



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

*ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA
SANGRE*

T E S I S

*Que para obtener el título de
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA*

presentan

Aida Mónica Negrete Guardiola

Elesvan Segura Solorio



FALLA DE ORIGEN

Directora: Q F B. Idalia Avila Miyazawa

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 1989



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
OBJETIVOS.....	4
INTRODUCCION.....	5
I) GENERALIDADES	
A) Sangre.....	7
B) Células	
1) Neutrófilos.....	9
2) Eosinófilos.....	12
3) Monocitos.....	14
a) Origen y maduración.....	15
b) Interacción con antígenos.....	16
c) Endocitosis.....	16
d) Función.....	17
4) Linfocitos.....	17
5) Basófilos.....	20
D) Componentes del plasma	
1) Complemento.....	22
a) Vía clásica.....	22
b) Vía alterna.....	28
c) Regulación de la secuencia del complemento.....	31
2) Inmunoglobulinas (Propiedades).....	34
a) IgG.....	36
b) IgM.....	38
c) IgA.....	39

d) IgD.....	39
e) IgE.....	40
D) Barreras específicas e inespecíficas de la resistencia del hospedero a las bacterias	
1) Barreras específicas.....	43
2) Barreras inespecíficas.....	49
a) Superficies epiteliales.....	50
b) Sustancias bactericidas de mucosas y líquidos tisulares.....	50
c) Fagocitosis.....	52
d) Inflamación.....	53
E) Mecanismos de resistencia bacteriana.....	55
II) Participación de las células sanguíneas en la actividad bactericida.	
A) Leucocitos PMN	
1) Caracterización y actividad bactericida de componentes de leucocitos PMN.....	62
2) Papel de la lactoferrina en la actividad bactericida de PMN.....	75
B) Neutrofilos	
1) Mecanismos que siguen los neutrofilos en la destrucción de las bacterias.....	83
a) Sistema oxígeno-dependiente.....	88
b) Sistema oxígeno-independiente.....	97

2)	Caracterización y participación de los componentes de los neutrófilos en la actividad bactericida.....	103
3)	Papel que desempeñan:	
a)	Factores quimiotácticos.....	118
b)	Endotoxinas.....	121
c)	Fosfatasa alcalina.....	123
d)	Peroxido de hidrógeno.....	125
e)	Mieloperoxidasa.....	131
f)	Catalasa y peroxidasa GSH en la protección de PMN contra el Peroxido de hidrógeno.....	176
4)	La quimioluminiscencia en los neutrófilos.....	139
C)	Eosinófilos	
1)	Papel de la peroxidasa en la actividad bactericida de eosinófilos.....	147
2)	Comparación de la actividad bactericida intracelular entre neutrófilos y eosinófilos.....	154
D)	Monocitos	
1)	Activación y requerimientos del monocito para ejercer su actividad fagocítica.....	156
2)	Metabolismo de oxígeno en la actividad bactericida de monocitos.....	160
3)	Papel de la fibronectina en la actividad bactericida de monocitos	
a)	Generalidades.....	167

b) Estimula la adherencia y quimiotaxis atracción.....	177
c) Quimiotaxis.....	190
d) Adhesión de bacterias a fagocitos.....	189
e) Ingestión.....	185
f) Actividad bactericida.....	190
g) Niveles de Fe en determinadas partes del organismo.....	191
E) Linfocitos	
1) Actividad bactericida de los linfocitos B y linfocitos T.....	192
F) Variaciones en la actividad bactericida de las células macrófagos por diversos factores:	
1) Leucocitos	
a) Temperatura.....	195
b) Tumores.....	200
c) Tensión de oxígeno.....	201
d) Indium 111.....	204
2) Neutrófilos	
a) Deficiencia en hierro.....	206
b) Deficiencia del glutatión peroxidasa.....	212
c) Cloración.....	215
d) Iodación.....	218
e) Pruebas en suero de mujeres ovariectomizadas.....	220
3) Monocitos	
a) En ratas esplenectomizadas.....	222

III) Actividad bactericida de los componentes del plasma

A) Complemento

- 1) Funcion del complemento en la actividad bactericida.....224
- 2) Actividad del complemento por las vias clásica y alterna
 - a) Via clásica.....227
 - b) Via alterna.....232

B) Suero

- 1) Actividad bactericida del suero.....237

C) Inmunoglobulinas

- 1) Papel de las inmunoglobulinas en la actividad bactericida.....246

IV) Ensayos para la determinación de la actividad bactericida en

A) Neutrófilos.....251

- 1) Metodo I.....252
- 2) Metodo II.....253
- 3) Metodo III.....256
- 4) Metodo IV.....258

B) Leucocitos PNN.....263

- 1) Metodo I.....263
- 2) Metodo II.....265

C) Monocitos.....267

- 1) Metodo I.....268
- 2) Metodo II.....271

D) Suero.....	273
1) Metodo I.....	273
2) Metodo II.....	275
3) Metodo III.....	277
V) Resumen.....	281
VI) Conclusiones.....	291
VII) Bibliografia.....	296

ABREVIATURAS

AA = Aminoácido
 Ac o Ab = Anticuerpo
 AM = Macrófago alveolar
 AFC = Vía alterna del complemento
 BCCF = Actividad del factor de crecimiento de células B
 BHI = Infusión cerebro corazón
 BPI = Proteína incrementadora de la permeabilidad
 BSA = Albúmina de suero de bovino
 C = Complemento
 CAP57 = Proteína catiónica derivada de gránulos citoplásmicos
 de polimorfonucleares
 CAPs = Proteínas catiónicas antimicrobianas
 cfu = unidades formadoras de colonias
 CGD = Enfermedad Granulomatosa Crónica
 CHOs = Carbohidratos
 CL = Quimioluminiscencia
 Con A = Concaivalina A
 CR1 = Receptor de complemento 1
 CR3 = Receptor de complemento 3
 D = Dominio
 dal = Daltons
 DM = Medio dulcecco modificado
 DPB = Buffer de fosfato dulcecco
 ED = Dominio extra
 ESTA = Acido tetracético- N,N,N,N-etilen glicol²-bis(B-aminoetil
 eter)
 EMHS = Suero tratado con Magnesio
 EPO = Eosinófilo peroxidasa
 FMLP = N-formil Metionil-Fenilalanina
 Fn = Fibronectina
 GALT = Mecanismo inmunológico asociado a tejido linfóide
 GBS = Streptococcus agalactiae del grupo B
 GCH = Glutación reducida
 GI = Tracto gastrointestinal
 GPx = Glutación peroxidasa
 GSSG = Glutación oxidasa
 H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno
 H56 = Suero calentado a 56 C por 30 min
 Hb = Hemoglobina
 HBR = Reacción de alta eficiencia
 HBSS = Solución salina balanceada de Hank's
 HI-B = Haemofilus influenzae tipo B
 HMPS = Derivado de hexosa monofosfato
 HOCl = Acido hipocloroso
 IF = Factor de iniciación
 IFN- γ = Interferón gama
 Ig = Inmunoglobulina

IGIVS = Preparación de inmunoglobulina G humana para uso intravenoso

IL-1 = Interleucina 1

IM = Interior de la membrana

In-III = Indium III

IV = Intravenosa

Kdalt = Kilodaltons

KDO = 2-ceto-3-desoxi octanato

KME = Acido 2-ceto-4-tiometilbutírico

LAF = Factor activador de linfocitos

LAF = Fosfatasa alcalina

LR = Histiocitos

LBR = Reacción de baja eficiencia

LF = Lactoferrina

LPS = Lipopolisacárido

LTA = Acido lipoteicoico

MC = Macrófago

MAC = Complejo de ataque a la membrana

MHB = Caldo de Mueller-Hinton

MHC = Complejo Principal de Histocompatibilidad

MIV = Unidades de índice metabólico

MN = Monocito

MO = Microorganismo

MPO = Mieloperoxidasa

MTT = 3(4,5-dimetil-tiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium bromuro

NBT = Nitroazul tetrazolium

O = Oxígeno

2

OM = Membrana externa

PAGE = Electroforesis SDS/Gel de poliacrilamida

PAMS = Macrófagos alveolares pulmonares

PBA = Activadores policlonales de linfocitos B

PBS = Solución salina bufferada con fosfato

PMAS = Acetato miristato forbol

PMN = Polimorfonuclear

PO = Tensión de oxígeno

2

PSF = Factor biológico activo o factor estimulador de la fagocitosis

RaRF = Factor reactivo Ra

Rb = Rubidio

RGDS = Arg-Gli-Asp-Ser

rMuIFN- β = Interferón beta murina recombinante

SBP = Salina bufferada de fosfato

SBT = Concentración bactericida del suero

3

(Sig) = Receptor de superficie de la inmunoglobulina

SM = Estreptomina

SOD = Superóxido dismutasa

SUBMICS = Concentración subinhibitoria de antibióticos

TBE = Caldo de soya tripticasa

TC = Tetraciclina

TMB = 1,3,5-trimetoxibenceno
TMB- γ = 8-N,N-dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato HCl
TMBCl = 2-Cl-1,3,5-trimetoxibenceno
TRF = Factor renovador de las células T
TNF- γ = Factor de tumor de necrosis
ZAS = Zimosan activado por suero

OBJETIVOS

- Analizar la participación y mecanismos por los cuales las células sanguíneas, llevan a cabo la destrucción de bacterias.
- Tener un panorama global de la Respuesta Inmune Normal frente a una bacteria, así como la influencia de diversos factores -- dentro de la misma.
- Caracterizar los componentes de las células sanguíneas que participan en la destrucción bacteriana.
- Describir los ensayos que han sido utilizados para evaluar la actividad bactericida en células sanguíneas que participan en esta.
- Enumerar y conocer la eficiencia de los métodos que han sido -- utilizados para evaluar la actividad bactericida de las células sanguíneas que participan en la misma.

INTRODUCCION

El concepto de inmunidad es antiguo, empirico y deriva propiamente del estudio de la resistencia a las infecciones. Varios siglos antes del descubrimiento de la teoria de los germen para las enfermedades infecciosas, ya se sabia que la convalecencia de una enfermedad se acompañaba de una resistencia especial contra la reinfección. Por lo tanto, los elementos de la inmunologia clásica precedieron a la bacteriología y contribuyeron a su desarrollo (3).

El sistema inmunitario es extremadamente complejo y posee una gran diversidad de actividades para mantener la homeostasia y la salud (12).

Las enfermedades bacterianas del hombre son ejemplos de los mecanismos que intervienen en la relación hospedero-parásito, cuyo resultado depende de las capacidades genéticas del hospedero y de la bacteria. Las complejas respuestas de las bacterias patógenas corresponden a respuestas inmunes igualmente complejas y múltiples en el hombre (12).

Al principio de la bacteriología, la investigación se ocupó principalmente de factores humorales. Esto se debió a la aparente primacia del papel protector de los anticuerpos sericos, sobre todo en relación con la inmunidad antitóxica. Pero en la actualidad sabemos que intervienen también fenómenos celulares en las respuestas inmunes a las bacterias, y que quizá desempeñan el papel más importante en ciertas interacciones hospedero-parásito. Por lo tanto, la inmunidad contra enfermedades bacterianas

debe partir de un punto de vista biológico muy amplio, abarcando las múltiples interacciones de factores humorales y celulares -- que forman la totalidad de la respuesta inmunológica del hospedero (9,10,12).

Una vez que los microorganismos invaden y penetran a mucosa o a las superficies epidermales, los sistemas bactericidas (fagocitosis) la lisis mediada por el complemento son las primeras líneas de defensa (9,10).

Al pasar los microorganismos al torrente sanguíneo, el macrófago lo reconoce como extraño, se une a su membrana, los ingiere y luego activa a los sistemas bactericidas, estudiados en el presente trabajo (9-12).

I GENERALIDADES

A) LA SANGRE

La sangre es un componente líquido del cuerpo humano que -- desde el punto de vista de su composición, se considera como una mezcla polifásica de estructura compleja, relativamente constante y que está constituida por: a) Elementos sólidos: los corpúsculos celulares formes o figurados y los productos minerales u orgánicos disueltos en el plasma. b) Sustancias líquidas: el suero propiamente dicho o plasma hemático, con un 90 a 100% de agua, la cual, junto con el agua intersticial constituye la mayor parte de la llamada agua extracelular de nuestro organismo. c) Elementos gaseosos (O_2 , CO_2 , SH), transportados por los hematies y en mucha menor cantidad disueltos en el plasma, con eliminación a través de los nocivos y aporte de los necesarios (204).

La sangre obtenida de las venas es de color rojo oscuro, al go azulada; en cambio, la sangre de arterias es de color escarlata, presentando un tono intermedio la sangre capilar; se sabe -- que este hecho depende del estado de oxidación o de reducción de la hemoglobina (204).

La sangre es un aparato constituido por múltiples estructuras o sistemas orgánicos, anatómicamente diferentes, cada uno de ellos encaminado a la realización de varias funciones como son:

1.- Funciones celulares:

a) Los hematies, estas células por la hemoglobina que contig

nen actúan como vectores de oxígeno y de anhídrido carbónico. Son las células encargadas de la respiración, que sirve de enlace entre el pulmón y los tejidos. La destrucción de los hematies suministra la bilirrubina, material necesario para la digestión y absorción enteral de los lípidos.

b) Los leucocitos, que intervienen en las funciones defensivas antimicrobianas y antialérgicas, contienen anticuerpos y liberan gamaglobulinas muy útiles para la defensa. El acúmulo y de integración de los leucocitos en los focos inflamatorios forman el pus, rico en proteasas y otros fermentos defensivos útiles para la lucha contra múltiples agentes vulnerables.

c) Los trombocitos o plaquetas intervienen en la homeostasis acumulándose en las heridas vasculares y facilitando la coagulación de la sangre (204).

2.- Funciones plasmáticas:

a) Son innumerables y dependen de los múltiples aniones, cationes, agua, proteínas, aminoácidos, ácido úrico, urea, azúcares, lípidos, enzimas, hormonas, anticuerpos inmunizantes (antitoxinas, aglutininas relacionadas con las gamaglobulinas), etc. que el plasma hemático transporta (204).

B) CELULAS

1) NEUTRÓFILOS

Son los leucocitos más abundantes en la sangre, representan del 50 al 60 % del total de las células blancas. Tienen un diámetro medio de 12 μ m, son menores que los monocitos y eosinófilos, y ligeramente mayores que los basófilos (10,11,204).

Los neutrófilos son los únicos leucocitos que muestran una diferencia significativa racial, 1500 a 6000/ μ l en individuos blancos y de 1100 a 6700/ μ l en negros. Los niños generalmente muestran un número menor de neutrófilos que los adultos (11).

El núcleo se tinte intensamente, es irregular y adquiere a menudo formas que se pueden comparar con las letras E, Z y S. Con frecuencia parece haber varios núcleos separados y de ahí su nombre "leucocito polinuclear", pero al observarlos mejor se pueden distinguir los filamentos delicados que conectan los segmentos (11,12).

Un filamento tiene longitud, pero no anchura, cuando se enfoca de arriba a bajo. Un neutrófilo segmentado maduro presenta por lo menos dos lóbulos separados por uno de estos filamentos. El número de lóbulos en los neutrófilos normales oscila de 2 a 5 con una media de 3. Los lóbulos nucleares presentan bloques toscos de cromatina con espacios paracromáticos muy bien definidos. El citoplasma, incoloro por sí mismo, está lleno de finas granuaciones (de 0.2 a 0.3 μ m). Alrededor de dos tercios de estas -- son gránulos específicos y un tercio gránulos azurófilos; la intensidad de coloración de estos últimos es menor que de la celu-

la inmadura (11).

Los neutrófilos se producen en la médula, a través de Mielo blasto, promielocito, mielocitos (esto es en masa mitótica), metamielocito en banda y neutrófilo (maduración y masa de almacenamiento); y en la sangre ya se da el neutrófilo (masa circulante y masa marginal (11).

En los neutrófilos humanos están presentes 2 tipos de gránulos bien definidos. Los gránulos azurofilos, formados en la fase de promielocito, contienen enzimas lisosómicas (hidrolasas ácidas, fosfatasa ácida, Beta glucuronidasa), peroxidasa, muramidasa y proteínas catiónicas antibacterianas. Las granulaciones neutrofilas específicas, formadas en la fase de mielocito, contienen fosfatasa alcalina, muramidasa, lactoferrina y colágena.

Los neutrófilos son importante componente celular en la inflamación no infecciosa, en inflamación mediada por bacterias -- piógenas y en reacciones que involucran complejos Ag-Ac. Los neutrófilos en sangre son capaces de marginar a las paredes de células endoteliales, se adhieren a estas pasando a los sitios de la lesión. Los neutrófilos son atraídos a los sitios de inflamación por factores quimiotácticos (10). Estos factores guían a las células a moverse directamente al área donde los factores están -- concentrados (11,12).

Las sustancias quimiotácticas conocidas para los neutrófilos, incluyen factores del hospedero y productos bacterianos. Los factores del hospedero más activos son los péptidos quimiotácticos derivados de la descomposición del C3 y C5. La descomposición proteolítica de estas dos proteínas no solo resulta de la

activación de la secuencia del C' sino también de la acción de las proteasas de tejidos y derivados del sistema de coagulación (trombina). Los neutrófilos por ellos mismos liberan un factor quimiotáctico para otros neutrófilos. Los factores quimiotácticos de la bacteria han sido obtenidos de un número de microorganismos. existen evidencias de que estos factores de la bacteria tienen un sitio de acción en las células distintas de los péptidos del C' (10).

Los neutrófilos tienen receptores para el complemento y unen y fagocitan las partículas recubiertas. Aparece la fagocitosis con la formación de una vacuola fagocítica que contiene la partícula ingerida, va acompañada en este proceso de un aumento en la actividad metabólica y producción de energía, granulaciones específicas seguidas inmediatamente por granulaciones azurófilas, vacían su contenido en las vacuolas fagocíticas. Estos granulos contienen una enzima mieloperoxidasa, que junto con el H₂O₂ (generado durante el estallamiento respiratorio que toma lugar después de la fagocitosis) y un haluro (de la halogenación) hacen un sistema antibacteriano muy bueno (mecanismo oxidativo) (10-12).

Los neutrófilos contienen receptores para el fragmento Fc de la IgG y para C3b, los cuales permiten la opsonización de organismos (10,12).

El proceso de ingestión es similar al de los macrófagos (9,10,12).

Se sabe que los neutrófilos juegan un papel básico en la inflamación aguda bacteriana, ahí las células son guiadas, qui-

za por péptidos y por factores bacterianos para migrar a la infección y para ingerir a los MOs que son opsonizados. Sin embargo, los neutrófilos también participan en tejidos patológicos involucrando el Ag-Ab y complemento (10,12).

2) EOSINÓFILOS

Estas células se encuentran en la sangre en un número pequeño, del 1 al 5 % (10,11). Su estructura se parece a la de los neutrófilos PMN, pero con la singular diferencia de que los granulocitos de estas células contienen gránulos más grandes, redondos u ovalados y con gran afinidad por los colorantes ácidos. Su citoplasma es incoloro o presenta un tono debilmente azul celeste, el núcleo se tinte algo menos intensamente que el de los neutrófilos PMN, y suele tener dos segmentos conectados, rara vez más de tres. Su diámetro es de 13 μ m (11).

Los eosinófilos se forman en la médula ósea. En contraste con los neutrófilos, en los eosinófilos solo aparece un tipo de granulaciones. En la fase de mielocito, los gránulos eosinófilos están teñidos de oscuro pero a medida que la célula madura (en una forma similar a los neutrófilos en otros aspectos), los gránulos presentan reacciones brillantes a los colorantes. Los gránulos eosinófilos son lisosomas y contienen hidrolasas ácidas, además de peroxidasa e histamina (11).

Los eosinófilos contienen alrededor de un tercio de histamina de la sangre. Son capaces de moverse y fagocitar, aunque menos activamente que los neutrófilos. Los gránulos eliminan su

contenido en las vacuolas fagocíticas. Responden habitualmente - junto con las células plasmáticas en las fases tardías de la inflamación. Son atraídos a los complejos Ag-Ac a los que ingieren. Su número normal varía entre 50 y 250 μ l de sangre y constituyen del 1 al 4% de los leucocitos. Un aumento en los eosinófilos es llamado eosinofilia (11).

Los eosinófilos son un componente celular en reacciones alérgicas, quizá son atraídos por un tetrapeptido quimiotáctico - aislado de tejidos con reacciones anafilácticas. Los eosinófilos son abundantes también durante enfermedades parasitarias, donde se piensa que pueden jugar un papel importante en mecanismos que aún no son entendidos. Existen evidencias de que los factores - quimiotácticos derivados de reacciones inmunológicas, puedan ser los instrumentos para que estos se acumulen en sitios de infección parasitaria (10,12).

Se ha sugerido la posibilidad de que los eosinófilos protejan los tejidos del huésped, no sólo a través de una fagocitosis y degradación de los complejos citotóxicos Ag-Ac, sino disminuyendo los efectos de los mediadores químicos de la respuesta inflamatoria (12,81).

Se sabe que uno de los mediadores químicos de la anafilaxia es el SRS-A, el cual produce una contracción del músculo liso y un incremento en la permeabilidad vascular. Contiene un grupo - sulfato y puede ser inactivado por la arilsulfatasa encontrada - en los eosinófilos. Por lo que el papel de los eosinófilos puede ser la inactivación de este mediador (10,12).

3) MONOCITOS

Los monocitos son las células mayores de la sangre normal. Su diámetro es de 2 a 3 veces mayor que el de un hemático (14 a 20 μ m), aunque se encuentran algunos más pequeños. Contienen un solo núcleo, lobulado, profundamente mellado o en forma de herra dura y en ocasiones redondo u ovalado. El citoplasma es abundante, con el colorante de Wright la cromatina se observa de cordones, en ocasiones pueden observarse granulos azulados (10,11).

Cuando el monocito se transforma en un macrófago se vuelve más grande (de 20 a 40 μ m); el núcleo puede volverse oval y la cromatina más reticular o dispersa, por lo que pueden ser visibles los nucleolos. Los monocitos constituyen alrededor del 2 al 10 % de la cifra total de leucocitos en la sangre periférica: de 200 a 1000/ μ l de sangre (11,204).

Estas células están ampliamente distribuidas en el organismo en la sangre, médula ósea, en el hígado, tejido linfoide, tejido conectivo, tejido nervioso y cavidad serosa. Forman una parte importante de los mecanismos de defensa, en gran parte por la remoción de MOs de sangre y tejidos. Los fagocitos son ampliamente avidos en la fagocitosis y pinocitosis, engloban muchos tipos de antígenos y así participan en los eventos inmunes. Los fagocitos mononucleares también responden al estímulo externo que viene de los linfocitos activados y/o MOs y participan en las reacciones inmunes. Elie Metchnikoff en 1892 los llamó macrófagos, porque ellos son capaces de la ingestión de grandes partículas. En 1924 Aschoff introduce el nombre de sistema reticuloendotelial, un término que es ampliamente usado para varias clases de células -

capaces de la destrucción de MOs. Los fagocitos han sido identificados como una línea celular originaria de un precursor, - el cual después de un tiempo madura, pasa poco tiempo en circulación, después pasa a los diferentes tejidos. Los fagocitos reciben diferentes nombres dependiendo de su localización en tejido y/o su estado de maduración (10,12).

Clasificación de los fagocitos mononucleares en suero:

Células	Localización
Célula madre	Medula ósea
Monoblastos	medula ósea
Promonocitos	medula ósea
Monocitos	medula ósea , sangre periférica
Macrófagos	tejido conectivo (histiocitos) Hígado (células Kupffer) pulmón (macrófago alveolar) nódulos linfoides (macrófagos libres o fijados) medula ósea (macrófagos) cavidad serosa (macrófagos pleurales y peritoneales) tejido óseo (osteoclastos?) sistema nervioso (células microgliales) (10)

a) Origen y maduración: El primer precursor reconocible es el promonocito, se encuentra en gran cantidad en la medula ósea. Los promonocitos se dividen rápidamente y entran en la sangre, llegando a ser monocitos, los cuales circulan de 24 a 28 hrs

después, migran a diferentes tejidos, y ahí maduran a M ϕ . Los M ϕ son células altamente fagocíticas y contienen numerosas lisozimas y vesículas endocíticas (10,12).

b) Interacción con Aqs. Los fagocitos mononucleares tienen la capacidad de unirse y englobar partículas de diferentes materiales. Debido a que tienen al menos dos distintos receptores de superficie, el receptor Fc y el receptor C3 (10,12)

El receptor Fc se une específicamente a la cadena pesada de la IgG y no a otras clases de Igs. Entre las subclases de IgG humana, los M ϕ se unen a la IgG1 y a la IgG3, muy débilmente a la IgG2 y no del todo a la IgG4. El receptor C3 reconoce al C3 nativo por la C3 convertasa (10,12).

c) Endocitosis. Después de que el Ag se une a la membrana, el M ϕ lo interioriza en vesículas por un proceso que requiere energía. Las vesículas endocíticas son invaginaciones de la membrana que son selladas y circulan en el citoplasma (10,12).

Las vesículas endocíticas eventualmente se fusionan con los lisosomas primarios para formar los fagolisosomas. Como las dos vesículas se fusionan, el contenido de los lisosomas se derrama en la vesícula endocítica, para empezar el proceso de digestión intracelular (10,12).

Las lisozimas de los M ϕ contienen un número de enzimas con especificidad para proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, fosfatasa ácida, beta-glucuronidasa, glucosaminidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa ácida, desoxirribonucleasa ácida, esterasa colesterol, etc. Esta gran variedad de enzimas hace

que el proceso de digestión intracelular sea extremadamente eficiente (10,12).

d) Función. Los MΦs toman Ags principalmente si estos -- son grandes polímeros o si están cubiertos con Acs y C'. El MΦ -- tiene un papel importante no sólo en la destrucción del Ag, sino que al mismo tiempo presenta una cantidad pequeña de Ag a los -- linfocitos. Se piensa que el Ag presentado a los linfocitos re-- presenta un número pequeño de moléculas que no han sufrido un ca-- tabolismo extenso. Los linfocitos reaccionan mejor a el Ag cuando este está asociado con los MΦ. En la presencia de un exceso -- de Ag soluble la respuesta de los linfocitos al Ag no es muy --- fuerte. Junto con la presentación del Ag, el MΦ secreta produc-- tos que estimulan al linfocito para una mejor respuesta. Así, la función de los MΦs resulta de una combinación de tres propieda-- des: a) remoción del exceso de Ag b) presentación del Ag y c) se-- creción de moléculas estimuladoras (10,12).

4) LINFOCITOS

Los linfocitos son pequeñas células mononucleares sin gránulos citoplasmáticos específicos. Son del tamaño de un hemátie o algo mayores (de 6 a 10 μ m), pero su diámetro depende mucho del espesor de la extensión, pues es muy grande en las muy delgadas -- donde los leucocitos están muy aplanados. El linfocito típico -- tiene un solo núcleo bien definido que contiene bloques pesados de cromatina, suele ser redondo, pero a veces presenta una escotadura en un lado (11).

Con frecuencia se encuentran linfocitos mayores de 12 a 15 μ m de diámetro, con un núcleo más pálido y citoplasma más abundante sobre todo en la sangre de los niños, y en ocasiones es difícil distinguirlos de los monocitos. Los márgenes deformes y dentados del citoplasma de los linfocitos, se deben a la presión de las células contiguas. El citoplasma de alrededor de un tercio de los linfocitos grandes presenta un número variable (generalmente de 5 a 10) de gránulos redondeados, aislados y de color rojizo púrpura (azurofilos). Son mayores que los gránulos de los leucocitos neutrófilos. La presencia de formas blásticas (linfoblastos no leucémicos, linfocitos reticulares), indica la transformación de las células linfoides como respuesta a la estimulación antigénica (11,204).

De acuerdo con los conceptos actuales durante la vida fetal los precursores de los linfocitos se originan en la médula ósea y se orientan o programan para desempeñar una función determinada en algunos de los órganos linfoides primarios, sea el timo, o la bolsa o saco equivalente (un órgano característico que se observa en los pájaros llamada bolsa de fabricio, se supone que en el hombre y otros mamíferos existe una bolsa equivalente, cuya situación se desconoce). Los linfocitos influenciados por el timo (linfocitos dependientes del timo o células T) y sus descendientes actúan sobre la inmunidad mediada por células, que incluye la hipersensibilidad retardada, el rechazo de injertos, las reacciones injerto-huesped, la defensa contra MOs intracelulares (tales como bacilo tuberculoso y brucelas) y probablemente la defensa contra los neoplasmas. Los linfocitos influenciados por la bolsa

equivalente (linfocitos dependientes de la bolsa o células B) y sus descendientes actúan sobre la inmunidad humoral o la producción de anticuerpos, como tales, o después de su transformación en células plasmáticas (11,12).

En los últimos periodos de la vida fetal y en la vida postnatal, los linfocitos se producen en el tejido linfóide bazo, ganglios linfáticos y tejido linfóide intestinal. Las células B y T tienden a localizarse en partes anatómicamente distintas del tejido linfóide donde tiene lugar la proliferación. En la sangre las células B y T comprenden la mayor parte de los linfocitos circulantes (también están probablemente presentes otros tipos), pero no pueden distinguirse por su tamaño o por la tinción de Wright; se requieren técnicas especiales. La mayoría de los linfocitos circulantes son células T que tienen una vida media más o menos larga de 6 meses, y quizá hasta de 10 años. Las células B constituyen una población menor (de 10 a 30 % de los linfocitos) tienen una vida media variable, algunos son de larga duración mientras que otros duran poco, estos se distinguen por la presencia de considerables cantidades de inmunoglobulina sobre su membrana superficial (5)(11).

Los linfocitos constituyen alrededor del 20 al 40% de todos los linfocitos; de 1000 a 4000 por cada microlitro de sangre. Abundan más en la sangre de los niños, constituyendo un promedio del 60% del total de los leucocitos en el primer año de vida, para descender a alrededor del 35% en el décimo, siendo las células inmaduras más numerosas que en el adulto. Los linfocitos constituyen alrededor del 5 al 15% de las células nuclea-

das de la médula ósea (11,12).

Los linfocitos y sus derivados, las células plasmáticas, actúan sobre las defensas inmunitarias del organismo (11).

5) BASOFILOS

Se parecen a los neutrófilos PMN, pero su núcleo es menos irregular (generalmente solo mellado o ligeramente lobulado) y los granulos son mayores y con gran afinidad por los colorantes básicos. Se identifican fácilmente. En algunos basófilos faltan la mayoría de los granulos por ser estos muy solubles en agua, dejando aberturas bien definidas en el citoplasma, entonces se ven como de un color malva. En una extensión bien preparada con el colorante de Wright, los granulos son de color púrpura oscuro mientras que el núcleo se ve algo más pálido y a menudo está parcial o completamente ocultado por los granulos, por lo que resulta difícil distinguir su forma (11,12).

Los basófilos se originan en la médula ósea a partir de los mielocitos basófilos en forma similar a la de los eosinófilos. En su desarrollo aparecen granulaciones no específicas. Las granulaciones basófilas contienen heparina o sustancias pseudoheparínicas, e histamina, así como 5-hidroxitriptamina. Los ácidos mucopolisacáridos son responsables de las propiedades de las granulaciones basófilas de tinte metacromáticamente (10,11).

En contraste con otros granulocitos las granulaciones basófilas no son lisosomas (11).

A pesar de su pequeño número, los basófilos son portadores

de alrededor de una mitad de la histamina sanguínea. Los basófilos reaccionan en los estados alérgicos, especialmente en los de atopia. Se ha demostrado que existen en los Acs IgE (reagínicos) del suero de individuos atópicos. Los basófilos de estos individuos se desgranulan cuando se tratan con alérgenos específicos - (11). Tienen la capacidad de emigrar a los sitios de inflamación (11,10).

Los basófilos son los menos numerosos de los leucocitos en la sangre normal y raramente comprenden más del 0.3 % de los leucocitos totales, los límites normales son de 0 a 160/ μ l (11,12).

C) COMPONENTES DEL PLASMA

1) COMPLEMENTO

El descubrimiento del Complemento (C'), surgió de observaciones hechas justamente antes del cambio de siglo. En las que el suero normal ejerció un efecto destructivo sobre la bacteria. Esta acción del suero normal se perdió, cuando fue calentado a 56 °C. La elevada actividad bactericida del suero de un hospedero inmunizado se perdió también, cuando el suero fue calentado a 56 °C, pero pudo ser reestablecida por la adición de suero de un hospedero no inmune, indicando con eso la participación de al menos dos actividades (10,12).

Hoy en día se admite que el sistema del C', consta de 18 proteínas plasmáticas que circulan en el fluido extracelular. Tabla 1. Estas moléculas interaccionan entre sí en una secuencia precisa que conllevan a la formación de productos de degradación biológicamente activos capaces de reaccionar con Microorganismos (MO) y células promoviendo la opsonización y el daño celular. Se conocen hoy dos vías de activación: La Vía Clásica y la Vía Alternativa (10,12).

a) VIA CLASICA

Esta vía sirve para reconocer la presencia de complejos Ag-Ac y para activar al mismo tiempo las proteínas que seguirán un patrón de activación específico. Estas proteínas se encuen-

Tabla 1. Sistema del complemento: algunas características físico-químicas (1,13).

Papel principal	Componente	Peso molecular	Concentración en suero g/ml
Vía clásica	C1q	400 000	50
	C1r	100 000	En deudocose
	C1s	70 000	100
	C4	240 000	460
	C2	117 000	50
	C3	180 000	1200
Vía alterna	Propiedades	190 000	20
	D	75 000	huellas
	B	100 000	225
	P3	170 000	20-50
Ataque	C5	105 000	75
	C6	125 000	60
	C7	120 000	60
	C8	120 000	15
	C9	70 000	huellas
Control	C1INH	105 000	100
	I(C3bINAI)	72 000	50
	Hc (-1-H)	150 000	520
	C3Ep	540 000	En deudocose

Tabla 1. Controles (9, 12).

Papel principal	Componente	Productos de degradación	Mozzilidad microbiana
Via clásica	C1 C1r C1s C4 C2 C3	C4a, C4b, C4c, C4d C2a, C2b C3a, C3b, C3c, C3d	
Via alterna	Propargina B B H C5 C6 C7 C8 C9	Bb, Bc C5a, C5b	
Control	C1NH 1 (C2bINA) H (-IH) C4hp		

trán en circulación como precursoras inactivas hasta que son activadas secuencialmente por reacciones químicas específicas (9).

Para que las proteínas del C₃ produzcan su efecto, deben reaccionar precisamente en la secuencia apropiada, es decir, C1, C4, C2, C3, C5 hasta C9. Si alguno de ellos falta la secuencia es bloqueada (9,12).

De las cuatro subclases de inmunoglobulinas G (IgG) humanas que se conocen, la IgG1, la IgG2 y IgG3 activan esta vía; la IgG4 no presenta esta propiedad (9,10,12).

Para que se lleve a cabo la activación del C₃ en este modo experimental se requiere de una molécula de IgM o en la mayor parte de los casos de dos moléculas de IgG que se encuentren muy cercanas una de la otra (9,10).

El C1 es la unidad de reconocimiento del sistema del C₃. Esta macromolécula está formada por tres subunidades, C1q, C1r y C1s, unidas entre sí por iones de calcio en una relación molar de 1C1q: 2C1r: 2C1s. El C1q es una proteína semejante a la colágena, la cual, vista al microscopio electrónico, muestra seis subunidades capaces de unirse específicamente a las porciones Fc de las Igs, a la región C 2 de la IgG y a la región C 4 de la IgM, que previamente han reaccionado con el antígeno. El C1q sufre un cambio en su conformación cuando reacciona en forma no covalente o mediante un enlace iónico con las regiones Fc de las IgG y a su vez ocasiona que el C1r adquiera actividad enzimática de serina proteasa y pueda degradar al C1s. Al degradar al C1s, el C1r forma un péptido y expone el sitio activo de la enzima en

C1a o C1 esterasa. La unidad de activación es iniciada entonces por la C1 esterasa, que degrada un péptido pequeño de C4 y otro de C2, denominados C4a y C2b respectivamente (9,12).

El C4b enlazado forma un complejo reversible con el C2, que es activado cuando lo degrada el C1a. El fragmento C2a permanece unido al C4b y presenta actividad de serina proteasa con especificidad para C3 y C5. Es así como el fragmento más grande de ambos componentes, C4b y C2a, se fusionan formando la enzima C4b2a, llamada también C3 convertasa. Esta convertasa se encuentra unida con fuerza, por medio de la subunidad C4b, a un sitio cercano al complejo A-C1. Una sola molécula de C1 esterasa puede producir una gran cantidad de C3 convertasa. La C3 convertasa se libera de C1 y se enlaza con la membrana de la célula blanco, donde actúa sobre la C3. La C3 convertasa degrada al C3 en su cadena alfa, por el enlace que forman los aminoácidos arginina de la posición 74 y la serina de la posición 73, originando los fragmentos C3a y C3b. El C3a es un fragmento pequeño con un peso molecular de aproximadamente 8300 daltons, mientras que el C3b es un fragmento más grande, con cerca de 175000 daltons (9,12).

El enlace de C3b al complejo C4b2a sobre la superficie celular ocasiona la formación de otra enzima, la C4b2a3b o C4b2a3b, que degrada al C5 y continúa la cascada del C'. Muchas moléculas de C3b se pegan a sitios adicionales sobre la membrana celular. Un inactivador de C3b, el componente I ayudado por una globulina denominada H, degrada al C3b a un fragmento inactivo C3bi (9,12).

El complejo trimolecular C4b2a3b inicia el ataque a la membrana al actuar sobre el C5, degradándolo en el enlace que forma la

arginina entre las posiciones 74 y 75 de la cadena alfa, y generando el fragmento C5b y el glicopeptido C5a. El fragmento grande C5b se pega a un sitio diferente sobre la membrana (9,12).

Los componentes C6 y C7 se enlazan al C5b. Parece que la función del C6 es la de estabilizar al C5b. El complejo C5b67 es bastante estable y, en ausencia de inhibidores plasmáticos, se disocia de la membrana y ataca células no sensibilizadas (9,10).

Sin embargo, dicha reacción no es eficiente y suele ser inhibida por componentes plasmáticos. Este complejo trimolecular se inserta en la bicapa lipídica de la membrana de la bacteria. Si no lo hace con rapidez, pierde la capacidad de asociarse a la membrana debido quizá a cambios conformacionales (9,12).

El siguiente paso en la secuencia es el enlace de C8 en un proceso no enzimático, con la formación de un complejo estable que comprende C5, C6, C7 y C8, que constituye la eventual unidad de ataque sobre la membrana celular al crear un pequeño canal transmembranal que permite la filtración lenta de iones. El enlace del C9 al complejo C5b678 ya unido a la membrana provoca un aumento en el diámetro del canal, así como su estabilización. Existen datos para suponer que el C9 es el componente responsable de la actividad citolítica del complejo C5-9 (9,12).

Cuando la reacción C5-9 se completa sobre la membrana, hay una fase de activación que depende de la temperatura seguida por otra de lisis celular independiente de ella. La lisis de la célula es muy lenta en ausencia de C9. La función de este último componente parece ser la de aumentar la deficiencia y la velocidad de destrucción lítica (9,12).

Debido a la alteración en su membrana, la bacteria pierde la capacidad de mantener su equilibrio osmótico, por lo cual el agua penetra sin control tratando de contrarrestar la concentración del soluto y dando como resultado la lisis osmótica. En esta fase final, no se ha demostrado actividad enzimática y se piensa que el C' actúa como detergente ocasionando en la pared celular la formación de un agrupamiento molecular con una parte central hidrofílica rodeada de un anillo hidrofóbico. Este último interacciona con los lípidos de la membrana celular e interrumpen así la integridad de las capas lipídicas bimoleculares. El centro hidrofílico desorienta a los lípidos complejos de la membrana y permite el paso del agua y de los iones solubles en ellos (9,12). Fig.1

b) VIA ALTERNA

El organismo humano tiene la capacidad de destruir NOs y de mantener la integridad del huésped durante el primer encuentro con ellos. Esta respuesta tiene lugar antes de la producción de Anticuerpos (Acs) específicos (9,12).

La vía alterna de C' puede ser activada por una gran variedad de agentes como: polisacáridos bacterianos o vegetales, eritrocitos de conejo, estroma de eritrocitos humanos, IgA humana agregada, fragmentos agregados de (Ab')² de cobayos, factor veneno de cobra y factor neutrificante, así como los Acs bajo ciertas

* Entre los Acs que activan la vía alterna del C' tenemos: Los agregados pertenecientes a los tipos Ig (IgG-4, IgA-1, IgA-2 -- humanas, y la gama 1 del cobayo), que no son capaces de dar lugar a la iniciación de la secuencia hemolítica clásica debido a su incapacidad para unirse al C1q (3).

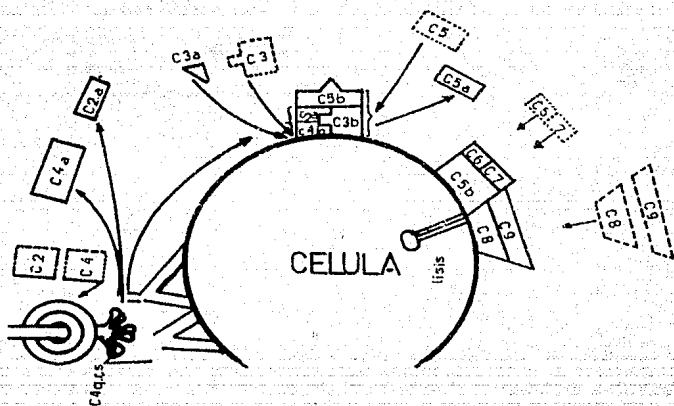
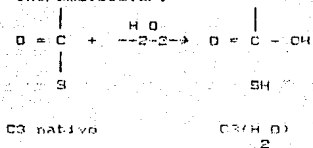


Fig. 1 Esquema de la activación de la vía clásica del Complemento (9).

condiciones. La secuencia de activación en el plasma normal incluye a la cadena alfa de la molécula de C3, que en forma espontánea incorpora una molécula de agua y rompe así el enlace tioéster intramolecular.



La molécula de C3(H O) funciona como C3b, aunque difiere en que no libera el fragmento C3a. Esta molécula activada, tipo C3b se asocia en forma reversible con el componente B que es activado enzimáticamente por el factor D. El complejo C3b que constituye la convertasa C3 iniciadora, actúa sobre el C3 y lo degrada a C3a y C3b. Como lo hace la convertasa en la vía Clásica. (9)

La molécula de C3b, atada a una partícula activadora se enlaza a una molécula B⁺⁺ íntegra en presencia de iones Mg⁺⁺, formando un complejo C3b labil con una débil actividad para degradar el C3. El C3b de este complejo, induce un cambio conformacional en la molécula B, que la hace susceptible a la acción enzimática del factor D. Existe en el plasma en forma activa y degrada al fragmento B en dos fragmentos: El Bb con un pm de 63 Kd, que es una Ig gama rica en glicina; y el Ba con un pm de 30 Kd. El primer fragmento permanece asociado al C3b, formando la C3 convertasa. Esta convertasa es extremadamente labil y decae con rapidez (en cerca de 5 min), liberando Bd de un complejo. Sin embargo, la convertasa amplificadora es estabilizada por la properdina --

que se incorpora al complejo formando la enzima C3bPBb. Esta enzima tiene una vida media de 30 min. a 30 C. Es posible que la convertasa alcance un máximo de estabilidad al interaccionar con el factor de iniciación (IF). Una vez que se forma la enzima C3bPBb estable, degrada más C3b y genera más C3bPBb estable, el cual produce aún más C3b y así sucesivamente (2,12).

El siguiente paso es el depósito adicional de C3b en los sitios donde se encuentra localizado el complejo C3bPBb con la formación del complejo (C3b)ⁿ PBb. Durante este proceso el C3b induce cambios conformacionales de la molécula de Bb que expone el sitio enzimático para la degradación de la molécula de C5, generando la C5 convertasa (2,12) Figura 2.

c) REGULACION DE LA SECUENCIA DEL COMPLEMENTO

La regulación de la acción de los componentes del C', se lleva a cabo a través de la habilidad intrínseca de algunos puros esenciales y a través de la acción de proteínas extrínsecas (3).

Las proteínas extrínsecas que participan en la regulación de la secuencia del C' son: 1) El C1INH, que forma un complejo covalente con la C1s y bloquea así la activación del C4 y el C2, también inhibe a la C1s, retardando la autoactivación del C1r. 2) La C4bp, que alcanza al C4b y al combinarse con el factor I propicia su degradación en dos sitios con la formación de los fragmentos C4c y C4d. El fragmento C4d contiene el sitio de enlace covalente del fragmento C4b, por lo que permanece unido al

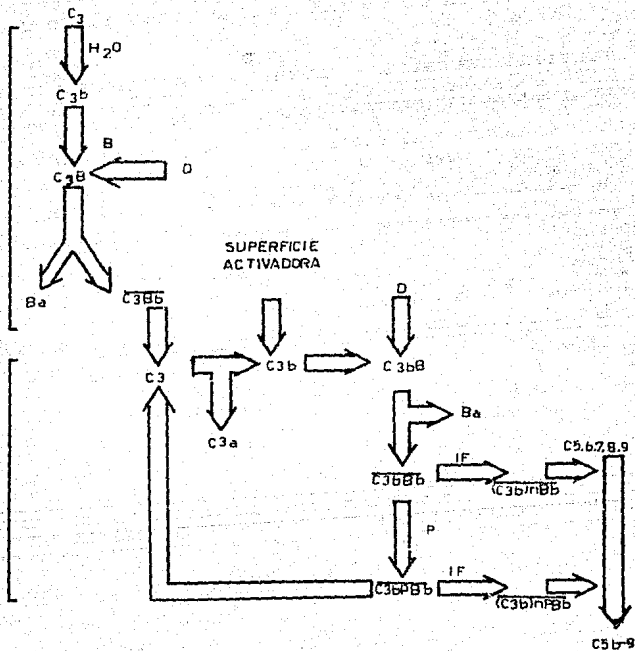


Fig. 2. Esquema de la activación de la vía alterna de Complemento: I) En ausencia de sustancias activadoras y II) en presencia de sustancias activadoras (S).

complejo inmune, pero carece de capacidad en la activación de C'.

3) El inactivador de C3b que degrada la cadena alfa de C3b inhibiendo su participación en la formación de la C5 convertasa y en la adherencia inmune; 4) La proteína H que aumenta la proporción de inactivación de C3b por I y disocia Bb del complejo C3b, Bb.- Se requiere de una acción conjugada del factor I y H para regular estas funciones (3).

INMUNOGLOBULINAS

La OMS define el término de inmunoglobulina (Ig) como si-
 que: Son proteínas animales con actividad de Ac es decir, tienen
 la propiedad de combinarse específicamente con las sustancias --
 que indujeron su formación (Ag) (9).

