópica	3
Defensa del huésped	4
Inmunidad mediada por células en los pacientes, ... con asma bronquial atópica	4
Planteamiento del problema	6
Objetivos	7
Hipótesis	8
Material y métodos	9
Materiales	9
Métodos	12
Resultados	17
Discusión	34
Conclusión	36
Bibliografía	37

INTRODUCCION

El asma es una enfermedad pulmonar crónica caracterizada por aumentar la irritabilidad del árbol traqueo-bronquial y manifestar episodios recurrentes de obstrucción aérea generalizada, -- usualmente reversible espontaneamente o después de una terapia apropiada.¹

Esta definición ha permitido clasificar el asma en alérgica (extrínseca o atópica) y no alérgica (intrínseca).²

El asma intrínseca, es aquella en la cual la causa no está demostrada pero, la disnea frecuentemente esta asociada con enfermedades respiratorias, inhalantes irritantes, aire frío, estado emocional y ejercicio. Estos pacientes no muestran elevación de anticuerpos IgE en suero, la historia clínica no sugiere hipersensibilidad a alergenos específicos.

El asma extrínseca, es aquella en la cual la enfermedad es causada solamente por alergenos demostrables apareciendo los -- peores síntomas en primavera y verano.^{2,3}

En el año de 1984 Smith determinó que el asma es menos común en zonas tropicales o ciudades poco desarrolladas que en las -- ciudades industrializadas y en zonas templadas.⁴

Ellul-Micallef nos indica que en Kuwait y ciudades áridas y cálidas se tiene una morbilidad del 18% de la población, encontrando variaciones significativas con la edad, nación, origen, -- y estación.⁵

El asma puede iniciarse a cualquier edad, presentándose en -- los niños antes de los 10 años. En el primer año de vida se tiene que el 11% de los infantes son afectados y 6% en el segundo. de estos casos de un 5-7% se considera como asma crónica.^{6,7}

Presentando mayor incidencia los niños con un 14.3% y las niñas 6.3%.

Se ha observado que las niñas en los primeros años presentan -- eczema que se ha correlacionado solamente como un factor de -- riesgo.

Los niños son más susceptibles al desarrollo del asma incluso cuando los padres o hermanos tienen asma o rinitis alérgica.⁷

Edfor-Slubs confirma cierta predisposición genética obteniendo una concordancia del 19% para los monocigotos y 4.8% para dicigotos; siendo de esta manera los factores ambientales más importantes que los factores genéticos.

La mortalidad por el asma se ha incrementado el 10% de 1979 a 1983, en la mayor parte de las regiones de Estados Unidos Americanos, en muchos estados y también en diversas ciudades. La - Revision of the International Classification of Diseases, atribuye estos cambios a un incremento en la prevalencia y/o severidad del asma.⁹

TIPOS DE DESENCADENANTES DEL ASMA BRONQUIAL ATOPICA

I. ESPECIFICOS

a) Inhalantes

Varias revisiones sugieren que los antígenos extrínsecos juegan un papel importante en la etiología de la mayoría de los pacientes con asma, existiendo muchos enfermos sensibles al polvo de los hogares, el cual está compuesto por componentes orgánicos como son caspa, cabellos humanos, pelo de animales, restos corporales, excretas de insectos, vegetales celulosas, esporas de hongos, (Alternaria tenuis, Cladosporium herbarum, penicillun notatum, Aspergillus niger, Mucor mucedo y Rhizopus nigricans) polen, (olivo, fresno, sauce, nogal, etc...)

En un estudio realizado en Australia con niños asmáticos se demostró que más del 85% eran alérgicos al ácaro dermatophagoides.¹⁰

b) Sustancias ingeridas

La absorción de alérgenos en el intestino digestivo puede conducir a la producción de anticuerpos IgE con síntomas alérgicos consecutivos a los alimentos, los aditivos de los alimentos,

y a los medicamentos (aspirina, penicilina, quinina).

c) Bacterias

Los germenés más usuales son: estreptococos, neumococos y es tafilococos, pudiendo intervenir la flora faríngea saprófita.

d) Contactos

Dentro de los alérgenos se encuentran la lana, algodón fi-- bras vegetales, plumas, los animales como el perro y el gato -- (pelo, caspa, epitelios).^{11,12,13}

II. DESENCADENANTES INESPECIFICOS

En términos generales se reconocen los factores físicos y -- psíquicos.

Factores físicos: predominan los climáticos (frío excesivo, cambios de temperatura bruscos, corrientes de aire, humedad), - agentes ambientales (olor de productos químicos, humo de automó viles, tabaco y de las industrius) y sobreesfuerzo físico.

Factores psíquicos: como consecuencia de la intervención ex- clusiva de los factores psicológicos y ambientales se desencade nan crisis disneizantes (pseudoasma).

Los niños, que por su desarrollo psíquico moldeado por el am biente familiar o conflictos, muestran esta especial predisposi ción.¹²

ANTICUERPOS EN ASMA BRONQUIAL ATOPICA

Desde el descubrimiento de la inmunoglobulina IgE se han acu mulado muchos conocimientos relacionados con los eventos molécu lares y celulares en las reacciones alérgicas:¹⁴ determinándose en pacientes con aczema atópico un incremento en la concentra-- ción sérica de IgE, que puede variar según la extensión de la - piel.^{13,18,19}

Considerando tres estudios diferentes en los cuales se mide la concentración de la inmunoglobulina IgE, nos indica que el - 62%, 76% y 77% de los pacientes con asma atópica presentan los

niveles elevados.^{18,19,20}

Es importante indicar que una considerable minoría de los pacientes con asma alérgico en estos estudios presentan niveles de IgE relativamente normales. Por eso el nivel total de IgE no es altamente específico como prueba de diagnóstico en las enfermedades alérgicas, y un nivel normal nunca debe interpretarse como un caso exento de asma.¹⁴

DEFENSA DEL HUESPED

Actualmente se sabe que los fagocitos, son las células de defensa más importantes, contra la invasión. Se ha determinado -- también que estas células son incapaces de fagocitar algunos invasores, si estos no están opsonizados previamente.^{20,21,22}

Leijh confirma que para el funcionamiento óptimo de la fagocitosis y muerte intracelular se requiere de factores del suero llamadas opsoninas como son las inmunoglobulina IgG junto con C_{3b} de complemento. Siendo concebible que en ciertas enfermedades la estimulación extracelular por factores del suero son perjudiciales, los cuales dan una muerte defectuosa en el sitio de inflamación e infecciones prolongadas.²³

Otros estudios indican que durante un período de remisión -- clínica y ciertas enfermedades nos dan una ingestión normal, bajo ciertas condiciones y la muerte intracelular es afectada durante dicho estado.^{24,25}

El suero de pacientes con deficiencia selectiva de C_2 no muestra destrucción eficiente " in vitro " de S.aureus 502A por polimorfonucleares en presencia de suero normal.²⁶ Este suero, sin embargo, fué capaz de promover la destrucción de E. coli, sugiriendo que C_2 puede ser requerido para la opsonización de algunas bacterias.²⁶

INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS EN LOS PACIENTES CON ASMA BRONQUIAL ATOPICA.