Todas las moléculas de Ig tienen en común una estructura --
 que consiste de 4 cadenas polipeptídicas, 2 largas y 2 pequeñas.
 Fig. 3. La cadena larga es llamada pesada o cadena H y la peque-
 ña es llamada ligera o cadena L. Se han establecido 5 clases de Ig
 basándose en la estructura primaria de sus respectivas cadenas --
 pesadas las cuales son IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, tabla 2. Las res-
 pectivas cadenas pesadas son γ , α , μ , δ y ϵ . Existen dos tipos
 de cadenas ligeras: kappa y lambda (tabla 4). En suero humano, --
 aproximadamente el 65% de moléculas de IgG tienen dos cadenas pe-
 sadas gamma y 2 cadenas ligeras kappa, mientras que el 35% tiene
 dos cadenas pesadas gamma y dos cadenas ligeras lambda. La misma
 distribución se tiene para las moléculas IgA e IgM en circula-
 ción; la relación kappa/lambda para IgD e IgE aún no ha sido es-
 tablecida. (Fig 3) (10).



Fig 3. Esquema de las 5 clases de las Ig humanas (10).

R. Porter, en 1953 demostró que, tratando las moléculas de IgG con la enzima papaina en la presencia de cisteína, se separa la molécula en dos principales fragmentos: uno de estos fragmentos tiene la capacidad de ligarse al Ag y por ello fue llamado -fragmento Fab (ab ligado al Ag). El otro fragmento no se combina con el Ag pero fue cristizable y por ello fue llamado fragmento Fc (cristizable) (10).

Cada fragmento tiene un peso molecular de aproximadamente - 50 000 dal. Se conoce que la papaina parte a la IgG aproximadamente en la mitad de la cadena pesada en un segmento llamado región bisagra. La cisteína persea que ha tenido una función dual en la activación de la enzima papaina y la reducción de algunos enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas (Fig. 4) (10).

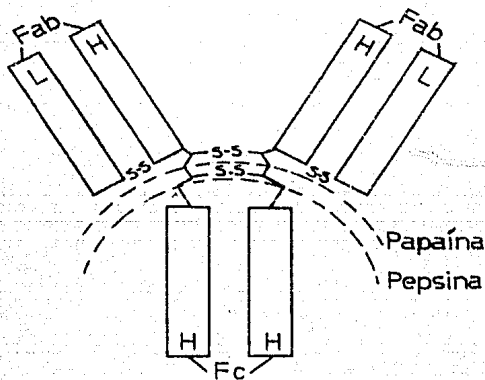


Fig.4 Representación esquemática de una Ig. (10)

Debido al descubrimiento de ciertas propiedades biológicas de los Acs, tal como el transporte a través de la membrana materna-fetal. Entre otros se estableció que la habilidad de un Ac para combinarse con un determinante antigénico, reside en la porción Fab de la molécula. Mientras que ciertas propiedades biológicas que determinan la disposición subsiguiente del Ag, reside en la porción Fc (10.11).

Resultan productos diferentes de la acción de la pepsina sobre la IgG. La pepsina separa a esta en la cadena pesada un sitio distante de los puentes disulfuro, en la región de la bisagra; la porción de la molécula correspondiente al fragmento Fc producido por tratamiento con papaina es dirigido por la pepsina en fragmentos peptídicos. Los dos antígenos unidos a los fragmentos uno de los cuales es más largo que el fragmento producido por papaina, es por esto llamado Fab', permanece enlazado. Por lo tanto, un fragmento bivalente pesado llamado (Fab')₂ con un coeficiente de sedimentación de 5S, resulta de la acción de la pepsina sobre la IgG (10.12).

a) Propiedades de la IgG

La molécula de IgG tiene un peso molecular de 159 000 dal y un coeficiente de sedimentación de 7S. Cada molécula consiste en dos cadenas ligeras lambda o dos lambda y dos cadenas pesadas gamma. Se han identificado cuatro subclases de la IgG sobre la base antigenica y diferencias estructurales en la cadena pesada designadas como γ^1 , γ^2 , γ^3 y γ^4 (10).

La distribución relativa de estas cuatro subclases en suero

es del 25 al 30% de IgG, del 20 al 25% de IgB, 4 al 7% de IgA y del 3 al 4% para IgG + IgA (10).

La respuesta de Acs a algunas antigé- nas se caracteriza por una representación proporcional de los IgG de 1 a 4 subclases, pero hay una tendencia por ciertos Acs ser asociados primariamente con alguna de las subclases (Fig 5 (10)).

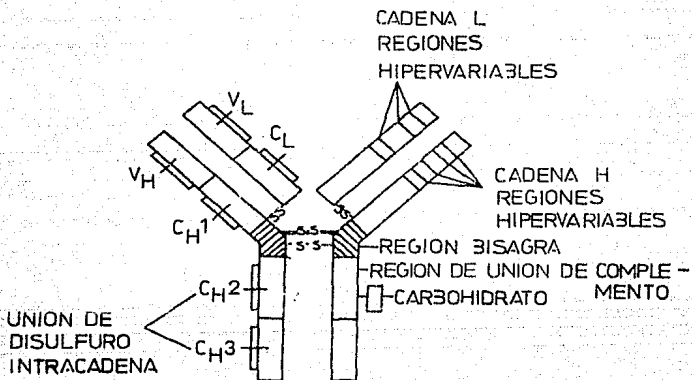


Fig 5 Presentación esquemática de un Ac IgG con los detalles en su estructura. (10)

Se ha encontrado que las cadenas pesadas consisten de segmentos variables y constantes de AAs como el VH segmento de 135 el que consiste de aproximadamente 115 AAs. Y el CH segmento de aproximadamente 300. El segmento CH consiste de tres regiones - de aproximadamente 110 AAs denominados CH₁, CH₂, CH₃, los cuales - muestran gran homogeneidad entre ellos. El segmento VH y VL son regiones que contribuyen a la formación del ligamiento con el Ag en la porción Fab de la molécula del Ac (10).

b) Inmunoglobulina M

La Igm tiene una molécula de peso de 900 000 dal. Cada molécula consiste en 5 subunidades idénticas consistiendo de dos cadenas ligeras 2 kappa o lambda y 2 cadenas pesadas (10,12).

En la sangre, se encuentra presente de un 5 a un 10%. La Igm se produce inicialmente durante la respuesta humoral de tipo humoral, su estructura le permite reaccionar con inmunógenos de tamaño grande que tienen determinantes antigénicos repetidos, como los polisacáridos de pneumococos, los flagelados bacterianos y las cubiertas virales. Cuando se combina con estos Ags, activa el C' de una forma tan efectiva que es suficiente una molécula para destruir a la célula (10).

La Igm se encuentra casi ausente en el feto y solo se eleva cuando existe algún estímulo antigénico, lo cual sucede generalmente después del nacimiento. Su vida media es de 5 días, no cruza placenta y se encuentran huellas de su presencia en la leche materna y en otras secreciones (3,12).

Dos tipos de oligosacáridos están presentes en Igm, uno sim

ple que consiste de manosa y N-acetilglucosamina y uno complejo que consiste de manosa, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa y ácido sialico. Estos carbohidratos se encuentran pegados al amino C 4 (9).

c) Inmunoglobulina A

La IgA constituye cerca del 10% de las Igs séricas. Su contenido de CHOs es elevado (12%) y se encuentra asociado a las cadenas pesadas. Esta globulina se encuentra en cantidades elevadas en secreciones como la saliva, las lágrimas y el calostro (9,10).

En la circulación la IgA se encuentra en forma monomérica con un coeficiente de sedimentación de 7S, mientras que en las secreciones se encuentra por lo general en forma dimerica, y tiene un coeficiente de sedimentación de 11S (9,12).

La IgA secretoria presenta una mayor resistencia que las otras Igs a la digestión por enzimas proteolíticas y a los agentes reductores, lo que en parte explica su papel protector a nivel de superficies mucosas. La concentración porcentual aproximada de IgA en la saliva es de 32 mg/100 ml, en el calostro de 151 mg/100 ml y en las lágrimas de 7 mg/100 ml (9,10,12).

d) Inmunoglobulina D

La IgD constituye una pequeña parte de las Igs circulantes. Su descubrimiento se debió al hallazgo de un mieloma que no pertenecía a las otras clases de Igs. La IgD es muy susceptible a la acción de enzimas proteolíticas, debido a que su formación no es compacta como la de otras Igs. Su vida media es de 3 días. En

algunas de las IgD estudiadas se ha demostrado actividad de anti cuerpo contra penicilina, insulina, proteínas de leche, toxide-
difterico y antígenos nucleares y tiroideos. Su papel más impor-
tante parece ser el de reguladora de la respuesta inmunitaria du-
rante las etapas de maduración y desarrollo de los linfocitos B
(9.12).

e) INMUNOGLOBULINA E

Una de las propiedades más importantes de la IgE, es su par-
ticipación en la mediación de reacciones alérgicas en el hombre,
como la rinitis alérgica, el asma y la anafilaxia. La IgE se en-
cuentra en muy pequeñas cantidades en la sangre. Esta globulina
presenta como otra de sus peculiaridades, la de ser termolábil -
(56 C durante 30 min), y homocitotropa. Debido a esta última pro-
piedad se determinó (mucho antes de conocer su existencia), su
presencia en el suero de individuos alérgicos. Fue en 1921 cuan-
do Kustner, que era alérgico al pescado, inyectó intradérmicamen-
te una pequeña cantidad de suero en la piel de Frausnitz y des-
pués el antígeno de pescado en el mismo sitio. La prueba ahora -
conocido como P.K. muestra cuando es positiva una reacción infla-
matoria que se presenta durante los primeros 30 min, que está -
caracterizada por eritema y edema (9.10).

La IgE contiene aproximadamente el 18% de CHO y tiene un pe-
so molecular de 190 kdal, tiene el mayor número de enlaces C-S -
intracadena, lo que parece conferirle más susceptibilidad al ca-
lor y a ciertos agentes químicos como el Mercaptoetanol y pro-
porcionarle la propiedad de fijarse en los tejidos, sobre todo -
en las células cebadas. La IgE no precipita ni fija C' por la --

vía clásica de activación. Se encuentra en mayor cantidad en el suero de pacientes con alergia al polen y en aquellas por infecciones por helmintos Tabla 2 (3).

Por otro lado, las Ig son sintetizadas por los linfocitos B y por células plasmáticas. En los primeros son incorporadas a la membrana plasmática y en las segundas son secretadas en la envoltura externa de las células (10, 12).

La mayoría de los linfocitos B circulantes sostienen a la IgM monomérica y a la IgD en su membrana plasmática. La minoría de los linfocitos B circulantes sostienen IgA, IgG, IgD o IgE en su membrana plasmática (10).

Tabla 2. Características de las Iga (10).

	IgA	IgG	IgM	IgD	IgE
Peso molecular (kdal)	150	150-350	500	150	190
Coefficiente de sedimentación (S ₂₀ W)	7	7(3-15)	13	7	8
CHOs (aprox %)	3	7	12	12	12
Sobrevivencia biológica (plasma T-1/2 día).	21	6	5	3	2
Fase a placenta	+	-	-	-	-
Activación del C'	+	-	+	-	-
Concentración en suero (mg/100 ml).	1,100	250	100	3	0.01

Tabla 3. Actividades biológicas de las Igs (10).

Clase de Ig	Actividades benéficas	Actividades perjudiciales
IgG	Neutralización de toxinas. Aglutinación Opsonización Bacteriolisis (con la ayuda del C').	El complejo Ag-Ac es capaz de mediar el daño a tejidos. Ejem: Reacción de Arthus, Enfermedad del suero.
IgM	Neutralización de toxinas. Aglutinación Bacteriolisis (con ayuda del C'). Antígeno receptor sobre linfocito B.	Igual que en IgG
IgA	Neutralización de toxinas. Aglutinación Opsonización ?	?
IgD	Ag receptor sobre linfocitos B.	?
IgE	Cambios mediados en la permeabilidad vascular.	Reacciones anafilácticas. Hipersensibilidad local ó sistémica.

Tabla 4. Características de las Igs: Clases y Subclases (10).

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadena pesada	γ	α	μ	δ	ϵ
Subclases	$\gamma^1, \gamma^2, \gamma^3, \gamma^4$	α_1, α_2	M_1, M_2	-	-
Cadena ligera	k o λ	k o λ	k o λ	k o λ	k o λ
Cadena J	-	+	+	-	-
Fórmula molecular	$\gamma_2 k_2$ o $\gamma_2 \lambda_2$	$\alpha_2 k_2$	$(\mu_2 k_2)_{5J}$ o $(\mu_2 \lambda_2)_{5J}$	$\delta_2 k_2$ o $\delta_2 \lambda_2$	$\epsilon_2 k_2$ o $\epsilon_2 \lambda_2$

D) BARRERAS ESPECIFICAS E INESPECIFICAS DE LA RESISTENCIA DEL HOSPEDERO A LA BACTERIA

1) BARRERAS ESPECIFICAS

Cuando el antígeno entra al cuerpo, dos tipos diferentes de reacciones inmunológicas pueden ocurrir: 1) Síntesis y liberación de anticuerpos libres en sangre y otros fluidos del cuerpo (inmunidad humoral). Este Ac actúa, uniéndose a la bacteria para mejorar su fagocitosis o se combina y neutraliza las toxinas bacterianas. 2) La producción de linfocitos, los cuales son por sí mismos efectores de la inmunidad celular (CI).

La inmunidad mediada por células puede ser transferida a individuos no inmunizados por medio de linfocitos o fracciones de estos (factor de transferencia), provenientes de organismos que han desarrollado una respuesta celular contra un determinado Ag. Al igual que en la respuesta humoral, es necesario que el Ag sea presentado al linfocito T en una forma especial. El macrófago es en apariencia la célula que cumple con esta función. La membrana del linfocito es activada como consecuencia del contacto con el Ag y la señal se transmite al interior de la célula, la cual inicia un proceso de diferenciación, transformándose en una célula blástica. De manera paralela se presenta una actividad proliferativa muy intensa. Una cantidad importante de estas células se especializan en la producción de factores solubles biológicamente activos (linfocinas) que modulan la actividad de otras células (sobre todo de macrófagos y monocitos). Otro grupo

de las mencionadas células adquieren una actividad citotóxica capaz de destruir células infectadas con parásitos intracelulares que exhiben en su superficie determinantes antigénicos propios del agente infeccioso o que muestran alteraciones de membrana reconocidas por los linfocitos T activados. Por último, entre estas células blásticas existen muchas que no asumen ninguna de las dos funciones señaladas y que permanecen en el organismo como células de memoria (3).

Los linfocitos T cooperadores no son activados cuando interaccionan directamente con el Ag, pero sí se activan cuando el Ag es presentado por una célula accesoria con esa función. Esta célula debe ser de la misma especie y presentar sobre la superficie glucoproteínas de clase II de MHC, es decir, Ags Ia, éstas deben tener la misma forma alélica del linfocito T. La célula accesoria después de procesar al Ag, sintetiza y libera IL-1 (3)

Los Ags proteicos sufren cambios cuando son captados por el macrófago u otra célula accesoria que los presenta. Durante la presentación del Ag, la proteína permanece asociada externamente a la célula por largo tiempo sin llegar a ser degradada. En este proceso es fundamental la relación entre el péptido inmunogénico y las moléculas Ia. El fragmento inmunogénico se asocia de manera directa con las moléculas Ia o bien con moléculas cercanas a ellas. Eventualmente se forma un complejo entre las estructuras que comprende al receptor de T, el fragmento antigénico y la molécula del macrófago (3,204).

La presentación del Ag se lleva a cabo bajo una estricta regulación, en gran parte a través del control de la síntesis y ex-

presión de las moléculas Ia. Tres grupos de moléculas inhiben la expresión de Ia: Las prostaglandinas de la clase E, la alfa-fetoproteína y los glucocorticoides. Las dos primeras pueden ser responsables del número disminuido de macrófagos que presentan Ia durante el periodo neonatal (3).

El macrófago es la célula más importante en la presentación del Ag y en el reclutamiento y aumento de clones celulares T. Los linfocitos B tienen limitada esta capacidad debido a su falta de habilidad para interiorizar partículas grandes (2).

Las células B son las precursoras de las células formadoras de Ac. Las células T son requeridas como células auxiliares que estimulan a las células B para que se diferencien en células productoras de Ac (10,202).

Tanto las células T como las células B poseen receptores específicos para los Ags y cooperan en la elaboración de una respuesta formadora de Ac a los Ags dependientes del Timo. Esta colaboración podría suceder por contacto directo y acción recíproca de las células T y las células B, en la cual la célula T enfoca y presenta el Ag a las células B de especificidad apropiada. Un fuerte requerimiento genético de compatibilidad de los Aghísticos ha sido reportado para las acciones recíprocas cooperativas que incluyen el contacto directo de las células T activadas y las células B específicas (3,10,202).

La producción de Ac frente a un Ag, se produce cuando una serie de clones de células B, formadas cada una de ellas por uno o varios linfocitos idénticos, reconocen los determinantes antigénicos, que son las señales de identidad superficial de los Ag.

Los receptores situados en las membranas de todas las clones de las células B se unen a un determinante específico. De inmediato la clona empieza a multiplicarse y se forma una población de células plasmáticas, que secretan moléculas de AcS libres. Las moléculas de Ac, presentan dos tipos de unión, uno en cada brazo, dotados de la misma especificidad que presentaban los receptores de la clona inicial. A través de esos sitios de unión los AcS se unen a otras moléculas del mismo Ag, destruyéndolas en unos casos y neutralizándolas en otros. Puesto que cada Ag porta muchos determinantes, abundan las clones de las células B que intervienen en la respuesta inmunitaria (200).

Como respuesta a los Ags dependientes del timo, las células T pueden diferenciarse en células T auxiliares o en células T supresoras. Las células T supresoras para Ags específicos pueden mediar la competencia antigénica y la tolerancia por liberación de sustancias supresoras. La cooperación positiva entre las células T auxiliares y las células B que expresan Igs M, da por resultado las células B que expresan IgG. Estas últimas pueden autoduplicarse. De manera semejante, la producción de IgE y probablemente de IgA requiere de cierta clase de ayuda de las células T (202).

Las células T cooperadoras y supresoras portan ambas el aloantígeno Thy-1 (Θ) pero pueden ser distinguidas sobre la base de los fenotipos del Ag Lyt. Las células T supresoras manifiestan un Ag Ia particular, que está especificado por la porción I-J de la región I del MHC (10,203).

El Ag en asociación con los MfS facilita la cooperación en-

tre las células T, lo cual resulta en la generación de las células T cooperadoras y las células T supresoras. Las supresoras -- posteriormente actúan en forma recíproca con los linfocitos cooperadores para suprimir la respuesta (202).

Las células T cooperadoras, por ejemplo, pueden tener un efecto positivo sobre las células B, pero también pueden participar de manera negativa provocando el cierre en la producción de más células T cooperadoras. Los productos de las células plasmáticas también pueden ejercer efectos supresores o estimulantes -- sobre la capacidad del sistema para generar Acs. Hay un efecto -- depresivo mayor de los Acs que opera mediante la eliminación de Ag del sistema. Además, las células plasmáticas que hacen Acs anti-idiotipo al reaccionar con las células T podrían ser supresoras o estimulantes, dependiendo de la clase de Ig del Ac anti-idiotipo. Por ejemplo, un Ac anti-idiotipo que fije el C' destruiría las células T cooperadoras, mientras que uno que no fije el C', podría simular el estímulo proporcionado por el Ag, estimulando a estos linfocitos (10,202).

La respuesta inmunitaria, como otros sistemas complejos, se encuentra bajo control genético preciso. En principio, este control genético puede ser expresado a cualquier nivel de la respuesta, incluyendo el reconocimiento del Ag (por las células B o por las células T), la elaboración de los Acs, la cooperación de las células T-B y diversas etapas de la diferenciación celular -- después del contacto con el Ag (10,202).

La región genética que expresa los Ays H-2 de los ratones -- tienen dos regiones principales, la región K y la región D, en--

entre los dos marcadores se encuentra el marcador Ss-Slp, y entre la región II y las Ss-Slp está la región I o región de la respuesta inmunitaria. Esta constituye una área compleja que puede ser dividida en tres subregiones. Los genes localizados en la región I condicionan las respuestas inmunitarias a bajas concentraciones de Ags que ocurre naturalmente (10,202).

Los genes I_r ligados a la histocompatibilidad controlan las respuestas a los Ags dependientes del Timo. Además de que se expresan en las células B así como en las T (10,202).

El sistema inmunitario es una red con una regulación muy precisa en la cual las interacciones de células/células, proporcionan la capacidad para un fino control de la respuesta inmunitaria (202,203).

2) BARRERAS INESPECIFICAS

La capacidad que tienen los individuos para afrontar y combatir de manera espontánea microorganismos real o potencialmente patógenos, con los cuales nunca habían estado en contacto y a los que están expuestos de manera cotidiana se llama resistencia natural, la cual consiste en la acción combinada de una serie de eventos y factores innatos del individuo, cuya efectividad está determinada genéticamente, se caracteriza además, por tener un efecto inespecífico; esto es que su acción está dirigida a cualquier Ag, lo cual hace de la resistencia natural un mecanismo importante para la sobrevivencia de las especies. Para este efecto, participan las barreras a) tegumentarias (piel, mucosas) y b) fisiológicas, procesos fagocíticos inespecíficos, el C' y otros factores humorales. El funcionamiento de todos estos se ve influido a la vez por factores intrínsecos del huésped (como su estado nutricional, edad y balance hormonal) o ambientales, como las radiaciones ionizantes (9,12).

La resistencia natural, llamada, también innata o inespecífica, puede ser absoluta o relativa. Es absoluta cuando todos los integrantes de una especie o raza carecen de susceptibilidad para ser infectados por un microorganismo determinado, la resistencia es relativa si dentro de una misma población, uno o varios de sus miembros presentan esta falla de susceptibilidad, aun cuando nunca antes hayan estado en contacto con el microorganismo, mientras que el resto de la población si es susceptible.

a) Superficies epiteliales (3).

La piel representa una barrera física que impide la penetración microbiana, debido a su impermeabilidad y a sus propiedades bactericidas relacionadas con la presencia de ácido láctico y ácidos grasos en el sudor y en las secreciones sebáceas (9,12).

Las superficies húmedas o mucosas de las vías respiratorias y urogenitales atrapan partículas, y el epitelio ciliar favorece que la capa de moco con partículas atrapadas sea expulsada en forma constante. Por otra parte, la mucosa nasal, con su epitelio pseudoestratificado con cilios, protege a los pulmones de la invasión de partículas presentes en el aire. Estas mucosas poseen además propiedades bactericidas y virucidas. El aparato gastrointestinal tiene una protección epitelial y enzimas bactericidas en la saliva y en los jugos gástricos. La elevada acidez del estómago inhibe la multiplicación de MOs, por lo cual se mantiene estéril (9,12).

b) Sustancias bactericidas de mucosas y líquidos tisulares.

La sangre y otros líquidos tisulares no permiten la implantación de MOs debido a las sustancias antimicrobianas que normalmente contienen (9,12).

La lisozima, se encuentra en varios tejidos y líquidos corporales, excepto en el líquido cefalorraquídeo, el humor acuoso, el sudor y la orina. Su concentración es elevada en las lagri-

mas. Esta enzima mucolítica es una proteína básica con un alto contenido de arginina que actúa a pH de 3 a 6. Su función es la degradación de los aminopolisacáridos de la pared celular, provocando la lisis bacteriana. A veces llegan a causar la muerte sin disolver la pared (9,12).

Se ha observado que los polipéptidos básicos están contenidos en los líquidos corporales de los animales resistentes al antrax; estos polipéptidos son ricos en lisina y al combinarse con la lisozima y la protamina a pH elevado, atacan la pared celular y desintegran a las bacterias. Es posible que las proteínas básicas que aparecen en los exudados inflamatorios actúen en igual forma (9).

Los interferones son un grupo de proteínas que impiden la replicación viral y participan en la regulación de la respuesta inmunitaria. Tanto en el ser humano como en el ratón se reconocen tres tipos: el alfa, que consiste en una familia de 8 moléculas distintas, provenientes de leucocitos infectados con virus, el beta, que deriva de fibroblastos infectados con virus, y el gamma, formado por células T estimuladas con antígeno. Los interferones se unen a la membrana de la célula blanco a través de receptores, y en el interior, estimulan la producción de dos nuevas enzimas, una de ellas, la 2-5 oligoadenilato-sintetasa, actúa sobre el ATP formando un polímero de Adenilfosfato, el cual activa a su vez una endorribonucleasa celular que inhibe la producción del RNA viral. La otra enzima es una cinasa activada por un PNA concatenado; esta inhibe la síntesis de proteínas virales e impide la actividad del factor de iniciación (9,10).

Otra propiedad de los interferones es la activación de las células asesinas naturales NK, las cuales son capaces de reconocer cambios celulares superficiales en las células infectadas por virus, unirse a ellas y destruirlas (9).

El sistema del C' tiene una participación decisiva en la resistencia natural, ya que puede ser activado de manera espontánea por varios MOs a través de la vía alterna, dando como resultado la lisis bacteriana. Después algunos de sus componentes causan opsonización y otros activan la quimiotaxia (9).

c) Fagocitosis.

La función de los fagocitos en la resistencia natural es atrapar partículas, material soluble y MOs vivos o muertos que penetran en los tejidos. Estos materiales, después de ser englobados, son digeridos; sin embargo, algunos no logran ser degradados y entonces solo se almacenan, evitando por lo menos un mayor daño tisular. Este fenómeno de almacenamiento es a menudo observado en zonas con una alta contaminación atmosférica (9,12).

Las células fagocíticas se han dividido en microfagos y macrófagos (9,204).

Los microfagos son los primeros en acudir a los sitios infectados, a través de las paredes de capilares adyacentes. Allí fagocitan con avidez. Sin embargo, son células relativamente frágiles y el ácido que se acumula en el área de inflamación en ocasiones los mata. En cambio los macrófagos llegan con lentitud, pero son elementos más resistentes que fagocitan no solo material extraño sino también leucocitos muertos y otros detritus ce

lulares. Otra ventaja del macrófago es su capacidad de dividirse in situ, lo que permite su acumulación en el área problema. Además llega a formar localmente células gigantes como resultado de la fusión de células individuales o de la división nuclear. Estas células pueden atrapar partículas muy grandes. Comparadas con los neutrófilos PMN, su capacidad fagocítica es mucho mayor. Los fagocitos con mayor actividad se especializan con rapidez para mantener la homeostasis corporal en el caso de una infección microbiana (9).

Cuando estas células no alcanzan a detener la infección, esta progresa y entonces el hospedero requiere de otros mecanismos para combatirla. Es evidente que la fagocitosis constituye una de las actividades más importantes del organismo, su contribución a la resistencia natural es crucial (10,12).

d) Inflamación.

Este efecto es inducido por varios tipos de sustancias producidas durante el daño primario a los tejidos. Consiste en la dilatación y el aumento de la permeabilidad de los capilares con migración de células y otros constituyentes plasmáticos a los sitios afectados. Como resultado de la reacción inflamatoria, el hospedero obtiene una serie de beneficios, de los cuales se mencionan solo algunos: el envío de un gran número de H0 que se encargan de limpiar el área afectada; fagocitando H0s y otros detritos celulares; la infiltración tisular, que constituye un mecanismo local para la producción de factores específicos de inmunidad; la formación de fibrina en los tejidos, con lo que se cir-

conscribida mecánicamente a las bacterias, facilitándose así la labor de los fagocitos; el exudado plasmático que proporciona factores humorales con propiedades antibacterianas en alta concentración; el aumento de los flujos sanguíneos y linfático, que diluyen y arrastran productos bacterianos tóxicos; la elevación local de la temperatura, que dificulta la proliferación de algunos microbios y la presencia de proteínas plasmáticas que normalmente no se encuentran en el sitio de la lesión, lo cual representa una respuesta protectora del organismo, propician un ambiente bioquímico adverso para el desarrollo bacteriano, además de que algunas poseen actividad antimicrobiana (9,12).

E) MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia a los compuestos antimicrobianos fue percibida ya en 1907 por Paul Ehrlich, quien observó que algunos Tripanosomas podían crecer en presencia de los arsenicales, que se utilizaban para el tratamiento de las enfermedades producidas por estos protozoos (7).

La capacidad de crecimiento de una bacteria en presencia de un compuesto antimicrobiano, se adquiere en virtud de un cambio en la información genética de la bacteria localizada en el genoma o en los plásmidos extracromosomales (7,8).

No todo el DNA de las bacterias está en forma de un único gran cromosoma circular; hay una pequeña porción de DNA celular (que a veces representa solo del 0.1 al 0.2%), que está fuera del cromosoma en forma de plásmidos o episomas. Estas estructuras de DNA subsidiarias se asemejan a los cromosomas, en que son capaces de una autorreplicación autónoma dentro de la bacteria. Los plásmidos están también adheridos a la membrana plasmática bacteriana e, igual que los cromosomas, son unas moléculas cerradas dobles. Sin embargo, los plásmidos se diferencian de los cromosomas en que no son indispensables para la existencia de la bacteria y que se pueden eliminar de ella por un proceso de curación* (7,8).

* Proceso que consiste en el tratamiento de las células por la acriflavina y otras acridinas, la rifampicina, el bromuro de etidio, los iones cobalto y otros (7).

En las bacterias se han descubierto ya varios tipos de plásmidos, que se diferencian unos de otros en la información genética de que son portadores. Entre los mejor estudiados están los factores de resistencia, portadores de una información que dirige la síntesis de enzimas que confieren resistencia a las bacterias para determinados antibióticos como la penicilina, la estreptomycina, el cloranfenicol y las tetraciclinas (TC) (1,5).

El que haya cepas resistentes a los antibióticos en una población, depende de la naturaleza química del compuesto y en parte del MD (7).

Desde el punto de vista bioquímico, la resistencia a los compuestos antimicrobianos se puede adquirir de cuatro formas -- principalmente:

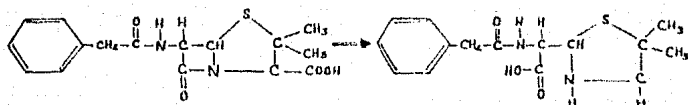
1. Por el cambio en la permeabilidad de la membrana de los MDs. La resistencia de algunas bacterias a la acción de antibióticos como tetraciclinas resulta del cambio en la capacidad de la membrana plasmática para el transporte del mismo. En efecto, la resistencia a las TC que es consecuencia de la adquisición de la información genética contenida en un determinado plásmido, aparece porque la bacteria es capaz de excretar la TC que ha sido previamente transportada al interior de ella; las bacterias no resistentes al antibiótico son capaces de transportar el compuesto a su interior, pero no de excretar sus moléculas (7).
2. La posibilidad de que el microorganismo modifique las propiedades de la enzima que sufre directamente la acción del compuesto. La resistencia de los pneumococos a la acción de las Sulfonami--

das, se explica frecuentemente por la producción de cepas mutantes bacterianas, en las que está alterada la información genética para la enzima tetrahidropteorato sintetasa, en las cuales la enzima que se sintetiza, tiene mucho menor afinidad para la sulfonamida que para el p-aminobenzoato (7).

3. Que el MO sufra cambios en su metabolismo, de tal manera, que se disminuya la importancia fisiológica de la enzima directamente afectada por el compuesto. No hay ejemplos bien definidos de este tipo de efecto, aunque se ha sugerido que la resistencia a la penicilina de ciertas bacterias, se puede explicar por la presencia de una cantidad menor de la normal de peptidoglucana en la pared celular; se concibe que, en estas condiciones el papel estructural de la peptidoglucana en la pared, sea asumido por otros polímeros (7).

4. Con mucha frecuencia se explica la resistencia a la acción de un compuesto antimicrobiano porque el microbio adquiere algún medio para hacerlo inactivo. Se han reconocido dos principales tipos de mecanismos de inactivación (7).

a) Algunos organismos resistentes segregan una enzima que convierte al compuesto antimicrobiano en una forma inactiva. Por ejemplo, las beta-lactamasas, que son principalmente peptidasas, y catalizan la degradación hidrolítica de penicilinas y cefalosporinas. La hidrólisis de la penicilina G por una beta-lactamasa tiene como resultado la producción de un ácido antibióticamente inactivo, como se ve a continuación (7).



Penicilina G

Acido penicilico G

b) Otro tipo de inactivación se produce por una modificación química del compuesto antimicrobiano, el mejor ejemplo es la conversión del cloranfenicol en O-acetoxicloranfenicol, reacción catalizada por la enzima cloranfenicol trasacetilasa (7).

La característica más enigmática de estos procesos de inactivación es que requieren que el microbio produzca una enzima completamente nueva, proceso que significa una hazaña notable en el campo de la evolución molecular. La síntesis de estas enzimas de inactivación bacteriana está dirigida por genes que residen en plásmidos y que pueden ser transferidos de una bacteria a otra (7).

Por otro lado, la resistencia a la actividad bactericida del suero y fagocitosis por leucocitos PMN, es una propiedad de muchas cepas bacterianas, que causan severas infecciones, involucrando penetración a tejido y daño. Se han implicado a los componentes de la envoltura bacteriana tales como: la membrana exterior del LPS, polisacáridos capsulares y proteínas de la membrana exterior, en la resistencia de cepas bacterianas a la actividad bactericida del suero (6).

En el caso de las bacterias Gram (-), uno de los mecanismos que actúan para destruir a las bacterias, es la acción del C'-

Los últimos componentes de la cascada del C₃ son depositados -- sobre la superficie bacteriana para formar una estructura como -- de rosquilla llamada complejo de ataque a la membrana (MAC). Este complejo con una superficie externa hidrofóbica y centro hidrofílico que penetra en la pared de la célula bacteriana, causando su muerte (4).

Las enterobacterias han desarrollado un mecanismo de evasión al mecanismo normal anteriormente mencionado. Estas bacterias permiten que el MAC sea depositado sobre la superficie, pero su inserción en el lípido de la membrana no es exitosa y es desalojado. Para que ocurra esta desviación de inserción, la cadena de LPS tiene un papel importante. El CS depositado en la superficie de la bacteria tiende a unirse al polisacárido del LPS a alguna distancia de la superficie de la bacteria. Al estar el MAC lejos del lípido de la membrana externa es fácilmente removido (4).

Sin embargo, los gonococos tienen otro mecanismo en el cual el MAC no es removido de la superficie de la bacteria, como sucede con las enterobacterias, pero se establece la unión a componentes de las proteínas evitando la penetración del MAC (4).

Keith A. Joiner et al, experimentaron con *Salmonella minnesota*, escogiendo una cepa lisa con una cadena de LPS bien desarrollada, y una mutante rugosa con parte del lípido A unido al núcleo del lipopolisacárido, estando este último incompleto, es decir no tenía cadenas en el lado del lipopolisacárido, encontrando

que el tipo liso fue altamente resistente al suero. La forma rugosa fue altamente susceptible a la acción lítica del C' (4,6).

Aunque ambas formas de la bacteria activan al C' y a ambas se les une el C3 en su superficie, la diferencia entre las formas susceptibles y resistentes al suero, reside en el proceso de adherencia del complejo de ataque a la membrana, C5b-9 (4).

Se concluye que el MAC se forma apropiadamente sobre la superficie de la bacteria resistente. Sin embargo, para que el MAC induzca la lisis es necesario que se inserte en la bicapa lipídica de la membrana de la bacteria. Tomando como referencia esto, el MAC llega a ser hidrofóbico para facilitar la inserción (4).

En el caso de las bacterias lisas esta inserción no tiene éxito. El MAC hidrofóbico no tiene acceso a la membrana externa de la bacteria y es removido. Parte de esto se explica de la unión del C' a los LPS bacterianos (3).

Fue demostrado, que el C3b tiende a unirse covalentemente al polisacárido o del lado de la cadena del LPS bacteriano lejos de la superficie bacteriana, de tal forma que el C3b actúa como el foco para la formación del MAC. La bacteria lisa resistente al suero evita el depósito del MAC lejos de la estructura vital (4).

Por otro lado, otras enterobacterias (*E. coli*, *Salmonella*) relativamente resistentes al suero evitan el ataque del C', limitando el depósito de C3b. El C3 depositado en la superficie de la bacteria es metabolizado normalmente, pero menos C3b es depositado sobre la bacteria más resistente limitando el ataque del C' (4).

Otras bacterias como la *Vibrio vulnificus*, una especie de *Vibrio* diferente de la *Vibrio* spp, activa con menor intensidad al C' que el *vibrio parahaemolyticus*, reduciendo la opsonización que es necesaria para una unión eficiente, y para la ingestión de la bacteria (3).

Se sabe también, que la composición de los LPS de *Haemophilus ducrey* es un factor determinante de su susceptibilidad al suero (6).

La capacidad de los LPS de *H. ducrey* para inhibir la actividad bactericida del suero se correlaciona con la actividad anti-complemento de los LPS. Así, el efecto inhibitorio de los LPS de *H. ducrey* en la actividad bactericida del suero, puede ser debido a su habilidad para activar y agotar al C' del suero. Parte del sitio de la estructura de los LPS, implicados en la sensibilidad del suero, es retenida en los LPS de la cepa isogénica (6)

Finalmente en estudios realizados con *Pneumococo* tipo 7, se sugiere que probablemente la causa de resistencia al suero de los cocos Gram (-), sea simplemente la barrera física impuesta por el grosor de la capa peptidoglicana, ya que el complejo dimérico de ataque a la membrana puede insertarse solamente de 10 a 15 nm en la superficie receptiva, y la capa de mureína se encuentra hasta los 100 nm de espesor (2).

* Componente estructural de la pared bacteriana sinónimo de peptidoglucona, glucopéptido etc..(7).

II PARTICIPACION DE LAS CELULAS SANGUINEAS EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA

A) LEUCOCITOS FMN

1) CARACTERIZACION Y ACTIVIDAD BACTERICIDA DE COMPONENTES DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Existen una variedad de proteínas bactericidas potentes, que difieren en peso molecular y movilidad electroforética, las cuales son aislados de los gránulos de FMN de diferentes especies. Estas proteínas frecuentemente muestran actividad selectiva en varias especies como en bacterias Gram (+) y Gram (-) (17)

En los gránulos de leucocitos se localizan varias proteínas cationicas antimicrobianas, algunas cataliticas, tales como: lisozimas y mieloperoxidasa y otras a las que no se les conoce actividad enzimatica. La función de los gránulos con la vacuola fagocitica, permite que estas proteínas puedan ejercer su efecto sobre los MOs capturados (14,16). Las proteínas cataliticamente-activas incluyendo lisozimas, MPO y ciertas proteasas, tienen actividad bactericida limitada por si solas pero en combinacion con otros factores y proteínas cationicas, se potencializa su actividad (14,17).

Weiss J. Franson y Col, reportaron la purificación parcial de una potente proteína bactericida y fosfolipasa A₂ separada de leucocitos PMNs ambas poseen actividad incrementadora en la permeabilidad hacia la envoltura de E. coli (14).

La actividad de esta proteína purificada está estrechamente ligada a la envoltura de las bacterias susceptibles, la que es reconocida inmediatamente después de un trastorno en la barrera permeable a actinomicin D. El incremento en la permeabilidad de la envoltura refleja solamente alteraciones estructurales limitadas, y no es parte de una desorganización general de la bacteria. Aunque la pérdida de la habilidad para multiplicarse se manifiesta en pocos minutos después de exponer a la bacteria a las proteínas bactericidas de humano y de conejo, la bacteria muestra una pequeña degradación molecular, y una casi inalterada biosíntesis macromolecular (13,14).

Por otro lado, esta proteína catiónica incrementadora de la permeabilidad bactericida, es al menos de 20 a 50 veces más efectiva hacia todas las cepas rugosas de *E. coli* y *S. typhimurium* que algunas otras fracciones proteicas derivadas de gránulos de leucocitos humanos (15). Es la proteína bacteriana más potente hasta ahora descrita. Es altamente específica en su acción para un amplio rango de especies Gram (-). (16).

Representa del 0.5 al 1% del contenido total de proteínas de los PMN humanos y de conejo respectivamente (16).

Esta proteína es casi inactiva a pH 5. Este es el modo que el papel del pH intravascular puede ser importante, entonces estas proteínas antimicrobianas incrementadoras de la permeabilidad bactericida que tienen su máxima actividad a pH neutral, pueden llevar a cabo su función después de la captación intracelular de la bacteria, aun acompañado de la formación de la vacuola y la degranulación, antes de que ocurra una baja en el pH (15,7).

El hecho de que el número de especies bacterianas Gram (-) sean especialmente sensibles a esta proteína, pero que todas las Gram (+) examinadas hayan sido resistentes, sugiere que la unión es necesaria para expresar la actividad biológica, es decir los efectos biológicos de la proteína incrementadora de la permeabilidad bactericida (BPI), requieren de la adherencia de la proteína a la superficie de la bacteria. Esta interacción involucra pasos secuenciales, el primero, es la unión de la proteína básica a la superficie bacteriana cargada negativamente (15, 16), el segundo es un grupo de eventos necesarios post-unión basados en interacciones hidrofóbicas de la BPI con la envoltura. A 37°C ambas uniones y post-uniones, toman lugar en segundos. La BPI ejerce dos efectos, el irreversible y el reversible, sobre bacterias susceptibles como *E. coli*, 15 min. después de exponer a la BPI a *E. coli*, esta pierde irreversiblemente su habilidad para formar colonias. Las alteraciones de la envoltura son muy leves y parecen estar enteramente limitadas a la membrana externa (OM) de la envoltura, dejando el interior de la membrana (IM) estructural y funcionalmente intactas. Las alteraciones de la OM incluyen un incremento inmediato en la permeabilidad para moléculas hidrofóbicas tales como el antibiótico Actinomicin D, y una activación selectiva de las enzimas bacterianas que degradan los fosfolípidos de la OM y las peptidogliconas de la envoltura (15,16).

La especificidad de las propiedades antibacterianas de la BPI, para bacterias Gram (-), así, como el principio de los efectos de la envoltura y su reparación cuando la BPI es removida, puede ser explicado por una interacción de la BPI con los LPS de

la bacteria que constituyen los extractos externos de la OM, solamente bacterias que contienen LPS son sensibles a BPI (16,15, 17,18).

Las moléculas con carga negativa en la OM son los LPS (15, 16). El residuo de azúcar 2-ceto-3-desooctanato (KDO), localizado en la base de la cadena de polisacáridos, representa una agrupación de cargas negativas, normalmente ocupados por Mg^{2+} , Ca^{2+} que cruzan, unen y estabilizan la OM. Se piensa que los péptidos básicos que perturban la membrana tal como el antibiótico Polimixin B y la proteína BPI, inicialmente interactúan con la envoltura por competencia con los cationes divalentes para estos sitios cargados negativamente, por lo tanto desestabilizan las capas de LPS (18). Además la ruptura ocurre, cuando las regiones de BPI se insertan entre la porción del lípido A de los LPS. Consecuentemente los fosfolípidos de la OM ocupan una posición asimétrica en el interior de la bicapa hidrofóbica, pudiendo translocar las bicapas de fosfolípidos formando canales hidrofóbicos para pasaje de moléculas hidrofóbicas, previamente impermeables (16).

Posteriormente a estos estudios Peter Elsbach et al, reportaron la separación de la BPI de la fosfolipasa A₂, además de la purificación de dos proteínas estrechamente relacionadas, esta separación de la fosfolipasa A₂ de leucocitos resultó en la pérdida de la habilidad de esta para degradar los fosfolípidos de E. coli intactos, pero no mostró efecto sobre la actividad incrementadora de la permeabilidad por proteínas bactericidas. Sin embargo, esta función se restauró con la combinación de la fosfo

impase a con la proteína incrementadora de la permeabilidad bactericida, lo que sugiere que la toxicidad de los extractos de conejo solo depende de la actividad de la proteína asociada con la BPI. Sin embargo, aunque los extractos de membranas de PMNs humanos también contienen fosfolipasa A₂, nunca se ha observado actividad de la toxicidad en asociación con la fosfolipasa incrementadora de la permeabilidad bactericida de humanos (15).

Debido a esta diferencia de especificidad las actividades biológicas de las proteínas incrementadoras de la permeabilidad bactericida de leucocitos de conejo y de leucocitos PMN humanos, en comparación con la actividad de los lípidos incrementados por la proteína de conejo, es cerca de dos veces más grande que la producida por la proteína de humanos, mostrando que en este aspecto las dos proteínas no son equivalentes (14).

Las dos proteínas ejercen prácticamente la misma potencia y especificidad antimicrobiana (14).

La actividad bactericida de estas proteínas es evidente solamente hacia bacterias Gram (-). Todas las cepas bacterianas Gram (-) probadas que son susceptibles a la acción bactericida de las proteínas, exhiben, además, un incremento casi inmediato en la permeabilidad de la envoltura bacteriana. La membrana que fue usada para medir la permeabilidad de las bacterias Gram (-) (15,16,19).

Se requieren altas concentraciones de estas proteínas para producir efectos bactericidas e incrementar la permeabilidad en

cepas lisas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que corresponden a cepas rugosas con polisacáridos incompletos (15).

Ambas proteínas tienen actividad incrementadora de la permeabilidad y actividad bactericida a un pH neutral (15,16,19).

Ambas proteínas son inactivadas por los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} y ambas tienen estabilidad a un calentamiento moderado. A 60°C no son afectadas, pero son destruidas por calentamiento a 80°C (15,16).

Las dos proteínas tienen un peso molecular de 50 Kdal (proteína de leucocito de conejo) y 58 Kdal (proteína de leucocitos de humano), con una composición de aminoácidos (AA), bastante similar, ambas proteínas son fuertemente cationicas (puntos isoeléctricos > pH 9.6), sin un alto contenido en AA básicos, lo que sugiere que los AA están en forma de amidas, siendo la secuencia de AAs de los primeros 12 residuos NH-terminal (14,16).

Recientemente se estableció usando mutantes S17 de *E. coli* deficientes en fosfolipasa, que la fosfolipasa A₂ de leucocitos participa en un ataque sobre los fosfolípidos bacterianos, cuando *E. coli* es expuesta a concentraciones bactericidas de la fracción G (obtenida por cromatografía de Sephadex-carboximetil), la cual es rica en fosfolipasa A₂ (14).

El principio de la degradación de la red de fosfolípidos, coincide con un incremento casi instantáneo en la permeabilidad a Actinomicin D y con la fase de destrucción rápida. Es evidente por lo tanto, que un ataque sobre la envoltura de los fosfolípidos tiene un papel en la función de estas proteínas (14).

Aunque la hidrólisis de fosfolípidos es aparentemente esen-

cial para la destrucción efectiva de E. coli, el ataque temprano-degradativo por la fosfolipasa A₂ leucocitaria de conejos en la envoltura de lípidos, puede muy bien tener una función importante en la destrucción microbicida realizada por los leucocitos (14).

En otros estudios Michael et al, observaron que los granulocitos de conejo y cobayo, contienen una familia de proteínas lisosomales de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana selectiva. Estas moléculas ricas en cisteína y arginina se encuentran en distintas clases de gránulos citoplásmicos, y se ha considerado con actividad microbicida (15).

Zeya y Spitznagel, observaron la existencia de una familia de péptidos de bajo peso molecular altamente catiónicos en granulocitos de conejo (16).

Los efectos antibacterianos de estos péptidos de granulocitos fueron fuertemente dependientes del pH. Su actividad bactericida óptima, se observó entre pH 7-8, exhibiendo relativamente pocos efectos a un pH de 5.8 (16).

En otros experimentos, de los granulocitos humanos presentes en sangre periférica, se obtuvieron fracciones de proteínas lisosomales por el análisis en columna con DEAE celulosa y por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (17).

Estas proteínas lisosomales juegan un papel muy importante en la eliminación de cuerpos extraños en el organismo. Hidrolasas de lisosomas actúan destructivamente sobre las bacterias y virus, cambios en los niveles de esta hidrolasa dan lugar a: Infecciones, cambios tumorales, reacciones inflamatorias y otros--

estados patológicos (19).

Granulos de proteína proporcionan LF, las cuales también actúan contra las bacterias y otros posibles factores implicados en la actividad bactericida como un pH bajo y la lisozima (19,20)

Cuatro fracciones lisosomales son identificadas a través de exámenes electromicroscópicos, en los cuales se observaron las siguientes diferencias morfológicas. Tabla 5 (19).

Al obtener las 4 fracciones lisosomales ya sea por columna con DEAE-celulosa o por centrifugación en gradiente de sacarosa, se observa que las fracciones 3 y 4 son las que contienen la mayor cantidad de proteína, por lo que el aumento en la actividad biológica se ha obtenido (19).

El contenido de proteínas es directamente proporcional a la actividad enzimática y a la actividad bactericida, por lo que cada fracción lisosomal tiene diferente grado de actividad (19).

TABLA 5. Diferencias morfológicas de cuatro fracciones lisosomales (19).

	F-I	F-II	F-III	F-IV
Intensidad de luz	muy clara	muy densa	homogénea	densa
Estructuras	abundante	normal	---	---
Densidad electrónica	baja	baja	---	baja
Número de lisosomas	bajo	muy bajo	alto	normal
Otras estructuras	---	mitocondria	---	núcleo celular

F= Fracción

La actividad enzimática (de enzimas como fosfatasa ácida, - enzimas proteolíticas con un pH ácido y neutro de las fracciones de proteína, muestran la mayor actividad enzimática en la fracción III (19).

La actividad enzimática de las enzimas lisosomales es directamente proporcional a la actividad bactericida de las fracciones obtenidas (19).

Proteínas lisosomales (obtenidas por análisis electroforético en gradiente de sacarosa) contienen enzimas tales como lisozima y ribonucleasas (presentes en grandes cantidades) mostrando actividad bactericida (19).

La destrucción de células bacterianas, podría ser el resultado del sinergismo de proteínas y enzimas catiónicas (19).

Existe una relación directamente proporcional entre la actividad de enzimas lisosomales y la actividad bactericida de las fracciones obtenidas. Estas enzimas indicativas, así como colagenasa y elastasa, son de utilidad para el diagnóstico clínico. La fosfatasa ácida está localizada en algunos fragmentos del retículo endoplásmico, esto muestra su interdependencia a lisosomas, a retículo endoplásmico y a aparato de Golgi (19).

Con la presencia de lisosoma se puede determinar la actividad enzimática lisosomal y el aumento de procesos patológicos (19).

Con la obtención de estas fracciones de proteínas lisosomales, podemos ver la importancia que tienen estas en la actividad bactericida que llevan a cabo los leucocitos PMNs (20).

Se han observado cambios en *E. coli*, la pared celular sufre la más grande destrucción, también se observa daño en el protoplasma. *Staphylococcus* sufre cambios similares. En *Streptococcus* del grupo A y *M. tuberculosis* después del tratamiento con proteínas lisosomales no mostraron ningún cambio en su pared. Varios estudios indican que durante la fagocitosis de bacterias por FMN y Macrófagos, se observaron cambios en la estructura de las mismas. Existen diferencias en la sensibilidad de muchas clases de bacterias en el curso de la reacción con proteínas lisosomales. *Staphylococcus* y otras bacterias Gram (+) son fácilmente destruidas. Algunos microorganismos tales como *Listeria* y *Toxoplasma gondii*, crecen junto con células fagocitarias, debido a que son resistentes a la acción de proteínas catiónicas. Probablemente la actividad de proteínas lisosomales de FMN no es capaz de destruir su pared celular (20).

Por otro lado, los FMNs son capaces de destruir *Staphylococcus* y *Streptococcus*, esto contradice un poco lo dicho con respecto a que las proteínas lisosomales de FMNs no destruyen la pared celular de *Streptococcus*. Esto puede ser porque los FMNs lisados disuelven algunos elementos de la pared celular de *Staphylococcus* y epidermidis, sin embargo, la lisis de leucocitos no afecta células de *Streptococcus*, es posible pues que sustancias tales como aniones y cationes de polielectrolitos presentes en la lisis de leucocitos, inhiban selectivamente la lisis de *Streptococcus* (20).

Es poco conocida la naturaleza de los sistemas enzimáticos, a través de los cuales se lleva a cabo el daño a la pared celu-

lar de las bacterias, por enzimas lisosomales presentes en PMN y en MØ (20).

Enzimas respiratorias de la pared celular de Staphylococcus son los primeros sitios de acción de las proteínas cationicas -- aisladas de PMNs de conejo. Los mismos MØ que crecen anaerobicamente, no fueron sensibles a la acción bactericida de proteínas cationicas, esto sugiere la presencia de cadenas de Citocromo -- (el cual no existe en la bacteria de Staphylococcus que creció -- junto con glucosa), el cual es necesario para la union de protei -- nas cationicas y para las próximas acciones de éstas proteínas -- (20).

La acción de las proteínas cationicas es suprimida por la --
adición de Fe^{2+} y Fe^{3+} (20).

La acción de las proteínas bactericidas obtenidas de PMN, -- es dependiente del tipo de bacteria a probar (20). Por lo que a -- demás de hidrolasas lisosomales ácidas la presencia de otros fac -- tores son necesarios, así como MPO, ribonucleasa y anión super -- óxido (20,21).

Las proteínas cationicas, lisozimas y enzimas atacan los mu -- copeptidos de la pared celular de algunos tipos de bacterias, -- otras bacterias son resistentes a estos factores quedando la par -- ticipación de otros componentes como C' , ácido ascorbinico y --- H_2O_2 (20).

La importancia de estas proteínas lisosomales presentes en PMNs y MØ, es que en la fagocitosis se lleva a cabo el rompimien -- to de la pared celular de bacterias, sólo al principio de los --

procesos de digestión celular (20).

La acción de estas proteínas granulocíticas lisosomales, está comprobada experimentalmente en conejos, afirmando que las proteínas lisosomales estimulan la desaparición de bacterias, para la sangre en circulación. Aunque los experimentos in vivo e in vitro de procesos fagocíticos, no son siempre comparables con el curso de los efectos adicionales de organismos vivos de un factor desconocido, inhibiendo así las propiedades bactericidas de la sangre y tejidos líquidos, por lo que es difícil determinar el efecto cuantitativo de la absorción intracelular y de la digestión de las bacterias (21).

Por otro lado, se han estudiado los sobrenadantes de células mononucleares activadas por lectinas, los cuales tienen la capacidad de estimular el metabolismo de los PMNs, y además de la fagocitosis. Sin embargo, células mononucleares estimuladas, secretan componentes del C' (22). El efecto de los sobrenadantes de células mononucleares activadas, parece ser independiente de los efectos producidos por Acs y C' (23).

Esta estimulación de PMN va a ayudar a la actividad bactericida, y esto es importante para la defensa inmune del hospedero contra bacterias (22).

Es posible, que una parte de la actividad presentada en los sobrenadantes mononucleares estimulados, este dada por la Tuftszina (un tetrapeptido aislado de suero normal), que ayuda a estimular la fagocitosis. Aunque in vitro, la producción linfocítica de Tuftszina, no ha sido demostrada, es probable que esta sea un producto celular mononuclear, ya que se encuentra deficiente en

el suero de pacientes esplenectomizados (22).

Además en los sobrenadantes de células mononucleares, se encuentra el Factor estimulador de PMN (FSF), este factor no tiene características funcionales de una opsonina en suero, con la que se pueda comparar. Experimentos demostraron que los mecanismos de acción del FSF, son diferentes a los mecanismos de la opsonina en suero, la cual efectivamente efectúa la actividad bactericida sin una preincubación con PMN, por lo que se ha preferido llamar al FSF (Factor Biológico Activo), presente en sobrenadantes de células mononucleares activadas y no como una opsonina (22).

Las características físicas y biológicas del FSF, no han sido investigadas, por lo que este factor no se puede comparar con una linfoquina, las cuales también afectan a los PMN. Las linfoquinas son biológicamente activas, están presentes en sobrenadantes de linfocitos activados (con lectinas o Ag) cultivados in vitro, estas linfoquinas están involucradas en la inmunidad mediada por células, juegan un papel importante en la defensa del hospedero a MO, mejorando la actividad metabólica y fagocítica de MØ y monocitos (22).

Además de estas linfoquinas, existen otras que pueden afectar a los PMN, como los factores quimiotácticos y los Factores de inhibición en la migración de leucocitos, ambas afectan la movilidad de los leucocitos PMN, Monocitos y MØ. La estimulación de PMN para realizar la actividad bactericida, puede ser una función adicional de estas linfoquinas, no siendo extraño que un factor tenga más de una función biológica (22).

Linfocitos y monocitos estar presentes en los cultivos de células mononucleares, y ambas células son capaces de producir una variedad de sustancias biológicamente activas. puede ser prematuro pensar que el PSF descrito anteriormente, es un derivado de linfocito. Sin embargo, se indica que la actividad del PSF es ta presente en sobrenadantes de líneas celulares linfoides cultivadas no fagocíticas (22).

No importando la naturaleza y el origen del factor, sería interesante determinar si Ags bacterianos purificados, podrían también estimular a los linfocitos para secretar FCF. Y si esto ocurre in vitro (después de la infección o inmunización), la estimulación mediada por las linfocinas para la actividad bactericida de PMN, podría ser entonces considerada como un mecanismo de defensa inmune adicional, por el cual el hospedero evade a los MCR (22).

2) PAPEL DE LA LACTOFERRINA EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE POLIMORFONUCLEARES

La Lactoferrina (LF), fue descubierta en 1939 por Sorensen y Sorensen. A esta proteína se le han dado varios nombres tales como: Lactoferrina, lactotransferrina, lactocidofilin o equino siderofilina (29).

La LF es una glicoproteína de una sola cadena que puede unir dos iones férricos (26,34,28,31), está cargada positivamente (PI 9.0) (33), su peso molecular es de 90 Kdal (26,31).

Fue separada primeramente de leche de bovino (31), es sintetizada en células epiteliales acinares (31,34), de una variedad de tejidos glandulares como glándulas salivares y glándulas bronquiales (31).

Su distribución en los fluidos del cuerpo es similar a la de la IgA secretoria (31). Se ha encontrado en productos exocriños (28,31), tales como: leche materna, saliva, lágrimas, moco cervical, fluido seminal, bilis, secreciones bronquiales, desgarnes, calostros, secreciones nasales, fluidos gastrointestinales y orina (29,31,34).

Es una proteína importante en los PMN humanos, los cuales la contienen en cerca de $3.4 \mu\text{g} \cdot 10^6$ células (27,29).

En los primeros estudios se demostró que la proteína ligadora de hierro, está presente en el núcleo o en la membrana nuclear de los neutrófilos maduros (31), y por otro lado, la inmunohistoquímica, muestra que la LF aparece primeramente en células mieloides en la etapa de promielocito y que su concentración

en citoplasma se incrementa progresivamente hasta la fase madura que es el neutrófilo segmentado (25). Sin embargo, en otros estudios se demostró que la LF no está presente en los precursores mieloides (31), y el sistema hematopoyético se encuentra casi exclusivamente en los gránulos específicos de los neutrófilos (28)

Por lo tanto, en los PMN la LF está presente en los gránulos específicos (12,28,35) asociada con lisozimas de los mismos (34). Cuando la bacteria es fagocitada los gránulos específicos y azurófilos, son liberados dentro de la vacuola fagocítica (25, 28,36), siendo los azurófilos los primeros en ser liberados (25). El contenido de estos junto con la caída del pH en la vacuola fagocítica (25), parecen ser responsables de los efectos bactericidas (25).

Si la LF en PMN es esencial para los efectos bactericidas, su capacidad, para ligar al hierro puede ser la clave para esta función (25,30), ya que es conocido que normalmente tiene una gran capacidad para ligar al hierro aunado a que puede hacerlo a un pH bajo. Esta capacidad hace que el hierro (Fe^{3+}) sea casi completamente inaprovechable como especie iónica libre por las bacterias, o bien el hecho de que exista en el medio poco Fe^{3+} puede favorecer el funcionamiento de otros agentes antibacterianos (25).

William D. Welch et al. encontraron que la saturación de la proteína bactericida LF ligadora de hierro en leucocitos PMN in-

* El pH desciende por el ácido láctico, que es producido por el impulso metabólico provocado por la fagocitosis (12).

tactos, usando un complejo anticuerpo-ferritina, resulto en un gran decremento de la actividad bactericida (25,27). Esto es por que el complejo Ac-ferritina, causa la pérdida total de la capacidad ligadora de hierro de la LF (25).

Por otro lado, los PMN dificilmente fagocitan los complejos Ag-Ac, y cuando este metodo es usado para transportar Ag a la vacuola fagocitica, el poder bactericida de la célula es seriamente dañado (28). Deitel & Portier (29), postularon que la cantidad y calidad de los cambios en los componentes de la superficie de la bacteria, pueden resultar en un decremento en la accesibilidad de la LF a los sitios $2+$ (30).

Falvi Kaivuranta-Vaara et al, encontraron que cuando los PMN humanos en suspension fueron expuestos a los LPS de la bacteria, las células liberaron cantidades significativas de LF. Esta liberación ocurre como una consecuencia de la endocitosis granular mas que como un resultado de la muerte de la célula, y es dependiente del tiempo y de la concentración del LPS. Como lo indican las figuras 6 y 7. Esta liberación es en parte o enteramente regulada por uno o varios factores derivados de los monocitos, ya que una pequeña cantidad de monocitos combinando una suspensión de PMN purificados, es suficiente para estimular la liberación de la LF, mediada por LPS (30).

El mecanismo por el cual esto se lleva a cabo, no ha sido determinado pero sugieren que el factor de tumor-necrosis (TNF- γ) el cual es sintetizado y liberado dentro del medio cuando los monocitos son incubados con los LPS, tiene un papel importante en este proceso (30).

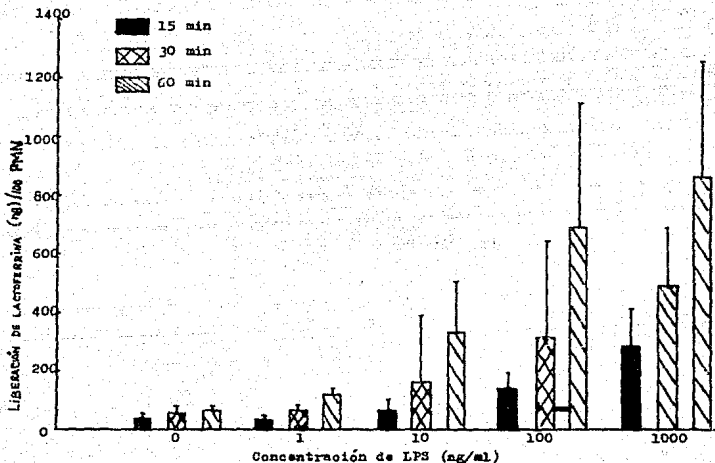


Fig 6 Liberación de la lactoferrina de los PMN humanos (10 células por ml) incubados con LPS de 0 a 1.000 ng/ml. Los resultados representan los valores promedio obtenidos en 5 experimentos realizados por duplicado (30).

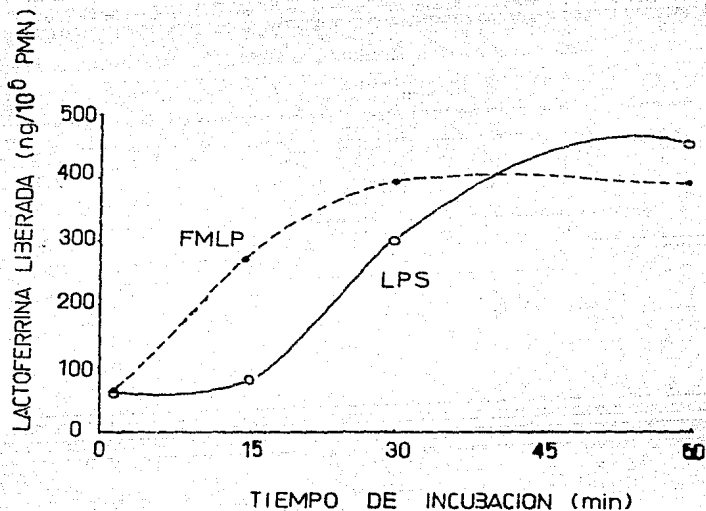


Fig 7. Cinética de la liberación de la LF de PMN humanos (10^6 células por mililitro) incubados de dos a sesenta minutos con $10 \mu\text{g}$ de N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) (●) ó 100 ng de LPS/ml (○). Los resultados son los valores obtenidos en un experimento y son representativos de otros dos experimentos (30)

En estudios anteriores se ha visto que el IFN- γ , es capaz de provocar la liberación selectiva del contenido de los gránulos específicos (27). Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que otros productos de los monocitos, provoquen la liberación de la LF como por ejemplo la IL-1, que es sintetizada y liberada cuando los monocitos son incubados con LFC. Esta IL-1 estimula el metabolismo oxidativo de los PMN y su degradación (20).

Existen varias funciones por las cuales la LF puede mejorar los mecanismos antibacteriales del hospedero, entre ellas tenemos: 1) Promueve la adherencia de los PMNs a superficies celulares agrega a los neutrófilos (27,28). Los niveles elevados de la LF pueden amplificar una respuesta inflamatoria y facilitar el abastecimiento de los neutrófilos a los focos de infección (27,28,29). 2) Por su alta afinidad al hierro la LF puede secuestrarlo de la bacteria (24,27), lo que hace que este nutriente esencial sea inaccesible para la bacteria (24). Ciertas observaciones sugieren que las bacterias son directamente afectadas por las propiedades quelantes de la LF, posiblemente en su superficie, y esto es aplicable tanto a bacterias G(+) y G(-) (24). 3) Mejora la producción del OH^- , el cual presenta actividad bactericida. Aun cuando existen otros compuestos diferentes a la LF, pero que también contienen hierro, estos no mejoran la producción de OH^- tan eficientemente como esta, lo que sugiere que la estructura de la LF saturada de hierro, presenta más efectivamente al hierro al sistema generador de OH^- (28,32).

Esta actividad de la LF, depende de la saturación con hierro, como se ha observado, que la LF pierde hierro durante un

simple proceso de purificación, podría existir la posibilidad de que cuando la LF es liberada a la vacuola fagocítica, se presente pobre en hierro, lo que sería solucionado obteniéndolo del medio interno de la vacuola fagocítica o bien de las mismas bacterias, logrando así una mejor actividad bactericida (28).

Varios factores físicos y químicos afectan la actividad de la LF, entre ellos se pueden citar: 1) La temperatura, dado que su descenso inhibe la actividad bactericida de la LF y el aumento de ella, de 22 a 37 °C, puede causar desestabilización de la membrana externa de la bacteria permitiendo así, que las moléculas de LF alcancen los sitios blanco (37). Lo que indica que la LF depende de la temperatura para realizar su función, o en su defecto la temperatura afecta al organismo (34). 2) La adición de MgCl₂ a la mezcla de reacción, aún cuando el Mg²⁺ puede interactuar con la LF, no es probable que este afecte la habilidad de la LF para destruir, ya que previos estudios han mostrado que aún 100mM de MgCl₂ no bloquean la destrucción por LF de un MO Gram (-) y (+) (34).

Sin embargo, todos estos efectos observados con la LF separada, posiblemente sean modulados por otros componentes que también están presentes en las secreciones de las superficies mucosas, tales como: Lisozimas, Igs, albumina y lactoperoxidasa (34).

B) NEUTRÓFILOS

1) MECANISMOS QUE SIGUEN LOS NEUTRÓFILOS EN LA DESTRUCCIÓN DE LAS BACTERIAS

Los neutrófilos PMN defienden al hombre contra agresiones de patógenos (40,43,54). El proceso defensivo se desarrolla por pasos: Los neutrófilos se mueven hacia el MO patógeno, este es alcanzado, ingerido y destruido (40).

El citoplasma de los neutrófilos contiene gran cantidad de granulos unidos a la membrana, siendo de dos tipos en base a sus características morfológicas. Los granulos azurófilos o primarios son relativamente largos y densos, se desarrollan en el promielocito y contienen MPO, un número de hidrolasas ácidas, elastasa y proteínas catiónicas (41).

Los granulos específicos o secundarios son más pequeños y menos densos, se desarrollan en el mielocito y contienen LF, vitamina B12-ligada a proteína, colagenasa y algunas especies de fosfatasa alcalinas (41).

El éxito de los neutrófilos en la defensa contra MO, no sólo depende de la destrucción del MO ingerido, sino también de la habilidad de los neutrófilos para realizar las actividades relacionadas al reconocimiento y movimiento para introducir a la bacteria (quimiotaxis), además de la captura o ingestión de la misma (fagocitosis) (32,35,44).

Uno de los mecanismos por los cuales los neutrófilos realizan su actividad, está basado en los cambios morfológicos y bio-

químicos que tienen estos y no simplemente en aquellos que impulsan el fenómeno de la fagocitosis (25).

Se ha encontrado que los cambios morfológicos en los neutrófilos comienzan durante la quimiotaxis. Los neutrófilos circulantes esféricos se polarizan dentro de una región amplia llamada Lamellipod cubierta de gradientes quimiotácticos (CSa endotoxina) generados por la bacteria o el suero y en una región estrecha llamada Uropod (23).

Los receptores de superficie para mediar la fagocitosis se encuentran en la región Lamellipod y son disipados y vaciados de otras partes de la superficie de la membrana, en consecuencia la Lamellipod se llega a especializar para la fagocitosis. Al mismo tiempo la degranulación de los gránulos específicos, los cuales contienen un reservorio de receptores y componentes de la oxidasa, enriquecerán esta parte de la membrana (25).

Por lo tanto, cuando se hace contacto con una partícula proceda o no de la fase quimiotáctica, ésta es rápidamente rodeada por pseudopodos, los cuales expanden sus fillos al contacto y la partícula es introducida en la vacuola fagocítica. Esta fase de englobamiento se lleva a cabo en segundos (25).

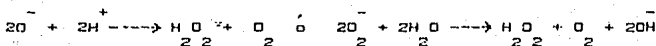
Al mismo tiempo que se crea la vacuola fagocítica hay un descenso en el pH y la fusión de los gránulos de los neutrófilos a esta vacuola, esto se extiende también a la membrana plasmática que no está ocupada en la formación del fagosoma (22,25,130).

El pH es también importante para otros sistemas bactericidas, por ejemplo: $\text{Fronidasa-H}_2\text{O}$, H_2O_2 -MFO-Haluro. En este último se sabe que la MFO tiene actividad antimicrobiana óptima in

vitro a pH de 4.5 a 5.0 en varios sistemas modelo de células libres. Similarmente casi todas las hidrolasas lisosomales necesitan un pH de 4.0 para su actividad óptima (193). Por otro lado, promueve la velocidad de reducción del superóxido a H_2O_2 (193), además de favorecer la acción de los gránulos y enzimas de la membrana vacuolar como la NADPH oxidasa y proteasas neutras (194).

Petr Cech y col., reportaron que la vacuola fagocítica de MC peritoneales fue transitoriamente alcalina (pH de 7-7.5) dos minutos después de la inducción de la fagocitosis. Posteriormente la vacuola es rápidamente acidificada a un pH de aproximadamente 5.8 después de 7 min y finalmente se equilibra a un pH de 5.4 ± 0.2 después de (15-20 min) (194).

La alcalinización vacuolar puede bien ser una consecuencia del efecto alcalinizante de la dismutación de los aniones superóxido producidos por la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio (193).



Por otro lado, el mecanismo por el cual el pH intravacuolar desciende aun no es conocido pero se proponen dos posibilidades (193)

1) Incremento en la formación del ácido láctico como una consecuencia del estallido respiratorio, el cual acompaña a la fagocitosis (193).

2) Por la presencia de H^+ bombeado de la ATPasa, quizá por el -

sistema anhidrasa carbonica (193).

Incluyendo todos los efectos de la fagocitosis y degranulacion, tenemos que los MOs se engloban o encierran en un estrecho compartimento, el cual es definido por la membrana: en parte derivado de la membrana plasmatica y en parte derivado de la membrana de los granulos (35).

Ademas, estos objetos fagocitados son suspendidos en un medio enriquecido con un alto contenido en granulos, los cuales comprenden un numero de hidrolasas, acidos y proteasas neutras (colagenasa, elastasa y catepsin G), MPD y otras proteinas mas con funciones aun no especificadas (vitamina B12 unida a proteina) (35) Fig. 8

En lo referente a cambios bioquimicos en los neutrofilos, se observa un incremento en el consumo de oxigeno (35,47). El cual esta relacionado con la intensidad de la fagocitosis y puede ser 50 veces mayor comparado con la velocidad basica (20,35).

La base para este consumo de oxigeno no mitocondrial, es la activacion de una entidad comunmente llamada NADPH oxidasa. Esta oxidasa que esta presente en la membrana fagosomal y en la membrana plasmatica, reduce oxigeno a superoxido (O_2^-) por reduccion de un electron. El superoxido es muy inestable y cambia rapidamente a peroxido de Hidrogeno (H_2O_2) y oxigeno (O_2) (14,35). El NADPH, el cual es donador de electrones es regenerado del derivado de Hexosa monofosfato (HMPS) en el citosol de la celula (23, 35,48,52).

La actividad del HMPS esta por consiguiente estrechamente

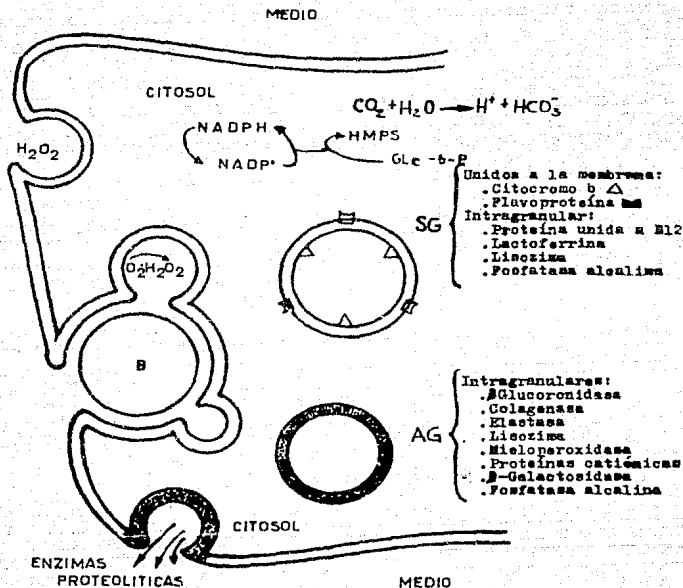


Fig 8. Modelo esquemático de la fagocitosis. B es una bacteria - que está incorporada dentro de una vacuola fagocítica con gránulos específicos (SG) y gránulos azurófilos (AG). Componentes de la NADPH oxidasa: flavoproteína \square y citocromo b inactivado Δ activado ∇ . Gle-6-P es glucosa-6-fosfato. BPI es una proteína incrementadora de la permeabilidad bactericida (35).

ligada a la actividad del NADPH, y a la producción de CO_2 (consecuentemente, también a la producción de H_2O y HCO_3^-) los cuales se incrementan notablemente durante la fagocitosis³ debido al consumo de oxígeno (35,46).

Se ha caracterizado al NADPH oxidasa como una cadena transportadora de electrones, la cual contiene una flavoproteína y un citocromo-b en una proporción molar de 2:1. El mecanismo por el cual se lleva a cabo el transporte de electrones aún no se conoce en su totalidad, pero recientemente con un nuevo método de fraccionamiento subcelular, se demostró que el complejo flavoproteína citocromo-b, reside primeramente en la membrana de los gránulos específicos y es traspasado a la membrana fagosomal o membrana plasmática. Solamente cuando el complejo es traspasado llega a ser activado para funcionar como NADPH oxidasa (35,36,48).

Esto implica que los componentes del NADPH oxidasa, están inactivados en la membrana de los gránulos, pero son activados cuando estos se fusionan con la membrana fagosomal. Por esta vía la actividad del NADPH oxidasa, termina en la máxima producción de H_2O_2 (35, 52).

2 2

a) SISTEMA OXIGENO DEPENDIENTE

Desde el descubrimiento de los efectos del NADPH oxidasa en la enfermedad granulomatosa crónica (CGD). Los sistemas bactericidas de los neutrófilos, han sido clasificados como dependientes e independientes de oxígeno (16,32,35,49,57). El sistema oxígeno dependiente frecuentemente es referido como el sistema H_2O_2 -MPO-Haluro. Esto es generalmente correcto, aunque se sabe que

2 2

la ausencia de MPD no afecta grandemente la actividad bactericida, ya que el H_2O_2 es tóxico por sí mismo y puede generar radicales extremadamente reactivos tal como el radical hidroxilo (23, 35, 41, 137).

Las especies susceptibles al sistema bactericida oxígeno dependiente son bacterias aerobias, hongos y aun neutrofilos que no pueden generar mucho H_2O_2 debido a defectos bioquímicos (35). Aunque algunas bacterias particularmente G (-) son destruidas igualmente por los neutrofilos bajo condiciones de anaerobiosis, así como de aerobiosis (35).

Por otro lado, se sabe que el primer producto del metabolismo oxidativo y que está implicado como agente bactericida en los neutrofilos es el peróxido de hidrógeno, el cual tiene una potente actividad contra microorganismos cuando es combinado con la MPD y un haluro (23, 35).

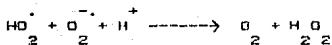
El peróxido de hidrógeno que se necesita para el sistema bactericida mediado por la MPU, es formado por los neutrofilos durante la fagocitosis inducida en el estallido respiratorio y puede ser detectado en el fagosoma (16, 47, 137). Adicionándole a esto que existen algunos microorganismos tales como Lactobacillus, Streptococcus y Neumococos que pueden generar H_2O_2 . Estos organismos carecen del grupo Heme y por lo tanto, del sistema citocromo. Sus oxidaciones finales son catalizadas por flavoproteínas, las cuales en general, reducen el oxígeno a peróxido de hidrógeno (41). Ellas también carecen de la enzima catalasa y por lo tanto, el H_2O_2 formado no se degrada eficientemente, dando

como resultado la acumulación del H_2O_2 , el cual contribuye significativamente a la actividad bactericida de los neutrófilos, específicamente cuando los leucocitos tienen el sistema generativo del H_2O_2 deficiente, como en la enfermedad Granulomatosa Crónica (41,46).

Para la formación del peróxido, se sabe que cuando el oxígeno acepta un electrón, este se convierte en anión superóxido (O_2^-) o bien puede ser protonado por el radical perhidroxi (HO_2) (23,41).

El anión superóxido puede actuar como oxidante o como reductor. Cuando actúa como reductor, este pierde un electrón y es oxidado a oxígeno, cuando actúa como oxidante gana un electrón y es reducido a peróxido de hidrógeno (23,41).

Cuando las dos moléculas interactúan, una es oxidada y la otra es reducida, en una reacción de dismutación con la formación de oxígeno y peróxido de hidrógeno:



Esta reacción puede ser espontánea o bien catalizada por la enzima superóxido dismutasa (23,41). La dismutación espontánea es más rápida a pH de 4.8, donde la concentración de radicales protonados y no protonados es igual (32,41).

La velocidad de dismutación disminuye a un pH más ácido donde predomina el radical protonado y es particularmente baja a un pH alcalino donde predomina el anión superóxido. La dismutación del superóxido es catalizada por la superóxido dismutasa en un extenso rango de pH; sin embargo, esta función de la super-

oxido dismutasa es muy significativa a un pH neutro donde la dismutación espontánea es relativamente lenta (23,41,58).

La liberación del peróxido de hidrógeno al medio extracelular es paralelo al estallido respiratorio de las células normales (47).

Se considera que existen varias vías metabólicas en los neutrófilos, las cuales catabolizan en diferentes localizaciones subcelulares al H_2O_2 libre, así como la catalasa y la glutatión peroxidasa en el citosol, y la MPO en la vacuola fagocítica. Por lo que la liberación del H_2O_2 depende de la concentración del H_2O_2 libre intracelular, y a su vez representa la fracción de H_2O_2 no utilizado por otras vías catabólicas. Esto fue confirmado por R.K. Root et al, en experimentos en donde se mostró, que que el H_2O_2 liberado aumenta cuando una o más de las vías que lo catabolizan, son bloqueadas por inhibidores metabólicos (47).

Figura 9.

Una vez generado el peróxido de hidrógeno este se combina con la mieloperoxidasa (MPO), formando un complejo enzima-sustrato, que puede oxidar a una variedad de compuestos, entre ellos están los haluros, asumiendo que su oxidación produce un agente(s) tóxico(s), que pueden atacar a los microorganismos por varias vías (41,47).

Se han propuesto dos maneras de ataque a los microorganismos: la halogenación y la oxidación. La primera, puede ocurrir por Iodación aunque también es posible que la cloración y bromación contribuyan a la muerte de la bacteria. En el segundo, se forman poderosos agentes oxidantes por el sistema peroxidasa con

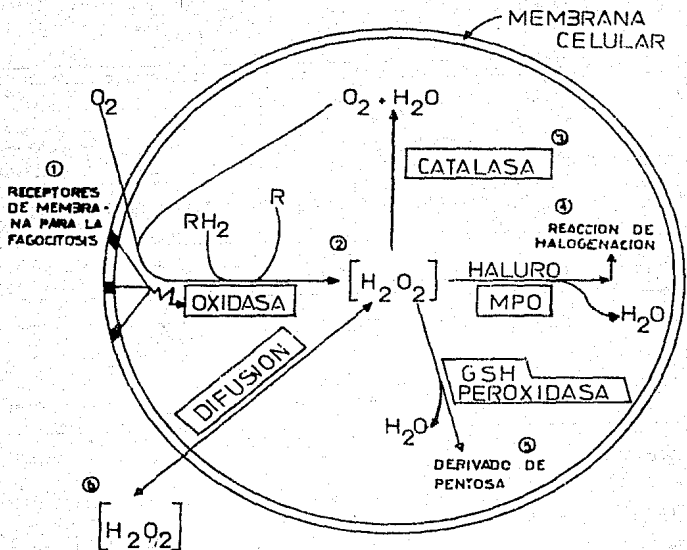
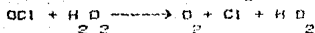


Fig. 9 Eventos que involucran la formación del H_2O_2 , catabolismo y liberación por los PMN humanos. (1) Inicialización de la fagocitosis por la interacción de partículas con receptores fagocíticos de membrana, lo que activa a la oxidasa, para generar peróxido de hidrógeno libre intracelular. (2) este peróxido de hidrógeno libre es catabolizado por catalasa (3) MPO y (4) Glutatión peroxidasa con una subsecuente unión al derivado de Pentosa. (5) El resultado de la concentración libre de peróxido de Hidrógeno que difunde de la célula. (6) es entonces un reflejo directo de la concentración que permanece del peróxido de Hidrógeno libre intracelular. (47)

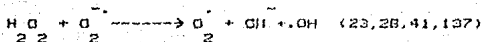
el cloruro. El primer producto formado parece ser el ácido hipocloroso, el cual es un potente agente bactericida (16,41).

Por lo tanto, el organismo tiene creado la cloración de los fluidos intrafagosomales, que se necesitan para la destrucción de microorganismos ingeridos. Para esto en particular, se ha propuesto el siguiente mecanismo (41).



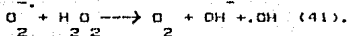
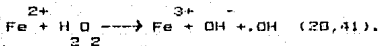
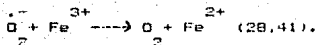
No obstante, el pH dentro del fagosoma puede ser desfavorable para esta reacción, (la cual ocurre mejor a un pH alcalino). Es posible que el hipoclorito generado por el sistema MPO forme oxígeno singlete por ambos lados, por reacción con exceso de peróxido de hidrógeno o de algún otro modo, contribuyendo a la toxicidad (16,41).

Sin embargo, Klebanoff y col., sugieren que el peróxido generado por la oxidasa de los neutrófilos no es directamente bactericida, sino que más bien, ejerce toxicidad a través de los productos que forma. Por ejemplo, el radical hidroxilo altamente reactivo (OH), que es el resultado de una reducción más amplia del Peróxido de hidrógeno. Haber y Weiss, propusieron el siguiente mecanismo para la formación del radical hidroxilo (OH), implicando la reducción del H_2O_2 por el superóxido (32,41).



Pero debido a que esta reacción es muy lenta comparada con la dismutación espontánea del superóxido, es muy difícil que el

peróxido de hidrógeno actúe directamente con el superóxido para formar radicales hidroxilo bajo condiciones biológicas. Por lo tanto, se cree más bien que un metal funge como catalizador --- oxido-reductor, reduciendo al superóxido y oxidando al H₂O₂, como lo indican las siguientes reacciones: (23,28,41)



Recientemente, se ha descubierto la presencia de otro mecanismo generador de OH en PMNs y monocitos, que es el sistema xantina-oxidasa el cual está basado en la formación de etilen a partir de B-metil-tiopropionaldehído (metanal) o ácido 2-keto-4-tio metil butírico (KMB) (23,123).

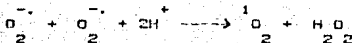
* Esto puede ser por la quelación del hierro por un transportador biológico tales como Lactoferrina y/o Transferrina (132).

La formación del etileno por los PMNs intactos es totalmente dependiente de la MPD, su formación por xantina-oxidasa es inhibida por SOD, catalasa y trazas de OH (etanol, benzoato) y es estimulado por H_2O_2 , esto sugiere que la interacción del $O_2^{\cdot -}$ y del H_2O_2 para formar OH, el cual inicia la formación del etileno (23,137).

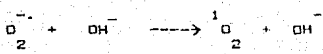
Este sistema está asociado con la reducción de oxígeno a $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y a sus respectivas interacciones para formar OH y posiblemente el $O_2^{\cdot -}$ estos productos derivados del oxígeno, son formados en la superficie celular y probablemente en la vacuola fagocítica, donde interactúan con la MPD y otras proteínas liberadas por los gránulos. La combinación de estos agentes destruye a los MOs ingeridos (23).

Otro producto del metabolismo de oxígeno, potencialmente tóxico, es el oxígeno molecular singlete (O_2^1), un estado excitado de oxígeno, el cual es formado cuando uno de los electrones de las valencias es transferido a un orbital de más alta energía con inversión del spin. El oxígeno singlete puede ser formado por la interacción de varios productos de la reducción del oxígeno (23).

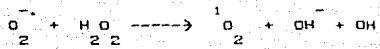
Entre los posibles mecanismos para su formación están: la dismutación espontánea del $O_2^{\cdot -}$:



la interacción de $O_2^{\cdot -}$ y OH^-



y la interacción de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2



El exceso de energía del oxígeno singlete, puede ser disipada por decaimiento termal, emisión de luz o reacción química (23).

No obstante, a la formación del H_2O_2 , los componentes citoplasmáticos están protegidos del exceso de este, por la catalasa y por el sistema glutatión, en el cual la oxidación del glutatión reducido (GSH) (por la peroxidasa glutatión) y la reducción del glutatión oxidada (GSSG) (por la glutatión reductasa), resulta en la utilización del H_2O_2 , para que el derivado hexosamonofosfato reoxide al NADPH (41).

Las dos primeras enzimas derivadas de la hexosa monofosfato la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, reducen al NADP a NADPH, y la continua actividad de los derivados depende de la reoxidación del NADPH. La actividad de la hexosamonofosfato (medida por la oxidación a CO₂ por carbonyl Glucosa) se incrementa en la fagocitosis, y esto puede servir como mecanismo para la discipación del exceso de H_2O_2 citoplasmico (41).

b) SISTEMA OXIGENO INDEPENDIENTE

El sistema oxígeno independiente, está constituido por la actividad de los lisosomas, lactoferrina, fosfolipasa y proteínas cationicas granulares (35).

La actividad bactericida del sistema oxígeno independiente de los neutrofilos contra especies gram-negativas, reside en una proteína granular llamada proteína cationica incrementadora de la actividad bactericida (BPI), la cual contiene un peso molecular de 59000 y representa aproximadamente el 1 % del total de las proteínas del neutrofilo humano. La BPI se une y es activa solamente contra especies gram-negativas. No es por sí misma una enzima pero combinada con la membrana externa de la bacteria, la cual es permeable a algunas moléculas hidrofobicas y fosfatasa A, puede activarse como tal. La acción letal de la BPI es extremadamente rápida ya que las bacterias pierden su habilidad para formar colonias en los primeros 15 s (16,35).

El efecto biológico de la BPI requiere de la adhesión de esta a la superficie de la bacteria. Esta interacción involucra pasos secuenciales, el primero de los cuales, es la unión de la proteína básica a la superficie bacteriana cargada negativamente. Alguna interferencia evita todos los efectos biológicos de la BPI. La interacción de la BPI con la superficie bacteriana a través de la carga, no es suficiente para su efecto biológico, necesitando de eventos post-unión basados en la interacción hidrofobica de la BPI con la envoltura de la bacteria (16). Las al

teraciones que la BFI provoca en la envoltura de la bacteria, son altamente discretas y parecen ser enteramente restringidas a la membrana externa (OM), dejando el interior de la membrana (IM) estructural y funcionalmente intacta. Las alteraciones de la OM provocan un aumento inmediato de la permeabilidad para moléculas hidrofóbicas, tales como el antibiótico Actinomicin D y una activación selectiva de las enzimas bacterianas que degradan los fosfolípidos de la OM, y los peptidoglicanos de la envoltura (16).

Aunque algunas de las bacterias sensibles a BFI pueden también ser destruidas por el sistema H_2O_2 -MPO-Haluro, la BFI es el agente activo mediante el cual los neutrófilos realizan su actividad bactericida hacia estas bacterias (35).

H. Odeberg y Oleson, realizaron un experimento para probar la hipótesis, de que al haber interacción entre diferentes agentes en la vacuola fagocítica, el resultado sería una potencialización en la actividad bactericida (39).

Encontrando que la elastasa por sí misma, no tiene efectos bactericidas pero sí potencializa los efectos bactericidas de ambos sistemas, el oxígeno dependiente (MPO- H_2O_2) y oxígeno independiente (quimiotripsina como proteína catiónica). Demostrando también que otras proteasas como la colágena no mostraron ningún efecto bactericida, bajo las mismas condiciones (39).

La elastasa de los neutrófilos humanos ya ha sido purificada, y esta constituida por tres isoenzimas, las cuales participan en la potencialización de los efectos bactericidas en los sistemas ya mencionados. No obstante, la elastasa granulocítica también ha sido implicada en daño a tejidos e inflamación, la función que esta ejerce dentro de los neutrófilos aun no se

conoce, pero se cree que probablemente participe en la digestión de MOs fagocitados (39).

Por otro lado, también se encontró que el potencial bactericida de la MPO es considerable. Se ha reportado que la actividad bactericida de la MPO-H₂O₂ puede ser inhibida por una alta concentración de H₂O₂ y puede ser desinhibida, si se incrementa ya sea la velocidad de producción del H₂O₂ o la concentración de la MPO (39).

Sin embargo, no ocurre así, cuando se combina la quimiotripsina como proteína catiónica con el sistema MPO-Glucosa-oxidasa, ya que no se encontró ningún efecto en el potencial bactericida, indicando que este sistema funciona independientemente, no sucediendo así con la elastasa, ya que esta amplifica la acción de la quimiotripsina como proteína catiónica (39).

Todo esto sugiere, que la destrucción bacteriana puede ser el resultado de la acción sinérgica de diferentes sistemas antibacterianos (39).

De estudios hechos por John E. Repine y col., se encontró que los neutrófilos deficientes en MPO-LAP (LAP, fosfatasa alcalina) a bajas concentraciones de bacterias, ejercen una destrucción muy pobre, comparada con la de los PMN de cuantos normales. Mientras que a altas concentraciones, la acción bactericida de los PMN deficientes en MPO-LAP fue perfeccionada, y estuvo dentro del rango de destrucción observada en los neutrófilos normalmente granulados. Las bases exactas de este fenómeno aun no se conocen. Se ha postulado por Mlebanoff y Pincus, que una disminución en la actividad de la MPO, puede ser compensada por el in-

cremento en la utilización del metabolismo oxidativo asociado a reacciones bactericidas no mediadas por enzimas (4).

Por otro lado, John R. Hoidal y col., al evaluar la fagocitosis, capacidad bactericida y metabolismo de PMN altamente purificados, monocitos (MNs) y macrófagos alveolares (AMs) del mismo individuo normal, encontraron diferencias cuantitativas y cualitativas en la fagocitosis, así como: (5).

1. La velocidad de la fagocitosis de *S. aureus* opsonizado y *E. coli*, fue mayor para los PMNs que para MNs o AMs (5).

2. La capacidad de la fagocitosis de *S. aureus* opsonizado y de *E. coli*, fue mayor para PMNs y AMs que para MNs (5).

3. La actividad bactericida fue mayor para los PMNs que para MNs o AMs (18).

4. Después de la estimulación por el PMA (acetato miristato) forzó el oxígeno no mitocondrial ingerido por los PMN, fue mucho más grande que para los MNs o AMs.

NOTA: Esta diferencia debe ser interpretada con precaución, ya que las vías de utilización del oxígeno pueden ser diferentes para los PMNs, MNs o AMs, es decir, el sistema H_2O_2 -MPO-Haluro, el cual es probablemente un sistema microbicida importante para los PMNs y MNs (5).

5. En contraste para los PMNs o MNs, la fagocitosis de *S. aureus* por los AMs, no fue dependiente de opsoninas (19).

Existen al menos dos razones por las que la capacidad bactericida de los PMN es superior (5).

Primero, los PMNs parecen ser más activos que los MNs o AMs. Las bases para estas diferencias aun no son conocidas, pe-

no puede ser debido a su alta densidad de receptores en su superficie.

La segunda razón puede ser o está relacionada al intenso estallido oxidativo no mitocondrial, el cual, resulta en la formación de especies de oxígeno que son tóxicas para la bacteria.

Se puede concluir que los PMN son más eficientes que los monocitos, en la adhesión e ingestión de bacterias, aunque la velocidad de destrucción intracelular es similar para ambas células (40).

Por otro lado, se ha encontrado que los macrófagos alveolares humanos (AM) por broncoscopia, en la presencia de neutrófilos humanos producen un aumento considerable en la destrucción de *Pseudomonas aeruginosa*. Al exponer la bacteria con neutrófilos incubados más AM, se observó un mejoramiento de la capacidad bactericida oxidativa de los neutrófilos (54).

Por lo tanto, los AM secretan y sintetizan un número de factores biológicamente activos y solubles, como por ejemplo: complemento, unión superóxido y factores quimiotácticos para neutrófilos, los cuales protegen contra enfermedades infecciosas. Los AM secretan un mediador soluble, con la capacidad de mejorar la actividad antibacteriana oxidativa de los neutrófilos (54).

La adhesividad a la membrana de los neutrófilos, y el mecanismo de ingestión de los mismos, es aumentado después de exponer a los neutrófilos con los AM, esto está correlacionado con la activación de los neutrófilos durante la infección bacteriana (54).

La actividad bactericida oxidativa está dada por la generación del anión superóxido el cual también aumenta durante la fagocitosis dada por los neutrófilos y AM (54).