Se ha informado que en individuos con enfermedades atópicas

se presenta asma bronquial, eczema y defectos en la inmunidad celular.²⁷ Además se ha observado en algunos estudios clínicos en pacientes con enfermedades atópicas un incremento en la concentración de IgE.

Grove observó en pacientes con asma bronquial que sus linfocitos tienen reducida su capacidad de transformación linfoblástica al ser estimulados con fitohemaglutinina; así mismo en estos pacientes se encontró un defecto en la reacción cutánea de hipersensibilidad retrasada con antígeno de toxoide tetánico.²⁸

En estudios previos "in vitro" realizados en pacientes asmáticos se han demostrado que se encuentra reducida la capacidad de los linfocitos T para formar rosetas.²⁹

En otros estudios se ha observado que los pacientes con enfermedades atópicas presentan gran proliferación bacteriana en la piel; no ha podido aclararse totalmente la razón de esta incapacidad para controlar las infecciones cutáneas en los pacientes con eczema atópico; sin embargo, se ha observado en algunos pacientes con dicho padecimiento e infecciones recurrentes, un defecto funcional de las células polimorfonucleares.³⁰

Clark nos informa que el defecto en la quimiotaxis leucocitaria y las anomalías en la inmunidad celular en estos pacientes, son factores importantes en la marcada susceptibilidad que se tiene por las infecciones recurrentes.³¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que el asma atópico se inicia en la mayoría de los casos durante la etapa infantil, siendo causa común de ausencia escolar, de hospitalización repetida (cuya mortalidad se ha incrementado en un 10% de 1979 a 1983) y tomando en cuenta que actualmente no existen estudios acerca de las funciones de las células polimorfonucleares (Quimiotaxis, Fagocitosis y Destrucción Intracelular) en asmáticos de edad pediátrica, desconociéndose la relación que existe de estos con los niveles séricos de la inmunoglobulina IgE. Se consideró importante realizar este estudio para poder establecer en que etapa se encuentra deteriorada la actividad funcional de las células polimorfonucleares y poder darle un tratamiento efectivo al paciente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Establecer la relación entre Síndrome de Hiperinmunoglobulinemia E y la actividad funcional de las células PMN*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

2. Demostrar que los pacientes con asma bronquial atópica cursan con un deterioro de la actividad quimiotáctica de las cé PMN*
3. Determinar en niños con asma bronquial atópica la capacidad de las células PMN* de destrucción intracelular y la fagocitosis de S. aureus.
4. Evaluar por medio del método Inmuno-enzimático, los niveles séricos de IgE en niños con asma bronquial atópica.

* PMN Polimorfonucleares.

H I P O T E S I S

Tomando en cuenta que los niños con asma bronquial atópica -- presentan inmunidad celular disminuída, esperamos, que en estos pacientes exista deterioro en la actividad funcional de quimiota xis, fagocitosis y destrucción intracelular. Asimismo, es posi- ble que estén correlacionados con el Síndrome de Hiperinmunoglo- bulinemia E.

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES

Material humano:

- Grupo de 15 pacientes con diagnóstico de Asma Bronquial atópica.
- Grupo control de 14 niños clinicamente sanos.
- 8 ml. de sangre heparinizada.
- 2 ml. de sangre coagulada.

Material biológico:

- Cultivo se Staphylococcus aureus; cepa ATCC 25923.

Material de laboratorio:

- | | |
|--|---------------------------|
| - Tubos cónicos de poliestireno 15 ml. | Nalgene |
| - Jerigas de plástico de 1, 10 y 20 ml. | B/D Plastipak |
| - Pipeta Pasteur de vidrio. | Kimble |
| - Filtros de celulosa de tipo HA de 0.4 um | Millipore |
| - Matraz de fondo plano de 500 ml. | Pyrex |
| - Matraz de fondo plano de 1000 ml. | Pyrex |
| - Matraz aforado de 1000 ml. | Pyrex |
| - Cajas de Petri. | Pyrex |
| - Tubos de vidrio con tapón de rosca. | Pyrex |
| - Tubos de ensayo de 5 y 15 ml. | Pyrex |
| - Pipeta serológica de 0.1, 5 y 10 ml. | I. Argentina |
| - Pipeta serológica de 1.0 ml. | W. Germán |
| - Pipeta de Thoma para leucocitos. | Proper-Trophy |
| - Hemacitómetro | Oxford |
| - Micropipetas 50, 200, 500 y 1000 ul. | Clinicon
International |
| - Cámara de Boyden | American Optical |

- Portaobjetos No. 1 (18 x 18) Corning
- Lavador automático. Cordis
- Cubreobjetos. Madesa
- Papel parafilm.

Equipo:

- Centrífuga, International Centrifuge modelo CS.
- Microscopio óptico, Carl Zeiss.
- Agitador de tubos Vortex, Super mixer Mo. 1290.
- Contador de colonias, Darkield Quebec modelo 3325.
- Espectrofotómetro, sp 8-100 Pye UNICAM.
- Potenciómetro, Internacional Científica modelo E 510.
- Bomba de vacío, Celman Instrument Company, modelo E 510.
- Estufa de incubación, Comercial de Abastecimiento S. de R.L. modelo 52.
- Balanza granataria, Ohaus.
- Balanza analítica, Sartorius 2462.

Reactivos.

- Heparina. Lipo-Heparin
- Solución salina (0.9). Pisa
- Penicilina 1 000,000 U. Lakeside
- Estreptomicina Lakaside
- Suero fetal Difco.
- Agar selectivo No. 110 Merck
- Caseína Sigma
- Rojo de fenol Sigma
- Resina Sigma
- Cloruro de sodio P. Químicos Monterrey
- Dextrosa anhidra P. Químicos Monterrey
- Bicarbonato de sodio. P. Químicos Monterrey
- Metanol. P. Químicos Monterrey

- Etanol. Merck
- Fosfato de potasio Baker Chemical Co.
- Cloruro de calcio Baker Chemical Co.
- Fosfato de sodio dibásico. heptahidratado. Mallenckrodt Chemical Works.
- Cloruro de potasio Mallenckrodt Chemical Works.
- Xileno. P. Químicos Monterrey
- L equipo de Enzygnost-IgE. Behring Institute.

M E T O D O S

MEDICION DE LA QUIMIOTAXIS DE LAS CELULAS PMN.³² Utilizar -- 2.0 ml de sangre heparinizada, dejarla sedimentar espontáneamente. Separar el plasma rico en leucocitos. Ajustar a una suspensión celular de 3×10^6 cel/ml. Utilizar como agente quimiotáctico caseína en solución de Hank a una concentración de 5mg/ml en cámara de Boyden modificada con membranas (filtros Millipore-MF) con microporos de 3µm de diámetro de diámetro. Leer las preparaciones en microscopio óptico y contar el número de células en cinco campos al azar.