Se piensa que el derivado de los AM, el cual activa a los neutrófilos para desencadenar la actividad bactericida es un tripeptido formilado, que tiene un peso molecular mayor de 10000 daltons. Se cree que es un factor quimiotáctico, aun cuando no se ha demostrado su naturaleza (54).

Los AM tienen un papel importante en la defensa pulmonar del hospedero, ya que amplifica la capacidad bactericida de los neutrófilos (54).

2) CARACTERIZACION Y PARTICIPACION DE LOS COMPONENTES DE LOS NEUTROFILOS EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA

Los neutrófilos contienen dentro de sus gránulos citoplásmicos, una variedad de sustancias potencialmente microbicidas y enzimáticas capaces de degradar estructuras de tejido conectivo y membrana, además de factores que inducen el incremento en la permeabilidad vascular (56) (64).

El citoplasma de los neutrófilos contiene gránulos unidos a la membrana que son de dos tipos, con diferencias en características morfológicas, desarrollo y contenido enzimático. Los gránulos azurófilos (primarios) son grandes y densos; se desarrollan en el promielocito, y contienen MPO, un número de hidrolasas ácidas, elastasa, proteínas cationicas y enzimas beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa ácida (64). Los gránulos específicos (secundarios) son más pequeños y menos densos, se desarrollan en el mielocito, y contienen lactoferrina, vitamina B12 unida a proteína, colagenasa, la mayor parte de las lisozimas celulares, y en algunas especies fosfatasa alcalina (12) (13) (41,49,68).

Se ha encontrado que los gránulos azurófilos, presentan una actividad bactericida de alrededor del 90%, con respecto a los gránulos específicos que solo tienen del 5 al 10%, esta actividad de los gránulos azurófilos no se presenta ni en el citosol ni en la membrana plasmática. La baja actividad dada por los gránulos específicos, se cree se debe a una contaminación de los gránulos azurófilos los cuales contienen MPO (49).

Los factores bactericidas derivados de los granulos azurofilos son activos a un pH neutro con actividad optima a pH de 5.5. Son extremadamente activos a la concentracion de 0.3-30 μ g/ml, y a una concentracion de 0.1-0.3 μ g/ml, destruyen 10⁵ bacterias de E. coli, en un periodo de 30 min. (11). Su actividad parece no involucrar al sistema dependiente de H₂O₂, ya que la catalasa (500 U/ml) no reduce significativamente su actividad (49,60).

La membrana azurofila esta compuesta de un numero limitado de especies de proteina, incluyendo dos polipeptidos de 29 y 6 Kdal (49).

Despues de la fagocitosis, la membrana de los fagosomas se fusiona con los granulos adyacentes, conectando las rupturas de esta, y los granulos liberan su contenido dentro del fagosoma (41). Al respecto Peter M.enson et al, encontraron que los neutrofilos liberaron las enzimas beta-glucoronidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa acida, MPO, pequenas proteinas basicas con habilidad para liberar histamina de celulas madre y grandes cantidades de lisozimas, cuando fueron estimuladas por la fagocitosis (64).

En otros experimentos se ha demostrado que las IgG y el C₃ estimulan la liberacion de enzimas de neutrofilos, ya que estos tienen receptores para C₃ o para IgG en su superficie. Lo que indica que la adherencia de los receptores de los neutrofilos a su sustrato (por ejemplo: C₃ o IgG), resulta en la fagocitosis de la bacteria y en la subsecuente liberacion de los constituyentes de los granulos (64).

Como ya se mencionó anteriormente, la capacidad microbicida de los PMN, ha sido explicada sobre la base de dos clases de mecanismos: los dependientes de oxígeno y los independientes de oxígeno (54).

Modrzakowski et al, investigaron la interacción del contenido de los granulos de neutrófilos humanos, fraccionados por cromatografía de filtración usando Sephadex G-100, con cepa lisa de enterobacteria y su mutante rugosa deficiente en LPS. Obteniendo en la columna cromatografica de Sephadex G-100, cuatro picos mayores, los cuales contienen: a) MPO, b) proteasas neutras, c) lisozimas y d) cuatro picos de proteínas indefinidas. Las porciones de los valles de estas proteínas fueron concentradas y probadas para actividad bactericida, mostrando que la mutante rugosa fue más sensible a la acción bactericida de las fracciones de los granulos que la cepa lisa. Por otro lado, el valle AB (entre el pico de MPO y proteasas) y el valle CD (entre el pico de lisozimas y el pico indefinido D), mostraron una alta actividad bactericida contra mutantes rugosas de bacterias Gram (-). Las bacterias Gram (+) no fueron sensibles a la actividad bactericida del valle de proteínas AB, como lo fueron las bacterias Gram (-) Fig 10 (56).

La acción microbicida del valle de proteínas AB, puede dar una idea del mecanismo bioquímico del decremento en la resistencia a la actividad bactericida (5a).

Por otro lado, el uso de cepas lisas y mutantes rugosas deficientes en LPS, permitió localizar áreas de potente actividad bactericida durante la elución. Esto es importante porque se tie

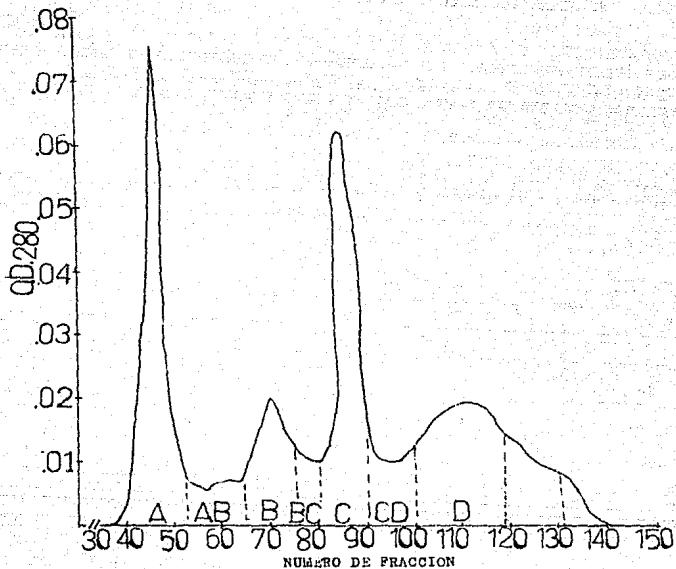


Fig. 10 Separación por cromatografía en columna de fracciones granulares de PMMA número 1. El pico A representa a la PMMA de PMN, el Pico C representa a la lizocina de PMMA (51).

ne localizada un área de baja concentración proteica con capacidad de destrucción que representa, un pequeño porcentaje del total de proteínas granulares. Además, la alta especificidad de la actividad bactericida contra mutantes rugosas in vitro, donde las concentraciones factibles son pequeñas comparadas con su acción potencial contra las bacterias lisas in vivo, donde las concentraciones factibles en fagolisosomas son probablemente grandes puede dar un indicio del significativo potencial de las sustancias (56).

En otros estudios también realizados por el mismo autor y Col, se encontró en el contenido de gránulos fraccionados de PMN una proteína, la cual presentó actividad bactericida con un aparente peso molecular de 56 000 a 57 000. Esta proteína demostró tener actividad contra la membrana externa de mutantes LPS de *S. tiphimurium* LT-2, mostrando mayor sensibilidad la cepa rugosa que la lisa a esta proteína. Observándose, que estas proteínas se unían directamente al LPS de la membrana externa (56).

Se investigó también el comportamiento de las proteínas cationicas de gránulos contra lipopolisacáridos. Cuando se adicionó el LPS derivado de LT-2 o LA-2168 al ensayo bactericida, hubo una inhibición en la actividad bactericida, esta fue dependiente de la concentración y calidad de los LPS adicionados (57).

La molécula LPS LT-2, fue mucho más eficiente en proteger a la célula de la acción bactericida de esta proteína, que LPS de TA-2168. Lo que indicó que la cantidad y tipo de LPS presente en la superficie de la bacteria, juega un papel importante en la resistencia de las bacterias a las proteínas de gránulos de PMN --

(56).

Sin embargo, aun se están investigando los mecanismos por los cuales estas proteínas ejercen su acción bactericida (56).

En recientes estudios H. Osberg y I. Olsson (57), demostraron que los neutrófilos humanos, contienen un grupo de proteínas catiónicas como quimotripsina, las cuales forman los gránulos primarios y poseen actividad bactericida contra MOs Gram (+) y Gram (-) (41) (59) (68).

La proteína catiónica como quimotripsina de granulocitos humanos, difiere en algunos aspectos de las proteínas catiónicas granulares (con la actividad bactericida demostrada) en otras especies (59).

Su peso molecular está dentro de 25.5 a 26.5 Kdal el cual es diferente del que se encontró en proteínas catiónicas de los granulocitos de conejo, las cuales tienen un peso molecular de 4 a 8 Kdal (59).

Ademas de que no se ha tenido éxito en los estudios para demostrar, alguna actividad de proteasas para las proteínas catiónicas de granulocitos de conejo (59)

La actividad antibacteriana de proteínas catiónicas, como quimotripsina de neutrófilos humanos es, sin embargo, independiente de la actividad de esterases, ya que el calentamiento destruye la actividad enzimática, pero no la actividad bactericida (59).

Es por lo tanto, posible que la actividad bactericida de proteínas catiónicas de conejo y de humanos sean dependientes de las propiedades catiónicas de las proteínas. Varios polipeptidos

básicos antimicrobianos como por ejemplo: histona, protamina, polilisina y ciertos antibióticos polipeptídicos, exhiben características catiónicas como detergentes. Los detergentes catiónicos causan un trastorno generalizado en el carácter semipermeable de la membrana (59).

Otros agentes activos de membrana por ejemplo salicilamida, tiene un efecto más selectivo, inhibe el transporte dependiente de energía de AAs y aniones en la membrana (59).

Por otro lado, ya que el crecimiento bacteriano y la multiplicación dependen de la actividad biosintética de los organismos, los efectos de las proteínas catiónicas sobre las proteínas RNA y DNA han sido estudiados. Encontrando que las proteínas catiónicas inhiben la incorporación de Leucina, Uracil y Timidina a las macromoléculas bacterianas de *S. aureus* y *E. coli* (59).

En estudios sobre fracciones catiónicas purificadas de granulocitos de conejo, que fueron enriquecidos con granulos asociados a fosfolipasa A₂. Se ha indicado que la destrucción de *E. coli* estuvo acompañada por un aumento en la permeabilidad de la envoltura microbiana. La integridad estructural de los MOs fue, sin embargo, lo suficientemente buena que se preservó y permitió la síntesis de macromoléculas (59).

Estudios sobre el flujo de Rubidio (Rb^+), indican que la integridad de la membrana citoplasmática se preserva. Esto se basa en el hallazgo de que la salida de Rb^+ ocurre al adicionar concentraciones bactericidas de proteínas catiónicas como quimotripsina, pero considerando que la salida de Rb^+ puede ser debida al aumento de la efusión y la recaptura inhibida del espacio periplasmático.

tico. No se pueden hacer conclusiones acerca de la integridad de la membrana citoplasmica (59).

Ya en trabajos previos se habia mostrado, que las bacterias Gram (+) son más sensibles a las proteínas catiónicas, (como quimotripsina) que las bacterias Gram (-) (59).

H.Oeberg y I.Olsson mostraron que el transporte de Rb^{+} y la síntesis macromolecular, es más sensible a la acción inhibitoria de las proteínas catiónicas en bacterias Gram (+) que en (-). Partiendo de que las proteínas catiónicas son componentes activos de la membrana, la diferencia en la susceptibilidad de las bacterias, puede ser debido a la diferente permeabilidad de las proteínas catiónicas en la membrana celular. La membrana celular sin protección de MOs sensibles y no sensibles, es igualmente sensible a la acción antibacteriana de los componentes activos de la membrana (59).

Esto se ejemplificó por detergentes catiónicos, como el Cetiltrimetil ammonium bromuro, que destruye los esferoblastos* de ciertos MOs Gram (-), pero no de MOs intactos, los cuales adsorben los componentes antibacterianos. La envoltura exterior de bacterias G(-), también funciona como una barrera para otros componentes antibacterianos tales como Actinomicin D y Lisozima. Esto es congruente con la hipótesis de que la baja sensibilidad de MOs G (-) a la actividad antibacteriana de proteínas catiónicas como quimotripsina, depende del impedimento relativo para la

* Los protoplastos son las estructuras obtenidas a partir de las células vegetativas de los MOCs, cuando se les extrae la pared celular completa; cuando a estas estructuras les queda parte de la pared celular, se denominan esferoblastos (7).

penetración de las proteínas a la membrana citoplásmica (49,59).

La actividad antibacteriana de las proteínas catiónicas, como quimotripsina de granulocitos humanos, y otras proteínas catiónicas tales como histonas, es inhibida a altas fuerzas iónicas. La actividad microbicida de un estrato ácido granular de granulocitos de conejo fagocitado, se encontró relativamente independiente de la fuerza iónica del medio de incubación (59).

También estudiando los efectos del Mg^{2+} sobre la actividad bactericida de proteínas catiónicas, se mostró, que altas concentraciones de Mg^{2+} , protegieron a la bacteria contra la fagocitosis (59).

El factor antibacteriano Fosfolipasa A₂ enriquecido de granulocitos de conejo, fueron contrarrestados a altas concentraciones de cationes divalentes, pero la inhibición de la actividad bactericida fue superada aumentando la concentración del factor del granulo (59).

La proteína catiónica como quimotripsina, se comporta de un modo muy similar en la presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} (59).

Modrzakowsky y Spitznagel reportaron que una proteína de B6 500 dal que mostró actividad bactericida in vitro, contra *S. typhimurium* y *E. coli*, fue mas activa contra el LPS de mutantes rugosas que contra las cepas lisas (50).

Por otro lado, Shafer et al, propusieron, que esta misma mutante fue fenotípicamente menos resistente a una preparación antimicrobiana parcialmente purificada que lo que fue una cepa lisa, debido a la pérdida del polisacárido central hidrofílico o con una consecuente exposición de los grupos aniónicos del lípi-

do A. Esta hipótesis se confirmó debido a que organismos blancos preincubados con concentraciones letales de polimixina B, un antibiótico catiónico conocido por interactuar con el lípido A, volvió fenotípicamente resistente a la bacteria a gránulos de proteína. Una mutación (prmA), la cual produjo un incremento en la resistencia al Polimixina B, y un incremento del amino-4-desoxi-
-carabinosilación a el sustituto 4 lípido A fosfato, resultando un incremento en la resistencia a proteínas granulares parcialmente purificadas (60).

Esta interacción del polimixina B y el lípido A, puede servir como un modelo para estudiar la interacción del lípido A con las CAPs derivadas de FMN (60).

Ya que la mutación prmA, aumenta la resistencia a las proteínas granulares antimicrobianas catiónicas separadas, tanto como el polimixina B. Por lo tanto, la disminución de la electronegatividad del lípido A, provocada por el prmA, disminuye la capacidad del lípido A para unirse a las proteínas catiónicas granulares (60).

Es posible que el incremento a la resistencia de prmA contra proteínas granulares, es debido al decremento en la unión de las proteínas catiónicas, implicando que las CAPs son unidas a la superficie microbiana por uniones catiónicas (60).

Se concluye que al menos dos proteínas granulares de diferente actividad microbicida, contribuyen a la actividad bactericida de los estratos granulares in vitro (50-57,59,60).

En estudios también relacionados a las proteínas catiónicas pero realizadas por otros autores, se reportó que las proteínas

cationicas derivadas de los gránulos citoplasmicos de PMN, se han implicado como mediadores en la destrucción de la bacteria - vía oxígeno-independiente (61).

Se purificó una proteína antimicrobiana cationica de 57 000 dal CAP57 de gránulos de PMN humanos, que destruye a un número - de MQs Gram (-) (61).

Por otro lado, la estructura del LPS bacteriano parece determinar parcialmente los niveles de resistencia bacteriana a CAP57, especialmente cuando la resistencia está directamente relacionada con el largo de los carbohidratos (CHOs) en el antígeno y oligosacárido (61).

El lípido A, la parte aniónica e hidrofóbica de la estructura antipática, del LPS, puede proveer un sitio de unión para CAP57 (61).

Shate et al, sugiere que CAP57 se enlaza al lípido A vía interacción iónica con el residuo 4' fosfato (61).

Previos trabajos con proteínas cationicas antimicrobianas, han sugerido que la unión de estas proteínas a la pared bacteriana externa, es necesaria para que ocurra la destrucción, sin embargo, esto no ha sido directamente demostrado (61).

Usando el ligando (1²⁵) CAP57 en el ensayo bactericida, se encontró que los niveles de resistencia de CAP57 a la cepa S. - *tiphimurium*, correlacionó con su capacidad para unirse a CAP57, por lo tanto, el que las mutantes de LPS rugoso sean menos resistentes que las cepas que contienen mas azúcar en el oligosacárido central o en el antígeno, se puede explicar debido a la pro-

gresiva pérdida del azúcar en los LPS, ya que las mutaciones mejoran la capacidad de CAPS7 para unirse a grupos cargados negativamente en el lípido A, y en el interior de la región central del LPS (61).

Williams Shafer et al, en estudios específicos sobre gonococos, encontraron que las proteínas antimicrobianas catiónicas (CAPs) derivadas de los gránulos citoplásmicos de PMN, han sido implicados en la destrucción de estos. En recientes estudios de laboratorio se sugiere que al menos tres CAPs tienen la capacidad de destruir gonococos in vitro. Estas proteínas incluyen dos CAPs con aparente tamaño molecular de 37 a 25 Kdal y dos de 24 a 25 Kdal, asemejándose estas a la isoenzima conocida como catepsina G lisosomal (62).

La Catepsina G una serina proteasa como quimotripsina, consiste de tres isoenzimas las que poseen actividad antibacteriana contra ciertos MOs Gram (+) y (-) (62).

Se encontró que la actividad antibacteriana de la Catepsina G, es independiente de la actividad de esterasa serina, y fue probablemente debido a la naturaleza altamente catiónica de la proteína (PI > 12.5) (62).

Los resultados experimentales sugieren que la Catepsina G, fue al menos 100 veces más activo contra gonococos comparados contra otras bacterias tales como *S. aureus* y *E. coli*. La destrucción del gonococo por la Catepsina G fue evidente en el rango de pH de 6 a 7.2, ya que este rango de pH es similar al del fagolisosoma en maduración. Es probable que el gonococo fagocitado por los PMNs sea susceptible a la destrucción por la catepsina

na G. Esto es verdad por periodos no solo inmediatamente despues de la fagocitosis, donde el pH intravascular se piensa es neutral sino tambien en los subsecuentes periodos cuando los fagolisosomas llegan a acidificarse (62).

Se evoca a la naturaleza catiónica de la Cathepsina G, como responsable de la destrucción. El mecanismo preciso por el cual esta CAP media la destrucción de gonococos, no es todavia conocido. Sin embargo, es probable que la union de la Cathepsina G a las estructuras apropiadas de la superficie celular, danen a la envoltura de la celula de tal manera que sea letal para ella (62).

El factor estimulador de la fagocitosis (FSF), el cual es generado en la fracción de granulos de neutrófilos PMNs durante la fagocitosis, mejora el paso de la ingestión mediada por el receptor C3b especificamente por los PMNs (65).

Este factor es una proteina con un peso molecular de 16 Kd y un PI de 8.7. Es diferente de otras proteínas basicas, tales como proteínas cationicas, licorimas y lactoferrina (65).

Aunque el mecanismo por el cual el FSF es generado de los PMNs durante la fagocitosis no es conocido, se postula que la generacion de este, no es el resultado de una síntesis sino la activación de un precursor, puesto que la ciclohexamida (un inhibidor de la síntesis de proteínas), no afecta su generacion en los PMNs (65).

Yoshio Ishibashi et al, encontraron que el precursor del FSF puede ser una proteina de 36 Kd con un PI de 6.5, la cual es diferente de las proteínas cationicas, ya que estas en los granu

los son altamente básicas (PI 10). Por lo tanto si el PSF es una proteína básica (PI 8.7), su precursor es más ácido (PI 6.5), y tiene una porción altamente ácida en su molécula (65).

Por otro lado, se sabe que la Interleucina I es sintetizada y almacenada como un precursor de peso molecular de 33 000 dal y que es convertida a una forma de peso molecular bajo en M ϕ estimulados, probablemente debido a una descomposición enzimática. Tomando esto en consideración, parece probable que el precursor PSF de alto peso molecular (36 kd) se ha convertido a su forma activa con un peso molecular bajo (6 kd), debido a la remoción de su porción ácida por una descomposición enzimática (65).

Recientemente, han sido estudiados una nueva clase de componentes antimicrobianos naturales, que se encuentran dentro de los neutrófilos PMN de humanos y de conejo, las defensinas (66).

Las defensinas son el constituyente mayor de los granulos de neutrófilos en especies de mamífero. Su contenido celular en PMN de conejo y humano es de aproximadamente 15 y 5% respectivamente de las proteínas celulares (68).

Son péptidos de 29 a 34 residuos de AAs. Cada uno contiene 11 residuos conservados de los cuales 6 fueron cistina. Un máximo alineamiento de la secuencia de las defensinas revela que, cada uno de ellos contiene una infraestructura conservada integrada de 8 residuos invariantes, 6 de los AAs son cistinas las cuales detienen y estabilizan el doble de los polipeptidos fundamentales. La arginina 15 y la glicina 18, son los otros dos AAs conservados (68).

Esta estructura homóloga de las defensinas, sugiere que es

te peptido, ha surgido de un gen ancestral común. Todas las defensinas son estables al ácido y relativamente resistentes a las proteasas, tienen estabilidad a temperaturas y pH bajos, esto es probablemente por su densidad intramolecular con puentes disulfuro (68).

Esta defensina presenta actividad antibacteriana y fungicida (68). Su mayor actividad bactericida está dada a un pH de 7.8 y a una fuerza iónica baja. Es activa a elevadas concentraciones (< 50 mg/ml) para destruir bacterias Gram (+) y (-) (49).

Por otro lado Renato Genaro et al. estudiaron sobre la actividad bactericida de gránulos de neutrófilos de bovinos y encontraron que los lisados de neutrófilos de bovino, desempeñan una significativa actividad bactericida hacia MOC Gram (+) y (-), bajo condiciones en las cuales los estratos de neutrófilos humanos son virtualmente inactivos. Mostrando esto, la especificidad de la actividad bactericida (63).

Si bien es cierto que los mecanismos por los cuales las bacterias ejercen su actividad bactericida no están aun bien definidos, estos estudios nos han permitido conocer, que existen ciertos componentes con características químicas propias y con selectividad a ciertos MOC, que participan en la defensa del hospedero (62).

Entre los componentes destaca la participación de las proteínas catiónicas de gránulos de neutrófilos humanos (CAPs), lisozimas, proteasas neutras y proteínas como la quimotripsina y -catepsin G (62).

3) PAPEL QUE DESEMPEÑAN:

a) FACTORES QUIMIOTÁCTICOS

La quimiotaxis de los neutrófilos hacia los sitios inflamatorios es primordial para la defensa del hospedero en contra de los MOs. Los neutrófilos pueden migrar en respuesta a una variedad de factores quimiotácticos. Se cree también que además de inducir la migración de los neutrófilos, los factores quimiotácticos pueden modular otras funciones en los neutrófilos, las cuales pueden ser importantes en la inflamación. Por ejemplo los factores quimiotácticos estimulan la liberación extracelular de la enzima lisosomal. Además, en el metabolismo de los neutrófilos los factores quimiotácticos, pueden estimular la producción de H₂O₂ la CL celular (69), y promueve la adherencia de los PMNs a la superficie de las células endoteliales vasculares (33).

Cuando la bacteria invade al hospedero, probablemente los neutrófilos primero interactúan con los factores quimiotácticos y entonces migran al sitio de invasión, una vez que llegan proceden a la fagocitosis y destrucción de la bacteria. Por lo tanto, frecuentemente los neutrófilos interactúan con los factores quimiotácticos antes de interactuar con la bacteria (69).

Debido a que la importancia de los factores quimiotácticos para la migración de las células es clara, pero no su papel en la modulación de la fagocitosis y destrucción de bacterias. Andrew et al, estudiaron (69), los efectos en la capacidad bactericida de neutrófilos por el zimosan activado de suero (ZAS), el CS parcialmente purificado y 2 péptidos quimiotácticos N-for-

mil-metionil (69).

Los experimentos hechos por Andrew C. y asociados, demostraron que usando Zimosan-activado de suero (ZAS) a una concentración de 4.5%, la cual fue quimiotáctica, mejoró la destrucción de *S.aureus* por neutrófilos. Este efecto de mejoramiento fue observado a varias proporciones de bacterias-neutrófilos (69).

Por otro lado, se encontró que la fracción C5a mejora la destrucción bactericida dependiendo de la dosis. Además la concentración requerida para mejorar la actividad bactericida de neutrófilos fue similar a la concentración requerida para inducir la quimiotaxis de neutrófilos. Esto sugiere, pero no demuestra que el factor quimiotáctico mejoró la destrucción bacteriana (69).

El mejoramiento de la destrucción bacteriana por los factores quimiotácticos en los neutrófilos puede tener varios mecanismos. Primero estos factores pudieron haber incrementado el número de bacterias fagocitadas. Sin embargo, esto es muy poco probable porque a las proporciones de 1.5 y 1.1 de bacterias-neutrófilos más del 95% de las bacterias son ingeridas en 30 min bajo control de leucocitos (69). Además, Verhoef et al encontraron que a las proporciones de 10:1, el 80% de los *S.aureus* fueron ingeridos por un control de neutrófilos. Segundo, los factores quimiotácticos pudieron haber estimulado la velocidad inicial de la fagocitosis. Sin embargo, parece poco probable que un limitado efecto estimulador a estos primeros efectos, resulte en un mejoramiento de la destrucción bacteriana, la cual persistió por 3 hr. Además, si los efectos quimiotácticos primeramente actua-

ron para incrementar la velocidad o prolongación de la fagocitosis, entonces el número de bacterias viables intracelulares tendría que ser más grande en células tratadas con factores quimiotácticos que en células control, o de lo contrario el número de bacterias viables dentro de leucocitos tratados con factores quimiotácticos, es tan bueno como el número viable en el inoculo total, el cual fue menor en cada punto del tiempo con leucocitos control (69).

Por último los factores quimiotácticos pudieron haber estimulado las vías bactericidas Oxígeno-dependiente o la vía oxígeno-independiente (69).

Los requerimientos para la vía bactericida oxígeno-dependiente fueron probados usando leucocitos tratados con azida de sodio y leucocitos de pacientes con CGD. La azida de sodio se sabe, inhibe la destrucción bactericida probablemente por inhibición de la MPD y tal vez por la vía oxígeno dependiente (69).

El CSA y el N-formil metionil-fenilalanina (FMLP), no favorecieron la destrucción de *S.aureus* por leucocitos CGD, aunque sí favorecieron la destrucción por neutrófilos normales (69).

Se llegó a la conclusión de que los factores quimiotácticos pueden mejorar la destrucción bacteriana probablemente por la vía oxígeno dependiente (69).

Todos los hallazgos referentes al mejoramiento de la actividad bactericida de los neutrófilos por los factores quimiotácticos pueden ser un importante vínculo para entender la interacción de moléculas biológicamente activas con células efectoras en defensa del hospedero (69).

b) ENDOTOXINAS

Experimentos realizados en neutrófilos han sugerido que la endotoxina lipopolisacárido (LPS), rompe la función de PMN humanos por disociación del metabolismo de glucosa en el consumo de oxígeno y la actividad bactericida (79).

La consumación de oxígeno y actividad bactericida son reducidas por preincubación de PMNs con LPS. En vista, de que el oxígeno es crucial para la acción bactericida de PMNs, no es sorprendente que los PMNs, utilizando menos O_2 en la destrucción, resulte en un decremento en su eficiencia. Sin embargo, interesantemente adicionando bacteria y LPS simultáneamente a PMN, también resultó similar a lo anterior, pero aquí se observó un retraso en la reducción de la actividad bactericida (70).

Por otro lado, Cohn y Morse, mostraron que había un mejoramiento en la destrucción de *Staphylococcus* por PMNs peritoneales de conejo en la presencia de 10% de suero y LPS. Pero se redujo la destrucción con 1% de suero y de 10 a 50 μ g de LPS por ml. El LPS acrecentó la actividad bactericida de PMN exudativos de conejo, en contraste, con la reducción observada en la actividad de PMNs humanos. Mas probablemente, esto representa otro ejemplo de la considerable variación en la respuesta al LPS entre diferentes especies (70).

Con PMNs humanos variando la concentración de suero, no se altera la respuesta a LPS, sino solo se reduce la prolongación de la fagocitosis a bajas concentraciones de suero (70).

La disminución observada en la actividad bactericida, no es el resultado de una fagocitosis disminuida. Esto está de acuerdo con trabajos previos, en los cuales se demostró, una fagocitosis acelerada cuando el LPS y 10% de suero estuvieron presentes con bacterias y PMNs (70).

Los múltiples efectos que el LPS tiene sobre los PMN, son posiblemente, mediante alteración directa a la membrana. Es conocido que el LPS se une a los PMNs quizá, via receptor específico de membrana. El desplazamiento parcial de ácido siálico de la membrana de PMN humanos, causó una respuesta de PMN mucho muy parecida a la respuesta dada con PMN preincubados con LPS (70).

Lo anteriormente mencionado sugirió, que la acción del LPS puede ser mediante la interacción con los grupos de ácido siálico de la membrana celular (70).

c) FOSFATASA ALCALINA

La enzima fosfatasa alcalina (Monoester ortofosfórico fosfihidrolasa), parece estar involucrada en la actividad bactericida normal de la célula. Por lo menos eso se ha indicado en pacientes con deficiencia primaria de fosfatasa en los leucocitos, los cuales han tenido repetidas infecciones y un defecto marginal en la actividad bactericida (76).

En un individuo aparentemente saludable con una marcada anomalía en la enzima fosfatasa alcalina (LAF), y una actividad bactericida normal de sus células, se encontró que la enzima leucocítica fosfatasa alcalina es sensible al compuesto Bromo le vanisole, sugiriendo que este representa un tipo de isoenzima del hígado. Sin embargo, esto no es concluyente o absoluto, ya que los ensayos se realizaron en células fraccionadas debido a que es imposible realizar ensayos para la enzima usando células intactas, primero porque la LAF no tiene actividad a un pH de 9, y segundo porque las células no permanecen intactas a este pH, haciéndose imposible probar la enzima en toda la célula, a un pH en donde la actividad sea medible (76).

Los estudios inhibitorios junto con los estudios del paciente, sugieren que la LAF no es esencial para la actividad bactericida de neutrófilos. Sin embargo, esta conclusión está en desacuerdo con dos previos estudios; Strauss et al, describen a un paciente con infecciones bactericidas recurrentes neutrófilos con morfología anormal, la LAF estaba ausente y se reportó un ligero defecto bactericida. La magnitud de este defecto sin embar-

go, es cuestionable ya que las células del paciente destruyeron el 96% de un inoculo inicial de *S. aureus* a 120 minutos, considerando un solo estudio (75).

Además los neutrófilos del paciente tenían un pronunciado defecto en la quimiotaxis, por lo que parece ser más probable que la infección observada en el paciente, debería estar más relacionada con el defecto en la movilidad de la célula (75).

Por otro lado, similarmente Repine et al, describieron un paciente con infecciones bactericidas repetidas y una deficiencia primaria de LAP. Los neutrófilos de este paciente difieren de los reportados por Strauss et al, en que estos son morfológicamente normales y demostraron quimiotaxis normal. Los autores sugirieron que el paciente tenía un defecto marginal en la actividad bactericida. Particularmente cuando se desafió con altas proporciones de bacterias-células. Sin embargo, a una alta proporción solamente 4 de 18 determinaciones de la actividad bactericida de los neutrófilos de los pacientes, estuvieron por debajo del 95% (límite confidencial de sujetos normales). Parece muy probable que tal defecto marginal sea responsable de las infecciones recurrentes sufridas por el individuo. El LAP histoquímico de este individuo (18.9), fue muy comparable al reportado para el paciente estudiado por Lawrence R. y Col. (76).

Si las explicaciones alternativas dadas para los individuos que tuvieron deficiencia de LAP en sus neutrófilos, teniendo un ligero fallo en la actividad bactericida son acertadas, entonces efectivamente la LAP no se requiere para la actividad bactericida normal de neutrófilos (76).

d) PEROXIDO DE HIDROGENO.

Existen evidencias de que el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), ocupa una posición clave en los mecanismos de defensa del hospedero en contra de patógenos (35,47).

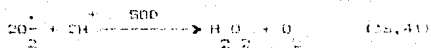
La defensa contra patógenos bacterianos está estrechamente ligada a las células fagocíticas. Los PMNs humanos comprenden un gran grupo de fagocitos, y son los primeros en defender al hospedero en contra de invasores bacterianos. Los PMNs contribuyen a la defensa del hospedero por identificación (reconocimiento), movimiento hacia (quimiotaxis) y envolvimiento de la bacteria (fagocitosis) (36).

El movimiento de la bacteria por PMN, impulsa el estallido respiratorio lo que genera productos oxígeno reactivos, tal como H_2O_2 . La ingestión de la bacteria también estimula la liberación de agentes granulares tóxicos (degranulación), los que provienen de gránulos del citoplasma de PMNs. Estos productos granulares pueden entonces actuar en conjunto con el H_2O_2 , para destruir a los MDs ingeridos (36).

Por otro lado, se sabe que el envolvimiento de la bacteria, también como otras partículas y agentes químicos, estimulan a los PMNs, para incrementar su velocidad en el consumo de oxígeno en reposo. Es claro, que el incremento en el consumo de oxígeno, está primeramente involucrado en la producción de intermediario O_2 reactivo, el cual es tóxico para la bacteria, de hecho investigadores como Iyer y asociados, demostraron la importancia del

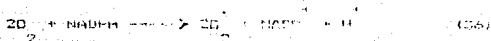
H_2O_2 , encontrando que la parte del sustrato oxidado, se oxida en forma a peróxido en la medida que se cataliza a los FPNs (32,47).

La fuente primaria de H_2O_2 , en los FPNs surge por el anión superóxido (O_2^-). El anión superóxido, es formado de la reducción de un electrón del O_2 y fue descrito primeramente en 1970, en una reacción predominantemente a medio acuoso es su dismutación la cual es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) (36,48).



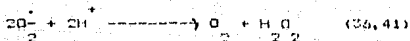
Cuando McCord y Fridovich, encontraron la actividad de la SOD en eritrocuprina en 1966, incrementó el interés en el papel que tiene el anión superóxido, en la descomposición de la bacteria, especialmente desde que Root y Metcalf demostraron que, la mayoría del oxígeno consumido por FPNs durante el estallido respiratorio fue convertido a anión superóxido, la formación del anión superóxido sobre la membrana plasmática, ocurre por una reducción en el oxígeno (35).

Existen evidencias de que la actividad de piruvato, dona un electrón que usa la célula, NADPH o NADH. El NADPH es el más probable. También la concentración del NADPH baja considerablemente durante el estallido respiratorio. La enzima que cataliza esta reacción en los FPNs, es la NADPH oxidasa (30,46).



La dismutación subsiguiente del anión superóxido formado en esta reacción, muy probablemente provee el H_2O_2 necesario en más

procesos.

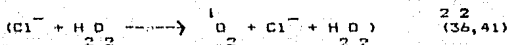


El resultado de la dismutación en un 100% de $\overset{+}{O}$ producido durante el estallido respiratorio, está convertido en H_2O (36).

La importancia del H_2O en el estallido respiratorio, puede también ser deducida de las siguientes observaciones:

- 1) La catalasa, un colector del H_2O , inhibe la capacidad microbicida de PMNs (36).
- 2) Los PMNs en la enfermedad granulomatosa crónica (CGD), solamente tienen muy pequeñas cantidades de H_2O y no pueden efectivamente destruir las bacterias que no producen su propio H_2O (36).
- 3) Los PMNs de CGD, pueden efectivamente destruir Streptococcus pneumococcus y lactobacillus, los cuales carecen de catalasa y por lo tanto forman H_2O (36).
- 4) Los defectos bactericidas en los PMNs de CGD, se corrigen adicionando el H_2O o glucosa oxidasa, la cual forma H_2O pero no $\overset{+}{O}$ (36).

Por otro lado el oxígeno singlete ($\overset{1}{O}$), se ha desarrollado como un producto bactericida del sistema MPD- H_2O -Haluro (36,41)



El $\overset{1}{O}$ tiene la misma fórmula molecular que el oxígeno atmosférico, pero es mucho más reactivo por su especial afinidad para

atacar a los compuestos que contienen dobles ligaduras (36).

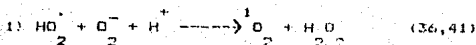
Además cuando la fagocitosis de la bacteria por los PMNs — fue asociada con la emisión de pequeñas cantidades de luz, el interés en el O_2 se incrementó. Sin embargo, el O_2 no es probablemente o al menos directamente el responsable de la CL, ya que el análisis espectral, demostró un pico de más actividad que un espectro específico para O_2 . No obstante, es posible que el O_2 pueda estar causando la excitación secundaria de otras partículas para provocar la débil formación de luz (36).

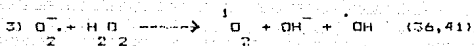
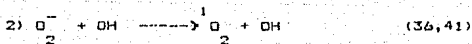
El O_2 tiene la capacidad de dañar la bacteria en los sistemas biológicos, su formación puede ser una parte integral de los procesos de destrucción de los fagocitosis (36).

Los siguientes datos también apoyan el papel potencial del O_2 en la destrucción de la bacteria por PMN (36).

- 1) La CL es deficiente en los PMNs deficientes en NPO, los cuales no destruyen a la bacteria in vitro normalmente (36).
- 2) La CL puede ser generada sin las células en la presencia de la combinación bactericida del sistema $HO-H_2O_2$ -Haluro (36).
- 3) Cuando la NPO es inhibida por acida en los PMNs, la CL y la actividad bactericida son deprimidas (36).
- 4) Las bacterias ricas en carotenos, son destruidas menos efectivamente que las bacterias pobres en carotenos (36).

El O_2 puede ser formado más directamente de O_2^- , H_2O_2 o radical hidroxilo ($OH\cdot$)





Desafortunadamente, ninguna de estas reacciones pueden ser probadas, porque solamente medidas imperfectas de $\text{O}_2^{\cdot -}$ detectado - es aprovechado (36).

Por último una vez que el H_2O_2 ha sido formado por los PMNs es muy probable que interactue con productos granulares, tales - como: la MPO o Lactoferrina para formar otros compuestos los cuales intensifican su toxicidad para los MOs. Fig 11. (36,41,46).

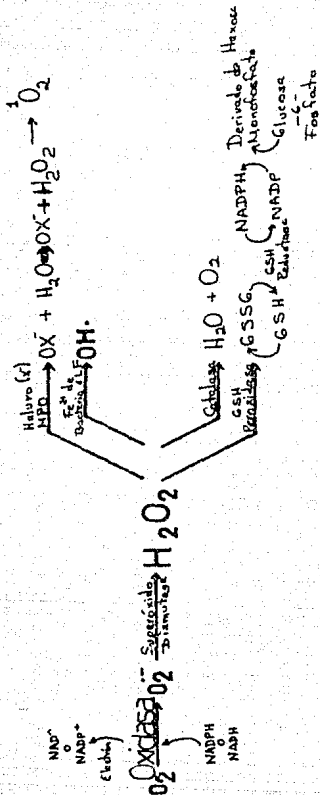


Fig. 1. Postulado principal del papel del peróxido de hidrógeno en los mecanismos bactericidas de los FPM o neutrófilos (36).

c) MIELOPEROXIDASA

La Mieloperoxidasa (MPO) se encuentra en altas concentraciones en los gránulos azurófilos en los neutrófilos y monocitos de mamíferos (41,72).

Es una enzima tetramérica, tiene en su estructura una subunidad α B, la que tiene dos grupos prostéticos hemo (72), está compuesta también de dos peroxidases. Las cuales son capaces de funcionar independientemente, pero están unidas permanentemente por puentes disulfuro (72). Es de un intenso color verde, por lo que el color del pus es debido a su presencia (41).

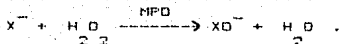
De la MPO puede aislarse por reducción y alquilación la enzima α B llamada hemimieloperoxidasa. Ambas enzimas tienen la misma actividad específica, usando el ensayo peroxidasa independientemente del Cl⁻. Las dos formas de MPO tienen idéntico espectro visible bajo condiciones oxidadas y reducidas (72).

Con la producción del H₂O₂ por el estallido respiratorio la fagocitosis de la bacteria impulsa a los PMN para sufrir la degranulación (36). Los productos de degranulación son importantes para realizar la toxicidad del H₂O₂. Por ejemplo la degranulación da a los PMN la MPO dentro del fagosoma, lo cual es un paso esencial en la función antimicrobiana (23,36,41,73).

Por otro lado, la acción bactericida del H₂O₂ es marcadamente aumentada cuando la MPO cataliza la reacción del H₂O₂ con un haluro, tales como el Cloro o el Iodo (23,36,41,73).

La MPO combinada con su sustrato (H₂O₂) forma un complejo enzima-sustrato que puede oxidar una variedad de compuestos (41)

Figura 12.



El ion hipofosfito (XO^{-}) formado en esta reacción probablemente termina en ácido hipocloroso, un potente agente bactericida el cual tiene la capacidad de combinarse con la pared de la célula, y la bloquea por un mecanismo aún no conocido (36,48).

Las siguientes observaciones sugieren que el sistema MPO antimicrobiano es una parte funcional de los mecanismos de destrucción de los PMN. Primero, el pH óptimo para el sistema MPO, es similar al reportado para la vacuola fagocítica. Segundo el ion cloruro es abundantemente aprovechable en los PMN y el iodo puede ser proveído por la hormona tiroidea. Tercero el H_2O_2 necesario para la reacción MPO puede ser formada por los PMN o por la bacteria fagocitada. Finalmente la pared celular de la bacteria fagocitada por los PMN, contiene haluros los cuales pudieron ser generados por el sistema MPO (36,137).

Se ha concluido por lo anteriormente mencionado, que para que la destrucción de la bacteria, sea efectiva se necesita el sistema MPO (36). La destrucción de la bacteria es demorada y/o decrece en los PMN que carecen de MPO. Aparentemente los PMN deficientes en MPO, pueden usar otros sistemas microbicidas para destruir la bacteria (23,36,41,73). Figura 13 y 14.

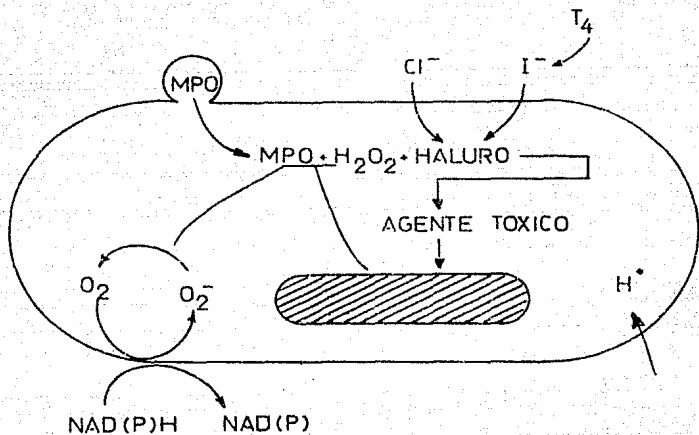


Fig 12 Sistema antimicrobiano MPO-Peroxido de Hidrogeno-haluro - en neutrófilos normales. T₄ tiroxina; NADPH= dinucleótido adenina nicotinamida reducida; NADP= dinucleótido adenina nicotinamida y fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (41).

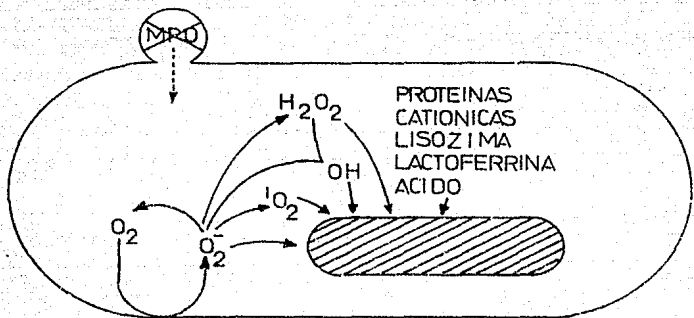


Fig. 13 Sistema antibacteriano cuando la MPO está deficiente en los neutrófilos humanos. (41).

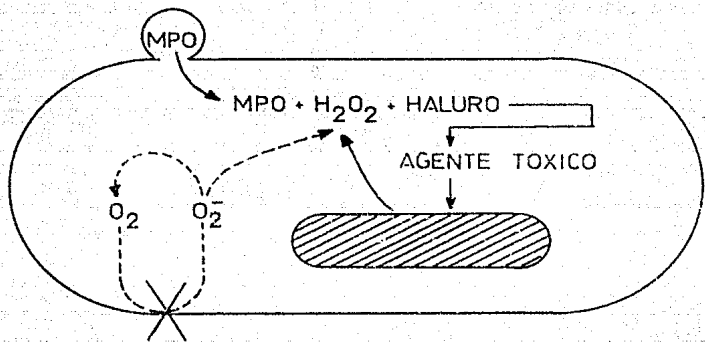


Fig 14 Sistema antimicrobiano MPO-peróxido de hidrógeno haluro en neutrófilos de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (41).

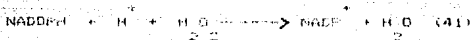
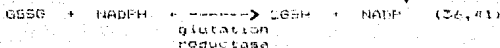
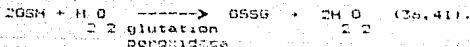
1) CATALASA Y PEROXIDASA GSH EN LA PROTECCION DE PMN
CONTRA EL H₂O₂.

Mientras que los sistemas por los cuales se incrementa la toxicidad del H₂O₂ son importantes, tambien hay sistemas igualmente importantes que tienen los PMN para protegerse ellos mismos del H₂O₂ liberado, y del que sale de su citosol (36).

Los componentes plasmáticos son protegidos del superóxido (o más comunmente de los agentes tóxicos derivados del superóxido, así como radicales hidroxilo u óxigeno singlete o ambos), -- por la superóxido dismutasa (41).

Un fallo en la limitación de la actividad del H₂O₂ localizado en lugares intracelulares inapropiados, probablemente resulte en la propia destrucción de los PMN, y finalmente en un deterioro en la defensa del hospedero (36,38).

La catalasa que está presente en grandes cantidades en el citoplasma de PMN, probablemente sirve como un inactivador rápido del H₂O₂ errante, que escapa de la vacuola fagocítica (36,38) además, el sistema Glutathion reductasa- peroxidasa, también funciona como recogedor potencial del H₂O₂ fuera del fagosoma y por las siguientes reacciones redox: (36,41).



En el sistema glutacion la oxidación del glutacion reducido (GSH) por la glutacion peroxidasa y la reducción del glutacion oxidado (GSSG) por la glutacion reductasa resulta en la utilización del H_2O para formar el derivado de hexosamonofosfato (HMPS) a través de la reoxidación del NADPH. La primera de las dos enzimas de la HMPS, la dehidrogenasa glucosa 6- fosfato y la deshidrogenasa 6 - fosfogluconato, reducen NADP⁺ a NADPH, y la actividad continua del HMPS, es dependiente de la reoxidación del NADPH (41).