DESTRUCCION INTRACELULAR DE Staphylococcus aureus.³³ Preparar un cultivo de 24 hrs. de Staphylococcus aureus (ATCC25923) en caldo nutritivo BHI. Al día siguiente centrifugar el cultivo a 1500g x 10min y lavar tres veces con NaCl al 0.9%, resuspender en una solución amortiguadora de Hank hasta obtener una suspensión final de una lectura de 0.6 a una D.O de 650 nm.

Diluir esta suspensión 1:50 con Hank's conteniendo una mezcla de suero humano normal al 10%.

Tomar 6 ml de sangre heparinizada tanto del paciente como -- del testigo, y dejar sedimentar los leucocitos lavar tres veces con Hank's y realizar una suspensión final que contenga 3×10^6 cel/ml. Etiquetar 6 tubos estériles de la siguiente manera:

	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	T ₁₂₀	T _{C1}
Susp. de bacterias (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Susp. de leucocitos(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Sol. de Hank (ml)	-	-	-	-	-	0.5

Incubar los tubos a 37°C con agitación durante 30 min para -- producir la fagocitosis.

Posteriormente centrifugar los tubos excepto el tubo T_{C1} a -- 400g x 10 min. Uno de los sobrenadantes guardan en otro tubo -- etiquetado como T_{C2}, tirar los demás sobrenadantes y resuspender los depósitos en Hank's conteniendo el 10% de suero fetal --

de ternera, 100 U de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina para destruir las bacterias extracelulares.

	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	T ₁₂₀	T _{C1}	T _{C2}
Reincubar los tubos de los tiempos	-	+	+	+	+	-	-
Centrifugar 400g x 10'	+	+	+	+	+	-	-
Lavar los sedimentos 3 veces con Hank's.	+	+	+	+	+	-	-
Resuspender los depósitos en 1 ml de agua estéril.	+	+	+	+	+	-	-
Congelar y descongelar 2 veces.	+	+	+	+	+	-	-
Diluir 1:100	+	+	+	+	+	-	+
Diluir 1:1000	-	-	-	-	-	+	-

Depositar una alícuota de 0.05 ml de cada dilución en una caja de Petri con agar 110, extender la gota perfectamente en toda la caja, dejar incubando las cajas a 37°C por 48 hrs. y realizar una cuenta bacteriológica.

Calcular los resultados en por ciento (%) a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

Del total de bacterias obtenidas en el tubo T_{C1} menos el total de bacterias obtenidas en el tubo T_{C2} se obtendrá el total de bacterias fagocitadas por los leucocitos.

ABREVIATURAS.

- T₀ = Tubo a los cero minutos.
- T₃₀ = Tubo a los treinta minutos.
- T₆₀ = Tubo a los sesenta minutos.
- T₉₀ = Tubo a los noventa minutos.
- T₁₂₀ = Tubo a los ciento veinte minutos.
- T_{C1} = Tubo control de bacterias.
- T_{C2} = Tubo con bacterias no fagocitadas.

PRUEBA INMUNO-ENZIMATICA PARA LA DETERMINACION DE IgE.

Extraer tanto del paciente como del testigo, mediante punción percutánea, 2 ml de sangre venosa, dejarla coagular y separar el suero el cual será congelado a -70°C para determinar posteriormente la concentración sérica de IgE.

Realizar las determinaciones por duplicado. Se utiliza el --- equipo de Enzygnost IgE, para dichas determinaciones.

El equipo contiene:

1. Tubos con antiIgE humana; los tubos contienen anticuerpos de cabra.
2. Anti-IgE/POD conjugada (anti-IgE humana, peroxidasa conjugada de conejo).
3. Amortiguador conjugado (IgE): para anti-IgE/POD conjugada.
4. Suero estandar de IgE S₁ a S₅ (10, 25, 100, 500, 1000 IU/ml).
5. Suero control de IgE (90 ± 18 IU/ml).
6. Medio de incubación (preservativo azida de sodio).
7. Solución lavadora POD (concentrado): amortiguador de fosfato conteniendo Tween.
8. Amortiguador/sustrato POD: peróxido de hidrógeno en amortiguador de fosfato de citrato.
9. Cromogeno.
10. Solución inhibidora POD (Ac. sulfurico 0.5N).
11. Cinta adhesiva.

Preparacion de soluciones.

Diluir 50 ul de la solución lavadora (concentrada a 1000 ml con agua destilada).

Adicionar 200 ul de anti-IgE/POD conjugada al vial de amortiguador conjugado (IgE 11ml) y mezclar con agitación suave, que equivale a la solución conjugada.

Diluir 50 ul de cada estandar S_1 a S_5 , el suero control y las muestras a determinar con 500 ul del medio de incubación.

PROCEDIMIENTO

91

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TUBOS	IDENTIFICACION	SUERO DILUIDO		SOLUCION CONJUGADA				CROMOGENO AMORTIGUADOR SUSTRATO		SOLUCION INHIBIDORA.		
1-2	10IU/ml	200 u1	TAPAR E INCUBAR POR 2 HRS (+ 10 MIN) DE 20 A 25°C. LAVAR CON 2 ML DE SOLUCION LAVADORA 2 VECES.	200 u1	INCUBAR 2 HRS (+ 10 MIN) DE 20 A 25°C. LAVAR 3 VECES CON SOLUCION LAVADORA.	TRANSFERIR 10 ML DE LA S. AMORTIGUADORA/SUSTRATO AL VIAL DE CROMOGENO.		200 u1		1 ml	MEDIR EN EL FOTOMETRO A 492 nm.	
3-4	25IU/ml	200 u1		200 u1			200 u1	200 u1	200 u1	200 u1		1 ml
5-6	100IU/ml	200 u1		200 u1			200 u1	200 u1	200 u1	200 u1		1 ml
7-8	500IU/ml	200 u1		200 u1			200 u1	200 u1	200 u1	200 u1		1 ml
9-10	1000IU/ml	200 u1		200 u1			200 u1	200 u1	200 u1	200 u1		1 ml
11-12	S. control	200 u1		200 u1			200 u1	200 u1	200 u1	200 u1		1 ml
12-13	etc.	200 u1		200 u1			200 u1	200 u1	200 u1	200 u1		1 ml

CALCULOS

Medir las extinciones y obtener la media. Realizar una gráfica de concentración contra absorción en papel smilogarítmico para la curva de referencia.

R E S U L T A D O S

Se estudiaron 15 pacientes con el diagnóstico de asma bronquial atópica con edades entre 3 y 15 años.

A todos los pacientes que recibían tratamiento se les suspendió la administración 48 horas antes de la toma de especímenes de sangre para la realización de las pruebas.

Los resultados se analizaron en la computadora Burroughs 7800 del Programa de Computo Académico de la UNAM, utilizando el paquete computarizado SPSS con los métodos de Análisis de Varianza y Análisis Discriminante.

Análisis de Varianza.

En este método se formularon dos hipótesis:

$$H_0 : I_{gE_T} = I_{gE_A} \quad T = \text{testigo (niños sanos)}$$

$$H_1 : I_{gE_T} \neq I_{gE_A} \quad A = \text{asmáticos}$$

Tomando la siguiente regla de decisión:

Si F_{cal} es mayor que F_{tablas} ($\alpha=0.05$) y 27 grados de libertad proporcionales a las pruebas de contrastación. Se rechaza H_0 , los grupos no son iguales y las diferencias son debido a la variabilidad biológica de las unidades de experimentación.

Prueba de Destrucción Intracelular de Staphylococcus aureus.

Se midió la capacidad de destrucción intracelular de los polimorfonucleares de los pacientes con asma bronquial atópica a diferentes tiempos; 0, 30, 60, 90 y 120 minutos, observándose que la viabilidad bacteriana disminuía del 100 por ciento en el tiempo cero, 51.11% (30'), 32.25% (60'), 22.93% (90'), 24.67% (120') (tabla 1 gráfica 1).

Estas cifras promedio se comparan con los observados en el grupo testigo que fueron de 36.48% (30'), 21.09% (60'), 13.05% (90') y 6.92% (120') observar (tabla 2, gráfica 1).

Utilizando el método de Análisis de Varianza se tiene que se rechaza H_0 ($p = 0.05$, F de Fisher) en los tiempos mencionados anteriormente, por lo cual las diferencias son debidas al padecimiento (tabla 6).

Prueba de Fagocitosis de Staphylococcus aureus.

Al medir la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares de los pacientes con asma bronquial atópico, se observó que fagocitan el 96.27% de las bacterias y 96.75% en los testigos (tabla 3 y 4, gráfica 2).

Utilizando el Análisis de Varianza se acepta H_0 ($p = 0.05$, F de Fisher) por lo cual la diferencia se debe a la variabilidad biológica de las unidades de experimentación (tabla 6).

Quimiotaxis en Cámara de Boyden.

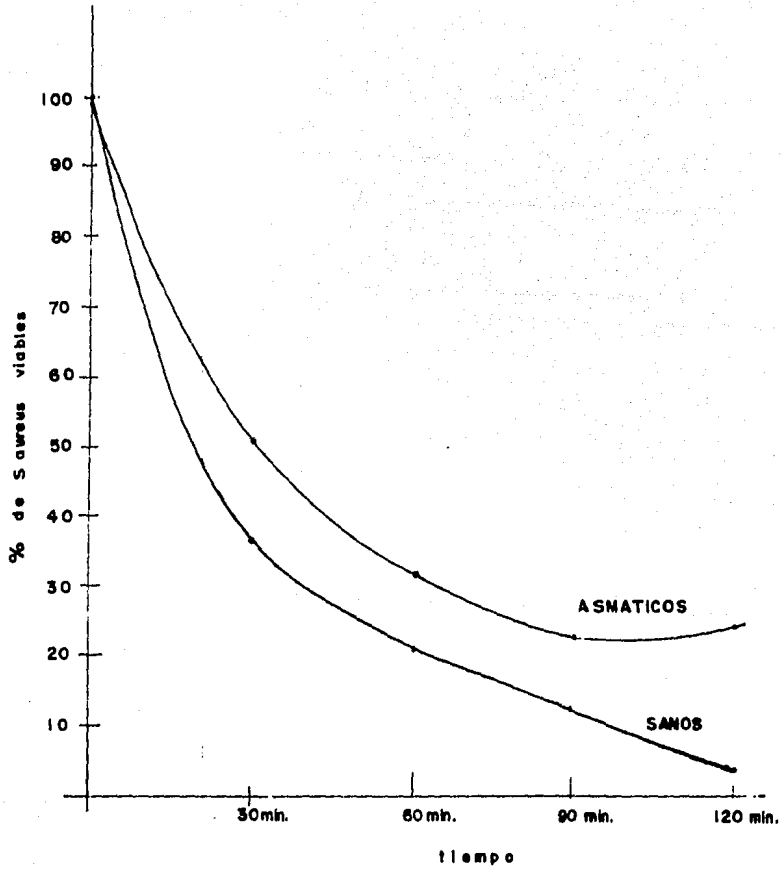
Se determinó la actividad quimiotáctica inducida y espontánea en los pacientes con asma bronquial atópica obteniéndose valores de 39.88 cel/c y 80.99 cel/c respectivamente las cuales se compararon con el grupo testigo obteniéndose 26.66 cel/c para la quimiotaxis espontánea y 43.44 cel/c para la inducida (tabla 5 gráfica 3).

TABLA No. 1

DESTRUCCION INTRACELULAR DE STAPHYLOCOCCUS aureus EN EL GRUPO TESTIGO					
TESTIGO No.	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
	%	%	%	%	%
1	100	31.88	21.88	15.09	10.14
2	100	46.39	25.67	14.41	9.90
3	100	41.00	29.16	13.88	5.50
4	100	37.75	23.46	12.24	6.12
5	100	31.36	24.95	18.50	6.41
6	100	30.42	11.97	7.04	5.63
7	100	34.55	15.93	10.29	5.80
8	100	37.68	20.88	19.50	6.80
9	100	35.50	22.88	10.00	5.33
10	100	45.00	25.00	13.63	4.50
11	100	40.00	20.00	11.66	8.30
12	100	31.57	15.78	12.28	7.00
13	100	36.60	20.00	16.60	10.00
14	100	31.10	17.70	7.70	5.50
\bar{X}		36.48	21.09	13.05	6.92
s		4.90	4.45	3.54	1.83

TABLA No. 2

DESTRUCCION INTRACELULAR DE STAPHYLOCOCCUS aureus EN EL GRUPO ASMATICO					
PACIENTE No.	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
	%	%	%	%	%
1	100	44.48	22.06	20.91	19.18
2	100	36.30	25.33	21.20	18.76
3	100	78.09	32.85	13.80	21.42
4	100	58.27	45.63	38.93	28.39
5	100	32.13	29.12	26.93	26.39
6	100	38.00	60.76	46.15	46.98
7	100	37.07	28.78	38.17	22.15
8	100	51.81	29.09	8.18	32.72
9	100	52.38	25.75	9.52	19.04
10	100	72.78	30.59	31.62	17.46
11	100	62.83	20.35	17.69	15.04
12	100	42.78	28.85	10.12	19.40
13	100	32.78	22.13	12.29	17.10
14	100	45.65	28.35	9.40	20.28
15	100	81.37	54.16	38.88	45.83
X		51.11	32.25	22.93	24.67
s		15.77	11.46	12.50	9.62