La actividad de la HMPS, aumenta en la fagocitosis de tal manera que esto puede ser un mecanismo para disipar el exceso del H_2O citoplásmico (41).

Anomalías en la función de PMN con deficiencias en el sistema glutacion reductasa-peroxidasa, declara la necesidad de otros mecanismos para la degradación del H_2O en los PMN. Por ejemplo el estallido respiratorio y la producción de H_2O_2 son curiosamente parados después de varios minutos de actividad normal en neutrófilos deficientes en reductasa glutacion. Sin embargo, pese a la alteración en la capacidad de producción del H_2O_2 , es

Las células no tienen deterioro en la destrucción de las bacterias in vitro. La deficiencia en glutatión peroxidasa, puede llevar a la propia destrucción de los PMN causando con esto una deficiente función bactericida de los PMN y por lo tanto mayor susceptibilidad a las infecciones (37).

Lo mencionado sugiere que el H_2O_2 participa de una manera principal en los procesos bactericidas de los neutrófilos, pero los posibles efectos generados del H_2O_2 por los neutrófilos son mucho muy amplios. De hecho, la liberación del H_2O_2 extracelular puede contribuir para que los PMN intervengan en enfermedades pulmonares tales como: lesión pulmonar, edema agudo, trastornos hemolíticos y otras condiciones patológicas (38).

La producción del H_2O_2 por los PMN es un arma de doble filo críticamente involucrada en la defensa del hospedero y lesión de las bacterias (36).

4) LA QUIMIOLUMINISCENCIA EN LOS NEUTROFILOS

El conocimiento acerca de la quimioluminiscencia (CL) tiene poco tiempo, ya que es hasta finales del siglo XIX cuando se publicaron los descubrimientos de sustancias quimioluminiscentes como: la lafina y el Pterogalol, y es hasta el año de 1934 cuando se descubren sustancias quimioluminiscentes como el Luminol y la Lucigenina (78) (79).

La luminiscencia se presenta cuando una sustancia se excita energéticamente y después, al regresar a su estado fundamental, disipa la energía absorbida en forma de luz. Existen varias formas de Luminiscencia, las cuales difieren en la fuente de energía involucrada en la promoción o excitación de los electrones a un nivel de energía más alto, y son: (79)

- 1). Radioluminiscencia Donde la excitación la realizan rayos beta o gama.
- 2). Fluorescencia o Fosforescencia Donde la excitación la producen fotones de luz infrarroja, visible o luz ultravioleta.
- 3). Quimioluminiscencia Donde la activación la efectúa una reacción química.
- 4). Bioluminiscencia Donde la reacción química está catalizada por una enzima.

El tipo de luminiscencia de interés para nosotros será la CL.

De acuerdo con Fernad y Brodin, se dice que la CL, ocurre cuando una molécula, emite un fotón como resultado de una reacción química exergónica, en la cual uno de los intermediarios o productos finales, se deja en un estado de excitación electrónica; este fenómeno ocurre adiabáticamente, y sin absorción de luz, ya que se requiere una gran cantidad de energía para producir un fotón (aprox. 200 kJ). La mayoría de las reacciones quimioluminiscentes son de tipo oxidativo (72).

La CL de los neutrófilos (PMNs) surge de la utilización del oxígeno molecular como un aceptor de electrones para generar reacciones de radicales libres y estados excitados (78), implicando la presencia de estados moleculares ricos en energía en los cuales los electrones ocupan orbitales más altos que los estados de energía base. Este exceso de energía puede ser disipado por un decaimiento térmico, emisión de luz o por un incremento en la reactividad química (75).

Se ha sugerido, que el contacto o la ingestión de material particulado activa el mecanismo microbiciótico de las células fagocíticas (79).

La naturaleza de las partículas ingeridas, influye en la velocidad de la fagocitosis, así, como en los cambios metabólicos que la acompañan, por ello los niveles de luz varían ampliamente de estímulo a estímulo (79).

Las levaduras (zimozano), bacterias muertas por calor y partículas de poliestireno, entre otras, estimulan la fagocitosis y el metabolismo del oxígeno y en algunos casos, parecen actuar como sustratos en las reacciones productoras de luz (79).

La CL también es inducida por péptidos de formilmetionina, estos péptidos son formados en la bacteria, y es probable que su acción represente una importante respuesta fisiológica (79).

El metabolismo oxidativo de las células fagocíticas, también puede ser iniciado por estímulos solubles sobre la membrana celular, (incluyendo agentes químicos como: el acetato de formilmiristato, fluoruro de sodio y luminol, lectinas como: Conavalina A, componentes del C' y Ace anti-H-2) (79); de tal manera que la señal para que la energía oxidante se libere, está mecanísticamente vinculada a una interacción dinámica y topológica de los receptores de la membrana de FMN, con las Igs y las partículas que ya han tenido contacto con el C'. El análisis y la transformación de la información óptica a la membrana de los receptores celulares, determina la intensidad y frecuencia de la señal, además de ser el elemento central para la iniciación de la ingestión de los MOs (78).

El mecanismo por el cual, se lleva a cabo la CL, se ha estudiado en estos últimos tiempos. Se sabe que los oxidantes que intervienen en la reacción oxidativa de la CL son el Oxígeno molecular o el Peroxido de Hidrogeno (79).

En general, la descomposición exotérmica de un Peroxido, genera directamente compuestos carbonilo, en un estado electrónicamente excitado y ello forma la base de casi toda la CL orgánica (79).

El mecanismo general de la CL involucra tres etapas:

- 1). Reacciones preliminares, para proporcionar un intermedio clave.

2). Un paso de excitación, en el cual la energía química del intermediario clave es convertida en energía de excitación electrónica.

3). La emisión de luz a partir del producto excitado formado en la reacción química (79).

La emisión de luz puede darse en dos formas, la primera puede ser por la relajación del oxígeno a su estado triplete fundamental (77)(79), y la segunda al resultado de la reacción entre ciertos componentes de los MOs (compuestos que poseen dobles uniones Carbono-Carbono) y el oxígeno singlete (75)(79) para formar dióxido etano, los cuales son químicamente inestables y debido a ello se desdoblaron para formar aldehídos o cetonas excitadas electrónicamente, y estos al retornar a su estado fundamental emiten luz la cual resulta en la CL (79).

Sin embargo, el O_2 y el H_2O_2 también son capaces de oxidar compuestos del MO y formar especies emisoras de luz. Y las sustancias excitadoras pueden ser formadas por mecanismos que no involucran al oxígeno singlete (75).

Por otro lado, la oxidación del Cloro por la MPO y el H_2O_2 resulta en la formación de una especie altamente reactiva, la cual representa al hipoclorito en sus propiedades químicas, y este hipoclorito puede reaccionar con un exceso de H_2O_2 para formar oxígeno singlete. Recientemente se ha demostrado que la MPO, el H_2O_2 y el Cloro convierten el difenilfuran a cis-dibencostileno. una reacción específica para el oxígeno singlete, sugiriendo la posibilidad de que este estado excitado sea responsa-

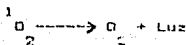
ble en parte directa o indirecta de la emisión de luz (75) (76).

Considerando que el estado base triplete del oxígeno es un birradical en el cual el spin de los dos valencias de los electrones de más baja energía están en la misma dirección, el oxígeno molecular singlete, es formado cuando una absorción de energía cambia la valencia del electron a un orbital más alto de energía con una inversión del spin (75).

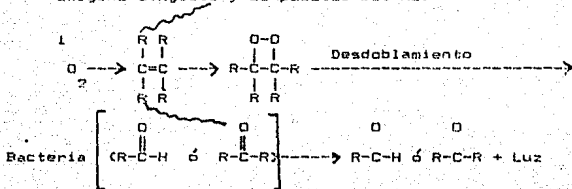
El oxígeno singlete se ha involucrado en la actividad microbica de los PMNs sobre la base de su papel en la toxicidad debido a su acción fotodinámica y sobre la resistencia de los organismos ricos en pigmentos carotenoides (los cuales son potentes desechos de oxígeno singlete) a la actividad bactericida de los PMNs (75).

Se ha propuesto un mecanismo para la emisión de luz por el oxígeno singlete; el cual implica los siguientes pasos:

- a). Emisión a partir de la relajación del oxígeno singlete excitado a su estado basal:



- b). Emisión de luz por productos formados al interactuar el oxígeno singlete y compuestos del MO:



Henry Rosen y Seymour, encontraron que la CL es más pronunciada con el Bromuro como haluro, aunque también existe emisión de luz cuando es usado el Cloro y el Iodo, pero en este último - la CL es baja y limitada a un pequeño rango de concentraciones - (75).

Entre otras variaciones referidas a la CL de los neutrófilos, se ha visto que la CL de los mismos es inhibida por la azida, la cual probablemente, reacciona directamente con el oxígeno singlete. La CL de los PMNs normales y deficientes en MFO, es fuertemente inhibida por la superóxido dismutasa, sugiriendo un requerimiento del anión superóxido para una óptima CL (75).

Los LPS incubados con PMN deprimen la CL inducida por fagocitos y la liberación de oxígeno, así como, la actividad bactericida (30). Esta depresión depende de la clase a la que el LPS pertenezca, lisa (S) o rugosa (R); es decir, los LPS-S no inducen la CL, mientras que los LPS-R sí. La inducción de la CL, --- por los LPS-R, es debida a sus propiedades lipofílicas de tal -- forma, que la alta concentración del Lipido A en la molécula, ha ce que sean más fagocitables por los PMN con respecto a los --- LPS-S, o bien puede ser que el LPS en los LPS-S ejerce un efecto inhibitorio sobre la acción de los PMN (74).

En general, se sabe que los efectos que los LPS tienen sobre los PMN son posiblemente mediante alteraciones, a través de la membrana, uniéndose a ella quizá, vía receptores específicos, o bien, pueden interferir en la liberación de oxígeno por medio de la enzima oxidasa, o interactuar con el ácido siálico de la - membrana de la célula. Esto surge de la observación de que la re

moción parcial del ácido siálico de la membrana de los PMN humanos causan una respuesta similar a la de los PMN preincubados -- con LPS (74).

Recientemente, se ha encontrado que los monocitos son significativamente menos activos que los neutrófilos, en la elaboración del O_2 y en la generación de CL, como lo indica la Fig.15 - (76).

La CL de los monocitos es posible por la elaboración del O_2 estimulada por agentes químicos activos de superficie, o por el contacto con la IgG. De tal forma, que la perturbación de la superficie de los monocitos, así como la fagocitosis, inducen a los monocitos a elaborar O_2 y así generan la CL (76).

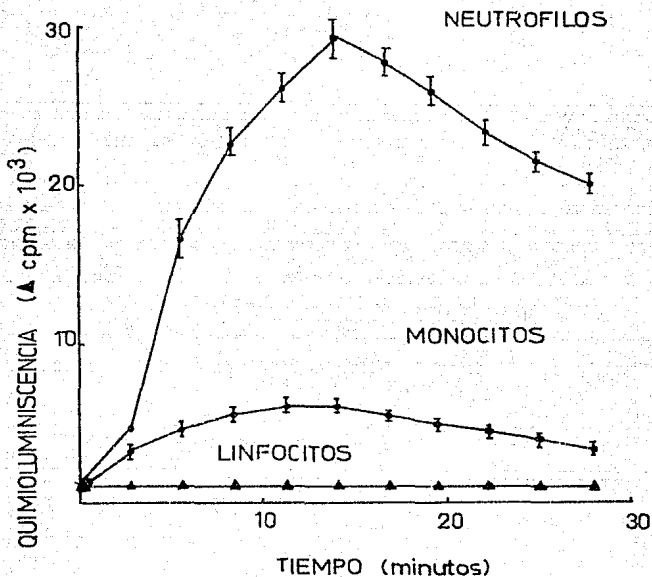


Fig. 15 Generación de la CL de 5x10⁶ neutrófilos, monocitos o linfocitos en contacto con agregados de IgG unidos a filtros de microesferas (TC).

C) EOSINOFILOS

1) PAPEL DE LA PEROXIDASA EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE EOSINOFILOS

Los eosinófilos están presentes en un pequeño número en la circulación y acumulados en ciertos tejidos bajo condiciones normales. Existe un aumento en el número de eosinófilos en individuos con parasitismo helmintico, estados atópicos, ciertos neoplasmas y en respuesta a fármacos (81).

La peroxidasa, localizada en los gránulos de eosinófilos es llamada Eosinófilo Peroxidasa (EPO), y en los gránulos de neutrófilos y monocitos es llamada Mieloperoxidasa (MPO). Esta enzima tiene una potente actividad antimicrobiana, cuando se combina con H_2O_2 y un haluro (Cl^- , I^- , Br^-). Esta actividad es importante para la defensa del hospedero contra la invasión microbiana, siendo letal para bacterias, virus, hongos y micoplasmas (81,82).

Pacientes con ausencia genética de MPO en neutrófilos y monocitos presentan niveles normales de EPO, indicando que las dos enzimas son codificadas por diferentes genes (81).

El cloruro, bromuro y yoduro son empleados en el sistema EPO- H_2O_2 -Haluro, observándose un efecto bactericida con cada uno de estos haluros. La mayor actividad se presenta con el yoduro, luego el bromuro y finalmente con el cloro. En el sistema EPO- H_2O_2 -I⁻, aun en una mínima cantidad de EPO el sistema funciona. Sin embargo, el sistema con cloruro puede ser efectivo solo a con

centraciones elevadas de EPO y a un pH bajo. Por el contrario, en el sistema $MPO-H_2O-Cl$, se necesita una mínima cantidad de MPO para que funcione el sistema, presentándose la actividad bactericida (B1). Sin embargo, la destrucción bacteriana es completa al usar yoduro como haluro en cualquiera de los dos sistemas MPO o EPO (B1, B2). Aunque EPO proporciona mayor actividad que MPO. En algunos estudios, preparaciones de eosinófilos humanos fueron microbicidas cuando se combinaron con H_2O y yoduro pero no con cloruro (B1).

Por otro lado, se observa el efecto del pH el cual es efectivo cuando este es ácido, presentándose así, la mayor actividad bactericida (B1, B2). Esto es efectivo en cualquier sistema EPO- H_2O -Haluro, donde el haluro también es importante en la actividad, esto es, cuando se utiliza la menor concentración de él. Dando una mejor actividad microbicida que cuando se emplea en altas concentraciones (B1).

La concentración del ión cloruro requerida para la actividad bactericida, está dentro del rango esperado en la vacuola fagocítica, indicando la participación del cloro en esta actividad. Aunque la concentración de iodo en suero es muy baja, esta puede ser concentrada en leucocitos por un gradiente de concentración. Además, de hormonas tiroideas que pueden reponer este haluro, a través de la desionización de hormonas. El H_2O es generado durante el estallamiento respiratorio, que toma lugar después de la fagocitosis. Este puede ser reemplazado por un sistema generador de H_2O : Glucosa + Glucosa oxidasa (B2).

Con un exceso de H_2O se da la inhibición en la actividad

de las enzimas EPO y MPO (B2).

Proteínas como albumina y gelatina; hemoproteínas como azida, cianida y aminotriazol; también inhiben la actividad bactericida del sistema EPO-H₂O²-haluro (B1, B2).

La gelatina inhibe el sistema EPO-H₂O²-Cl⁻, sin embargo, en el sistema con I⁻, si hay actividad bactericida en la presencia de la gelatina. Esto también puede ocurrir con la albumina. La inhibición por albumina y gelatina afirma que la actividad bactericida in vitro, puede ser influenciada por proteínas externas. Estas probablemente compiten con la bacteria por los productos tóxicos de la oxidación del haluro. Aunque se sugiere, que bajo ciertas condiciones el cloruro puede satisfacer la necesidad del haluro en el sistema antimicrobiano por EPO, esto debe ser enfatizado, ya que la EPO reacciona en un grado menor con cloro que la MPO. Azida, cianida y aminotriazol, inhiben el sistema a una determinada concentración de ioduro, pero si esta concentración es modificada, la inhibición no se lleva a cabo, por lo que existe actividad bactericida, lo mismo sucede con la MPO (B1, B2).

En contraste, se observa que la azida aumenta la actividad estafilocidal de eosinófilos, un efecto atribuido a la estimulación de la fagocitosis. Cuando lisostafina es añadida a la destrucción de microorganismos viables intracelulares en neutrófilos y eosinófilos 30 minutos post-fagocitosis, se presenta una

* La lisostafina es una peptidasa que degrada de forma específica los puentes de pentaglicina de la pared celular de *S. aureus*. Se trata de una enzima de una cepa estafilocócica denominada *S. staphylococcus*. Su empleo sistémico se halla limitado en el hongo por la capacidad inmunogénica de este compuesto y por su tendencia a seleccionar variantes que presentan alteraciones de pared y que pueden ser resistentes a otros antibióticos. En algunos casos, resulta útil su aplicación tópica (12).

respuesta que es atribuida a la disminución de la actividad microbici-
cida intracelular, sugiriendo que la acida puede tener un efecto
doble en eosinófilos; una estimulación de fagocitos y una
inhibición intracelular posiblemente en el sistema microbici-
mediado por EPO, (B1).

La actividad microbici- celular de eosinófilos, no es tan
importante en la defensa del hospedero como la actividad de los
neutrófilos (B1-B3).

La descarboxilación de AA, es postulada como otro mecanismo
bacterici- de los leucocitos, en donde el sistema MPO-H₂O₂-Cl⁻,
lleva a cabo la descarboxilación y desaminación de una variedad
de AA (B2).

La importancia de la descarboxilación es, que los aldehidos
y cloraminas que se forman de esta descarboxilación, llevan a la
descomposición de péptidos bacterianos, siendo éstos bacterici-
das. Esto es concebible, ya que la unión péptido-bacteria, está-
dada por uno de los dos mecanismos: cloración y subsecuente-
te desdoblamiento o descomposición oxidativa por oxígeno single-
te, que es un intermediario en el sistema mediado por MPO y EPO
(B2).

La descarboxilación de AA fue medida por la liberación de -
CO² para el AA L-alanina-¹⁴-¹⁴C (B2).

La descarboxilación de L- alanina con MPO no es lineal con-
respecto a la concentración de enzima, posiblemente por la dispo-
nibilidad del sustrato o por que en las reacciones de competi-
ción se incluyen otros sustratos de peroxidasa y/o descomposi-

ción de H_2O_2 por catalasa. En contraste, EPO muestra muy poca actividad, esto podría ser por una contaminación de neutrófilos (82).

Al observar la descarboxilación en los dos sistemas (MPO, EPO) se observa, que la concentración óptima de proteínas en neutrófilos y eosinófilos para la máxima descarboxilación fue mayor para los neutrófilos que para los eosinófilos, esto es debido a que EPO tiene capacidad limitada para descarboxilar alanina (82).

En el sistema MPO se observa, que es dependiente de la concentración de H_2O_2 presente, esta concentración es 1.8×10^{-4} M para MPO, a la concentración reportada que es de 2.1×10^{-4} M. Concentraciones más altas o más bajas de este valor, inhiben la actividad (82).

La descarboxilación por la EPO es limitada e independiente de la concentración de H_2O_2 , pero es menos activa que la MPO (82).

El pH óptimo para la descarboxilación por MPO es de 4.5 utilizando como buffer acetato de sodio, la actividad se ve influenciada por un aumento o una disminución en el pH. Este buffer empleado permite los estados más grandes de descarboxilación por lo que se sugiere emplearlo para otros experimentos posteriores (82).

El pH para EPO está dentro de un rango más amplio de 4.6 a 6, utilizando el mismo buffer (82).

MPO sí pudo oximidar el aspartato, la histamina, etc. en cambio, EPO no es capaz de esta oximización (82).

Por lo que vemos que el sistema MPO, es más efectivo para -

la descarboxilación que EPG. MFG debe tener una concentración de terminada de H_2O un pH 4.5 y acetato de Sodio como buffer para poder obtener la mejor descarboxilación (92).

Otro posible sistema bactericida mediado por peroxidasa es la iodación de proteínas, que fue examinada en los dos tipos de leucocitos usando I_2 . Con el yoduro como colector la muerte de MDe fue asociada a la iodación de proteínas bacterianas (82).

El papel fisiológico de la iodación puede ser cuestionado en vista de que el yoduro está presente en muy bajas concentraciones en plasma (menos de 0.5×10^{-6} M). Sin embargo, la ingestión de yoduro por leucocitos humanos normales es 1000 veces mayor a la presentada por eritrocitos. Además tales yoduros pueden ser reemplazados combinando tiroxina y triyodobencina, probablemente por desionización (82).

Los eosinófilos y neutrófilos tienen la habilidad de iodonar proteínas. Los eosinófilos en reposo son 30 veces más activos que los neutrófilos en reposo. Aunque los neutrófilos muestran un estado más grande de estimulación en la fagocitosis de zimosan, los eosinófilos mostraron gran capacidad de iodonar proteínas como lo hicieron los neutrófilos. En la presencia de H_2O , yoduro y zimosan, los eosinófilos y neutrófilos (como células libres) son capaces de iodonar proteínas de la misma manera. Sin la presencia de zimosan se presenta muy poca iodación (81,92).

Los eosinófilos pueden liberar los componentes del sistema-

peroxidasa (peroxidasa, H₂O₂) dentro del fluido extracelular. La iodonación por fagocitos, es dependiente de peroxidasa y H₂O₂ y la disponibilidad de grupos aceptores de electrones, tales como tiro-sina, residuos de proteínas. Cuando el sistema fue preoponizado y fue empleado como estímulo, la iodonación por eosinófilos es considerablemente aumentada por la adición de albúmina, clara que la estimulación por albúmina bajo estas condiciones se ve aumentada con eosinófilos más que con neutrófilos. Si la albúmina es requerida bajo estas condiciones como un origen de proteínas para la iodonación extracelular, esto sugiere que los eosinófilos están propensos a la liberación de los componentes del sistema de iodonación dentro del fluido extracelular. El sistema es tóxico a tumores de mamíferos y a esquistosoma de *Squitosoma mansoni*. Esto nos dice que los eosinófilos, los cuales están acumulados en los tejidos en asociación con ciertos neoplasmas y parasitismos, pueden contribuir a la defensa del hospedero por la liberación de componentes del sistema peroxidasa. El papel que siguen, indica que la toxicidad extracelular de EPD puede ser potenciada por poblaciones de granulos (82).

La actividad microbicida celular de los eosinófilos no es tan crucial en la defensa del hospedero, como sucede con la actividad de neutrófilos (81).

Otros experimentos serán necesarios para poder aclarar el papel de varios mecanismos antimicrobianos mediados por peroxidasa (82).

2) COMPARACION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA INTRACELULAR ENTRE NEUTROFILOS Y EOSINOFILOS

Los eosinófilos y neutrófilos son capaces de la ingestión y destrucción de MOs in vitro (83).

Durante estos eventos hay un aumento en el metabolismo celular, un estallido respiratorio que resulta en la producción de agentes potencialmente bactericidas, tales como H_2O_2 y aniones su peróxido. Este estallido respiratorio es necesario para la destrucción de muchas bacterias; sin embargo, los mecanismos por los cuales el estallamiento metabólico oxidativo resulta en la destrucción de la bacteria, aun no han sido bien aclarados. Parte de la capacidad bactericida, puede residir en efectos tóxicos directos de sustancias oxidativas como superóxido y H_2O_2 (83).

Alternativamente, la actividad bactericida más grande puede ser mostrada por la combinación de leucocitos peroxidasa con H_2O_2 y un haluro. El H_2O_2 obtenido de neutrófilos puede formar un sistema bactericida con cloruro o yoduro como cofactor. En la presencia de yoduro, se lleva a cabo la yodonación de proteínas (mecanismo bactericida); con el cloruro la descarboxilación de AA, formando aldehídos (mecanismo bactericida) (81-83). En contraste, la peroxidasa obtenida de eosinófilos, puede servir en la reacción peroxidasa- $H_2O_2-I^-$, resultando una yodonación de proteínas y destrucción bacteriana, pero la peroxidasa no puede descarboxilar AAs eficientemente en la presencia de cloruro, y similarmente no tiene efecto bactericida en la presencia de cloruro. Ambas peroxidases son igualmente efectivos en destruir bacterias

cuando el ióduro es utilizado como hidruro (83).

Los eosinófilos son menos eficientes en la destrucción bacteriana que los neutrófilos y esta reducción en la habilidad bactericida, puede ser atribuida a que los eosinófilos tienen un bajo potencial fagocítico (83).

Se comparó la capacidad de fagocitosis de eosinófilos obtenidos de un paciente con eosinofilia, y en neutrófilos de paciente normal, y se observó que la capacidad de fagocitosis fue similar para los dos tipos de células. Por otro lado, los eosinófilos fueron menos capaces de destruir bacterias (83).

En el sistema EPO-H₂O₂-Cl⁻, la EPO no mostró actividad bactericida en un sistema de células libres, cuando H₂O₂ y Cl⁻, mientras que la neutrófilo peroxidasa destruyó un gran número de bacterias bajo las mismas condiciones. Esto podría explicar el relativo defecto bactericida de los eosinófilos y sugerir una evidencia para la importancia de estos mecanismos bactericidas en neutrófilos. Sin embargo, no se puede probar que el defecto bactericida en los eosinófilos intactos, sea por la falta de reacción en el sistema peroxidasa-H₂O₂-Cl⁻; los dos fenómenos no han sido relacionados. Además de que los eosinófilos no destruyen una proporción de bacterias, indica que otros mecanismos bactericidas están involucrados (83).

Los eosinófilos contienen grandes cantidades de peroxidasa la cual es inmunológica y bioquímicamente distinta de la MPO de los neutrófilos, la cual tiene mucha importancia dentro de esta actividad bactericida, mayor a la que mostró eosinófilo peroxidasa (83).

D) MONOCITOS

1) ACTIVACION Y REQUERIMIENTOS DEL MONOCITO PARA EJERCER SU ACTIVIDAD FAGOCITICA.

Se ha visto que las linfoquinas (sustancias producidas por los linfocitos), muestran capacidad para activar Macrotagos (M ϕ) derivados de monocitos de sangre y a M ϕ de tejidos, para el metabolismo oxidativo y actividades antimicrobiana (85) (86).

Existen evidencias de que el Interferon gamma (IFN- γ), es una de las principales linfoquinas que activan a los M ϕ humanos. Aunque se conoce que los M ϕ tiene receptores para IFN- γ , los mecanismos precisos por los cuales este activa a las células, incluyendo el papel de los iones calcio, aún son desconocidos (85) (86).

En experimentos realizados se ha observado, que los monocitos de sangre obtenidos recientemente, exhiben un potente estado respiratorio y una actividad microbicida considerable, y esta actividad puede ser mejorada por tratamiento con IFN- γ (85)

Por otro lado, aparentemente las interacciones ligando-receptor de la membrana de la célula, puede iniciar el calcio citosólico en leucocitos fagocíticos, esto es importante para ciertas funciones celulares y para el acoplamiento estímulo-respuesta (85).

Bernd Kemmerich et al, encontraron que para el mejoramiento del Ca²⁺ citosólico durante una estimulación con Con A, depende de la concentración del IFN- γ usado para el tratamiento. Obser--

vandose también cambios en la permeabilidad en el Ca^{2+} cuando se hizo un tratamiento con IFN- γ (85).

Por lo tanto, el mejoramiento del estallido respiratorio de los monocitos, depende de la disponibilidad del Ca^{2+} y de su movilización de los almacenes intracelulares considerados para las respuestas inducidas por estímulos (85).

Al estudiar la relación entre el Ca^{2+} citosólico y el mejoramiento del estallido respiratorio de monocitos, se encontró -- que al bloquear la liberación de calcio de los almacenes citosólicos con TMB-8 (8-N,N,dietilamina octyl-3,4,5 trimetoxyl benzoate HCl), se anuló completamente la capacidad del IFN- γ , para mejorar el estallido respiratorio. Por lo que la disponibilidad -- del calcio, es esencial para que las células tratadas con IFN- γ , muestren su estado activado (85).

De esta manera, se puede concluir que el Interferón como -- linfoquina, tiene un papel importante en la activación de los monocitos junto con el Ca^{2+} citosólico que facilita que el Interferón realice su función en el mejoramiento del estallido respiratorio (85).

Tetsuro Fujii, et al, encontraron que el Interferón beta murina recombinante (rMuIFN- β), activa a los $M\phi$ para ejercer actividad bactericida contra *Listeria monocitogenes* en particular. -- Esta activación puede ser por la inducción en la generación de -- un mediador, este mediador puede ser la Interleucina 1. También se notó que el rMuIFN- β estimula a los $M\phi$ sólo e en colaboración con el Factor estimulador de colonias, en la liberación de Interleucina 1. La interleucina 1 estimula a los fibroblastos para li

bonar a IFN- γ y adhiere fagocitos para liberar el Factor estimulador de colonias (87).

Por otro lado, Peter C. J. Leith et al. observaron que la destrucción intracelular es mayor en presencia de suero en el medio (88). Sin embargo, la velocidad de este proceso de destrucción varía de acuerdo a las características del suero empleado (suero fresco, normal o inactivado), observándose una mayor velocidad de destrucción cuando se emplea fresco que cuando se realiza en presencia de suero inactivado, lo que indica que otras proteínas de suero, estimulan la destrucción intracelular. Puesto que la actividad del C', está totalmente ausente en suero inactivado (84).

En otro experimento se observó, una estimulación en la destrucción celular, similar a la que se vio con suero fresco cuando se experimentó con suero inactivado, mas factores del C' (incluyendo al Factor B). Esta combinación, dió como resultado la generación de C3 y C3b, este último por amplificación. Ya que los monocitos tiene receptores para C3b en la membrana, por lo que esta estimulación ocurre por la vía clásica (40) (84) (88). Cuando se trató con el mismo suero y con pronasa (la cual disminuyendo grandemente el número de receptores C3), resultó en un marcado decremento en la destrucción intracelular por suero fresco indicando que los monocitos humanos también son estimulados por la interacción de su receptor C3b con el C3b de la bacteria (84,88).

También se observó, que la parte Fc de la IgG con el receptor Fc de la membrana de los monocitos, proporciona estimula---

ción de la destrucción intracelular, esto sólo fue con la IgG1 y la IgG3, ya que la IgG2 y la IgG4 fueron inactivas, lo que es lógico puesto que los monocitos sólo tienen receptores para IgG1 e IgG3 (84) (88).

En otro estudio realizado por los mismos autores, se observó que la IgG y el C', tienen efecto en la liberación de enzimas lisosomales. Ya que la combinación de la IgG unida a la superficie y el C3b, estimulan la liberación de lisozimas y β -glucuronidasa en granulocitos de conejo y humano (84).

Se concluye que la fracción Fc de la IgG interactúa con el receptor Fc de la membrana del monocito y que el C3b del C' interactúa con el receptor C3b del monocito, ambos estimulan la destrucción intracelular vía receptores específicos, sobre la superficie de la célula (84) (89) y que el funcionamiento normal de los receptores Fc y C3b en la membrana del monocito es necesario para la destrucción intracelular (84).

2) METABOLISMO DE OXIGENO EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE MONOCITOS

Los monocitos son una población de células fagocíticas que se encuentran en sangre periférica humana, los cuales son derivados de células precursoras en la médula ósea (40), y son liberados al torrente sanguíneo, en donde después de permanecer dos días emigran a los tejidos, y se convierten en células fagocíticas activas de mayor tamaño, que reciben el nombre de macrófagos (M ϕ) o histiocitos (LB). Estas células juegan un papel importante en la defensa del hospedero contra infecciones bacterianas (40).

La fagocitosis por PMN y monocitos de mamíferos, está asociada a un marcado aumento en el metabolismo oxidativo, con aumentos en el consumo de oxígeno, oxidación del derivado hexosa monofosfato, por la vía glucosa (HMPS), y un incremento en la generación de H $_2$ O $_2$ y anión superóxido (46,75,89).

En realidad, los conceptos comunes de cómo los M ϕ destruyen a los MOs, están basados en gran parte en la extrapolación de datos obtenidos con experimentos con neutrófilos. No obstante también se han realizado experimentos con M ϕ (46).

Debido a esta relación, se ha revisado el metabolismo oxidativo de los neutrófilos, para tomarlo como referencia para un mejor entendimiento del metabolismo oxidativo, realizado por los monocitos (46).

El primer evento en el metabolismo oxidativo de neutrófilos parece ser dirigido por una enzima que transfiere un electron --

del NADPH al O_2 . Por este mecanismo el oxígeno es su mayor parte pasa a anión superóxido (O_2^-) (46,85). Figura 15 #1.

Los radicales superóxido, actúan sucesivamente en una reacción de dismutación espontánea, produciendo el H_2O_2 y O_2 . La enzima superóxido dismutasa incrementa la velocidad de esta reacción hasta 10 000 veces a pH fisiológico (46,86).

El anión superóxido y el H_2O_2 , interactúan mutuamente para formar el radical hidroxilo ($OH\cdot$), el cual es un potente oxidante (reacción de Haber-Weiss) (46,86) Figura 15 #2.

La oxidación de la glucosa a través de la enzima membranal gliceraldehído 6 fosfato (G6PD), es estimulada por el NADP⁺ formado durante la fagocitosis. Este NADP⁺ es un producto de activación del ciclo de glutatión peroxidasa por H_2O_2 (46,79) figura 16 #1.

Un estallido de luminiscencia oxígeno dependiente, ocurre durante la fagocitosis (46). Se ha propuesto que esta luminiscencia, es causada por oxígeno singlete (una especie de oxígeno excitado capaz de emitir luz en regresión a su estado basal) (75). Pero la presencia de bandas anchas múltiples de luz en la emisión del espectro luminiscente, asociado a la fagocitosis indica que al menos, la luz no es emanada solo por el oxígeno, ya que aproximadamente 3/4 de la quimioluminiscencia, puede ser eliminada por la superóxido dismutasa, esto parece ser razonable para implicar el anión superóxido en el fenómeno (46). Figura 16 #4.

El H_2O_2 , así como el oxígeno pueden ser involucrados en la quimioluminiscencia fagocítica, a través de la generación de oxígeno como un producto directo de la reacción de Haber-Weiss o a través de la generación de radicales carbonato excitados por $OH\cdot$ (46).

Recientes reportes indican, que los monocitos así como los neutrófilos liberan O_2^- , y generan CL durante la fagocitosis, - esta liberación del anión superóxido puede ser inducida en los monocitos por sustancias solubles, capaces de alterar la membrana tales como la fosfolipasa C y miristato de acetato forbol --- (46,76).

Aunque es conocido que los radicales de oxígeno pueden dañar ácidos nucleicos, ligaduras de lípidos insaturados, grupos tiol, poco es sabido de los efectos bioquímicos de los metabolitos de oxígeno sobre MOs (46).

Por otro lado, la halogenación de la membrana bacteriana -- por el sistema H_2O_2 -peroxidasa, puede ser una parte integral de la letalidad. Esta probabilidad, parece tener gran aceptación ya que la iodación de partículas ingeridas, puede ser inhibida -- por ascorbato con inhibición de la destrucción y la introducción de la superóxido en la vacuola fagocítica o en el medio extracelular, aumenta la iodación pero reduce la destrucción (46).

Aun cuando los fagocitos mononucleares (monocitos y $M\phi$), -- son difíciles de obtener en altas cantidades, se ha observado -- que también se someten al estallido respiratorio asociado a la fagocitosis (46).

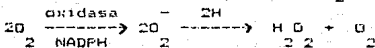
Se ha demostrado que los monocitos durante la fagocitosis, - muestran un consumo de oxígeno y activación del HMPS incrementan do la liberación del H_2O_2 , y la formación del OH (46,76).

Así como los neutrófilos de cobayos y los $M\phi$ alveolares peritoneales de conejo, contienen actividad de NADPH oxidasa, en una fracción de células rotas durante la fagocitosis, y ésta ---

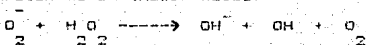
fracción puede generar H_2O_2 en la presencia de NADPH (46). Los monocitos de sangre humana pasan por estas mismas manifestaciones del estallido respiratorio asociado a la fagocitosis aunque en cambios menos pronunciados que en los estudios con neutrófilos, bajo las mismas condiciones (46).

FIGURA 16. Eventos que comprenden el estallido respiratorio asociado a fagocitosis.

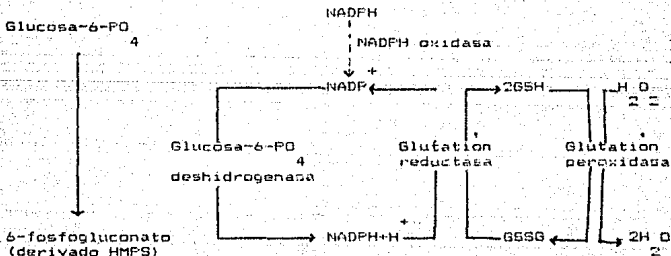
#1 Consumo de oxígeno y generación de O_2^- y H_2O_2



#2 Formación de OH $^\cdot$ (Haber-Weiss)



#3 Activación del derivado HMP



#4 Quimioluminiscencia

Por otro lado, existen evidencias de que los fagocitos mononucleares, juegan un papel esencial en el daño a tejidos y/o en la protección citotóxica. En tales condiciones se puede esperar que los M ϕ se fijan a los complejos inmunes o a las células cubiertas por Acs a través de sus receptores de membrana para CSb y/o la porción Fc de las Igs (76).

Los fagocitos mononucleares acumulados en sitios de inflamación son capaces de elaborar metabolitos de oxígeno tóxicos en los tejidos cercanos. Estos productos de oxígeno pueden dañar al tejido a través de la descomposición oxidativa de los ácidos grasos asociados a la membrana, reacción con bases ácido nucleico y por destrucción del grupo tiol (76).

Los leucocitos de sangre y de heridas son células funcionalmente equivalentes, la movilización de tejidos, no daña ni la función ni la activación de los leucocitos de heridas, y la función microbicida de éstos, es preservada para el progreso en la maduración de la herida (87).

Mediciones realizadas en el consumo de oxígeno, actividad del HMPS y producción del anión superóxido por leucocitos de sangre bajo condiciones in vitro, indican que el sistema oxidasa de leucocitos de heridas están funcionalmente intactos (89). Se ha visto que la resistencia a una infección por bacterias intracelulares, depende de la activación de M ϕ y linfocitos. Así, linfocitos sensibilizados por previas experiencias con un MO han mejorado la destrucción de bacterias intracelulares (46).

Los M ϕ obtenidos de animales con resistencia mejorada para bacterias intracelulares, exhiben un incremento en su tamaño, mo

vimiento desordenado de membranas, un número de mitocondrias, número de gránulos lisosomales, contenido de enzimas hidrolíticas, secreción de proteasas activadas, pinocitosis, fagocitosis (de algunas partículas), actividad tumoricida y antimicrobica, y otras manifestaciones de un estado de activación (44).

Se ha encontrado, que la capacidad mejorada de los $M\phi$ activados para resistir infecciones y tumores, está asociada a los incrementos en la producción del anión superóxido y H_2O_2 en respuesta a un estímulo por contacto de superficie o fagocitosis. Estos metabolitos de oxígeno y los productos de su interacción pueden romper la membrana de $M\phi$ s y células tumorales de mamíferos (45).

Así, la gran respuesta respiratoria de los $M\phi$ activados, juega un papel significativo en la capacidad acelerada, para efectuar la inmunidad mediada por células (46).

Richard B. Johnson al evaluar la fagocitosis, la capacidad bactericida y el metabolismo de los monocitos ($M\phi$ s) y $M\phi$ s alveolares ($AM\phi$ s), en comparación con los $PM\phi$ s, encontraron diferencias cuantitativas y cualitativas en las mismas (51). Siendo algunas de ellas las siguientes: La velocidad fagocítica para *S. aureus* opsonizados y *E. coli* fue menor para $M\phi$ s, $AM\phi$ s que para $PM\phi$ s, ocurriendo lo mismo en la actividad bactericida y metabolismo (51).

Los $M\phi$ s ingieren menos bacterias que los $PM\phi$ s. Sin embargo, la destrucción intracelular de la bacteria ingerida es similar para ambas células (40, 29). Esto puede ser debido a que los linfocitos que contaminan las preparaciones de $M\phi$ s, causan una disminución en su actividad bactericida (40).

La cinética de la fagocitosis por PMNs y MNs, cambia significativamente por variación de la fuente opsonica (40).

Por tanto se concluye que, si los MNs son derivados directamente de los MNs circulantes, entonces se sugiere que los fagocitos mononucleares que residen en un medio ambiente en el cual la disponibilidad de las opsoninas es limitada, han adoptado sus requerimientos opsonicos para facilitar la ingestión de ciertas bacterias, por ejemplo *S.aureus*. Sin embargo, a pesar de esta adaptación su capacidad bactericida permanece limitada cuando es comparada con los PMNs (51).

3) EL PAPEL DE LA FIBRONECTINA EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS MONOCITOS

a) GENERALIDADES

La fibronectina (Fn) es una glicoproteína de elevado peso molecular, aproximadamente 440,000 dal (90-92,95-98,101-103,105, 106-110,112,114,117). Es una molécula importante que ha sido llamada de diferentes formas de acuerdo a:

La migración en gel de poliacrilamida: Proteína 2, galactoproteína a, proteína unida a L1, proteína banda 1 (90).

Su localización en el exterior de células cultivadas:

Proteína de superficie celular, Ag de la superficie de fibroblastos (90,91).

Su ausencia en el exterior de células cultivadas transformadas:

Proteína grande de transformación sensible externa (90,91).

Su habilidad para promover su adhesión celular y extensión celular:

Proteína de adhesión celular, factor de adhesión celular, factor de desarrollo celular (90).

Su actividad opsonica: Glicoproteína opsonica unida a la superficie α_2 (90-91).

Su habilidad para unir gelatina: Factor antigelatina (90-91).

Su propiedad de coprecipitacion con fibrinogeno en frio: Globulina insoluble fria (90-91).

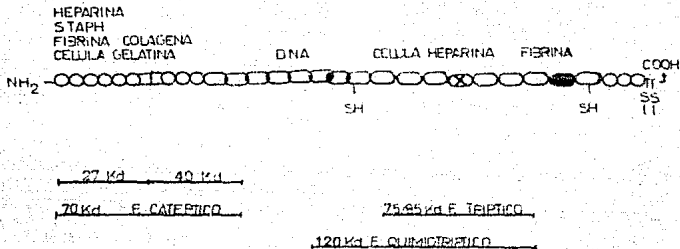
La Fn se encuentra ampliamente distribuida en una forma soluble en sangre (90-93, 96-98, 108, 110, 114, 119), y ademas en otros fluidos del cuerpo (101, 104, 110, 115, 117) como en fluido amniotico (90, 96, 114), plasma seminal (96), fluido cerebroespinal (90, 96, 114), fluido sinovial (96, 114), fibras intersticiales (97), saliva (114) y exudados inflamatorios (114). La Fn en forma insoluble está ampliamente distribuida en tejido (101, 105), donde se encuentra covalentemente unida a fibras multimericas (90-92, 98, 114, 115); ademas se localiza en la superficie de células (o en el interior) (96, 108, 110, 115), en la matriz extracelular (principalmente en endotelio) (92, 93, 96, 98, 110, 114, 119) y en la superficie de fibroblastos (117, 119). Aunque ambas formas de fibronectina muestran similitudes, incluyendo afinidades para fibrina, colágena, ácido hialurónico, heparina y actina, existen diferencias en estructura, solubilidad, inmunogenicidad y propiedades biológicas (108).

La fibronectina contiene aproximadamente 2300 aminoácidos y 5% de CHOs (90, 91, 114). Está compuesta de bloques repetidos y secuencias homologas que van desde 45, 60 o 90 AAs de largo (114).

La Fn en plasma circula como un dímero compuesto de dos monómeros (o también llamadas subunidades o armas) de 220 kDa, unidos por disulfuro (90-97, 98, 97, 102, 109, 114, 115), en la superficie de células existe como agregados grandes de multímeros, formados por interacciones covalentes y no covalentes (109) (figura 17).

En las bases de la secuencia de AAc, la molécula puede ser organizada dentro de tres tipos de unidades de homología. La secuencia de homología tipo I, contiene 45 AAc que están sujetos por uniones disulfuro. Ambas regiones, amino-terminal y carboxi-terminal de la molécula, contienen esta secuencia de tipo I. La secuencia de homología tipo II consiste de 50 AAc y contiene dos uniones disulfuro. Esta secuencia es específica al dominio de unión 40 Edal-colágena (114, 115). La región central restante de la molécula está compuesta de la secuencia de homología tipo III (92, 114, 115). Esta unidad contiene 50 AAc y no tiene uniones disulfuro. Sin embargo, contiene dos grupos sulfhidrilo libres (114, 115). La función de estos grupos no es conocida, pero bajo ciertas condiciones la formación del multímero de elevado peso molecular de Fn, puede ocurrir vía oxidación de estos grupos sulfhidrilo (115). Los mecanismos de la formación de este multímero de Fn unido a disulfuro, involucran cambios en un tercio de la región amino terminal de la molécula (110) (Figura 17).

Las armas de las moléculas pueden ser extendidas y separadas a 70 °C. La terminación de cada subunidad puede doblarse hacia adentro en la terminación del dominio carboxilo de unión colágena (Dominio #2), así se forme una proteína globular, flexible, que se puede expandir y contraer, dependiendo de su localización.



○	Tipo I	45-50 aa
□	.. II	45-50 aa
○	.. III	90 aa
⊗	DOMINIO EXTRA	90 aa
●	Región 0-120	aa

F= Fragmento

Fig 17 Diagrama de una subunidad de Fibronectina representando los dominios de unión para DNA, heparina, colágeno y para varios fragmentos proteolíticos. Los círculos, a.e. = aminoácido STAPHES, cuerdas II, III.

zación (90-92, 94, 114). Esto depende también del radio hidrodinámico, el cual aumenta o disminuye, dependiendo de la fuerza iónica (114).

Cada una del dímero de Fn puede ser dividida en dominios estructurales funcionales (90-92, 94), los cuales frecuentemente son referidos por una de las sustancias a las cuales se unen como por ejemplo: El dominio (D) #1 y el D #8 son referidos como dominios de unión a fibrina (91-93, 104, 109, 110, 114, 115). D #2, dominio de unión colágeno/gelatina (90-94, 104, 109, 110, 114, 115). D #6 es la región de adhesión a células y el D #4 una DNA (110, 114, 115).

Las funciones del D #3 y #5 no son conocidas. El D #7 es la terminación carboxilo. El C' probablemente une al dominio unidor de colágeno, porque C1q tiene un extremo como colágeno (104, 107). La región de adhesión celular (D #6) (91-93, 109, 114, 115), interactúa con células de mamíferos y promueve la unión a superficies de plástico. En varios tipos de células la secuencia Arg-Gli-Asp, en el dominio de unión a células de fibronectina, interactúa con una glicoproteína de superficie por células llamadas IIb/IIIa. El mismo dominio puede unir a una proteína transmembranal, las cuales luego interactúan con vinculina, α -actina, tropomiosina y miosina. La Fn también se une a componentes extracelulares y de la membrana interna; como a la cubierta de la glicoproteína de los virus (123), a *Candida albicans* (122), a una variedad de bacterias (109) incluyendo *S. aureus* (91-93, 104, 110, 114, 115, 119), *Streptococcus*, *Treponema* (103, 114, 120) y a parásitos (121) como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*. La Fn también puede

de adherirse indirectamente a E. coli via C⁺ (114). Además esta molécula tiene sitios de unión para la heparina (90, 92, 94, 104, 109, 110, 115), actina (92, 104, 110) y proteoglican (109, 110).