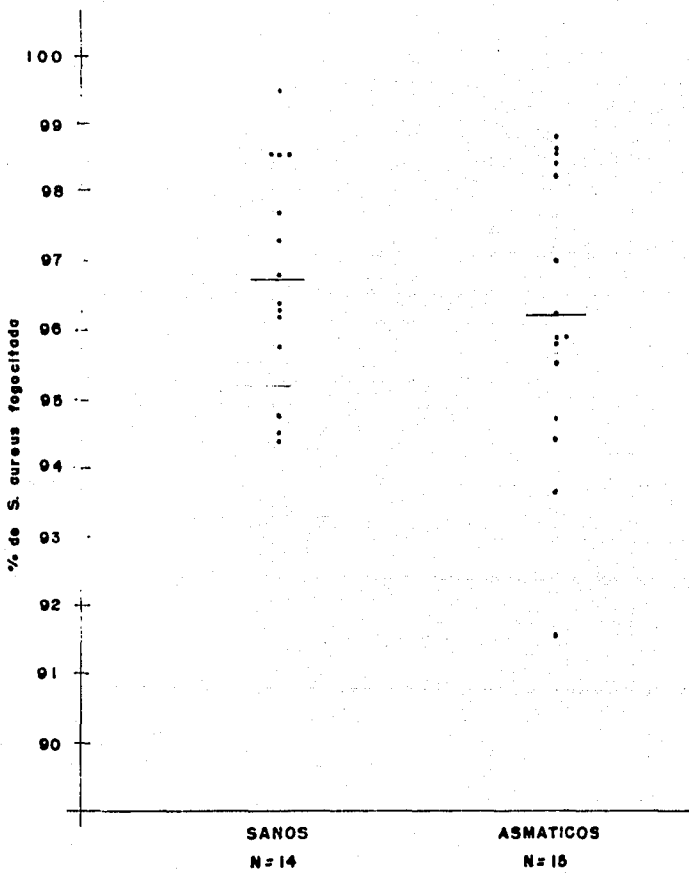
GRAFICA 1: Destrucción intracelular de *S. aureus*: valores promedio obtenidos a los diferentes tiempos, ambos grupos.

TABLA No. 3

FAGOCITOSIS DE STAPHYLOCOCCUS aureus EN EL GRUPO TESTIGO				
	TOTAL DE BACTERIAS OBTENIDAS			% DE BACTERIAS
	CONTROL 1	CONTROL 2	CONTROL L ₁ CONTROL L ₂	FAGOCITADAS
TESTIGO No.	X 10 ⁶	X 10 ⁶	X 10 ⁶	
1	2.38	0.034	2.34	98.57
2	2.80	0.104	2.69	96.28
3	3.93	0.142	3.78	96.38
4	2.54	0.373	2.50	98.53
5	3.28	0.172	3.108	94.75
6	2.93	0.043	2.88	98.53
7	3.60	0.017	3.58	99.52
8	3.24	0.136	3.10	95.80
9	2.28	0.061	2.21	97.31
10	2.62	0.146	2.47	94.42
11	2.70	0.148	2.55	94.51
12	2.70	0.110	2.59	95.92
13	2.48	0.078	2.40	96.85
14	2.72	0.075	2.64	97.24
X	2.87	0.117	2.77	96.75
s	0.45	0.084	0.44	1.56

TABLA No. 4

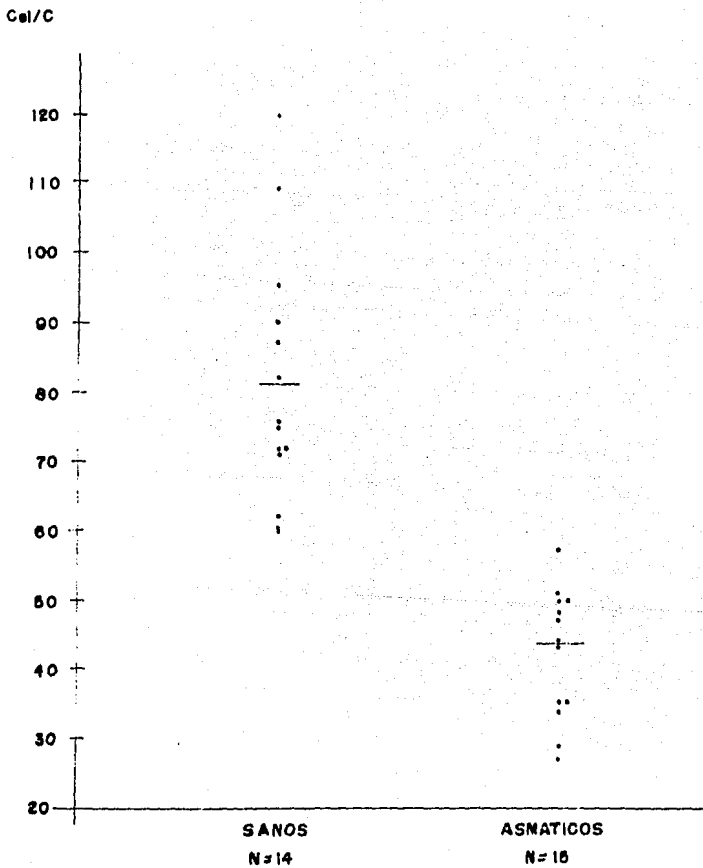
FAGOCITOSIS DE STAPHYLOCOCCUS aureus EN EL GRUPO ASMÁTICO				
PACIENTE No.	TOTAL DE BACTERIAS OBTENIDAS			% DE BACTERIAS
	CONTROL 1	CONTROL 2	CONTROL L ₁ CONTROL L ₂	FAGOCITADAS
	X 10 ⁶	X 10 ⁶	X 10 ⁶	
1	2.92	0.246	2.67	91.55
2	2.32	0.086	2.24	96.27
3	3.20	0.136	3.06	95.75
4	3.30	0.146	3.15	95.57
5	2.40	0.027	2.37	98.86
6	3.09	0.172	2.91	94.43
7	3.14	0.200	2.94	93.63
8	2.95	0.045	2.90	98.47
9	3.00	0.042	2.95	98.60
10	3.10	0.146	2.95	95.94
11	2.98	0.155	2.82	94.79
12	3.45	0.059	3.39	98.28
13	2.70	0.116	2.59	95.92
14	2.55	0.038	2.51	98.50
15	2.40	0.067	2.33	97.00
X	2.90	0.112	2.78	96.27
s	0.33	0.064	0.31	2.01