Existe un dominio extra (ED) que está insertado por fibroblastos dentro de una subunidad de Fn. La presencia de este dominio puede ser único en Fns celulares. El significado funcional de ED en la Fn no es conocido, pero puede tener un papel en la organización de tejidos, quizá afectando la fibrologénesis de la Fn o proporcionando sitios de unión para las células migratorias y para otras moléculas de la matriz extracelular (114, 115) Fig 17

La existencia de estos múltiples dominios específicos en la Fn, pueden explicar, cómo esta molécula puede actuar en una variedad de interacciones moleculares. Esta, puede actuar como una molécula que interconecta una serie de células y componentes de la matriz, para formar complejos macromoleculares en la superficie celular y en la matriz extracelular (92) Fig 18.

Las regiones de polipeptidos flexibles tienden a ser susceptibles al ataque por una variedad de proteasas, que van a adherirse a regiones separadas (90, 92, 94). Existen dominios que son resistentes a estas proteasas el D #1 y el D #3 (91). La acción proteolítica la dan proteínas como la Tripsina = T, así como Cathepsin B o plasmina y la Quimiotripsina=C. La digestión parcial proteolítica de la molécula, ha llevado a la figura de los dominios funcionales (91, 97, 113)

La Fn es idéntica o concenamente idéntica a la Fn hecha por células homólogas en cultivo (90, 91). El tamaño de la subunidad o de la Fn secretada por células en cultivo y la Fn en fluidos

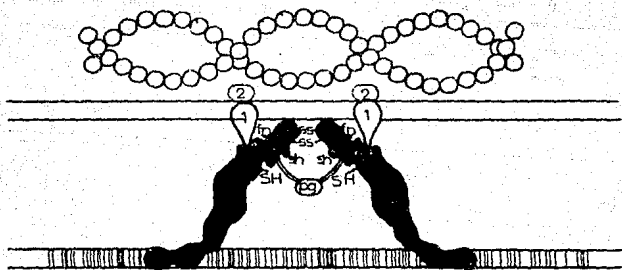


Fig 18 Modelo hipotético que muestra la acción de la Fibronectina como un ligando de la célula a la matriz extracelular. PB= Interacción de Fn con colágena y con heparina. 1) Proteína, glicolípido o varias moléculas de unión 2) Interacción de Fn con microfilamentos de actina (92).

amnióticos, es un poco más grande que la Fn en plasma. La Fn en plasma y la Fn sintetizada por Fibroblastos cultivados, son similares pero no idénticas en estructura, función y diferencias inmunológicas. Es probable que estas diferencias resulten de procesos diferenciales de un simple RNAm (90,91,115).

Muchos tipos de células sintetizan y secretan Fn, pero la mayor parte de esta molécula en circulación es producida por hepatocitos (97,114,115). La heterogeneidad del código RNAm que codifica para la Fn producida por hepatocitos de ratas, ofrece la posibilidad de subpoblaciones funcionalmente diferentes de esta molécula (97). La Fn soluble puede ser secretada en la superficie de la cubierta de las mucosas de la boca y de la vagina. La Fn en plasma tiene una vida media de 24-72 hrs (114). Aunque el destino de toda la Fn, que va a la circulación no se conoce, algo de la Fn soluble es incorporada dentro de las matrices extracelulares en los tejidos (91,114,115). La fuente de Fn en tejido in vivo no es conocida (115).

La Fn es sintetizada por una amplia variedad de células in vitro (tabla 6), ~~M~~ cultivados derivados de monocitos de sangre humana, sintetizan y degradan Fn (94,101). Fibroblastos y células endoteliales son los que más la producen, pero otros tipos de células, incluyendo algunas células epiteliales sintetizan Fn a niveles bajos (114).

En la Tabla 7 se muestran sus propiedades específicas (90, 91).

TABLA 6. Síntesis de Fn in vitro (92).

TIPO DE CELULA	COMENTARIO
Fibroblastos (92,102,119)	Frecuentemente disminuye después de una transformación oncogénica.
Celulas endoteliales (92, 102,106,119).	Alta velocidad de síntesis, alta proporción secretada in vitro.
Mioblastos y mioconductos	Parece cuantificable dependiendo de acuerdo a la fuente celular; - celulas transformadas presentan - muy poca cantidad; los mioconductos casi siempre tienen menos que los mioblastos.
Macrofagos (92,101,102) Hepatocitos	Toda o casi toda es secretada Toda o casi toda es secretada la Fn en plasma.
Celulas amnióticas	Fn amniótica es densamente glicosilada.
Celulas epiteliales intestinales.	Pequeñas cantidades solamente.
Celulas epiteliales mamarias.	Disminuida en celulas metastáticas.
Teratocarcinomas	Cambios con diferenciación.
Tejido embrionario primario.	Celulas de los tres estratos germinales sintetizan Fn.

TABLA 7. PROPIEDADES DE LA FIBRONECTINA
(90, 91, 92, 7, 97, 102, 104, 114, 115)

Globulina rápida (90, 91)
pI: 5.5 - 6.2 (90-92)
Coefficiente de Sedimentación 12-14S (90, 91).
Masa molecular 4.4×10^5 daltons (90, 91).
Composición de una subunidad: Lis, His, Arg, Asu, Thr, Ser, Glx, Pro, Gli, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tir, Trp, Cis, NeuAc, Gal, Man, -- GlcNAc.
Contenido de cisteína: Aproximadamente 1 subunidad : 2×10^5 dal.
Secuencia amino terminal: Piro, Glu-Ala-Glx-Met-Val-
Concentración en plasma en adulto normal: Hombre 300 μ g/ml Mujer 400 μ g/ml Rango normal: 250-600 μ g/ml
Concentración en suero normal: 20-50% menos que en plasma.
Coefficiente de Absorbancia: A_{280nm} 1% 1 cm = 12.8
CHO de Fn en plasma: 5-9% de Asparagina unida a complejos de oligosacárido.
Cociente friccional: 1.7
Resistente al calor pero sensitiva a la tripsina (97).
Grupos Sulfidrilos: 1 o 2 en el 30% de los C-terminales.
Estructura: terciaria asimétrica y alargada con dominios globulares.

La Fn interactúa con las células que tienen capacidad fagocítica, lo cual sucede de la siguiente manera:

b) Estimula la adhesión y quimioatracción.

La primera respuesta del hospedero a la invasión bacteriana, es la liberación de mediadores inflamatorios que alternan con los mecanismos de defensa del hospedero en una infección. Algunos de estos mediadores tienen actividad quimioatrayente, incluyendo fragmentos de Fn, los cuales ejercen su acción sobre los monocitos humanos (102,107,108,110,113). La activación de proteasas por ejemplo, elastasa de neutrófilos o plasmina, en los sitios inflamatorios permiten la liberación de fragmentos de Fn (112,113).

Productos de degradación de Fn son también quimiotácticos, para monocitos y se codistribuyen muy bien con Fn soluble (113).

La molécula Fn puede también actuar como estímulo indirecto en la acumulación de monocitos, mejorando la unión del factor inhibidor de la migración de macrófagos a monocitos (113).

Otras linfocinas como el factor aglutinador de macrófagos, son liberados por células T en respuesta a antígenos o mitógenos y es probablemente, la Fn. Así, ésta puede ser un quimioatrayente, un receptor de linfocinas y una linfocina para los macrófagos (108,113).

La Fn y fragmentos de ella no aumentan la quimiotaxis en neutrófilos. Sin embargo, la combinación de ácido hialurónico y

Fn, estimulan la quimioquinesis y quimiotaxis en neutrófilos (104-113). El tejido dañado está acompañado por la liberación de muchos quimioatrayentes de los neutrófilos, tales como: Fibrinopeptido B, C5a y metabolitos de ácido araquidónico, así como Fn y ácido hialurónico de la matriz intercelular. La liberación de los fragmentos de Fn por proteasas de neutrófilos puede ser una de las señales moduladoras del cambio para un flujo temprano de neutrófilos a una respuesta inflamatoria predominantemente monocítica (113).

Por lo anteriormente mencionado, la Fn puede jugar un papel importante como un quimioatrayente para neutrófilos y monocitos (113).

La actividad de adhesión celular de la Fn está localizada en la región central de la molécula. La actividad está contenida dentro de la secuencia de cuatro AAs, Arg-Gli-Asp-Ser (RGDS) (115). La proteína compleja de superficie celular, es identificada como un receptor de Fn en cierto número de células. Este receptor tiene una moderada afinidad para la Fn soluble ($KD=8 \times 10^{-7}$) mediando la adhesión de células a matrices de Fn. El complejo 140 Kdal, representa el principal sitio de unión superficie-célula para la Fn, sin embargo, es probable que células que contienen proteínas adicionales, funcionen como receptor de Fn (115, 115).

Una segunda molécula de superficie celular, se ha propuesto como un receptor de ensamble a la matriz. Este receptor exhibe una alta afinidad de 20 veces más por la Fn soluble ($KD=4 \times 10^{-8}$) que el receptor de adhesión celular (115).

Moléculas como glicosaminoglicanos, colágeno y heparinas proteoglicanos conteniendo sulfato, puede afectar la unión de F α a las células (115).

Así, la F α también mejora la adherencia de monocitos y neutrófilos circulantes al endotelio vascular (90-91,112-114). Los neutrófilos tienen un receptor específico para la F α (112,113), la que sintetizan y depositan en las superficies que ellos atraviesan (113,120). Los neutrófilos recolectados de un sitio inflamatorio, exhiben un aumento de 20 veces en la síntesis de F α , la cual es rápidamente liberada. La presencia de esta F α celular o (como ha sido llamada) F α inflamatoria, aumenta la actividad quimiotrayente, así como la actividad quimocinética. El factor quimiotrayente f-Met-Leu-Pe, estimula la liberación de F α acumulada en los neutrófilos. Esta F α inflamatoria derivada de neutrófilos, mejora la adhesión de sustrato-neutrófilo, sin embargo, la F α de plasma muestra reducción en esta adhesión. Esta diferencia está de acuerdo con las diferencias estructurales y funcionales entre la F α de plasma y la F α derivada de células (113).

Los monocitos de sangre periférica, macrófagos peritoneales, macrófagos alveolares y líneas celulares de macrófagos, se unen específicamente a superficies cubiertas de F α en el fragmento -- 110 Kdal de la molécula (111,113,115). Como con neutrófilos, los receptores de F α en macrófagos se unen pobremente a esta molécula (113,120), pero esta unión de la F α y monocitos, mejora la actividad fagocítica (108,110,112).

De esta manera, la F α aumenta la liberación de fagocitos a los sitios inflamatorios por estimulación de la quimiotaxis y fa

promoviendo la adhesión. Es de interés, que la prostaglandina I_2 disminuye la fagocitosis mediada por Fc, esto puede permitir que las células endoteliales se protejan por ellas mismas del daño mediado por macrófagos dentro del árbol vascular (113).

c) Quimiotaxis.

La Fc también juega un papel en la quimiotaxis, las células que mueve, deben ser capaces de adherirse reversiblemente a las superficies. La Fc es una proteína adhesiva para muchos tipos de células, incluyendo neutrófilos y M ϕ (103,114,114,120). Los PMN pueden unir a la Fc a la membrana celular, sin embargo, la unión es cuantitativamente menor que para los monocitos (112). Así la Fc puede ser una proteína que sirve en un proceso de adhesión reversible (113). Por lo que puede mejorar la quimiotaxis celular, porque actúa como una proteína de adherencia reversible y porque ayuda a organizar y transmitir fuerzas móviles para los microfilamentos que contienen actina y otras proteínas intracelulares (113).

d) Adhesión de bacterias a fagocitos

El primer paso en la fagocitosis es la adherencia de bacterias a la membrana fagocítica (94,110,114,117). La Fc promueve esta interacción para algunas especies bacterianas (94,110), como por ejemplo: La Fc media la adhesión de S.aureus (95-97,113,

114, 116, 119) y cepas negativas de proteína M*, como *Streptococcus pyogenes* (9, 118) a neutrófilos, pero no media la adhesión de *E. coli* (100, 105, 113), *Pseudomonas aeruginosa* o *Klebsiella pneumoniae* (91, 97, 99, 100, 105, 107, 113). Pocos estudios de la interacción de *S. aureus* con neutrófilos en un medio libre de suero, indican que la adhesión si ocurre, quizá esta adhesión es debida a que la Fn es secretada por los neutrófilos (105, 110, 113). Aunque cepas positivas de proteína M de *S. pyogenes*, se unen a la Fn la proteína M bloquea la adherencia (107, 113). La proteína M tiene un efecto similar en la interacción de neutrófilos con *S. pyogenes* que están cubiertos con el componente C2 del C' (107, 113).

Como se mencionó, el receptor de monocitos humanos para la Fn, está localizado en la región 110 Kdal de la molécula, esto se identificó con el uso de la técnica de Acs monoclonales. Este Ac monoclonal une monocitos de sangre periférica, Mx de tejido y (a una menor extensión) a neutrófilos, pero no une a fibroblastos, linfocitos, plaquetas o eritrocitos. El complejo 140 Kdal representa el principal sitio de unión superficie-célula para la Fn. Es probable que las células contengan otras proteínas adicionales que funcionen como receptores para la Fn (113, 115). La un-

* La proteína M es el factor de virulencia de *S. pyogenes*. Las cepas que son ricas en esta proteína, exhiben más fibrillas y mejor adhesión a las células epiteliales, que cepas que producen muy poca proteína (118).

** Son células que sintetizan y secretan cantidades considerables de Fn. Están presentes en sitios como en el endotelio dañado, particularmente en estados de cicatrización. Facilitan la adherencia bacteriana sin requerir de Fn endógena adicional. Cuando se exponen materiales cubiertos con Fn los Fibroblastos presentan una actividad fagocítica (119).

nión de partículas a NH_2 mediada por la Fn, no es suficiente para que ocurra la fagocitosis. Esta misma situación se aplica a la adherencia de *S. aureus* y *S. piogenes* a neutrófilos (105, 107, 113).

La interacción de Fn con *S. piogenes* (95, 97, 114, 119), ocurre en un dominio similar al dominio al que se une *S. aureus* (114). La unión bacteriostática de Strepto grupo A, C y G se lleva a cabo en el dominio 27 Kdal de la región NH_2 -terminal y otro en el dominio 120-140 Kdal de la parte final de $COOH$ (95-97, 118, 119). La Fn en la superficie de mucosas orofaríngeas, proporciona un sitio de adhesión para esta bacteria (96-100, 107, 114), uniéndose principalmente al Ácido Lipoteicoico (LTA) de *S. piogenes* (98, 118, 119).

La Fn contiene sitios específicos de unión para el ácido que reconoce la mitad del lípido de la molécula de LTA. Este es unido al dominio hidrofóbico en la molécula de Fn. El sitio de unión para el ácido graso en la molécula de albúmina, puede competir por la Fn por el LTA (98, 118).

La alta afinidad del LTA para la Fn, puede tener un papel importante, cuando la adherencia de *Streptococcus* ocurre en fluidos biológicos, como sangre o saliva (118). Para varios tipos de células la Fn parece ser un candidato viable como receptor para *S. piogenes* (118) Figura 19.

La albúmina inhibe competitivamente la unión de LTA a Fn (118). La penicilina también influye en la unión de la Fn a *S. piogenes* por una pérdida del LTA, sin embargo, no la evita (98).

S. aureus se une específica e irreversiblemente al dominio

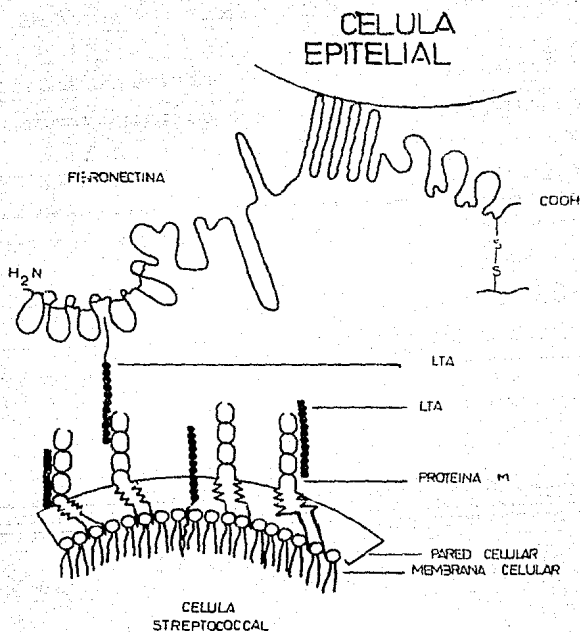


Fig 19 Modelo hipotético de la interacción de LTA sobre la superficie de *Streptococcus pyogenes* con Fn sobre la superficie de célula epitelial (11E).

NH₂-terminal (27 kDa) de la Fc soluble, esta porción de la Fc forma uniones covalentes en la matriz (95-97,114,115,117). Esta unión tiene una constante de disociación de 5 x 10⁻⁷ M y un rango de < 100-20,000 receptores de Fc/MO (116). Otro sitio de unión para S.aureus ha sido sugerido en la región 120-140 kDa de la región COOH-terminal, cerca del sitio de unión a colágena (116,117,119).

La estructura dimerica de la Fc, indica que cada arma de la molécula puede contener un receptor de Fc, por lo que es capaz de unir dos Staphylococcus, produciendo así aglutinación (97,---116). En efecto, algunas cepas de S. aureus son aglutinadas por Fc a 3 mg/ml, una concentración que es 100 veces mayor que la concentración normal de Fc en plasma (116). Las proteínas de unión de la bacteria a la Fc fueron aisladas, con un peso molecular de aproximadamente 197 y 60 kDa para Staphylococcus, se localizan en la superficie de la bacteria permitiendo interacciones entre ella con la Fc del hospedero (97,115,117,119). El ácido teicoico, es el principal componente de la pared celular de S aureus y media la capacidad de la bacteria para adherirse a las células epiteliales, por lo que el sitio de unión para la Fc parece ser el ácido teicoico (117).

Es necesario un pH ácido y un medio rico de crecimiento, para la expresión de los receptores de Fc. El número de éstos puede ser alterado por el crecimiento de S.aureus en la presencia de subMICs de antibióticos. La penicilina y cefalotina, aumentan la expresión de los receptores de Fc, quizá esto ocurre por la desorganización de los mureos expuestos en la pared celular. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas como: Clot-

ranfenicol, Eritromicina, Clindamicina y Pirlamicina, reducen la expresión de los receptores de Fc (78,116). Sin embargo, la IC aumenta la expresión de estos receptores y la Vancomicina los mantiene. El significado clínico de esto no es conocido, pero la expresión de estos receptores de Fc y la adherencia in vitro es sumamente fuerte (110). La remoción de los receptores de Fc para S.aureus por mecanismos significativos o por crecimiento de la bacteria en un medio que contenga antibiótico, disminuye la habilidad de adherencia. Así, los receptores de Fc parecen jugar un papel en la infección inicial de S. aureus (116). Los FMN y monocitos poseen receptores de adhesión para la Fc, estos son completamente similares, aunque los FMN tienen menos receptores que los monocitos (112).

Se podrá producir una vacuna que prevenga la invasión de las bacterias, si los receptores de la Fc se pueden purificar, se prueba que son inmunogénicos e inhiben la adherencia de las bacterias al tejido del hospedero (116).

e) Ingestión

La Fc sola no es una opsonina completa (101,105,113), pero puede alterar los receptores fagocíticos para IgG y componentes del C₃ y C₅, promueve la fagocitosis indirectamente (113,114). No ha sido demostrado un mejoramiento de la fagocitosis de la bacteria, cuando la Fc es usada como opsonina (92,94,95,97,101,103,105-108,110,113,117,120). Aun cuando se ha reportado, que la Fc promueve la ingestión de S.aureus por monoestratos de neutró-

filo, la velocidad de fagocitosis es muy lenta.

Sin embargo, sí tiene un papel importante en la preparación de los neutrófilos activados (CSa, f-Met-Leu-Pe, quimiocinas) para fagocitar eritrocitos unidos a CSa, (107,108,112,113,120).

Similarmente, neutrófilos de humano derivados con f-Met-Leu-Pe, son capaces de destruir *S.aureus* en la presencia de Fc de IgG rica o multimerica (103,105,113,120).

La falta de un elemento del C' para la ingestión de *S. aureus* (en contraste a eritrocitosis), puede ser debido a la presencia de un receptor de Fc específico en *S.aureus* que permita el puente de la Fc entre el neutrófilo y la bacteria. Con *S.aureus* la Fc sirve como un ligante al dominio C7' y como un signo parcial de la ingestión en el dominio de adhesión celular (90,91,105,113,115,119). Estas funciones son apoyadas por observaciones de *E.coli*, a las cuales no se une la Fc, y por lo tanto no son ingeridas por neutrófilos, en la presencia de Fc y f-Met-Leu-Pe. Así aunque la IgG una restos de bacteria (la señal más potente para la fagocitosis) las interacciones entre la Fc, partículas y neutrófilos, pueden tener un papel importante en la ingestión o cuando Acs específicos están ausentes. Tales condiciones podrían obtenerse en tejidos, en los cuales la concentración de IgG es baja o en la bacteria que tiene receptores de Fc o que activa la vía alterna de C' (113).

Las concentraciones locales de f-Met-Leu-Pe, de la bacteria y de CSa para la activación del C', podrían suplir la señal de activación necesaria para la ingestión de la bacteria (102,113).

La ingestión de partículas por M ϕ también es mejorada por -

la Fn (94,113). Ya que aumenta la ingestión de eritrocitos de buey cubiertos de IgG por monocitos humanos. Se cree que la velocidad y extensión de la digestión es mejor a elevadas concentraciones de IgG, y así la Fn no puede efectuar la fagocitosis adicional. Monocitos de neonato humano ingieren Streptococcus grupo B con mayor facilidad, en la presencia de gama globulina y Fn que en la presencia de Fn sola. Así el mejoramiento en la actividad fagocítica de la Fn, puede ocurrir cuando cantidades pequeñas de Acs específicos, están presentes. Los mecanismos por los cuales la Fn mejora la fagocitosis mediada por IgG, no han sido aclarados, pero se podría involucrar un aumento en la expresión (número) de receptores Fc, una redistribución de receptores Fc en la membrana del plasma (que es más favorable para la fagocitosis) o una activación del receptor Fc, o que la Fn se una a la IgG más activamente. Existen otras dos proteínas en la matriz intercelular, la laminina y suero amiloide P, las cuales también mejoran la fagocitosis mediada por el receptor IgG (113).

La Fn también mejora la fagocitosis mediada por C' en monocitos, por la conversión del receptor C' 1 (CR1) y el receptor de C' 3 (CR3) a un estado activo. El CR1 se une al producto de descomposición del tercer componente del C', C3b; y CR3 se une además al producto de descomposición de C3b, C3bi. Partículas con C3b o C3bi en su superficie se unen a monocitos, pero estas partículas no son ingeridas y no se producen radicales de oxígeno tóxicos. La adición de Fn a los monocitos, permite que las partículas se unan a CR1 y CR3, para ser ingeridos. La unión de la Fn a la superficie basal de monocitos es necesaria para que -

se active el receptor de C' (113).

Peptidos que contienen RGDs, cuando se fijan a superficies, tambien activan el receptor C3 y promueven la fagocitosis. La secuencia RGDs esta contenida dentro de los dominios de union celular de Fn. La activacion de CR1 y CR3 no requiere sintesis de proteina, ocurre rapidamente (en minutos) es reversible por la remocion de la Fn y es inhibida por agentes que depolimerizan los microtubulos. La fagocitosis via receptor CR1 y CR3, tambien ocurre si los monocitos son estimulados con lipopolisacidos o por acetato miristato forbol (113).

El C3b y C3bi en particulas pueden provenir de los componentes de suero o pueden ser producidos por los M ϕ y actuar en el sitio de inflamacion, donde los componentes del suero son escasos. Los M ϕ producen mas complemento que los monocitos perifericos aislados, y por lo tanto, son mas eficientes en la colocacion de C3b en eritrocitos dializados (113).

Asi la Fn, produce el mejoramiento en la fagocitosis de estas celulas (113). Aunque se sugiere que el fragmento de Fn 180 Kdal se requiere para la fagocitosis de C3b mediado por la Fn, otros dicen que la Fn intacta es activa para ambos receptores C3 y Fc en la fagocitosis de eritrocitos. Tambien se encontro que este fragmento terminal de Fn, inhibe la fagocitosis de S.aureus por monocitos y la Fn dimERICA y multimerica intactas, indirectamente mejoran la destruccion de esta bacteria (104,108,110,113). Existen inhibidores de la union de Staphilococcus a la Fn, como el acido glucuronico (94); la heparina que inhibe parcialmente a una concentracion de 0.2 mg/ml; la gelatina, que inhibe escasa-

mente; Arginina, lisina y glutamina, inhiben a altas concentra--
ciones (94); Fn en cantidades en exceso in vitro ($10 \mu\text{g/ml}$) --
(95,97); lisostafina (97); proteasas estafilococales, como V8 --
proteasa, degrada la proteína de unión de Fn (97); La bacteria --
puede producir material capsular en el último ciclo de crecimen--
to en el cual este podría actuar como un impedimento estérico --
para la unión de Fn a la superficie bacteriana (97).

Interacciones directas entre C' y Fn, pueden jugar un papel --
en la ingestión de partículas por monocitos (111,113). Aunque la --
Fn se une al extremo de colágena de C1q (50 Kdal), ésta unión no --
puede ocurrir a una fuerza iónica fisiológica o con C1q no desna--
turalizado excepto cuando C1q es altamente agregado (109-111,113 --
120). Los monocitos en la superficie cubierta por Fn, ingieren --
más eritrocitos cubiertos con C3b/C3bi y C1q, que son partículas --
cubiertas con C3b/C3bi o C1q solo. Esta ingestión no ocurre sin --
un aumento en el número de afinidad de los receptores C1q, el --
cual es similar al de CR1 y CR3. Aunque las interacciones de Fn --
con C1q no llevan directamente a la fagocitosis, si tienen impor--
tantes implicaciones para la adherencia de la bacteria al tejido --
del hospedero (111,113). La Fn también se une a los productos de --
desdoblamiento de C3c y C3d del tercer componente de C', falta --
probar si estas interacciones mejoran la fagocitosis. Por lo tan--
to la Fn, mejora la fagocitosis mediada por C' por activación de --
los receptores CR1, CR3 y C1q en monocitos (113).

Se sugiere que la ingestión depende de la Fn por un mecanis--
mo de adhesión. En los fibroblastos, la endocitosis mediada por--
Fn de las partículas de latex ha sido demostrada, así como la --

ingestión de colágeno desnaturalizado (gelatina), por sí en sí misma (108,113).

Finalmente la Fb activa a los receptores C3b y C3d en los M ϕ , esto debería (indirectamente) aumentar el paso de la bacteria cubierta con C3b y C3d, respectivamente, sin embargo, los datos no son suficientes, acerca de los efectos directos de la Fb en la ingestión bacteriana (113).

f) Actividad Bactericida

Cuando los monocitos de sangre periférica de humanos son mantenidos en cultivo celular, pierden su habilidad para producir anión superóxido O_2^- (108,113). Sin embargo, cuando estos monocitos son cultivados en la presencia de Fb (pero no con otras proteínas del suero), se restablece su actividad (108,113). Por lo que la presencia de la Fb durante la fagocitosis es importante (94,170,113).

El aumento de la actividad bactericida de monocitos cultivados con Fb puede ser debido a un incremento en la síntesis de proteína, ya que ésta aumenta la síntesis de proteína en monocitos humanos y es de vital importancia para la actividad de monocitos. Por lo tanto, la Fb actúa en los monocitos como una linfocina o promoviendo las interacciones celulares con otras linfocinas. Otra evidencia de su acción como linfocina, es el aumento en la producción de superóxido (108).

g) Niveles de la Fb en determinados sitios del organismo

La Fb del plasma puede ser proporcionada a los tejidos para repararlos después de un trauma o una lesión (94,115).

Los cambios de la concentración de Fb en plasma, no se asocian comúnmente a enfermedades. Esta concentración es normal en mujeres embarazadas pero puede aumentar en colestasis recurrente de preñez. Los recién nacidos tienen el 35% de la concentración en plasma de un adulto normal (115).

Pacientes con menor cantidad del 50% de la concentración normal, tienen mayor índice de mortalidad que pacientes con concentraciones normales (90).

Los humanos muestran niveles disminuidos de Fb en circulación después de un trauma brusco, operaciones abdominales o severas infecciones acompañadas por una coagulación intravascular diseminada (105). Se ha visto que enfermos con sepsis, fiebre y disfunción pulmonar, son restablecidos cuando se les administra la Fb a niveles normales (90,91,105,107,114). Lo anterior requiere de más estudios ya que otros autores sugieren, que la Fb como crioprecipitado no es útil en el caso del tratamiento clínico de la sepsis. Por lo que es importante determinar con más precisión el papel de la Fb en la patofisiología de las infecciones, inflamación y cicatrización (124).

E) LINFOCITOS

1) ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS LINFOCITOS B Y LINFOCITOS T

Como ya se mencionó anteriormente varios tipos de células participan en la respuesta inmune. Entre ellas tenemos, a los linfocitos B y T. Estos tienen receptores en su membrana, los cuales son capaces de reconocer e interactuar con Acs. Después de una apropiada interacción de estas células con el Ag, éstas son activadas y llevan a cabo varias funciones efectoras en la inmunidad (10).

Se ha visto que las bacterias G (-) y G (+), se comportan como mitógenos, y estimulan a los linfocitos T y B humanos para elaborar linfocinas, proliferar y por consiguiente para formar Acs. Entre las bacterias que se sostiene son activadoras celulares de linfocitos B (PBA) están: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Wood 46, *Memophilus influenzae*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Bacillus* sp, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella paratyphi* (67).

Todas las cepas anteriores activaron a los linfocitos, para secretar Igs, y esta activación fue dependiente de las células T, si bien es cierto que la proliferación es un proceso independiente de las células T, no lo es la formación de Acs, ya que se requiere la participación de las células T-cooperadoras. Por lo que la producción de Acs estimulados por bacterias, no solamente muestra una respuesta de los Linfocitos B, sino también de las células T y posiblemente la acción de células presentadoras del Ag (67).

Para que la respuesta fisiológica de Acs a la mayoría de --
Ags se lleve a cabo, se requiere de la participación de las célu-
las T cooperadoras, ya que éstas reconocen al Ag procesado en el
contexto de Ag de clase II del Complejo principal de histocompar-
tibilidad (MHC), en la superficie de las células B. Para proveer
ayuda efectiva, es necesaria la interacción de los linfocitos T
y B (interacción T-B) (66).

El estudio de esta interacción física, se inició en 1966 --
por Henry Claman y col (10). en estudios actuales se ha propues-
to que los linfocitos B pueden unirse al Ag via receptores de su
superficie (SIG), lo procesa y presenta la porción acarreadora --
procesada del Ag a las células T de una manera dependiente del -
MHC. Esta proposición implica que la interacción T-B no ocurre -
via puente Ag nativo, como fue propuesto en los primeros estu-
dios y que las células B pueden sustituir a los Mφ o células den-
driticas en la presencia del Ag (66).

Por otro lado, la interacción T-B en la presencia del Ag es
pecífico resulta en el aumento de la concentración del Ca^{2+} libre
intracelular en las células T, liberación de IL-2, proliferación
de células T, proliferación de células B y diferenciación de ce-
lulas B en células secretoras de Acs, indicando que esta interac-
ción ocurre antes de la activación para la proliferación y/o di-
ferenciación (66).

La interacción física entre las dos células, depende de la
correcta especificidad de la proteína acarreadora, del hapto, de
la unión covalente de las dos moléculas, del antígeno de clase
II MHC, de la concentración del Ag y de la temperatura de in-

ubación (66).

Los estudios de microscopía de luz, sobre la cinética de la unión de las células T y B después del agotamiento de los M₁ y de las células dentriticas a 37°C, indican que la interacción T-B, ocurre en dos fases que son cinéticamente diferentes: La interacción de la célula B con el Ag (fase 1), requiere de 4 a 6 hrs. La interacción del Ag unido a la célula B con la célula específica T (fase 2), requiere menos de 5 min. (66).

En estudios de microscopía electrónica de conjugados de células T-B, se mostraron dos tipos de interacciones: 1) Contacto entre el microvilli de las células B y el microvilli o pequeñas áreas de la superficie de las células T, este tipo de interacción ocurre en presencia y en ausencia del Ag. 2) Contacto entre una gran superficie de las células T-B, lo que requiere la presencia de hapteno específico (66).

Parece ser que la interacción de tipo 2, implica la mayor cantidad de señales de transmisión entre las dos células (66).

Esta interacción también presenta la posibilidad de que haya comunicación citoplásmica entre las células T-B y que las linfocinas derivadas de las células T, sean secretadas en el espacio fluido entre las células T-B, tales linfocinas extracelulares podrían estar en altas concentraciones, debido al pequeño espacio entre las dos células (T-B) y ser expresadas en la membrana, como se ha propuesto para la IL-1, e interactuar con receptores específicos sobre estas células en el conjugado (66).

Se ha involucrado en la interacción T-B, a las moléculas LFA-1, la que se expresa en las células T y B, L3T4 y thy-1.2 ex-

presadas en células T, y a la molécula I-a expresada en células B. Se cree que la molécula L3T4, interactúa con IA sobre las células B, y por lo tanto favorece la interacción T-B (66).

En la interacción T-B hay dos etapas: Interacción física -- con señal de transducción para la célula blanco y una fase subsecuente después de la separación de las células, en la cual la célula blanco expresa un nuevo programa: lisis en el caso de células blanco y sensibilidad a linfocinas derivadas de las células T en el caso de las células B (66).

Existen sustancias que tienen un papel importante en la regulación biológica de las células inmunocompetentes, como es el caso del IFN- γ (inmune humano) y la IL-2 (198,199).

El IFN- γ mejora la respuesta blastogénica inducida por mitógenos en linfocitos periféricos humanos (198).

La actividad del IFN- γ sobre las células B, puede ser interpretada de varias formas: a) El IFN- γ puede tener actividad de factor de crecimiento de células B (BCGF). Esto podría estar en analogía con la IL-2, la cual tiene efecto sobre las células B de una manera similar al BCGF, o bien el mejoramiento de este en la proliferación de células B activadas por S.aureus Cowan I, -- puede ser a través de receptores IFN- γ expresados en la célula. Como estos efectos del IFN- γ parecen estar relacionados con la primera fase de activación de las células B, deberán ser diferenciados de otros efectos por ejemplo: La actividad de maduración sobre las células B y la actividad del factor renovador de las células T (TRF) que puede participar en la fase tardía en la producción de Acs. b) El IFN- γ podría aumentar el efecto de la IL-1

mejorando la liberación de la misma o bien intensificando la expresión de sus receptores en la célula B ya que la IL-1, puede estar involucrada en el mejoramiento de la respuesta de las células T. c) Otras moléculas distintas a IL-1 pueden inducir al IFN- γ y contribuir al mejoramiento de la respuesta de las células B (198).

En cuanto a la IL-2 se sabe que es una linfoquina producida por células T activadas por Ag, se consideró que actuaba exclusivamente sobre los Linfocitos T, sin embargo, recientemente se ha demostrado que tiene participación en la respuesta de los linfocitos B. Esta linfoquina puede actuar sinérgicamente con otros factores derivados de las células T, tales como: BSEF, IL-1, YRF IFN- γ , promoviendo la proliferación y diferenciación en células secretadoras de Igs de las células B (197,198,200).

Por otro lado, en estudios de inmunidad celular de las células T, en el proceso de limitar a la bacteria al intestino y en la prevención de la diseminación sistémica de la misma, estos parecen tener muy poco efecto (177).

No obstante, la continua exposición de la superficie epitelial del lumen al medio ambiente antimicrobiano hostil, el tracto gastrointestinal (GI) mantiene una barrera altamente efectiva, a la entrada sistémica de bacterias intestinales (177).

La defensa del GI contra la translocación de bacterias, parece involucrar dos mecanismos: El primero es un mecanismo no específico, barrera química. Está compuesto de células mucosales con su complejo de unión intracelular, la capa de moco que cubre el epitelio y las bacterias intestinales nativas, particularmente -

anaeróbicas. El segundo es el inmunológico asociado a tejido linfóide (GALT). Este está compuesto de 1) una población difusa de células T cooperadoras, células B y células plasmáticas localizadas en toda la lámina propia del intestino y 2) placas de Peyer (en el intestino delgado) nodulos linfoides (en el intestino delgado y grueso) (197).

La superficie luminal está formada por células fagocíticas especializadas, llamadas células M. Después de estas, están los folículos linfoides los que se componen de células T y B (197).

Después de la ingestión de un Ag o de una célula, es transferido sin alteración a los M ϕ adyacentes. Los M ϕ procesan el Ag, presentándolo a los linfocitos de los nodulos linfoides de alrededor, después son generados los linfoblastos B y T específicos para el Ag. Estas últimas dejan al intestino y pasan a la circulación sistémica, llegando a la lámina propia del intestino donde maduran para inducir células T cooperadoras, células B y células plasmáticas, las que secretan IgA específica para el Ag en el intestino (197).

No obstante la presencia de ambos mecanismos, barreras químicas y GALT, la translocación sistémica de bacterias nativas, ocurre. Sin embargo, no por una disfunción de las células T, ya que éstas tienen funciones importantes en los nodulos linfoides del intestino (197).

F) VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LAS CELULAS SANGUINEAS POR DIVERSOS FACTORES

1) LEUCOCITOS PMN:

a) TEMPERATURA

Jerry Sebag et al, realizando estudios para conocer el efecto de la temperatura sobre la destrucción fagocitica, encontraron que los resultados variaban con la temperatura y con el tipo de cepa involucrada (125).

Así pues, la fagocitosis de Pneumococcus de tipo 29 es mejorada a 38 C, pero a temperaturas mas altas no proporciona ventajas sobre la temperatura normal (37 C). Por otro lado, en Neumonia pneumococcal se observó, que la fiebre en grado moderado puede ser benefica para el hospedero; pero la fiebre a 41 C puede ser perjudicial en infecciones con E. coli y puede contribuir a una excesiva bacteremia (125). Estos resultados son congruentes con los encontrados por Mc Dowell, C. et al, en donde se vió que los animales mantenidos a altas temperaturas ambientales, resisten infecciones por pneumococcus pero tienen una alta mortalidad a infecciones por coliformes (126).

Se obtuvieron datos sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de MOs y sobre el sistema de destrucción. Encontrando que E. coli O14, sensible al suero, proliferó mas rápidamente a altas temperaturas, lo que pudo haber contribuido para mejorar

su sobrevivencia en la presencia de suero a altas temperaturas. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento, no fue muy significativo para la destrucción fagocítica de esta cepa (125).

Por lo tanto, siendo la fagocitosis solamente un aspecto de los mecanismos de defensa del hospedero, y tomando en cuenta que otros mecanismos puedan comportarse de diferente manera a temperaturas elevadas, además de no haber suficientes datos disponibles, no se puede garantizar una conclusión del efecto de la temperatura sobre los MOs estudiados (125).

b). TUMORES

Las observaciones clínicas han mostrado, que pacientes con enfermedades neoplásicas exhiben una reactividad inmunológica disminuida; incluso algunos autores sugieren, que el neoplasma puede disminuir las reacciones inmunológicas por la liberación de factores inmunosupresores. Se han encontrado también, algunos casos de pacientes con cáncer, pero con una inmunidad humoral normal, sin embargo, otros autores han observado una depresión en la síntesis de inmunoglobulinas normales y una disminución en los niveles de complemento del suero (127).

K. Merkiel et al, realizando estudios para investigar el efecto de los tumores sobre la actividad bactericida de leucocitos, encontraron que los leucocitos de pacientes con neoplasma no destruyeron las bacterias probadas en muchos casos, pero si las multiplicaron. La capacidad bactericida de leucocitos en la sangre periférica, de pacientes con neoplasma, ha sido disminuida en comparación a la de leucocitos de individuos normales. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, $P < 0.025$ $P > 0.02$ después de la remoción de los tumores, los leucocitos tenían una actividad bactericida cercana a la normal por ejemplo Los pacientes mostraron el 1% de las bacterias destruidas y en los controles se mostró el 1.7% de las bacterias destruidas (127).

Estos hallazgos sugieren, que un tumor decrece la actividad bactericida del plasma y leucocitos, y que los tumores liberan algunos factores que trastornan la capacidad, o que los tumores absorben algunos factores del plasma o cambian las funciones de los FMN (127).

c) TENSION DE OXIGENO

El sistema antimicrobiano dependiente de oxígeno leucocitos PMN normales, es responsable de la destrucción de las bacterias por la generación de especies de oxígeno altamente reactivas, tales como anión superóxido, radicales hidroxilo y H_2O_2 (128,129). La producción de estos por leucocitos, no puede ocurrir cuando las células son incubadas en un sistema exento de oxígeno o en células de pacientes con CBD, donde el sistema leucocito oxidasa está genéticamente deficiente. Además los leucocitos sin oxígeno y leucocitos deficientes de oxidasa fracasan al destruir ciertas especies de bacterias a una velocidad normal (129).

Cuando los gases del aire inspirado se ponen en contacto -- con la pared de los alveolos pulmonares, el intercambio de estos es de acuerdo a la difusión, o sea, que un gas difundirá a través de la pared alveolar y a la sangre (o al contrario), de acuerdo con la diferencia de presiones que ejerza ese gas en particular en ambos lados de la pared. Las presiones de los gases en la sangre se expresan como tensiones (132).

La tensión de oxígeno (P_{O_2}), es la presión del gas seco equivalente a la que ejerce el oxígeno no disuelto en la sangre. El intercambio de gases entre el aire alveolar y la sangre es:

P_{O_2} en el aire alveolar es de 107 mmHg

P_{O_2} en la sangre venosa es de 40 mmHg

La diferencia de 67 mmHg es la que hace que el oxígeno difunda por la pared alveolar a la sangre (132).

La tensión de oxígeno en cirugías y heridas graves, puede --

ser baja, esto es importante ya que la hipoxia puede limitar la destrucción bacteriana por leucocitos en heridas. Así, la hipoxia retarda la destrucción de *S. aureus* por leucocitos in vitro y en animales con heridas. El aumento en la infectabilidad de heridas hipoxicas puede ser grandemente atribuido al daño en la destrucción de *S. aureus* por leucocitos de heridas a una tensión de oxígeno baja (129).

La hiperoxia leve puede mejorar la destrucción bacteriana y aumentar la resistencia a la infección. El porcentaje de destrucción de *S. aureus* in vitro se ve aumentado de 37% a 75%, conforme aumenta la P_{O_2} de 0 a 150 mmHg (129).

Por otro lado, la hemoglobina (Hb) es el principal acarreador de oxígeno en sangre e inhibe la función microbicida de PMN. La combinación de esta con PMN y *E. coli* in vitro, disminuyen grandemente la actividad bactericida de PMN, lo que sugiere un efecto directo de la Hb en los PMN. Los mecanismos de inhibición por los cuales esta altera las funciones de PMN no han sido conocidos, sin embargo, se propone que la función microbicida disminuye en la presencia de Hb, debido a la remoción de oxígeno en el medio circundante de los PMN por la Hb reducida (129).

El promedio de las concentraciones de las Hbs en adultos es de 120 a 180 mg/ml con una P_{O_2} venosa y arterial de 37 y 72 torr respectivamente. La inhibición significativa de la destrucción bacteriana por PMN, ha sido usando 50, 50 y 150 mg/ml de Hb a P_{O_2} de 35 torr. Esto es porque la adición de Hb con una P_{O_2} cerca de 35 torr, no inhibe la destrucción bacteriana (excepto para una inhibición del 12% con *S. aureus* a 115 torr y 150 mg/ml), la

disponibilidad de Hb reducida para unir oxígeno parece ser que determina el estado de la actividad bactericida de PMN. La inhibición de la destrucción de *S. aureus* por PMN, en la presencia de 150 mg/ml de Hb con una P_{O_2} de 113 torr, es contraria a la destrucción normal de *E. coli*, usando las mismas condiciones. Sugiriendo que *S. aureus* puede ser más resistente al sistema oxidativo antimicrobiano, que *E. coli*. La disponibilidad de sitios de oxígeno en la Hb, influye en la actividad bactericida, esto es soportado con la observación de que la Hb carboxi fracasó al inhibir la destrucción bacteriana por los PMN en la presencia de 150 mg/ml de Hb (128).

El máximo consumo de oxígeno por los PMN, ocurre un minuto después de la estimulación y es seguida por un rápido descenso. Ya que más bacterias son destruidas por PMN entre 5 y 15 min, la remoción de oxígeno por Hb reducida durante esta rápida fase de consumo de O_2 , podría limitar la actividad bactericida de PMN -- (128).

d) INDIUM III

Los PMN marcados con Indium III (In-III) 5-hidroxiquinolina (oxina), han sido usados exitosamente para localizar abscesos en perros y humanos. Esta función sugiere, que los PMN no son afectados por el proceso de marcaje con el In-III, sin embargo, para confirmar el funcionamiento y la integridad estructural de los PMNs con el In-III, así como su capacidad bactericida, se realizaron experimentos con el uso del mismo (130).

Para los experimentos se usó el complejo In-III-Oxina. Cuando este complejo se disuelve en etanol, difunde pasivamente a través de la membrana de los PMNs y se une a los componentes intracelulares proporcionando un marcado estable. Además, el In-III emite dos fotones gama de 173 Kev (84%) y 247 Kev (94%), lo que permite hacer detecciones externas. Tiene una vida media de 67 hr lo que también permite que se puedan realizar investigaciones (130).

Teóricamente la marcación con In-III altera la función de los PMNs por las siguientes razones: a) Un daño químico por la oxina o etanol, b) daño debido a la radiación intracelular, c) daño físico debido a un excesivo manejo de las células durante la separación y durante el procedimiento de marcado (130).

Sin embargo, experimentos realizados por Behnan Zakhireh et al, mostraron que ni la viabilidad, estructura o función de los PMNs son significativamente alteradas cuando se usa el proceso de marcación estándar (130).

Por otro lado, en experimentos realizados para determinar

las concentraciones óptimas no tóxicas de oxina, etanol y radioactividad, a los cuales están expuestos los PMNs durante el proceso de marcado, se encontró que la oxina es potencialmente la más dañina de todos los componentes que participan en el proceso de marcación. El mecanismo por el cual la oxina provoca el daño no es bien conocido. Sin embargo, se cree que la oxina, un agente bacteriano lipofílico, es un metal quelante no específico que puede, posiblemente dañar a las células por contaminación de iones metálicos quelantes, tales como cadmio y hierro (los cuales pueden ser encontrados en la solución de In-III) (130).

La oxina puede también dañar a las células (PMNs) por ligamiento de metales intracelulares esenciales, haciéndolos inaprovechables para las reacciones metabólicas (130).

Sin embargo, el uso de pequeñas concentraciones de oxina en el marcado estándar, no causan efectos adversos en la locomoción de los PMNs. Así mismo una concentración de etanol de 4 mg/ml no inhibe la fagocitosis ni la destrucción por los PMNs. Por otro lado, en experimentos en los cuales se usó una concentración de 60mg/ml de etanol (20 veces más alta que la concentración estándar del marcado), no hubo efecto sobre la locomoción y quimiotaxis. La radioactividad por arriba de 29 μ Ci por millón de PMNs (6 veces más alta que el límite de la dosis del marcado estándar), no tiene efectos adversos sobre la locomoción y quimiotaxis. Lo que indica que los PMNs circulantes son altamente resistentes a los pequeños efectos térmicos de radiación intracelular (130).

27. NEUTRÓFILOS

a) DEFICIENCIA EN HIERRO

El hierro existe en grandes cantidades en el organismo del hombre, pero normalmente no está disponible ya que es utilizado por proteínas tales como: Hemoglobina (Hb), mioglobina, ferritina y hemosiderina. La ferritina es la forma como se almacena el hierro (25).

Los niveles séricos del hierro varían en hombres adultos son de alrededor de 105 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ y en las mujeres adultas 110 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Existiendo un límite de 50 a 200 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (195).

Un adecuado suministro de hierro parece ser esencial para la función óptima de varias líneas celulares, importantes en la defensa del hospedero contra infecciones. Por el contrario durante la deficiencia de hierro, un número de distorciones celulares inmunes están presentes en los neutrófilos PMN (21).

La deficiencia de hierro puede tener un efecto directo en el desarrollo de tejido linfoide (195).

En la desnutrición de proteínas calóricas varias funciones inmunes son afectadas desfavorablemente, incluyendo la destrucción bacteriana intracelular por leucocitos PMN. Ocasionalmente se dan deficiencias aisladas, los cuales permiten estudiar el efecto de la deficiencia de un simple nutriente en cada función inmune (195).

La lactoferrina es una proteína ligadora de hierro, que se encuentra en secreciones mucosas y en gránulos específicos de --

PMN, puede ayudar a fagocitar rápidamente y destruir algunas bacterias (25, 34, 36, 195). Normalmente tiene una gran capacidad de ligar hierro inactivado, y es funcional a pH bajo, esto es muy importante para el efecto bactericida (25, 34, 196).

El efecto antibacteriano de la LF puede ser debido a su alta afinidad por Fe^{3+} , el cual hace que este sea casi inaprovechable como especie iónica libre o, alternativamente, las condiciones de hierro muy bajo puede ser esencial para las funciones de otros agentes antibacterianos (25).

Los PMN fácilmente fagocitan complejos Ag-Fe, y cuando este método es usado para transportar hierro a la vacuola fagocítica, la fuerza bactericida de la célula es seriamente dañada (25).

Se ha observado que el hierro puede actuar sinérgicamente con H_2O_2 , y formar la más grande toxicidad con el hidroxilo (OH) por el mecanismo de Fenton (36).

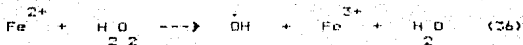
Sabemos que el H_2O_2 interactúa con la MFO, y un balance formando un buen sistema con actividad bactericida. También el H_2O_2 puede contribuir a la formación de radicales hidroxilos siendo importantes intermediarios en la hidroxilación enzimática. Estos radicales son las especies más reactivas del oxígeno (36).

Recordando la reacción de Haber-Weiss:



Se presenta otra reacción química llamada Fenton propuesta como fuente de OH. Cuando las especies fuertemente oxidadas, son formadas por la reducción del H_2O_2 por iones metales. La reducción -

es la siguiente:



Se sugiere que el anión superóxido es importante sólo como un reductor de electrones, y que toda la toxicidad de éste es mediada por iones de metal tal como Fe^{2+} (36).

Se ha mostrado que la catálisis del hierro puede acelerar la reacción in vivo (36).

Aunque no esté comprobada, esta especulación es fortalecida por la observación de que aquellos pacientes con deficiencia de LF en PMN, pueden tener infecciones serias, similar aquellas que hemos visto en CGD (36).

El transporte de hierro en el plasma, es liberado de las células epiteliales e intestinales que lo almacenan, es de nuevo reducido y abandona el intestino para pasar al plasma. Existe la posibilidad de que la tensión de oxígeno disminuida en la sangre pueda aumentar la actividad de las células de la mucosa intestinal que transfieren hierro al plasma. En presencia de CO_2 el hierro del plasma forma un complejo con una betaglobulina que tiene afinidad por los metales, conocida como transferrina o siderofilina. Esta es una glucoproteína que contiene hexosa, hexosamina, ácido siálico y posiblemente fucosa (172, 196).

El hierro que entra a la corriente sanguínea desde el intestino, está en gran parte, en estado ferroso Fe^{2+} . En el plasma, el Fe^{2+} es rápidamente oxidado (Fe^{3+}), y luego es incorporado a la proteína específica fijadora de hierro, transferrina. Esta --

proteína puede fijar dos átomos de Fe^{3+} por molécula para formar un complejo rojo de proteína férrica. Si se agrega hierro ferroso a la proteína (apotransferrina), se requiere oxígeno para la formación del complejo rojo y la velocidad de formación del color, depende de la velocidad de oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} por el oxígeno molecular. En condiciones normales, casi todo el hierro fijado a la transferrina es captado por la médula ósea. La ceruloplasmina, proteína fijadora de cobre que existe en el plasma, se ha encontrado que ejerce una actividad catalítica en el plasma para convertir al Fe^{2+} en Fe^{3+} , y así promover la tasa de incorporación del hierro en la transferrina (13).

Así, el efecto bactericida del plasma puede ser suprimido por la saturación de la transferrina con el Fe^{3+} . La estimulación del crecimiento bacteriano en la presencia de PMN, depende del grado de saturación de las proteínas del plasma, las cuales se unen al Fe^{3+} (26).

En la presencia de PMN la adición de Fe^{3+} da un 60% de saturación de transferrina con el hierro llevado a un rápido crecimiento, después de un retraso prolongado. El aumento progresivo en la saturación dio un correspondiente 60% de crecimiento, sugiriendo que la más alta saturación de transferrina, permita que las bacterias adquieran hierro más fácilmente. El efecto antibacteriano del plasma parece ser críticamente dependiente en la viabilidad del hierro para la bacteria, y esto afecta la habilidad de los PMN al control del crecimiento bacteriano (26).

Por otro lado, existen dos enzimas dependientes de hierro-- la NADPH oxidasa y la MPO. Si la actividad enzimática de neutró-

de hierro (131).

Es posible que la distorsión de PMN sea debida a una deficiencia en hierro, pudiendo ser esto uno de los mecanismos patogénicos de susceptibilidad en niños desnutridos por infecciones (131).

Se piensa que, la falta de un defecto generalizado en la fagocitosis por una deficiencia en hierro, se deba a que la energía producida y los mecanismos estructurales involucrados en la ingestión no son alterados, en respuesta a los niveles bajos de hierro. El envoltamiento de la bacteria implica la unión de microfilamentos hechos de proteínas polarizadas contractiles. La unión de estas proteínas producen la invaginación de la vacuola, el encierro y también la degranulación, esto lleva a la liberación de iones Ca^{2+} a la membrana, y a la estimulación y el control ejercido en los PMN por GMPc y AMPc respectivamente. Se cree que uno de estos procesos depende de la función del hierro (131).

b) DEFICIENCIA DE GLUTATION PEROXIDASA

La glutación peroxidasa (GPx) es una enzima que está presente en el citosol de la célula. Los niveles de GPx varían según la especie; las ratas demostraron un nivel alto natural de la enzima, los humanos tienen un nivel intermedio y los cerdos la tienen en cantidad muy baja (133).

La GPx de leucocitos es dependiente de Selenio, y su completa deficiencia puede ser inducida en roedores con una dieta deficiente en Selenio (133).

Esta enzima realiza la reducción del peróxido de hidrógeno o hidroperóxido lipídico, así como también la oxidación de glutación. Aun cuando el papel de esta enzima es generalmente claro, usualmente se considera como un antioxidante que protege a la célula, destruyendo al peróxido de hidrógeno, el cual es un potente tóxico que en exceso puede dañar a la célula (133).

Como ya se mencionó anteriormente, la fagocitosis y la destrucción de microbios por los PMNs, está normalmente acompañada por el estallido oxidativo, y la inhabilidad de las células para producir este estallido metabólico, está asociada a un defecto significativo en la destrucción de microbios (133,135).

Se sabe también, que alguna deficiencia en las enzimas nucleotido de piridina oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glutación peroxidasa, interrumpen la respuesta oxidativa de los PMNs (133).

D.A.Bass et al, encontraron que la GPx no es esencial para

la iniciación de la respuesta oxidativa involucrada en la actividad bactericida. Ya que en los leucocitos de ratas, los cuales contienen niveles altos de GPx, se indujo una deficiencia de la GPx y no se observó un daño significativo en la habilidad de las células para destruir los microorganismos probados, así como tampoco se redujo la respuesta oxidativa fagocítica (indinación, producción de superóxido y reducción de NTB) (133).

Se sabe que los eventos metabólicos que están implicados en la actividad bactericida, están acompañados de una marcada estimulación del derivado hexosa monofosfato (HMPS). Al respecto, -- Strauss et al, sugieren que hay un incremento en la actividad de la glutatión reductasa, permitiendo que la glutatión oxidasa -- (GSSG) y NADPH formen el NADP, el cual estimula a la HMPS incrementando a su vez la cantidad de NADPH, quizá en una forma activa diferente. Este NADPH puede reaccionar con el NADPH oxidasa -- para producir H_2O_2 , y una parte de H_2O_2 , puede reaccionar con el glutatión reducido en la presencia de GPx para formar el GSSG necesario para la primera reacción que ocurre en el metabolismo -- oxidativo. Por lo cual, Strauss propone que la estimulación de -- la HMPS, ocurre primero en la cadena de eventos metabólicos. Sin embargo, en previos estudios demostraron que cuando se inhibió a la HMPS con colchicina, la actividad bactericida de leucocitos -- no es afectada (134).

Por otro lado, D.A. Bass et al, encontraron que la actividad de la HMPS fue 10 veces más alta en leucocitos durante la fagocitosis (los cuales estaban deficientes de GPx) que la que se observó en leucocitos inactivos, no obstante, este incremento no

fue más alto que el que se observó en leucocitos con niveles normales de GPx, lo que indica, que la actividad de la HMPS no es enteramente dependiente del sistema glutatión, y puede ser que en parte, la HMPS estimulada produzca el NADP por la oxidación responsable para el paso inicial, en la producción del H₂O₂ por los leucocitos durante la fagocitosis (133).

Así pues, el principal papel de la GPx de los leucocitos, es la remoción del exceso del H₂O₂, puede ser que un nivel bajo de la Gpx observado en algunos pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica, sean secundarios a la producción del H₂O₂ (133).

c) CLORACION

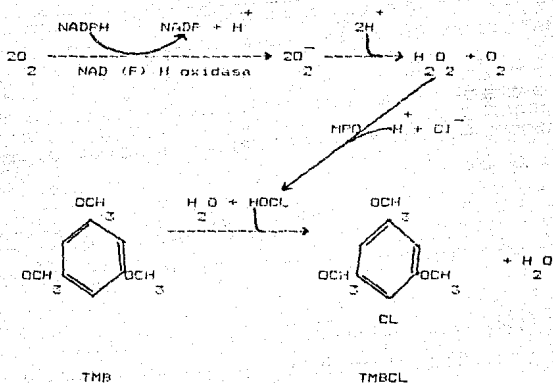
Se ha involucrado a los haluros como el Ioduro (I^-), Bromuro (Br^-) y Cloruro (Cl^-), en la actividad bactericida, siendo el cloruro el menos potente (91). Seymour J et al, consideraron también a los haluros como parte importante de la actividad bactericida (41) (55), asumiendo que su oxidación resulta en la formación de agentes tóxicos que pueden atacar a los MOC de varias maneras (41). El Cloro está presente en los leucocitos en concentraciones considerablemente grandes, para ser requerido como componente del sistema antimicrobiano mediado por la MFO (41). La cloración de la bacteria puede ocurrir a través de la sustitución de un haluro por un hidrógeno en los sitios cruciales de la bacteria (131).

Por otro lado, en estudios se observó que el H_2O_2 es tóxico por sí mismo, pero su actividad bactericida se incrementa en la presencia de un haluro (Cl^-) y de una enzima de los granulos de neutrófilos humanos, la MFO (35).

Se sabe también que el oxígeno respirado por los PMNs, es reducido a O_2^- para formar H_2O_2 y O_2 . Pero como estos no son potentes microbicidas, se cree que son precursores de agentes oxidativos más potentes (135).

Los PMNs contienen MFO, una enzima que ha mostrado catalizar la reacción para la formación del ácido hipocloroso ($HOCl$), en la que participa el peróxido y el cloro in vitro (48,136). Como se indica en la Fig 20 a continuación:

Figura 20 (136).



El (HOCl) una vez en la vacuola fagocitica puede reaccionar además, formando agentes de cloración como: Cl₂, N-cloroamino, -N-cloroamidas (136).

Christopher S. Faule et al, usando un régimen de cloración en donde participan el 1,3,5-trimetoxibenceno (TMB), con el HOCl formando el 2-Cloro-1,3,5-trimetoxibenceno (TMBCL), encontraron que en una serie de 19 cloraciones con FMNs se consumió el 75% de oxígeno disponible, y la cantidad de TMBCL fue el 28% del oxígeno consumido, sin embargo se consideró que la producción del agente clorado fue poca ya que el TMB compite con otras molecu-

las reactivas (tales como proteínas). Esta reacción es en parte afectada por albumina de suero de bovino (BSA) a una concentración de 5×10^{-6} M, lo que indica que la BSA no suprime totalmente la cloración de los PMN, sugiriendo que la cloración puede ocurrir intracelularmente (136).

En estos mismos experimentos se observó que la formación del agente clorado fue similar en la escala de tiempo a la actividad bactericida y sabiendo que los precursores de la cloración (MPO/H₂O/Cl⁻) se localizan en la vacuola fagocítica, es evidente que al menos se produce un potente agente microbicida de los PMN intactos (136).

d) IODACION

Se ha propuesto que el papel funcional de la MPO es la peroxidación del Iodo. Con el H₂O₂ como sustrato para generar productos reactivos de oxidación, los cuales reaccionan y destruyen a los MOs ingeridos. Sin embargo, esta hipótesis aun no es completamente comprobada (138).

También ha sido considerado, que posiblemente el cloro sea el sustrato natural para la peroxidación dependiente de la MPO, antes que el Iodo; ya que el cloro es mucho más abundante en las células además de que el cloro, es incorporado en el material orgánico cuando los neutrófilos fagocitan a la bacteria (138).

Anton y W.Segal et al, realizaron estudios para investigar la estequiometría de las reacciones de iodación, en relación al consumo de oxígeno y para examinar la localización subcelular de esta reacción, después de la estimulación de la respiración por la adición de la bacteria o Acetato miristato forbol (PMA) a las células (138).

Resultando de estos experimentos una relación lineal entre la iodación y consumo de oxígeno por los neutrófilos, después de la estimulación con bacterias opsonizadas, latex y PMA (138).

Por otro lado, los experimentos realizados indican, que una de 300 moléculas de oxígeno consumidas son utilizadas para la iodación; no obstante, esta deficiencia es difícil de relacionar con la función biológica primaria de la MPO, siendo una enzima abundante y con una cinética considerablemente rápida (138).

La concentración de Iodo requerida para la saturación de la reacción de iodación, es de 20-50 μ g siendo también efectiva

para destruir a la bacteria en el sistema MFO-H D -Haltero in vitro (138).

El PMA estimula el estallido respiratorio de neutrófilos, y causa que estos secreten el contenido de sus gránulos específicos, probablemente sin afectar a los gránulos azurófilos. Sin embargo, se considera que el PMA, provoca la liberación de pequeñas cantidades de MFO, la cual hace contacto con la membrana de la célula (138).

En experimentos realizados por los mismos autores, para localizar los sitios de iodación en la célula por fraccionamiento subcelular analítico (después de la fagocitosis de la bacteria), la iodación fue localizada junto a la bacteria en las regiones densas de los gradientes, indicando que la bacteria fue el principal blanco de iodación. Sin embargo, cuando se determinó la distribución de iodación después de un estímulo por el PMA, se encontró que aunque grandes porciones de iodación ocurrieron en la región de la membrana, la mayor parte de la radioactividad se encontró en los gránulos. Por otro lado, después de una electroforesis SDS/gel de policrilamida (PAGE) de células precipitadas con ácido tricloroacético, se observó la misma cantidad de componentes celulares ionizados en células estimuladas por bacterias, PMA o cuando fueron simplemente marcados por el método iodógeno (138).

La mayor parte de la iodación que acompaña a la fagocitosis bacteriana, involucra a los componentes de la propia célula fagocítica, aun cuando no se han identificado estos componentes iodados, parece ser que están igualmente distribuidos entre la membrana, gránulos azurófilos y gránulos específicos, incluyendo lípidos (138).

e) PRUEBAS EN SUERO DE MUJERES EMBARAZADAS

Robert H. Perzellan et al. realizaron experimentos para estudiar el efecto del suero de mujeres en gestación, sobre la función de los neutrófilos. Encontrando que algunas de las funciones de los neutrófilos normales, son alteradas en presencia del suero. Específicamente la ingestión de partículas, algunos aspectos del metabolismo celular incluyendo la reducción del Nitroazul de Tetrazolium (NBT), destrucción intracelular de MOs, la excreción de enzimas (lisosomales y citoplasmicas) y la muerte celular (139).

Así pues, el suero de mujer gestante y el plasma de la misma, disminuyeron la eficiencia en la destrucción bacteriana por los PMNs normales. Este efecto, es atribuido a componentes del suero, los cuales varían en su composición y concentración durante el embarazo, así como por ejemplo: Proteínas mensajeras, coagulación y componentes de la fibrinólisis, las proteínas específicas de la fase aguda del embarazo (todas incrementan su concentración) (139).

Por otro lado, se ha identificado aunque no muy claramente, la presencia de un componente del suero y se ha relacionado a la baja velocidad fagocítica, sugiriendo que el suero contiene un inhibidor de la actividad bactericida de los neutrófilos. Posiblemente esta sustancia actúe sobre los neutrófilos más bien que sobre las bacterias. Esto fue confirmado con experimentos en donde se incubaron leucocitos con suero antes de adicionar los MOs bacterianos, observándose disminución en la destrucción bactericida (139).

Por otro lado, se incubaron a las bacterias con suero de mujer gestante, y se encontró que los FINS destruyen igualmente a las bacterias tratadas como a las no tratadas (139).

Sin embargo, también se ha propuesto que, la prolongada supervivencia de las bacterias en suero de mujeres en gestación no implica una inhibición directa en la función bactericida de los neutrófilos, sino que más bien sugiere, que una vez que ocurre la ingestión, los eventos intracelulares subsiguientes incluyendo la destrucción, ocurren normalmente y por lo tanto la acción inhibitoria del suero se expresa fuera de los leucocitos, probablemente en la superficie de la membrana (139).

Las funciones de los neutrófilos obtenidos durante la gestación, y la de los neutrófilos normales, fueron suprimidas en la presencia de suero de gestación, lo que indica que el inhibidor es humoral y no celular. Al analizar el suero de mujeres embarazadas no se revelaron deficiencias de IgG ni de los componentes del C', que puedan ser considerados disminuyan la función de los neutrófilos. También se ha demostrado un componente de suero normal, que puede mover opsonicamente el C3 activo de partículas, posiblemente la concentración de este C3 inactivador está aumentada durante la gestación. No obstante, esto no ha sido confirmado (139).

El inhibidor encontrado es estable al calor, y como se observó que la fagocitosis es suprimida cuando se inactivó el suero a 56°C por 30 min, se concluye que es poco probable que uno de los componentes termolabiles del C', sea el responsable de la inhibición de la función de los neutrófilos (139).

3) MONOCITOS

a) EN RATAS ESPLENECTOMIZADAS

Siendo *Streptococcus pneumoniae* un habitante normal de nariz y garganta, y el más común en tracto respiratorio, se tiene que la primera defensa contra este MO aspirado en el pulmón, son los macrófagos alveolares, los cuales también juegan un papel importante en el síndrome de sepsis post-esplenectomía (140).

Los macrófagos alveolares pulmonares (PAM), en ratas esplenectomizadas y autotransplante de bazo, dan variación en cuanto a su actividad fagocítica y bactericida *in vitro* (140).

En ausencia de PAMs obviamente, el crecimiento bacteriano es elevado, en ratas esplenectomizadas los PAMs, presentan una disminución notoria en la actividad bactericida, sin embargo, con el autotransplante de un tercio de bazo, los PAMs recuperan su actividad bactericida, similarmente a los niveles de destrucción del grupo control (140).

Los fragmentos de bazo pueden ser sembrados en la cavidad peritoneal, los cuales subsecuentemente se regeneran dentro de los nodulos esplénicos y ejercen su función para los PAMs en su actividad bactericida (140).

La médula ósea produce los PAMs y otros macrófagos presentes en tejido, estos macrófagos poseen receptores para fragmentos Fc de IgG y componentes terciarios de complemento, ambos son importantes para la fagocitosis. El paso de la bacteria a pulmón depende no solo de la velocidad de la fagocitosis, sino-

también de la eficiencia en la destrucción bacteriana. Los FGMs de ratas esplenectomizadas de autotransplante y de las ratas con trol son equivalentes para fagocitar partículas de latex, así como para la fagocitosis por receptores Fc de células sanguíneas (140).

Se ha observado también, que opsonina y gamma globulina leucofilica, estimulan la fagocitosis por leucocitos de sangre. Sin embargo, estas disminuyen su actividad en ratas esplenectomizadas. En adición, un tetrapeptido (Tuftsin) derivado de la gamma globulina, estimula la fagocitosis de bacterias por neutrofilos. Esta sustancia es deficiente en pacientes esplenectomizados (140).

Likhte et al, mostraron que la gamma globulina leucofilica y opsonina, pueden ser restauradas a niveles normales con el autotransplante de un tercio de bazo subcutáneamente. La tuftsin o la gamma globulina podrían también estimular a los macrófagos de tejidos, pero esto no ha sido demostrado (140).

Pacientes con el autotransplante de bazo, muestran niveles normales de tuftsin, IgG e IgM. Por lo que la actividad bactericida se restablece a un nivel normal in vitro (140).

Con todo esto, podemos observar la importancia que tiene el bazo para la protección del organismo humano contra infecciones de MOs capsulados (140).

1941

... de la ...
... de la ...
... de la ...

... de la ...
... de la ...
... de la ...
... de la ...
... de la ...

... de la ...
... de la ...
... de la ...
... de la ...
... de la ...

... de la ...
... de la ...
... de la ...

... de la ...
... de la ...
... de la ...

terias. Las bacterias Gram (+) y Gram (-) tienen pared consistente de lipoproteínas, sin embargo, las bacterias Gram (+) son generalmente consideradas resistentes a la destrucción por C3, ya que tienen pared deficiente en lípidos y proteínas (143) (154).

La actividad bactericida inmune, comprende un sistema que involucra: la bacteria, anticuerpo (Ab), iones de magnesio (Mg²⁺) y factores del suero no identificados (146). Las sustancias opsonicas en suero incluyen componentes estables al calor, como Aco-específicos y los labiles al calor como los producidos por la activación de la cascada de C' (148).

Una función de los anticuerpos es el aumento en el depósito del complemento a la superficie bacteriana. El anticuerpo que se une a C1, aumenta el depósito de C3 por activación de la vía clásica. Sin embargo, el anticuerpo también actúa para incrementar la activación de la vía alterna del complemento, por alteración del sitio de depósito de los componentes del complemento. En el primer caso el anticuerpo actúa como un sitio de unión preferencial para el C3, el C3b se une a la IgG, la que está relativamente protegida por los factores H e I. El C3b (C3b) continúa la activación de la vía alterna para depositar más C3 sobre la superficie de los organismos (4). Se cree que la especificidad de los anticuerpos determina donde atacará el C3 sobre la superficie antigenica, lo que a su vez influye en el lugar de depósito del complejo de ataque a la membrana (MAC). Es decir, en un sitio puede ser capaz de insertarse en la bicapa lipídica de la membrana de la célula y causar lisis, y en otro no. (4).

Es razonable la hipótesis, de que el anticuerpo dirige a --

diferentes epítomos en un antígeno o en diferentes antígenos en la superficie bacteriana, mediante la exposición del complemento en sitios ligeramente diferentes. Lo anterior puede ser ideado de una exposición estereoespecífica del complemento mediado por anticuerpos. Estas diferencias estereoespecíficas pueden facilitar la inserción del C5b-9 en los lípidos de la membrana externa de la bacteria (4).

En estudios específicos para complemento, se encontró que el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), un producto conocido de los Leucocitos activados, es capaz de convertir directamente al C5 en una forma en la cual pierde su función hemolítica inmune, [C5(H_2O_2)] pero logra la activación del C5 y C5b, el cual reacciona con C6 y además con C7, C8 y C9, para formar un complejo lítico, para producir lisis reactiva (151).

Por las dos funciones anteriores, el C5(H_2O_2) se asemeja al C5b, el cual es la activación natural del fragmento C5. Sin embargo, hay algunas diferencias tales como: (a) El C5b pierde rápidamente su capacidad para formar complejos con el C6, mientras que el C5(H_2O_2) mantiene esta afinidad ligadora por el menos 16 hrs. (b) El C5b es más eficiente en la lisis que el C5(H_2O_2), este último tiene cerca del 10-15% de la actividad del C5b, en la lisis reactiva. (c) El C5 no presenta actividad quimiotáctica después de ser tratado con el H_2O_2 . La conversión del C5 no es llevada a cabo por el H_2O_2 propiamente, sino, por los radicales del oxígeno desarrollados durante su descomposición. Se cree que

es principalmente el radical hidroxilo (OH^-), el cual convierte al C5 a la especie C5b con actividad. Esto a su vez depende del hierro (15).

2) ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO POR LAS VIAS CLASICA Y ALTERNA

a) VIA CLASICA

La activación del Complemento por bacterias Gram (-), puede ocurrir vía clásica o vía alterna. La vía clásica puede ser activada por la interacción del Aq con los Acs de la superficie de la bacteria o directamente por el lípido A de los lipopolisacáridos (LPS) (6).

La vía clásica de C' requiere de Magnesio y Calcio. (1)

Aunque C' puede ser activado por varias sustancias no inmunos, la activación de la vía clásica in vivo es debida a las reacciones inmunes específicas ante Acs y sus correspondientes determinantes antigenicos, tres diferentes tipos de complejos inmunes, pueden resultar de estas reacciones: (12)

- Complejos consistentes de Acs unidos a los determinantes antigenicos en la superficie celular o a estructuras intracelulares solubles de la bacteria (12).

- Precipitados inmunes formados por la reacción de Acs con moléculas de Aq soluble de cercana equivalencia (12).

- Complejos inmunes solubles tambien que resultan de una reacción de Acs con Acs solubles (12).

Más estudios en la activación de C' dicen que:

- Los Acs usados deben ser de clase IgM o IgG para inducir la activación de la vía clásica (152).

- Una molécula simple de IgM en la superficie de la bacteria es suficiente para causar la lisis mediada por el C' (152).

- Con Acs IgG a lo menos dos moléculas de esta son requeridas para la unión y activación de C1 (152).

La interacción entre el sitio de combinación de un Ac y su correspondiente determinante antigénico, tiene efecto alostérico o conformacional en la porción Fc, así se inducen o se descubren los sitios de unión de C1q (152).

Por otro lado, muchas bacterias sensibles al suero son destruidas en suero no inmune es decir se une directamente a C1 en la ausencia de Acs implicando una capacidad de destrucción de la vía clásica por medio de la activación independiente de Acs (152).

Se sabe que el modo de interacción del complemento con los organismos Gram (-), es atribuible a contribuyentes específicos en la pared de la bacteria. Los LPS separados de la membrana externa de las células, han mostrado la capacidad de interactuar en la ausencia de Acs específicos, con el primer componente de C' y con su subcomponente C1q (152).

La interacción de C1q-LPS parece estar influenciada por el azúcar de la cadena específica O del LPS; por otro lado, si el lípido A, el cual es idéntico en todos los LPS, tiene capacidad de unirse a C1q, esta unión puede ser estabilizada por fuerzas hidrofóbicas (152).

Se asume entonces que el sitio de unión del C1 en los LPS es la región A del lípido de la molécula de los LPS. Además, se demostró que el C1 puede unirse a algunas bacterias Gram (-), tales como: *Klebsiella*, *E. coli*, *Shigella*, etc. (152).

El primer componente de C1 no tiene afinidad bajo condiciones fisiológicas a las formas lisas de *Salmonella minnesota* y *Salmonella Typhimurium*. Pero si se une a la cepa rugosa, debido a su carencia de cadenas de azúcar en el C6, lo que causa una alta afinidad y por lo tanto logra la unión. (152).

Al incubar al C1 purificado con proteínas de membrana externa de *Proteus mirabilis* (NW 56000), se observó una marcada reducción de la actividad bactericida del C1, indicando una interacción del primer componente del C1 con las proteínas de membrana externa: 125 μ g de proteínas son necesarios para inhibir el 50% de la actividad de C1, es decir 1 μ g de proteínas inhibe 132 moléculas de C1 en promedio (152).

Concluyendo: (a) Que las estructuras con las que se une el complemento a las bacterias son LPS, y proteínas de la membrana externa.

(b) La unión de C1 a la bacteria ocurre con una más alta afinidad que con la que se une a LPS.

(c) La bacteria de forma S (lisa), no tiene afinidad a C1, es capaz de unirse a C1 cuando la porción de azúcar del LPS es reducido.

Por lo tanto, los sitios adicionales de unión junto con los LPS en la membrana bacteriana, llegan a estar disponibles cuando la protección de la cadena de azúcar de los LPS falta. Los si-

tios adicionales son probablemente provistos por las proteínas de membrana externa (152).

Al evaluar el efecto de la ausencia de C2 sobre la ingestión de la bacteria, se encontró que el C2 es necesario para la destrucción óptima de *S. aureus* por los Polimorfonucleares (PMN), pero no para *E. coli*. Esto también se observó en la respuesta quimioluminiscente producida por los PMN estimulados por *S. aureus* o por *E. coli* lo que sugiere que la opsonización de *S. aureus* es mejor dependiendo del C2, y probablemente de la activación de la vía clásica. En contraste, la interacción de los PMN con *E. coli* parece ser independiente de C2. La necesidad demostrada del C2 para la actividad bactericida óptima contra *S. aureus* y para otros microorganismos puede depender de la activación del C' por la vía clásica. Por otro lado, puede ser un factor contribuyente en la infección recurrente de pacientes con completa deficiencia del C2 (148).

Se puede dar una inhibición selectiva de la activación de la vía clásica de C', por tratamiento de suero con Mg^{2+} y [Ácido Tetraacético-N,N,N,N-Etilen glicol-bis (E-aminopetil éter)] (EGTA), el cual suprime la actividad bactericida del suero. (14).

Recientemente se encontró un factor bactericida específico para el quimiotipo Ra de la cepa de *Salmonella* en suero de ratón normal (149,150). Este factor es llamado, factor reactivo Ra (RaRF), este es una proteína con un peso molecular de 300 kdal -

* En *Salmonella*, una mutante rugosa que tiene la cadena del núcleo completa, es llamada quimiotipo Ra (150).

y está compuesta de polipéptidos con un peso molecular de 20 y 70 kdal, su composición es sensible al calor (se inactiva a 56 °C por 30 min) y agentes reductores, requiere de Ca^{2+} para unirse a los determinantes antigénicos (149,150).

El RaRF se une específicamente al quilitipo Ra de *Salmonella* y a algunas bacterias Gram (-) que comparten el mismo determinante con esta enterobacteria (150), y activa al C₃ incluyendo al componente C4 en la presencia del Ca^{2+} , destruyendo así a la bacteria. También se une específicamente al LPS del Ra de la bacteria y su unión es específicamente inhibida por el H-acetil-D-glucosamina, el cual está presente en la porción final del polisacárido Ra (149).

Este factor no es una Ig ya que en una fracción purificada del mismo, se encontró ausencia total de las cadenas H y L de las Igs. Por otro lado, las características de este factor se asemejan a las de la proteína C reactiva, sin embargo, el determinante para la unión específica de este factor es el polisacárido compuesto de GlcNAc y L-glicero-D-manchepsoa, el cual es diferente de la proteína C reactiva, por lo que tampoco es esta proteína (149).

En otros estudios realizados se ha encontrado que, los niveles de los componentes del C₃ en la vía clásica en recién nacidos, ha sido significativamente más bajos que los de adultos. A la edad de 6 meses la concentración de C2 y C4 aumentan significativamente pero las concentraciones de C1q y C3 permanecen bajas (153).

Por otro lado, se ha demostrado que la vía alterna y clásica

ca son diferentes en la secuencia de activación en recién nacidos comparados con suero de adultos. Se ha mostrado la necesidad de los componentes C9 y C1 de la vía clásica, para la opsonización, por lo tanto el hallazgo de la actividad bactericida deficiente en algunos recién nacidos, ha sido asociada a los bajos niveles de C1q y C4 (153).

Finalmente, la acción antimicrobiana por el C' no es afectada por la edad (147).

b) VIA ALTERNA

La vía alterna (APC) puede ser activada por la superficie bacteriana de polisacáridos independientes de Ace (152). Así como por el ácido teicoico de la pared celular de las bacterias (4). Además de que esta activación culmina en el daño en la membrana bacteriana, provocando la muerte de estas (152,148). La APC requiere de Mg^{2+} para poder funcionar (141).

La mezcla compuesta de seis proteínas aisladas de la APC como C3, Bf, Df, B1H, C3bINA y properdina, más las cinco proteínas del complejo de ataque a la membrana C5, C6, C7, C8 y C9, constituye un reactivo bactericida en la ausencia total de Iga o de otros factores del suero; las lisozimas son necesarias para la destrucción bacteriana (141,143).

Además, entre las proteínas de la APC, la properdina juega solo un papel accesorio (141).

Por otro lado, usando E.coli K12 W11435 se encontró que los once componentes del sistema, fueron capaces de destruir a la

bacteria en ausencia total de Igs u otros factores del suero como ya se menciono anteriormente. La destrucción estuvo asociada a distintos cambios morfológicos de la bacteria pero no con su desintegración (142). Sin embargo, los estudios indican que con ciertas cepas de E.coli la adición de Igs al sistema, tiene un efecto positivo sobre la destrucción (143).

La habilidad para diferenciar entre las células que no pueden activar la AFC, reside en C3b. Se ha propuesto que a una baja magnitud de fluido, la C3 convertasa, que es la enzima iniciadora de la AFC, deposita el C3b de un modo casual en la superficie disponible de partículas biológicas. El depósito de este C3b ocurre, via su sitio de unión expuesto enzimáticamente. Subsecuentemente, el C3b unido interactúa con activadores de los constituyentes de la superficie, a través de un segundo sitio. Esta interacción permite la formación de la C3 convertasa, de esta manera el C3b se amplifica. Cuando esta interacción no ocurre es porque el C3b es adherido o inactivado por el BIH y el C3b inactiva la formación de la C3 convertasa (143).

El activador unido a la C3 convertasa cataliza la unión de muchas moléculas C3b y la formación de múltiples complejos C3-convertasa, como resultado, la C5 convertasa es formada. La properdina se requiere como un estabilizador de la enzima, y el ataque a la membrana es iniciado (143).

Aunque la properdina es la proteína que originalmente revelo la existencia de la AFC (4), y aunque se pensó era el componente clave de la vía, los resultados muestran que no cumple un papel esencial en la reacción bactericida o en la reacción bacte

riolítica. En otros trabajos, se ha encontrado que la función de la properdina es el mejoramiento de la regulación de la vía alternativa, ya que sólo tiene un pequeño efecto en la reacción bactericida, pero tiene un marcado efecto sobre el depósito del C3b, el cual varía de acuerdo a la cepa bacteriana probada (141,143).

Por otro lado, se ha observado que la reacción bactericida del suero tratado con Mg^{2+} (EMHS) depende de la integridad de la APC, requiriendo de los factores Df y Ef. El consumo de estos, no afecta a la reacción bactericida del suero humano normal (141).

La reacción del EMHS es independiente de los Acs inmunes o Acs naturales (141). La eficiencia bactericida de este suero, puede ser aumentada por la adición de una gran cantidad de bacterias, adición de bacterias homologas destruidas por calor o por la adición de LPS purificados (141,142).

Dos tipos de reacción son definidos: Una de baja eficiencia (LBR) que utiliza 10^4 bacterias/ml y una de alta eficiencia (HBR) que utiliza 10^4 bacterias vivas más 10^7 bacterias destruidas por calentamiento/ml (141).

Las reacciones LBR y HBR pueden ser moduladas por la adición de suero termoestable (suero calentado a 56°C por 30 min) (H56), el cual tiene una marcada inhibición en la actividad del HBR (141).

Los inhibidores son sustancias (glicoproteínas o polisacáridos) con una alta afinidad a Con A (141).

La reacción de EMHS se caracteriza por:

- a) Requiere de la integridad de la APC (141)(142).

b) Muestra dos niveles de eficiencia dependiendo de la concentración de la bacteria (141).

c) Es modulada por la adición de fracciones de suero termoestables con actividad inhibitoria y estimuladora (141,142).

Defectos funcionales de la APC, son reportados frecuentemente entre pacientes que sufren alergia atópica o infecciones recurrentes, lo cual no ocurre por alguna disfunción en los factores (C3, Bf, Df y probablemente properdina). Por lo que el defecto podría estar en la regulación de la interacción inicial entre el C3b generado en la fase fluida, y el activador de superficie. Los detalles de tal interacción aun no son conocidos, aunque Schreiber et al, han mostrado que la eficiencia de la APC puede ser reconstruida in vitro con seis proteínas purificadas (C3, Bf, Df, BIH, C3bINA y properdina), esto no excluye, que otros factores reguladores existan en suero humano y que modulen la activación de la APC (142).

Existe una alta incidencia de defectos en la opsonización de levaduras, en niños con infecciones recurrentes o enfermedades atópicas, debido a una activación defectuosa de la APC (144)

Al probar el suero atópico de estos pacientes con suero termoestable se encontró: a) Es defectuoso en la actividad bactericida, b) Es incapaz de ser potenciado con la ayuda de bacterias destruidas por calor, c) Se observa una actividad inhibitoria normal mucho más alta con reactivo H56 de suero atópico (142).

El defecto bactericida parece ser hereditario, ya que se encontró en otros miembros de las familias de los niños atópicos. Los mecanismos hereditarios aun no son claramente interpretados.

Son necesarios más estudios bioquímicos para identificar las ---
fracciones del suero (o actividades), en la ausencia de suero ---
atópico para entender, si los resultados pueden ser útiles para
el diagnóstico, prevención y posible terapia de estos defectos -
de la vía alterna de C (142).

B) SUERO

1) ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO

La interacción entre proteínas del suero, microorganismos puede llevar a la generación de factores quimiotácticos y puede promover la ingestión de MOs por PMN y monocitos. Un daño provocado en la actividad funcional de suero humano, causado por una deficiencia de Acs o un desorden en complemento (155) (157), repercutiría en infecciones severas y recurrentes (158).

Numerosas especies de bacterias Gram-negativas, muestran -- sensibilidad a las propiedades bactericidas o bacteriolíticas -- del suero. Esta actividad está asociada con la activación de la vía clásica o alterna del C'o ambas. La vía alterna, en la ausencia de Acs, es bactericida para ciertas bacterias Gram-negativas sin embargo, las Igs son requeridas para promover esta vía para la destrucción bacteriana (159).

Totte et al, encontraron que la fagocitosis y destrucción de bacterias anaerobias facultativas, ocurre en condiciones aerobias y anaerobias. La destrucción fagocítica de bacterias -- anaerobias obligadas, también ocurre en estas condiciones, pero solo usando un inóculo menor de 10⁷ cfu (unidades formadoras de colonias), con suero humano y una fagocitosis a una concentración de 5x10⁶ bacterias/ml (159).

En suero humano el 10% de bacterias anaerobias son más rá--

producción opsonizadas que E. coli, por lo que anaerobias compiten con E. coli por opsoninas, por lo tanto, inhiben la fagocitosis. (158).

Bacterias anaerobias obligadas inhiben la destrucción de anaerobias facultativas. El mecanismo por el cual ocurre, difiere en algunos aspectos: H. K. Ingham, postula que el efecto de las bacterias anaerobias sobre la fagocitosis depende primeramente de la interacción de estos MOs y el suero, y Tofto et al 1980 creen que es mediada por una opsonina labil al calor por la vía clásica del C' (158).

Por otro lado, Capnocytofaga spp, un nuevo género de bacteria Gram(-), anaerobio facultativo, bacilo del género Capnofilico, la cual causa serias infecciones orales y extrorales en el hospedero, provocando bacteremia en pacientes inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos. La bacteremia causada por Capnocytofaga, es más común en pacientes granulocitopénicos inmunosuprimidos, sugiriendo que los neutrófilos, pueden jugar un papel significativo en la defensa del hospedero contra este microorganismo. sin embargo, la observación de que las bacteremias ocurridas (aunque en una extensión menor) en pacientes no inmunosuprimidos indican, que otros mecanismos de defensa inmunes pueden ser igualmente importantes en la remoción efectiva de esta bacteria (159).

Cepas de esta bacteria son muy sensibles a las propiedades bactericidas del suero humano normal, sin embargo, el suero hipogamaglobulinémico no es tan efectivo para esta destrucción. Al observar los niveles de IgG e IgM contra Capnocytofaga se obser-

va; que son muy reducidos en el suero hipogamaaglobulinémico, comparado con el suero normal. Los mecanismos dependientes de inmunoglobulinas para la destrucción por suero deriva de que el suero hipogamaaglobulinémico puede ser reconstituido en su actividad bactericida por la adición de IgM (y en una menor extensión la IgG), obtenidas de suero humano normal. La IgM de suero de pacientes con macroglobulinemia de Waldenström, es incapaz de reconstituir el suero hipogamaaglobulinémico porque se puede presentar una unión no específica de la inmunoglobulina a la superficie bacteriana. Esto indica que los componentes del C₃ y C₄ son requeridos para la destrucción óptima de *Capsocytofaqa* por suero. Por lo que existe una buena correlación entre la destrucción mediada por suero y la acción de la vía clásica dependiente de C₃. Así, el C₃ en la presencia de C₄ puede ser importante para determinar la resistencia en el hospedero a infecciones intra y extraoculares, causadas por *Capsocytofaqa* spp (159).

Para MOs como *S.aureus* y *Streptococcus* del grupo B se observó que son opsonizados por la IgG, C₃, cuando éste último es activado por la vía clásica de C₁. El suero de sangre de cordón probó ser tan activo como el suero de adultos sanos para esta opsonización. El suero es inadecuado para la opsonización óptima cuando MOs como *E.coli* activan también la vía alterna del C₃. Esta ausencia de activación de la vía alterna por suero de sangre de cordón puede ser por una disminución de los factores: B, P y D (155).

* Enfermedad proliferativa perniciosa. Afecta a las células linfoides productoras de IgM (12).

La ingestión de *S. aureus* y *Streptococcus* del grupo B, en la presencia de suero de adulto inactivado por calor y suero de sangre de cordón inactivado por calentamiento, indican que la IgG de suero de sangre de cordón (la cual está presente en la misma concentración como en el suero de adultos), es funcionalmente activa. El nivel más alto de ingestión de *S. aureus* y *Streptococcus* del grupo B en la presencia de suero de cordón, suero de adulto normal y suero inactivado por calor, indican que la opsonización es óptima, cuando el C' es activado para opsonizar esta bacteria. Ambas bacterias pueden activar la vía clásica del C' y la vía alterna pueden o no activarla. *E. coli* es capaz de activar ambas vías pero su ingestión es principalmente por opsonización de la vía alterna. Los Acs IgM pueden tener un papel en la opsonización de *E. coli*, por activación del C' vía clásica, pero el suero de sangre de cordón no contiene IgM porque esta inmunoglobulina no cruza placenta, además de que la IgM de suero de sangre de cordón no es suficiente para obtener la máxima fagocitosis de *E. coli* in vitro (155).

En otros experimentos, Stephen Shaw, et al, estudiaron la actividad bactericida del suero en individuos de varias edades contra *Haemophilus influenza* tipo B (HI-B). Encontrando que la más baja actividad se presenta en infantes de 2 a 3 años (el período cuando los niños son más susceptibles a esta bacteria) (160).

Acs y C' tienen acción bactericida para HI-B in vitro, la susceptibilidad a esta bacteria puede ser debida a una deficiencia de Acs (160).

Durante el ensayo bactericida la presencia de nutrientes, fue adecuada para el crecimiento de H-R, lo que la hace más resistente al suero. La susceptibilidad de H-R pasaje su similitud depende de las concentraciones de metabolitos específicos, los cuales varían entre los medios usados (160).

Los mecanismos por los cuales los factores del suero aumentan la resistencia bacteriana son desconocidos (160).

Es importante mencionar el efecto bactericida que tienen los antibióticos en el suero humano. Esto ha sido estudiado por muchos años y todavía se sabe poco acerca de esta interacción. Muchas pruebas no incluyen los controles de antibióticos o sueros solos, que son necesarios para demostrar el sinergismo o el antagonismo en las combinaciones (161).

Los antibióticos tienen la capacidad de: 1) Evitar la síntesis de la pared celular durante el crecimiento; 2) Inhibir la síntesis de proteínas esenciales; 3) Afectar la permeabilidad de la membrana celular; (11). Por otro lado se dice que a concentraciones subinhibitorias son capaces de alterar la morfología de la bacteria, afectan la velocidad de crecimiento, alteran producción de toxinas, antígenos de superficie y la adhesión a la superficie de mucosas (156).

Estas alteraciones pueden afectar la invasividad de la bacteria, haciéndola más susceptible a las defensas del hospedero. Una interacción cooperativa entre antibióticos y los mecanismos de defensa del hospedero, podrían explicar por qué ciertos antibióticos exhiben la más grande eficacia in vivo, más que predominar sus bioactividades in vitro (156).

La participación del C en este sinergismo, es propiamente por la falta de efecto bactericida, cuando el mismo suero es calentado a 56 C por 30 min., demostrando que el sinergismo del antibiótico y del suero son dependientes del C. (15, 16).

Se ha observado que cepas incubadas solas con antibiótico, o con suero, no presentan actividad bactericida, siendo existentes a estos. Pero al incorporar ambos (cepa, suero, antibiótico), la actividad sí se presenta (16).

Antibióticos como tetraciclina (TC), Estreptomicina (SM), Ampicilina, Dimetropina, muestran actividad bactericida, para E. coli, pero ni el Cloranfenicol ni el ácido nalidixico la presentan (16).

Sin embargo, antibióticos como Furazolidina y Actinomicina en la presencia de suero, muestran un nivel de destrucción bajo y la Rifampicina por sí sola destruye a la bacteria pero al agregarle suero pierde su capacidad de destrucción (16).

La actividad bactericida de la TC y SM es dependiente de la concentración del antibiótico, a mayor concentración, menor porcentaje de supervivencia de las bacterias; y además depende de la dilución del suero, a mayor dilución mayor porcentaje de supervivencia. Las concentraciones de estos antibióticos en las cuales el sinergismo es observado, están dentro del rango de las concentraciones terapéuticas del suero (16).