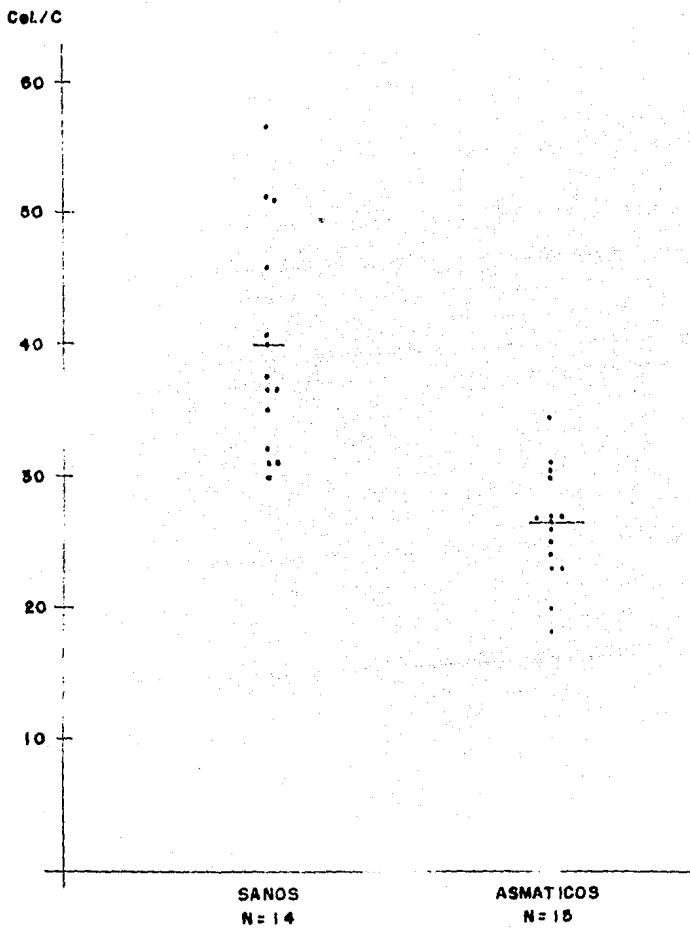
GRAFICA 2 : Porcentaje de bacterias fagocitadas en el grupo sano y grupo asmático.

TABLA No. 5

QUIMIOTAXIS EN CAMARA DE BOYDEN					
TESTIGOS			ASMATICOS		
CEL/C			CEL/C		
TESTIGO No.	ESPONTANEA	INDUCIDA	PACIENTE No.	ESPONTANEA	INDUCIDA
1	30.00	59.75	1	34.50	43.40
2	31.00	62.33	2	18.40	27.40
3	32.20	72.25	3	20.00	29.30
4	37.33	76.00	4	26.20	41.20
5	31.00	60.75	5	30.75	47.00
6	57.20	120.00	6	29.20	53.60
7	38.20	71.00	7	31.60	57.20
8	51.40	90.00	8	26.75	40.50
9	40.60	87.20	9	23.00	34.00
10	39.95	75.00	10	25.20	51.00
11	35.20	82.50	11	27.40	44.00
12	37.40	72.50	12	30.00	50.00
13	51.20	109.20	13	27.00	48.00
14	45.75	95.40	14	23.00	35.00
X	39.88	80.99	X	26.66	43.44
s	8.22	17.24		4.18	8.56



GRAFICA 3: Quimiotaxis inducida en el grupo sano y asépticos



GRAFICA 4 : Quimiotaxis Espontánea en el grupo sano y asmático

TABLA No. 6

ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	M. C.	F _s
IgE I II	1 27	2910191.00 11745932.00	2910191.00 435034.51	6.68
QUIMIOTAXIS ESPONTANEA I II	1 27	1265.54 1210.18	1265.54 41.73	30.32
QUIMIOTAXIS INDUCIDA I II	1 27	10202.08 5264.74	10202.08 194.99	52.32
FAGOCITOSIS I II	1 27	1.87 96.29	1.87 3.56	0.52
DESTRUCCION INTRACELULAR (30') I II	1 27	1549.69 4080.04	1549.69 151.11	10.25
DESTRUCCION INTRACELULAR (60') I II	1 27	903.17 1888.69	903.17 69.95	12.91
DESTRUCCION INTRACELULAR (90') I II	1 27	544.28 2686.49	544.28 99.49	5.47
DESTRUCCION INTRACELULAR (120') I II	1 27	2282.11 1436.64	2282.11 53.20	42.89

$F_{0.05}(27) = 4.25$ (TABLAS)

ABREVIATURAS

G.L.	=	GRADOS DE LIBERTAD
S.C.	=	SUMA DE CUADRADOS
M.C.	=	MEDIA DE CUADRADOS
F_s	=	ESTADISTICO MUESTRAL
I.	=	VARIACION ENTRE NIÑOS TESTIGO
II.	=	VARIACION ENTRE NIÑOS ASMATICOS

Análisis Discriminante.

Para seleccionar las pruebas de laboratorio que determinan -- las diferencias entre los niños asmáticos y testigos, se decidió realizar un análisis discriminante, utilizando el criterio de -- Wilks.

Del análisis discriminante se obtuvo una función dicriminan-- te mediante la cual vamos a conocer la influencia que tiene cada variable en la diferenciación entre grupos. (tabla 7)

De acuerdo a los coeficientes asociados a las variables se ob-- serva que las pruebas de laboratorio que más contribuyen a dife-- renciar entre los niños asmáticos y testigos son: Inmunoglobuli-- na IgE, quimiotaxis inducida, destrucción intracelular a los --- tiempos (30, 60 y 120 minutos); cuyos coeficientes son: 0.35681, -0.71862, 0.29963, -0.87095 y 1.23029 respectivamente. Al multi-- plicar estos coeficientes por los valores de cada variable aso-- ciada obtenemos una función que es una combinación lineal.

La combinación lineal de los cincí parámetros es:

$$D = 0.35681 - 0.71862 + 0.29963 - 0.87095 + 1.23029$$

El objeto de esta función es que exista una máxima separación entre los dos grupos. Observando la fig. (1) se aprecia que el - grupo testigo tiene valores D negativos y el grupo de los asmáti-- cos tienen valores D positivos.

Por medio del Análisis de Varianza se rechaza H_0 siendo los - grupos diferentes y las diferencias se debe al padecimiento.

Determinación de IgE.

Se determinó la concentración sérica de IgE total en los pa-- cientes con asma bronquial atópica obteniéndose valores de -- 815.8 UI/ml. la cual se comparó con el grupo testigo obteniendose 181.85 UI/ml. (tabla 8, gráfica 5).

Utilizando el método de Análisis de Varianza se tiene que se rechaza H_0 (p 0.05, F de Fisher) por lo cual las diferencias -- son debidas al padecimiento.

TABLA 7

COEFICIENTES DE LA FUNCION DISCRIMINANTE

VARIABLES		COEFICIENTES
V ₂	IgE	0.35681
V ₄	QUIMIOTAXIS INDUCIDA	-0.71862
V ₆	DESTRUCCION I. (30')	0.29963
V ₇	DESTRUCCION I. (60')	-0.87095
V ₉	DESTRUCCION I. (120')	1.23029

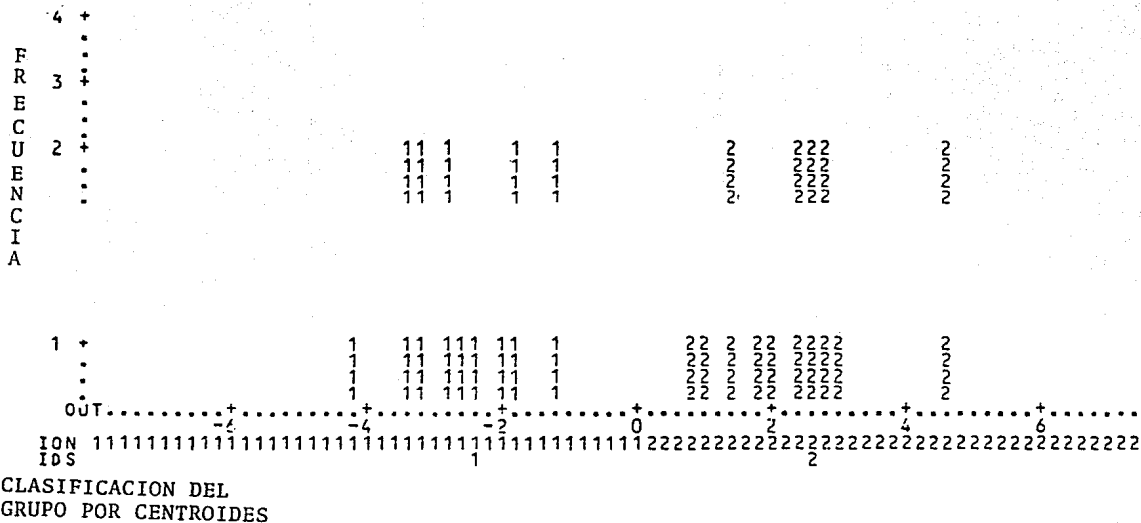
TABLA 8

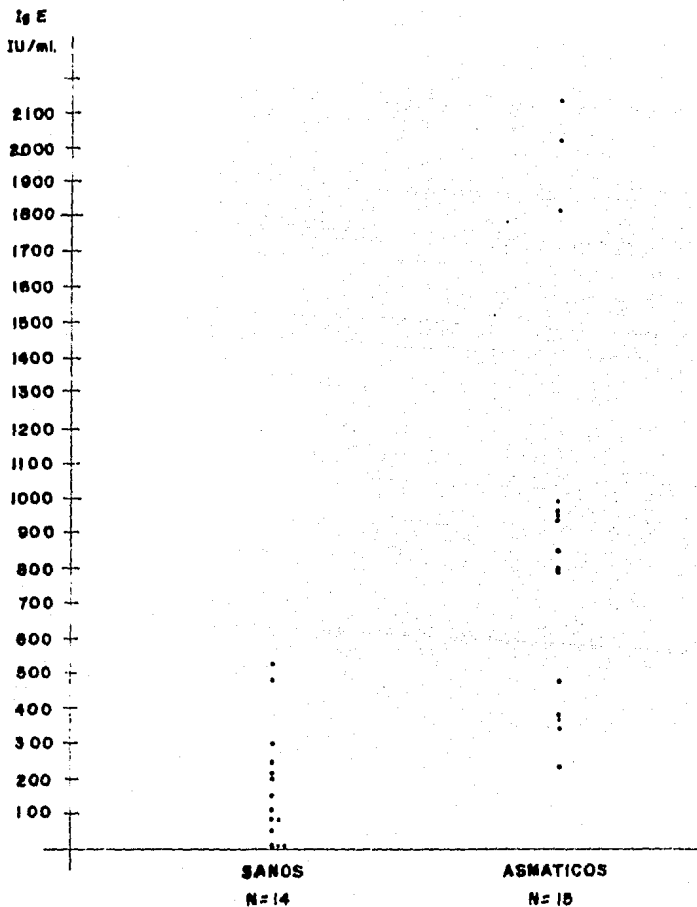
DETERMINACION DE IgE

TESTIGOS (UI/ML)	ASMATICOS (UI/ML)
150	1450
220	950
88	340
23	235
480	370
105	960
27	1400
520	1100
183	940
250	478
24	995
54	380
300	840
122	800
	999
\bar{X} 181.85	815.36
s 154.24	366.19

FIGURA 1.

HISTOGRAMA DE TODOS LOS GRUPOES DE INTERES
 FUNCION CANONICA DISCRIMINANTE





GRAFICA 5: Niveles séricos de IgE total en ambos grupos

D I S C U S I O N

McGeady y Buckley²⁷ han descrito que es característico en -- los pacientes alérgicos tener una excesiva producción de anti-- cuerpo IgE, admirándose desde entonces de una depresión en la - inmunidad celular.

En este estudio se confirma esta observación, ya que los ni-- veles séricos de IgE de los niños asmáticos es de 815.8 Ui/ml - siendo diferente respecto a las cifras de los niños testigo que es de 181.Ui/ml.

Recientemente se ha identificado un deterioro en la activi-- dad de quimiotaxis de los neutrófilos y monocitos en un grupo - de trastornos clínicos similares hiperinmunoglobulinemia E, in-- fecciones recurrentes y dermatitis atópica.³¹

En este estudio se encontraron resultados que demuestran que los pacientes con asma bronquial atópica cursan con un deterio-- ro de la actividad quimiotáctica de las células polimorfonuclea-- res; sin embargo, al realizar el análisis discriminante la qui-- miotaxis espontánea no es una prueba de laboratorio que sea --- útil para diferenciar a los grupos y la quimiotaxis inducida es una determinación que diferencia los dos grupos.

Este defecto " in vitro " se correclaciona con una reducción en la migración de leucocitos " in vivo " puesto que en estudi-- os realizados se ha observado que el suero de los pacientes es capaz de generar cantidades normales de factores quimiotácticos.

Leijh et .al.²⁵ confirman que las inmunoglobulinas y compo-- nenetes del completo son requeridos para la ingestión y muerte óptima de microorganismos por los granulocitos.

Se determinó que la muerte intracelular de los microorganis-- mos por los granulocitos requieren funcionamiento normal de los receptores F_c y C_{3b} .

Por otra parte Yamamura y Valdimarsson³⁴ mostraron que C_{3b} no es esencial para la ingestión de Candida albicans pero parti-- cipa en la muerte fagocítica de estos microorganismos.

Analizando los resultados obtenidos se determina que la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares de los pacientes asmáticos no mostraron alteraciones al compararlas con los resultados obtenidos en el grupo control lo que corrobora que la actividad fagocítica de los polimorfonucleares es normal.

Sugiriendo que al no ser esencial C_{3b} para la ingestión pasa inadvertida la alteración de los receptores C_{3b} en la membrana de los granulocitos ya que se puede llevar a cabo una buena ingestión, debido a esta alteración de los receptores F_c y C_{3b} se debe que la destrucción intracelular se encuentra disminuída.

C O N C L U S I O N

- Los pacientes con asma bronquial atópica cursan con deterioro de la actividad quimiotáctica de las células polimorfonucleares, determinando que esta alteración se debe al padecimiento.
- En los niños con asma bronquial atópica la capacidad de las células polimorfonucleares de destrucción intracelular de Staphylococcus aureus se encuentra disminuída comparándola con la capacidad de destrucción intracelular en los niños del grupo testigo. Sin embargo en ambos grupos la capacidad fagocitica se encuentra normal.
- Los niveles séricos de IgE total en los niños asmáticos se encuentran elevados. No obstante dicha determinación no es una prueba satisfactoria para el diagnóstico de asma bronquial atópica.
- Al realizar el análisis discriminante de dichas pruebas de laboratorio se determinó que la IgE, quimiotaxis inducida, destrucción intracelular en los tiempos (30, 60 y 120 minutos) -- son los que nos permiten diferenciar entre los niños clínicamente sanos y asmáticos.
- Al establecer la relación entre Síndrome de hiperinmunoglobulinemia E y la actividad funcional de las células polimorfonucleares se obtiene la siguiente correlación.

Sanos	Asmáticos
IgE disminuída (normal)	IgE aumentada
Quimiotaxis aumentada (normal) inducida	Quimiotaxis disminuída inducida
Destrucción intracelular(30') disminuída (normal)	Destrucción intracelular(30') aumentada
Destrucción intracelular(60') aumentada (normal)	Destrucción intracelular(60') disminuída
Destrucción intracelular(60') disminuída (normal)	Destrucción intracelular(120') aumentada

BIBLIOGRAFIA

1. SLY, RM.: " Current theories of the pathophysiology of --- asthma " J. of Asthma. 20:419, 1983.
2. FORFAR, J.O.: " Textbook of Paediatrics " Vol. 1, 3a. ed. Churchill Livingstone, Great Britain 1984; pp. 549-555.
3. GROVE, D.I.; BRUSTON, T.O.; WELLY, M.L.; MUNROFORD, R.; -- FORBE, I. J.; " Humoral and cellular immunity in asthma " J. Allergy. 55:152, 1975.
4. SMITH, J.M.; HARDING, L.K.; CUMMING, G.: " The changing prevalence of asthma in school children " Clin. Allergy. 1:57, 1971.
5. ELLUL-MICALIEF. R. ; AL-ALI. S. : " Spectrum of asthma ---- " Clin Allergy. 14:509, 1984.
6. MICHEL, F.B. et. al : " Natural history of asthma " Allerg Immunol. 16:247, 1984.
7. HORWWOD, L.J. et.al : " Development of asthma and proportio_nal hazards modeling " Pediatrics. 75:859, 1985.
8. EDFORS-LUBS, M.L.: " Allergy in 7000 twin pairs " Acta - - Allergol. 26:249, 1971.
9. SLY, R.M.: " Deaths from asthma " Ann Allergy 53:20, 1984.
10. KULCZYCKI, A. : " Role of immunoglobulin E and immunoglobulin E receptors in bronchial asthma " J. Allergy Clin. Immunol. 68:5, 1981.

11. FUDENBERG, H.H. ; STITES, D.P.; STOBO, J.D.; WELLS, J.V. :
" Inmunología básica y clínica " 4a. ed. El Manual Moderno,
México, 1983; pág. 515.
12. LEGORRETA, H.M. : " Hiperreactividad cutánea y su correla-
ción con los niveles séricos de IgE total e IgE alérgeno -
específica en niños con asma extrínseca " Tesis Profesional
que para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo
" Zaragoza " UNAM, 1985.
13. CHAFEE, F.H. ; SETTIPONE, G.A. : " Aspirin intolerance. Fre-
quency in an allergic population " J. Allergy Clin Immunol.
53:193, 1974.
14. INGANAS, M. ; JOHANSSON, S.G.O.; BENNICH, H. : " Anti-IgE
antibodies in human serum: ocurrence and especificity "Int.
Archs. Allergy Appl. Immun. 65:51, 1981.
15. OGAWA, M. ; BERGER, P.A.; MCINTEGRE, O. R.; CLÉNDENNIN, W.
E.; ISHIZAKA, I. : " IgE in atopic dermatitis " Arch. Derma
tol.103:575, 1971.
16. STONE, S.P.; MULLER, S.A.; GLEICH, G.J.: " IgE levels in --
atopic dermatitis " Arch. Dermatol. 108:806, 1973.
17. JUHLIN JOHANSSON, S.G.O. ; BENNICH, H.; HOGMAN, G.; THYRE-
SSON, N. : " Immunoglobulin E in dermatose " Arch. Dermatol.
100:13, 1969.
18. JOHANSSON, S.G.O. : " Raised levels of a new immunoglobu-
lin class (Ig ND) in asthma. " Lancet 2:951, 1967.
19. HENDERSON, L.L. ; et.al.: Evaluation of IgE tests in an --
allergy practice " J.. Allergy Clin Immunol. 48:362, 1971.

20. ARMSTRONG, D. : " Infections in patients with lupus ery ---
thematosus disseminatus " Arthritis Rheum. 17:285, 1974.
21. STOSSEL, T.P. : " Phagocytosis: recognition and ingestion " *Jemin Hematol.* 12:83, 1975.
22. STOSSEL, T.P. : " Clinical disorders of recognition and in-
gestion " *Am. J. Pathol.* 88:741, 1977.
23. LEIJH, P.C.J. ; et.al. : " Participation of immunoglobulins
and complement components in the intracellular killing of
S. aureus and E. coli by human granulocytes " *Infection and
Immunity.* 33:714, 1981.
24. HAMMINGA, L.P.C. ; et.al. : " Functions of phagocytic cell -
in recurrent cellular defect of monocytes " *G. Ital. Derma-
tol. Venereal.* 155:163, 1980.
25. VAN DER MEER, J.W.M. ; et.al. : " Functions of phagocytic -
cell in chronic mucocutaneous candidiasis " *Br. Med. J.* ---
1: 147, 1978.
26. REPINE, J.E. ; CLAWSON, C.C.; FRIED, P.S. : " Influence of
a deficiency of the secon component of complement of the --
bactericidal activity of neutrophils in vitro " *J. Clin.
Invest.* 59:802, 1977.
27. MCGEADY, S.J.; BERCKLEY, R.H.: " Depression of cell media--
ted immunity in atopic eczema " *J. Allerg* 56:393, 1975.
28. GROVE, D.I.; et.al.: " Humoral and cellular immunity in ---
asthma " *J. Allergy.* 55:152, 1975.

29. CHAZANSHAHI, S. ; TOWNLEY, R. ; CHAPERONE, E.; VILLACORTE, G. " T and B lymphocyte rosettes in asthma bronchial " Ann. Allergy. 36:324, 1976.
30. HILL, H.R.; QUI, P.G. : " Raised serum IgE levels defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections " Lancet I:7850, 1984.
31. CLARK, R.A. ; et.al. : " Defective neutrophil chemotaxis -- and cellular immunity in a child with recurrent infections" Annals of Internal Medicine. 78:515. 1973.
32. BOYDEN, S. : The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen of polymorphonuclear leukocytes " J. Exp. Med. 115:453, 1962.
33. THOMPSON, R.A. : " Techniques in clinical immunology in -- neutrophil leucocyte function test " Blackwell Sci, Pub. Oxford, 1977: 201-216.
34. YAMAMURA, M. ; VALDIMARSSON, H. : " Participation of C₃ in intracellular killing of Candida albicans " Scand. J. Immunol. 6:591, 1977.