La membrana externa de HDE Gram(-) es una barrera permeable, cuando esta es rota por ácido etilendiaminotetracético, la penetración de varias moléculas (incluyendo algunos antibióticos)

caso), aumenta. Es probable que el uso del suero en combinación con ciertos antibióticos, actúan comprimiendo la permeabilidad de la membrana externa, aumentando así la concentración intracelular del antibiótico y un nivel bactericida (161).

La membrana externa es el sitio inicial de ataque por C^{12} (5) (161), y en la acrobacia citoplasmática de la envoltura de bacterias gram(-). Es posible que una reducción de la permeabilidad de la membrana externa dada por C^{12} , resulta en la presentación de antibióticos a la membrana externa en concentraciones aumentadas (161).

El suero afecta las bacterias, de tal forma que se vuelven más susceptibles a SM. Si esto es cierto, entonces el sinergismo demuestra que la acción del C^{12} en la envoltura de las bacterias, puede ser un evento preliminar a la destrucción (161).

El antibiótico no tiene efecto en la vía clásica del C^{12} , y la vía alterna se ve afectada por la dilución del suero. Es posible que también las altas diluciones del suero, producen lesiones en la envoltura de la bacteria, las cuales son rápidamente reparadas para evitar su muerte, pero esta reparación es inhibida por TC y SM. El Cloranfenicol no es sinérgico con el suero, por lo que existen efectos diferenciales de antibióticos en la síntesis de proteínas bacterianas, por lo que parece probable que TC y SM, afecten los mecanismos reparadores y el Cloranfenicol no (161).

La actividad bactericida de TC y SM más el suero en *E. coli* CSH-2 muestra ser un mutante resistente a SM, este antibiótico con o sin suero no tiene efecto bactericida, pero si más el suero

no si es bactericida. La resistencia de SM a CSH-2, es debida a una alteración ribosomal, que impide la inhibición de la síntesis de proteína por SM, mientras que esto no afecta la acción de TC. Por lo que la actividad bactericida de SM más el suero, dependen de la inhibición de síntesis de proteína por SM y se elimina la posibilidad de que esta actividad, sea debida al daño en la membrana por SM. Este no aumenta la actividad bactericida de C' (161).

Las bacterias resistentes a ciertos antibióticos, contienen un elemento genético extracromosómico compuesto de DNA, el factor (R). Series de genes que determinan su resistencia están unidas al factor R, que se reproduce y se traslada de célula a célula transmitiéndose así, la resistencia a cepas antes sensibles a los antibióticos por contacto (11).

Así una cepa de E.coli J6-2R100 de plásmido R100 confiere resistencia a la TC, SM, Cloranfenicol y sulfonamidas (S) (161). Pero en la presencia de la cepa con suero y TC y/o SM, se da un efecto bactericida marcado sobre la cepa (161).

Otras cepas con plásmido R1, confiere resistencia al Cloranfenicol, SM, Sulfonamidas, Ampicilina y Canamicina. Ambos plásmidos son reprimidos por la síntesis de pilus. Desde luego, el sitio de resistencia no puede ser el sitio de acción de C' (5).

Los plásmidos resistentes al antibiótico, fueron localizados con una alta frecuencia en E.coli en serogrupos O8, O9 y O101. A lo menos algún plásmido puede alterar la sensibilidad de E.coli al efecto bactericida del suero (5).

La argumentación de los mecanismos de defensa del hospedero por antibióticos, podrían explicar las discrepancias entre la eficacia in vivo y las bioactividades in vitro. Esto también podría explicar porqué los efectos terapéuticos pueden ser obtenidos, cuando los niveles del suero de algunos antibióticos caen-abajo de su concentración inhibitoria (154).

C) INMUNOGLOBULINAS

1) PAPEL DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA

Como ya se mencionó anteriormente, las Inmunoglobulinas (Igs), son moléculas proteicas que tienen actividad de Ac, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con las sustancias que indujeron su formación (Ags). Los Acs juegan un papel importante en contra de muchas bacterias (9).

Muchas condiciones patológicas requieren de preparaciones de Igs como agentes terapéuticos (162). Esto es importante para evaluar cual es la Ig que por su actividad antibacteriana es capaz de evaluar la inmunidad del hospedero (9).

Una preparación de Ig, SRK-Ig preparada para la administración intravenosa, conserva actividad opsonica para *Streptococcus agalactiae* del grupo B (GBS), cuando hay deficiencia de Acs. Por otro lado, también la SRK-Ig puede interactuar con el GBS y el C para facilitar la opsonización y destrucción de la bacteria por neutrófilos (163).

Gerald W. Fisher sugiere que la SRK-Ig, tiene actividad bactericida funcional y puede ser un valioso terapéutico o profiláctico en pacientes con inmunodeficiencia (163).

* La opsonización se refiere al papel de los Acs en la preparación de la bacteria para la fagocitosis. La adherencia de la bacteria a la membrana plasmática de las células fagocíticas es un paso necesario en el englobamiento. Aunque algunas bacterias encapsuladas se adhieren a la superficie de fagocitos tal como leucocitos PMN y monocitos, otros incluyendo muchos MOs virulentos, muestran pequeña adherencia. Adicionando el Ac IgG a tales MOs se proporciona adherencia de estos a los fagocitos vía receptores de superficie celular específica para el Fc de las IgGs (10)

Por otro lado, es recomendada, la administración de preparaciones de IgG humanas, para uso intravenoso (IGIVs) con tratamiento de antibióticos. La eficiencia de la IGIVs contra enfermedades infecciosas se piensa que depende del volumen de Acs y del contenido de IgG en la preparación, además de la función efectora localizada en la región Fc de las IgG. Algunos procesos de producción para IGIVs que son intentados para remover la actividad anticomplementaria dañan las funciones efectoras mediante el Fc de la IgG, tales como: Oponofagocitosis, Citólisis inducida por C y citotoxicidad dependiente de Acs (14).

Es sabido que existen datos que sugieren la existencia de "una molécula mensajera", que puede manifestarse en la sangre durante los procesos febriles, y que actúa sobre los centros termorreguladores del hipotálamo; esta molécula es producida por los leucocitos PMN que intervienen en la respuesta inflamatoria. La liberación de este pirogeno leucocítico puede ser producida in vitro tanto por exposición de las células a la acción de una endotoxina como por exposición a ciertos virus o bacterias que pueden ser fagocitadas por tales células, a "Factores activantes", presentes en los exudados (9).

La IGIVs inhibe la fiebre inducida por LPS, esta supresión está relacionada con una interacción entre la porción Fc de la molécula de Ig y el receptor Fc de los macrófagos de conejo que

* El LPS, es un componente esencial de la membrana celular externa de todas las bacterias Gram (-) siendo el más potente pirogeno asociado con infecciones causadas por Bacillus Gram (-) (14)

inhiben la producción de IL-1 (164). Sin embargo, puede también actuar para inhibir la producción de factores pirogénicos endógenos como resultado de la respuesta a infecciones por el hospedero (164).

Por otro lado, la IL-1 es producida en respuesta al proceso de activación que está asociado con los cambios típicos de la perturbación de la membrana celular. No es claro, cómo la membrana proporciona señal para la depresión y transcripción del genoma de IL-1 (164).

También deberá ser aclarado cómo las Igs intactas unidas a los receptores Fc de los M ϕ , resulta en la inhibición de la producción de IL-1 por M ϕ (164).

Por lo tanto las preparaciones de Igs intravenosas con actividad antibacteriana, pueden ser de gran valor en las modalidades profilácticas y terapéuticas (163).

Por otro lado, se ha estudiado el efecto que tienen las gamma globulinas en el tratamiento de infecciones bacterianas en pacientes no inmunodeficientes. Encontrando que la adición de preparaciones de gama globulina, como una fuente de opsoninas incrementa la actividad fagocítica de muchos individuos no inmunodeficientes en sangre completa, especialmente en infantes. Este efecto puede ser dependiente de la actividad opsonica presente en las muestras de sangre (162).

* Los pirogenos endógenos son considerados idénticos al factor activador de linfocitos LAF, definidos como IL-1, o junto a la familia de moléculas que están estrechamente ligadas a ellas (164).

Van Epps et al, en 1976 indicaron que las IgA separadas de suero de pacientes con mieloma son capaces de inhibir la quimiotaxis de leucocitos PMN. Esta inhibición es directamente en la célula y afecta a los siguientes factores: C5a, caseína, factor quimiotáctico derivado de la bacteria y suero humano normal fresco. Esto puede ocurrir por interferencia estérica con el receptor quimiotáctico de los PMN o por supresión de las funciones esenciales de la célula para una respuesta quimiotáctica normal (165).

La supresión de la actividad bactericida y la inhibición de la quimiotaxis es reducida por la pepsina o por la reducción y alquilación, lo cual convierte a la IgA polimérica en IgA monomérica. Lo que indica que la porción Fc de la paraproteína IgA de alto peso molecular o forma polimérica, son factores importantes en la inhibición observada de la actividad bactericida de los PMN (165).

Se ha observado que la IgA insoluble o la IgA en la presencia de una superficie no fagocitable, tal como acetato de celulosa, estimula la liberación de enzimas en la membrana. Este tipo de interacción entre la IgA y la IgA polimérica, puede resultar en la inhibición de la ingestión y de la actividad bactericida de los PMN (165).

Se ha propuesto que la inhibición de la ingestión de los PMN en la presencia de paraproteínas IgA puede ser parcialmente debido a la interferencia de los receptores de los PMN para opsonizar, ya que se mostró en experimentos que la formación de rosetas con IgG o eritrocitos cubiertos por C, puede ser parcialmen

te inhibida por las paraproteínas IgA (165).

Por otro lado, se ha observado que la IgA circulante debido a su inhabilidad de la región Fc para unirse al C1, no activa la vía clásica del C' y es capaz de bloquear los mecanismos efectivos inmunes dependientes de C' (166).

Varias clases de Igs tienen la habilidad para neutralizar las exotoxinas solubles producidas por las bacterias; interfiriendo con los determinantes antigenicos de las toxinas en los sitios activos cercanos, bloqueando así la reacción con el sustrato. Las Igs pueden combinarse con determinantes lejanos de los sitios activos de la toxina, pero tal combinación altera la configuración y por consiguiente la actividad de estos sitios (9).

IV ENSAYOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA

A) NEUTROFILOS

La función de las células fagocíticas es una parte integral de la respuesta inmune, y por lo tanto, las técnicas para valorar la función fagocítica, son de suma importancia (167).

Existen métodos disponibles para valorarla, pero son complicados y costosos además de que su realización requiere de mucho tiempo. Un ejemplo de ello es el ensayo de destrucción microbici- da de S.aureus (170,171).

Por otro lado, existen técnicas como las de conteo en placa que son técnicas laboriosas y que consumen mucho tiempo (172) -- (173).

Se ha propuesto, el uso de técnicas como la incorporación de timidina (H), sin embargo, ese tipo de técnicas no solo em- plean mucho tiempo sino que técnicamente son inapropiadas para el uso en un laboratorio (174,175). Las técnicas por tinción son satisfactorias para grandes microorganismos como levaduras, no- obstante, son inadecuadas para MOs pequeños, tal como bacterias- (175,176).

De tal manera, que ha sido necesario desarrollar técnicas para valorar la actividad bactericida de neutrófilos, que puedan ser usadas en situaciones clínicas (167-169).

1) METODO I

W.A. Phillips propuso un método sencillo para probar la actividad bactericida de neutrófilos (1968).

MATERIALES.

Neutrófilos [separados por el método Boyum modificado (1968)]

S. aureus

Agar Columbia

Buffer de Fosfato de Sodio

Buffer de Fosfato Dulbecco (DFB)

Espectrofotómetro

METODO

1. La ingestión de la bacteria por los neutrófilos, fue seguida de la incubación de una mezcla de 600 μ l de cultivo de tejido en medio 199, 50 μ l de suero humano, 150 μ l de suspensión bacteriana y 200 μ l de suspensión de neutrófilos, en un tubo de plástico estéril por 10 min a 37 °C.
2. Al final de esta preincubación, los neutrófilos lavados cuidadosamente 3 veces, por centrifugación (700xg) por 3 min y fueron resuspendidos en 1 ml de medio 199 conteniendo penicilina (U/ml) y Estreptomicina (100 ug/ml). Se removió una alícuota al tiempo 0 (t=0) y permaneció a 37 °C, después se removió una segunda alícuota al tiempo 3 (t=3).
3. Inmediatamente de la remoción, las alícuotas fueron cuidadosamente lavadas, con DFB estéril por centrifugación (700xg 3min) y

resuspendidos en 4 ml de agua destilada estéril. Los neutrófilos fueron lisados por sonicación (MSE 1-73, 15W, 3 seg), y se contó el número de bacterias viables liberadas usando la siguiente técnica micrométrica:

25 μ l de la suspensión de neutrófilos lisados fueron adicionados a 225 μ l de caldo nutritivo, en una celda microvolumétrica estéril (Cooke H-24AR), y se hicieron diluciones 10 veces con una pipeta de 25 microlitros a una concentración final de 10^{-7} . El blanco que contenía solamente un caldo nutritivo estéril, fue usado como un indicador de contaminación. La celda fue incubada por 16 h a 37 C, y entonces se examinó bajo luz incidente por crecimiento cada resultado obtenido cuando hubo crecimiento fue positivo, y cuando no hubo crecimiento fue negativo. El índice de destrucción bacteriana fue calculado de la siguiente manera (168).

$$\text{Índice} = \frac{\text{No. de bacterias viables después de la incubación (t=3)}}{\text{No de bacterias viables ingeridas (t=0)}}$$

2) METODO II

D.W.Simpson R. et al, desarrollaron otra técnica para cuantificar la actividad microbicida intracelular fagocítica, en diferentes poblaciones fagocíticas como los neutrófilos (167).

El método está basado en la tinción y concentración de los MOs ingeridos muertos, el azul de metileno fue usado como indicador en la tinción y el MO probado fue *Saccharomyces cerevisiae*.

La fagocitosis de los macrofagos fue medida contando microscópicamente, el número de levaduras ingeridas (*Saccharomyces* ---

cereviciao)

MATERIAL

Ratones. Usados como fuente de células

Neutrófilos

Macrófagos peritoneales

Macrófagos alveolares

Macrófagos esplénicos adheridos

Levaduras

Azul de metileno

NaCl al 0.9%

Solución salina balanceada de Hank's HBSS.

METODO

Volumenes iguales de la suspensión de las células, azul de metileno y suspensión de levadura experimental, fueron adicionados a tubo de polipropileno (12mmx75mm) con tapa. Un mínimo de 4-10 células son necesitadas para una adecuada colocación y conteo de las células húmedas.

Debe de mantenerse un radio de levadura de 1:10, el contenido de la mezcla es igualado al 20%, cuando se usan macrófagos esplénicos agudos, el azul de metileno y la suspensión de levaduras son adicionados en volumenes iguales.

Los tubos o placas que contienen células, levaduras y azul-

de metileno, fueron incubadas a 37 °C en una plataforma oscilante a 5, 10, 30, 60 y 120 min. Después los tubos se centrifugan a 478xg a 4 °C por 6 min. El botón observado se resuspende en 20 µl de HBSS.

100 células son observadas en 5 campos, marcando el número de levaduras vivas y muertas notando simultáneamente el número de células activamente fagocitadas. Con este método se pueden medir tres parámetros: (147).

a) Capacidad fagocítica $\frac{\text{levaduras vivas y muertas}}{\text{100 células Neutrofílos}}$

b) % de destrucción $\frac{\text{No. de levaduras muertas}}{\text{Capacidad fagocítica}}$

c) Actividad fagocítica $\frac{\text{No. de células que contienen 2 ó más lev}}{\text{100 células Neutrofílos}}$

El ensayo microvolumétrico propuesto por W.A. Phillips y col fue comparado con una modificación de la técnica de conteo de placa (Hocking et al 1977). De esta comparación se observó, que hay una ventaja considerable en tiempo y costo, al usar la técnica volumétrica. En términos materiales, el costo del método microvolumétrico fue de 1.76 dólares, mientras que para el método de placa fue de 10 dólares. Siendo este método microvolumétrico un método barato y confiable, de tal forma que es útil para la rutina en el laboratorio (148).

En el segundo método aquí mencionado en donde se usó Schae

romyces cerevisiae, la capacidad fagocítica de los neutrófilos exhibió un incremento constante en los min. 30 y 60. El pico para la actividad fagocítica de los neutrófilos neutrofilatos, ocurre a los 5 min, y se mantiene en una meseta hasta los 60 min y decrece con el tiempo (167).

Este método a diferencia del propuesto por Schmid y Bruno - en 1974 (177) puede usar varias líneas celulares y también las células pueden ser adheridas, cultivadas o usadas en suspensión. Además de que la levadura que se utiliza en este método, puede prepararse y usarse inmediatamente. El método es rápido y produce resultados reproducibles y confiables, lo que proporciona una información significativa, sobre la actividad metabólica intracelular y fagocítica de las células fagocíticas (167).

5. METODO III

Por otro lado, John W. King et al, determinaron la función de los neutrófilos, por un ensayo usando la actividad del derivado Hemato Hemofosfato (HMPS), este ensayo se realiza con volúmenes de sangre completa (167).

Sabiendo que la actividad del HMPS se incrementa durante la actividad de los neutrófilos y que hay un aumento en el consumo de oxígeno durante la actividad del HMPS, este ensayo fue diseñado para determinar la influencia de tres variables en la actividad del HMPS (167).

Primero: Para determinar si la presencia de eritrocitos interfiere en la actividad del HMPS,

Segundo: para detectar diferencias entre la actividad del HMPS de preparaciones de Leucocitos (libres de eritrocitos) estimulados con zimosan y de sangre completa estimulados por el mismo.

Tercero: Para comparar el microensayo del HMPS de sangre completa de 30 neonatos con los del grupo control de 20 adultos saludables.

Al llevar a cabo los experimentos, controlando las variables anteriormente mencionadas, se encontró que los eritrocitos no interfieren en este ensayo en la actividad del HMPS después de la estimulación del zimosan (169).

Para el segundo objetivo, se encontró que no hay diferencias significativas en la actividad del HMPS estimulado o no estimulado, cuando se comparó con la actividad del HMPS de las proporciones de leucocitos libres de eritrocitos estimulados o no estimulados (169).

Finalmente la actividad del HMPS es similar en adultos y neonatos y en ambos grupos se incrementa la actividad del HMPS con estimulación del zimosan (169).

4) METODO IV

La quimioluminiscencia (CL) de los fagocitos, fue descrita primeramente por Allen et al, quien notó la emisión de luz durante la fagocitosis realizada por los neutrófilos PMN (178).

La CL o emisión de luz por los PMN se piensa, es el resultado indirecto de la generación de las especies oxidativas oxidadas electrónicamente. Las especies oxidativas involucradas en las reacciones de CL incluyen O_2^- , OH , H_2O_2 y O_2 (180).

Por otro lado, la CL como técnica inmunológica, se ha utilizado como sustituto de marcadores radioactivos en los inmunoensayos y para evaluar la actividad fagocítica de algunas células (79).

Usualmente la CL es medida con un líquido contador de escintilación, este instrumento es caro y difícil de correr a la temperatura del cuerpo. C.S.F Easmon et al, describieron un luminómetro 1250 (LKB Wallac) para medir la CL, este es menos costoso y comercialmente disponible (179).

Material: Zimosan, luminol y leucocitos

Método para medir la CL en el luminómetro 1250 (LKB Wallac):

1. La mezcla de reacción consiste en 0.5 ml de leucocitos (ver referencia para preparación en el artículo 2.) (10^6 células/ml) y 0.9 ml de medio, el cual consiste de 2×10^{-6} M de luminol en 3 ml de vial de poliestireno (179).

2. La mezcla anterior es puesta en la cámara de pruebas de luminómetro 1250 (LKB Wallac), se registra la lectura base (177).
3. Una suspensión de partículas opacificadas (100 o 200 AL), fue adicionada, y el rendimiento de luz resultó en mv y fue continuamente registrada en un registrador (LKB, Broens 2010) (179).
4. Todos los constituyentes de la reacción se mantuvieron a 37°C

Desventajas:

1. Varían los resultados obtenidos con las células rojas (eritrocitos).
2. Hay diferencias intrínsecas en la actividad metabólica de la población de células normales (179).
3. Existe dificultad para separar y diferenciar la población de células que serán estudiadas (179).

METODO

Fundamento: La CL puede ser amplificada por el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-talazinedione), el cual es convertido a un ion aminoftalato excitado en la presencia de especies oxidables como el anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 , radical hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno singlete (O_2^1) de tal forma que usando el luminol como amplificador se pueden medir pequeñas cantidades de especies de oxígeno activadas en una muestra y por consiguiente la CL (178,181).

Material:

Granulocitos puros obtenidos de sangre venosa

Zimosan

gamaglobulinas

agentes quimicos: medio Dulbecco modificado

luminol

Salina amortiguada de fosfato (SEP)

Metodo:

1. Para medir la CL se usó un fotómetro BLR-102 (177).
2. Después de haber incubado la especie a 37 C por 20 min fue pasada a la cámara de medición del fotómetro. Se mantuvo la temperatura a 37 C, y se adicionaron 10 μ L de luminol.
3. Después de 10 min para el equilibrio de la reacción, se midió la formación de CL por un min.
4. Se agregaron 10 μ L del inductor de la CL.
5. La CL fue continuamente registrada por un registrador conectado al aparato de CL, hasta que el pico de CL demostró declinar definitivamente.
6. Se lee las curvas y picos del registrador (173).

Ventajas:

1. Ya que la CL dependiente de luminol refleja la cantidad de especies de oxígeno activadas, generados de fagocitos activados, este método puede usarse para medir la activación fagocítica (178).

2. Utiliza pequeños volúmenes de sangre (0.01 ml) (178).
3. No utiliza mucho tiempo (178).

En general, independientemente del método y equipo utilizado en los ensayos para evaluar la actividad fagocítica, utilizan específicamente la CL, existen varias ventajas y desventajas, las cuales son las siguientes:

Ventajas:

1. Se requiere de un número relativamente bajo de células, y es posible también utilizar sangre completa, lo que permite que se pueda aplicar a individuos con neutropenia o en niños (79).
2. Se permite el estudio de diferencias en la opsonización por distintas cepas dentro de una misma especie bacteriana; se puede utilizar una gran variedad de partículas inductoras, así como también estímulos solubles de acuerdo al propósito del ensayo (79).
3. Favorece y facilita que los resultados sean obtenidos con un amplio rango de MOs (79).

Desventajas:

1. Son métodos indirectos de valoración de la función bactericida, ya que no diferencia entre los defectos de la ingestión y destrucción intracelular (79) (179).
2. El costo del instrumento para medir la CL, es relativamente costoso (179).

3. El rango normal de la CL de las células fagocíticas es amplio y la contaminación con células rojas puede disminuir la emisión de luz por interferencia (79).

4. Cuando se usan células aisladas se requiere de un alto grado de pureza y de un medio de mantenimiento adecuado para obtener una buena reproductibilidad, pero estos tratamientos alteran la respuesta celular a la CL (79).

5. La posible existencia de subpoblaciones con diferentes actividades metabólicas y funcionales, puede ser la causa de diferencias en la respuesta quimioluminiscente celular (79).

B) LEUCOCITOS PHN

1) METODO I

Como ya se mencionó anteriormente se han desarrollado muchos ensayos para valorar la destrucción microbiana por los leucocitos, pero muchos tienen inconvenientes como: procedimientos demasiado amplios (Lace et al 1965), requieren equipos muy costosos (Baehner et al 1965) o solo prueban una función (Lace et al 1965). Así, en 1977 David Lee Smith, en un esfuerzo por mejorar las técnicas de portaobjetos propuestas por Castro et al (1972), desarrolló un método simple y rápido que usa pocos milímetros de sangre periférica sobre portaobjetos, MOs vivos y anaranjado de acridina como colorante fluorocromico vital, el cual permite la valoración simultánea de la actividad fagocítica y microbicida (182).

Fundamento:

El anaranjado de acridina es un fluorocromo que cuando es examinado bajo el microscopio ultravioleta tiene una emisión verde. Cuando está en contacto con una doble cadena de DNA ortocromática y con una emisión roja, y metacromática, cuando está en contacto con DNA desnaturalizado o con RNA de cadena sencilla. Los procariontes y eucariontes con núcleo intacto tienen ortocromasia y aparecen verdes, los procariontes y eucariontes con núcleo degenerado tienen metacromasia y aparecen rojos. De esta manera se hace posible la valoración de la actividad bactericida de los leucocitos por medio de esta tinción.

MATERIAL

Sangre completa.

S.aureus

E.coli

Listeria monocitogenes

METODO

1. Poner en un portaobjetos una gota de sangre completa e incubar a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂ por 45 min.
2. Remover el coágulo y lavar lo con solución de Hanks a 37°C y un pH de 7.2.
3. El portaobjetos con los fagocitos adheridos se inunda con 0.1 ml de suero de McCoy's 5A-10% conteniendo MO en suspensión (para su preparación ver referencia 1B2), e incubar 15 min a 37°C, 10% de CO₂.
4. Se lava el portaobjetos con HBSS, a 37°C pH de 7.2 y las células adheridas son tenidas con el aparanzado de acridina C.146005 (para ver método referencia 1B2), lavar nuevamente con HBSS.
5. Hacer un frotis y examinarlo a 1250x en un microscopio ultravioleta con aceite de inmersión.

VENTAJAS

1. Determina simultáneamente la actividad microbicida y fagocítica.
2. Cualquiera microbio procarionte o eucarionte puede ser usado - incluyendo agentes cultivados de los propios pacientes.

3. El método es rápido. Usa solamente pequeñas cantidades de sangre y los materiales son fáciles de adquirir.
4. Permite la separación de fracciones humorales y celulares usando especies homologas (182).

DESVENTAJAS

1. Hasta ahora se ha observado una dificultad: Los *S. aureus* no viables son largos, y metacromáticos y pueden ser confundidos con las partículas de anaranjado de acridina (182).

2) METODO II

Este método es propuesto por S. Olling y B. Elgefors y fue desarrollado para poder detectar pacientes con deficiencia fagocítica (183).

MATERIAL

Suero resistente a *E. coli*

Suero de AB Rh(+)

Leucocitos

METODO

1. La suspensión de leucocitos en plasma fue preparada por sedimentación de Metrizato de Sodio metil celulosa.
2. Los leucocitos fueron lavados 2 veces y resuspendidos en un volumen de dos mililitros.

3. El suero y las bacterias fueron adicionados a 10 tubos en un volumen final de 0.5 ml en cada tubo.
4. Después de la incubación de 60 min, se adicionan 6 ml de agua a cada tubo.
5. Se dejan en reposo los tubos durante 5 min en el cual el leucocito es lisado debido a la hipotonicidad y las bacterias fagocíticas son liberadas. Se adicionan 0.5 ml de BHI concentrado a cada tubo.
6. Todos los tubos son refrigerados a 4 °C durante la noche. Al día siguiente son incubados a 37 °C para observar crecimiento. -- Después de 6 a 8 hrs se agitan varias veces y se toma la densidad óptica (186).

VENTAJAS

1. Este método permite que una persona realice 10 pruebas durante el día y que los resultados estén disponibles.
2. El método elimina las dos principales desventajas del método de placa, la inherente variabilidad del conteo y la frecuencia de aglutinación bacteriana.
3. Además este método también contiene controles para que la destrucción realmente dependa de la fagocitosis (183).

DESVENTAJA

1. Este método no discrimina entre las bacterias sobrevivientes intra o extracelulares (183).

C) MONOCITOS

La medición de la actividad bactericida por los monocitos y los macrófagos ha sido impedida por la dificultad en el conteo de las bacterias sobrevivientes (185). Por otro lado, la principal fuente de error en los ensayos es el conteo de los MDS muertos (184). Además, existen problemas en la interpretación de resultados debido a la multiplicación de las bacterias durante el curso del ensayo (185).

En un intento por mejorar esta situación, se propuso el uso de antibiótico, pero esto complicó más el problema, debido a que estos se acumulaban en los fagolisosomas, y bajo estas condiciones la destrucción de las bacterias en los fagolisosomas por los mecanismos bactericidas de las células no pueden ser cuantificada, porque no se puede separar la destrucción debido a los antibióticos (186).

En estudios recientes Anne, Morris Hooke et al, separaron una cepa mutante de *E. coli*, la cual no puede replicarse a la temperatura del ensayo (37 C), pero permanece completamente viable durante el curso de la incubación y puede ser cuantificada por placa a 25 C (186).

También la cepa retiene su potencial formador de colonias por largos períodos de incubación a la respectiva temperatura. (186).

Al investigar la síntesis del ácido ribonucleico en la mutante, se vio que la síntesis de proteínas es rápidamente inhibida en la cepa mutante, con un 98 % de inhibición en 3 min des-

pues de transferir a 37 C. Indicando que el efecto directo de la mutación es sobre la síntesis de las proteínas (42).

Debido a que una de las principales fuentes de error en los ensayos es el conteo de MDs muertos (40). Arthur M. Fried Lander desarrolló un ensayo, que mide la liberación del DNA de los MDs basado en el argumento de que la pérdida del DNA es una evidencia directa de la muerte de las células (184).

Midiendo la liberación del DNA de los MDs, el ensayo es un reflejo del grado de degradación y pérdida de la integridad estructural del MD. Siendo en este sentido una medida del resultado final de los procesos involucrados en la interacción de los MDs con los fagocitos (184).

MATERIAL

Bacterias: *Salmonella typhimurium* Lt2

E. coli O6

Staphylococcus epidermidis

(C14) Timidina (Tdr)

Sangre heparinizada

Medio Dulbecco-Modificado (DM)

1) METODO I.

1. La *S. typhimurium* previamente marcada (ver ref 184), fue diluida de 20000 a 40000 cpm en un mililitro del medio esencial Dulbecco-Modificado (DM) conteniendo el 20 % de suero fetal y el 1% de antisuero de conejo. Esta dilución se adiciona a un culti-

de macrófagos.

2. Después de 20 min se expone a 37 °C, en un incubador con atmósfera de CO₂, el medio es removido y la placa se lava 6 veces con HBSS para remover la mayoría de las bacterias ingeridas.

Aproximadamente de un 35 a un 55 % de las bacterias llegaron a asociarse con la monocapa. Se adicionó el medio DM a las placas y fueron reincubadas.

3. Después de 6 horas el medio fue removido y la placa se lavó con HBSS. El lavado fue combinado con el medio, y se determinó el porcentaje de radioactividad filtrable por conteo en una alícuota antes y después, pasando a través de un filtro de 0.45 µm. La monocapa es entonces lisada en un 0.2 % de Triton X-100 en agua y la radioactividad filtrable fue determinada similarmente, los datos son representados con el porcentaje total de radioactividad por placa.

4. Los controles consistieron de macrófagos lisados del DNA, con un oscilador sónico Biosonick y se incubaron con (C14) Tdr (184)

VENTAJAS.

1. Tiene especificidad absoluta, ya que la liberación del DNA de los MUs puede ser tomado como una evidencia definitiva de la muerte celular.

2. Evita muchas de las dificultades que se presentan con los ensayos basados en la inhibición del crecimiento, ya que es conocido que la medición por unidades formadoras de colonias es objeto de considerables errores, además de evitar artefactos por la agregación de las bacterias.

3. Es rápido, reproducible y puede ser aplicado para medir la --
destrucción de algunos MOs, los cuales se degradan lo suficien--
te para liberar su DNA (164).

DESVENTAJAS.

1. Algunos MOs pueden ser relativamente más resistentes a la de--
gradación necesaria para que el DNA sea liberado. Por ejemplo: la
cepa de bacillus Gram(-), *S. typhimurium* y *E. coli* liberan DNA --
más fácilmente que los *Staphylococcus*. La resistencia de estos--
últimos a la degradación de los leucocitos, es debida a su gruesa
capa peptidoglican, así como también se nota una resistencia--
similar a la degradación de constituyentes celulares. De tal for--
ma que el ensayo no puede ser aplicado a algunos MOs (164).

2. Carece de sensibilidad bajo algunas condiciones. Por ejemplo:
la muerte por inhibición de crecimiento retrasa la liberación --
del DNA (164).

3. Esta técnica funciona bien en ensayos de destrucción extrace--
lular, pero no en ensayos de destrucción intracelular (165).

Por otro lado, se ha desarrollado un ensayo en placa el --
cual usa una población altamente purificada de monocitos activa--
dos con IFN gama recombinante, en condiciones libres de antibió--
ticos (165).

El número de bacterias sobrevivientes es cuantificado colo--
rimétricamente, usando una tinción que es reducida en proporción
al número de bacterias en crecimiento. La tinción designada MTT

[3(4,5-Dimetiltiazolil-2-il)2,5-difeniltetrazolium bromuro], es reducido por deshidrogenasas secretadas por las bacterias, para formar púrpura de formazan (185).

La tinción cuantifica el número de bacterias viables, haciendo una comparación con curvas standar, en las que se conoce el número de bacterias bajo condiciones de incubación específica con sus correspondientes densidades ópticas (185).

MATERIAL.

Monocitos humanos

IFN gama recombinante humano

Salina buferada con fosfato (FDS)

Albumina de suero de bovino

Peroxido de hidrogeno

Centrifuga

Contador Microcelular CC-130 (Sysmex)

2) METODO II.

1. La cepa de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, crecieron por 7 hrs- en caldo de soya tripticasa (TBS). Despues de ser centrifugadas a 4000 x g por 10 min a 4 C, fueron lavados y resuspendidos en RPMI a 1×10^8 / ml y refrigerado a -80 C.

2. Previamente al ensayo las bacterias fueron rapidamente descongeladas, sonicadas y diluidas en RPMI, conteniendo una concentracion subaglutinante de suero AB humano (5%). Y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

3. Una microalícuota de *L. monocytogenes* o *S. aureus* fue adicionada directamente a los macrófagos tratados con INF-gama o a macrófagos sin tratar.

4. Se agitan las placas por 20 seg. en unas microplacas y son centrifugadas a 150xg por min, para poner a la bacteria en contacto con los macrófagos.

5. Al final de la centrifugación, se lizaron los macrófagos y se liberaron las bacterias intracelulares. El TBS fue adicionado para la lisis de 100 ul, todas las placas fueron transferidas a 4 C. Una segunda placa fue incubada por 30 min a 37 C, 5% de CO₂ para permitir la destrucción, fue asignada T90.

6. Los macrófagos fueron lisados, el TBS fue adicionado y transferido a 4 C. Todas las placas fueron transferidas simultáneamente a 37 C por 8 hrs, para permitir el crecimiento de la bacteria. Al final de esta incubación se agregaron 10 ul de MTT a 1 mg/ml de concentración de cepa.

7. Las placas fueron agitadas por 20 seg y reincubadas a 37 C por 15 min. El desarrollo del Formazan (color púrpura) es proporcional al crecimiento de las bacterias presentes. El formazan se lee a 600nm.

VENTAJAS.

1. El ensayo es completamente aplicable a una variedad de MDs
2. Produce resultados similares a los obtenidos por conteo de colonias, además de que requiere poco material y poco tiempo.
3. Permite el análisis de muchas variables y el tratamiento de células efectoras simultáneamente, usando un mínimo de monocitos.

D) SUERO

La valoración de la actividad bactericida del suero puede ser usada para controlar el resultado clínico en un determinado paciente, así como puede servir como un instrumento de investigación para mejores avances en casos clínicos difíciles (187).

La actividad bactericida del suero es importante por varias razones:

1. Integra algunos de los aspectos farmacológicos y microbiológicos al mismo tiempo, que nos proporciona información de la bacteria, del hospedero y del antibiótico (187).
2. Indica indirectamente la cantidad de droga que está presente en el suero y cómo afecta al organismo hospedero (187).
3. Su determinación es fácil de realizar en cualquier laboratorio. Además es posible estudiar con estas pruebas, la combinación de antibióticos en terapias para enfermedades infecciosas (187, 190, 191).

1) METODO I

Uno de los métodos más usados para determinar la actividad bactericida del suero, es el método de dilución en tubo.

Fundamento.

Este método está basado en la inhibición del crecimiento que resulta, al poner en contacto al MO con el suero, y el punto final de destrucción se determina en la dilución más alta en la cual no ocurra crecimiento visible (198).

Material.

S. aureus (ATCC25923)

E. coli (ATCC25922)

Pseudomona aeruginosa (ATCC27953)

Caldo de Mueller-Hilton (MHB)

Standard de sulfato de bario Macfarland (187).

Metodo.

1. El suero de pacientes (0.9 ml) fue diluido en tubos que contienen 0.9 ml de MHB, dando diluciones de 1:2 a 1:256 (189).
2. Los MOs infectantes crecieron en MHB a 37 C por 3 Hrs. El cultivo fue ajustado a 10 MOs/ml de bacterias Gram (+) y 10 MOs/ml para Gram (-), usando un standard de sulfato de bario Macfarland (189).
3. Se adiciona 0.1 ml de cultivo ajustado al suero diluido (189)
4. Los tubos fueron incubados por 18 Hrs a 37 C (189).
5. La mas alta dilucion en la cual no ocurra crecimiento visible es registrado como el punto bacteriostatico (189).

Este metodo ya ha sido standarizado por Reller y Stratton. La standarizacion de este metodo puede ser usado por los macrometodos y los micrometodos (188).

1. Macro o Micrometodo: Diluir dos veces el standard (187,188).
2. Diluyente: Caldo de Mueller-Hinton (187,188).

mas concentraciones fisiologicas de Mg²⁺ y Ca²⁺
mas 50% de suero humano

3. Inoculo: 5x10³ cfu/ml en diluyente (187,188).

4. Incubación: 18 Hrs a 35°C (197,199)
5. Punto final: 99% de destrucción (197,199).

2) METODO (1).

Por otro lado, Charles G. Prober et al, describieron un micrométodo para determinar también la actividad bactericida del suero (199).

Material.

Suero

Microorganismo del propio paciente

Caldo de Mueller-Hinton

Método. (Modificación del micrométodo reportado por Stratton y Rollet) (192).

1. 0.05 ml del suero normal humano inactivado por calor (56°C - por 30 min), fueron adicionados a cada pozo de dos columnas a través de 10 hileras en la microplaca.
2. 0,1 ml de suero de pacientes fue adicionado al primer pozo de cada hilera, y se hicieron dos diluciones del suero.
3. 0.05 ml de una dilución de 10^{-3} de un cultivo de 18 a 24 Hrs - de MO en caldo de Mueller-Hinton, fue adicionado a cada pozo con una pipeta calibrada, quedando un volumen final de 0.1 ml.
4. El rango de diluciones del suero del paciente fue de 1:2 a 1:1024.
5. El contenido de las celdas fue mezclado cuidadosamente en un mezclador Vortex, fue tapado e incubado en un lugar cerrado y húmedo de 18 a 24 Hrs a 35°C.

6. Después del período de incubación se prepara una segunda celda con 0.1 ml de caldo de Mueller-Hinton en cada pozo, y se transfieren 0.005 ml de cada pozo a la celda inicial en sus respectivos pozos. La segunda celda es cubierta e incubada en lugar húmedo de 18 a 24 hrs a 35° C.

7. Después de la incubación la celda es examinada con un campo oscuro y con una luz base.

8. La más alta dilución del suero del paciente que no muestre turbidez, botón de crecimiento o caldo, es definido como la concentración bactericida del suero (SET), y representa más del 99.74% de destrucción del inóculo inicial (190).

Ventajas:

1. Este método reduce la cantidad de suero humano normal requerido como diluyente (190).
2. Es fácil de realizarse y eficiente (190).
3. Utiliza una mínima cantidad de sangre (190).
4. Comparado con el macrométodo (ver referencia 190 para el método), tiene las siguientes ventajas:
 - a) El micrométodo puede realizarse por triplicado en un tercio del tiempo requerido para realizar el macrométodo.
 - b) Este método requiere solamente 1.35 ml de suero humano para montar la técnica por triplicado, mientras que el macrométodo requiere de 4.5 ml para una sola determinación.
 - c) La pequeña cantidad del suero del paciente que se requiere tiene ventaja, cuando se realizan estudios en niños (190).

Desventaja:

1. Este método presenta dificultad para determinar el punto fi-

nal visual con MOs de bajo crecimiento o en aquellos que requieren nutrientes especiales para su crecimiento. Sin embargo, para estos MOs el suocultivo para determinar el punto final bacteriostático, ha sido modificado (ver referencia 4 para la modificación) (190).

3) METODO III.

Como ya se mencionó anteriormente, el método de dilución en tubo, es usado para determinar la actividad bactericida y bacteriostática. Es realizado por la inoculación del suero del paciente diluido en serie con el cepilo MO del paciente, y seguido de una incubación. La más alta dilución en la cual no ocurre crecimiento visible, corresponde al punto final bacteriostático. En un estudio de 317 pacientes con intenciones de endocarditis bacteriana se mostró que los pacientes que tenían un punto final bacteriostático de 1:8 o más alto, responden más favorablemente que los que tienen una actividad menor de 1:8. Richard G.D. Antonio, desarrollaron un método radiométrico de 4 hrs, para predecir si el punto final bacteriostático subsecuente, como el resultado por el método de dilución en tubo, es más grande e igual que 1:8 (189).

Fundamento:

Este método está basado en la regulación de la actividad metabólica con una mezcla de ^{14}C glucosa, ^{14}C guanidina arginina y ^{14}C glicina, y en la cuantificación del CO_2 liberado, representando este último el 1% de inhibición presentada por los

antibióticos (189).

Material

S. aureus (ATCC25923)

E. coli (ATCC25922)

P. aeruginosa (ATCC27953)

Agar soya tripticasa

Caldn de Mueller-Hinton (MHB)

Antibióticos: Penicilina, Cefalosporinas

Carbóno 14 (¹⁴C)

Método:

1. El suero del paciente fue dividido en porción control y porción prueba. La porción prueba se diluyó seriadamente de 1:5, 1:15, 1:35, adicionando 0.5 ml en frascos con 0.5 ml de MHB. De cada dilución se prepararon al menos dos frascos (189).
2. El frasco fue tapado y se adicionó el sustrato radiactivo (ver referencia 3 para su preparación) (189).
3. La inactivación de las bacterias en la porción control, se realizó de acuerdo a la referencia 187 (189).
4. El suero inactivado fue diluido seriadamente en frascos que contenían 0.5 ml de MHB, quedando diluciones de 1:8, 1:15 y 1:32. Se prepararon al menos dos frascos por cada dilución. El frasco se tapó y se adicionó el sustrato radiactivo (189).
5. El cultivo de 1 hr del organismo infectante fue ajustado a 10^5 MDs/ml para Gram (+) y 10^5 MDs/ml para Gram (-) (3).
6. Se adiciona 0.05 ml de cultivo ajustado a todos los frascos control y de prueba (189).

7. Se incuban todos los frascos a 37°C por tres hrs. Al final de este período, el frasco fue puesto en hielo para detener el metabolismo bacteriano (189).

8. El CO₂ liberado, fue cuantificado en un SACTEC-R-201, y registrado con unidades de índice metabólica (MIV: 100 MIV = 0.025 g. de actividad de 14C) (189).

9. El % de inhibición para cada dilución es calculado con la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{[(\overline{\text{MIV}} \text{ frasco control}) - \overline{\text{MIV}} \text{ frasco prueba}]}{(\overline{\text{MIV}} \text{ frasco control})} \times 100$$

En donde MIV representa el promedio de dos frascos (189).

Ventajas:

1. Este método requiere solamente 4 hrs para su ejecución, acelerando así las decisiones clínicas y ajustes de dosis, tipo y vía de administración del antibiótico (189).
2. Los cambios en la turbidez del medio no interfieren con los resultados, porque el índice de crecimiento bacteriano está basado en la producción del ¹⁴CO₂ (189).
3. Tiene potencial para usarse con otros fluidos del cuerpo, tales como plasma, orina, sangre completa, etc.. (189).
4. La estandarización, la simplificación y la automatización son factibles (189).

Desventajas:

Este método tiene un 60% de inhibición final y con este porcentaje, no es posible predecir si el punto final bacteriosta

tico es igual o mayor al de 1:9 del método de dilución en tubo, aun cuando hay una buena correlación entre ambos métodos. Es decir el grado de inhibición por el método radiométrico, no puede ser usado para distinguir entre los niveles de antibióticos tóxicos.

VI. RESUMEN

Una vez que entra la bacteria al torrente sanguíneo, los neutrófilos y monocitos, interactúan primeramente con los factores quimiotácticos, antes de interactuar con este MO; esto es porque la migración de los neutrófilos al sitio de invasión es la respuesta a una estimulación de los factores quimiotácticos.

Además de estos factores, existen sustancias que ayudan a la quimiotaxis, tales como la lactoferrina y fibronectina.

En la fagocitosis, en primer lugar se establece una unión entre la partícula y la superficie de la membrana plasmática de la célula fagocítica. Para esta fase es necesaria la presencia de cationes divalentes, no depende de la temperatura y en ella intervienen una serie de receptores de la membrana. En esta fase también interviene la Fn, molécula que ayuda a la adhesión de las bacterias por las células sanguíneas.

Una vez que la partícula se ha unido a la membrana, se inicia la fase de ingestión; la partícula es rodeada por una invaginación de la membrana plasmática, que finalmente se cierra y penetra en el citoplasma para formar la vacuola fagocítica. La fagocitosis es estimulada por sustancias como el Factor Biológico Activo (PSF), Fn y la Tuftcina.

Después de formarse la vacuola fagocítica, esta penetra en el citoplasma; en este lugar se produce una fusión con gránulos de tipo lisosómico que vacían su contenido en la vacuola que contiene a la bacteria, las membranas del gránulo y de la vacuola se fusionan entre sí, formando un fagolisosoma o vacuola digestiva.

Se piensa que la destrucción bacteriana se produce en el fagolisosoma a causa de la acción del contenido de los lisosomas.

Los componentes de los gránulos poseen una potente acción antibacteriana como: la Lactoterrina, proteína que se une al hierro a un pH bajo, esto hace que el hierro sea casi inprovechable como especie iónica libre por las bacterias, o bien el hecho de que exista en el medio poco hierro, favorece el funcionamiento de otros agentes bactericidas; la BFI, altera la membrana de bacterias Gram (+), permitiendo la entrada de sustancias hidrofóbicas a la bacteria; defensinas, constituyente mayor de los gránulos en mamíferos, presentan actividad antibacteriana a un pH de 7.8 y a una fuerza iónica baja para bacterias Gram (+) y (-); los gránulos de los leucocitos poseen también una gran cantidad de proteínas cationicas que afectan a la barrera de permeabilidad en las bacterias Gram (+) y (-); la fosfolipase A₂ de leucocitos participa en el ataque a los fosfolípidos bacterianos, esto es crucial para obtener mejores resultados en la destrucción de bacterias; proteínas lisosomales como la lisozima, capaz de hidrolizar los compuestos mucopeptídicos de las bacterias susceptibles haciéndolas sensibles a los choques osmóticos.

Estas sustancias derivadas de los gránulos de los PMN, se han implicado como mediadores en la destrucción de bacterias por la vía oxígeno-independiente.

Como consecuencia del estallido respiratorio provocado por la fagocitosis, se produce ácido láctico, por lo que disminuye el pH de la vacuola fagocítica pudiendo llegar hasta 4, lo cual es suficiente para destruir ciertas bacterias patógenas. El meca

nismo por el cual el pH intravascular desciende, aun no es conocido pero se propone por un lado la formación del ácido láctico y por otro lado la presencia de H^+ bombeado de la mitocondria, quizá por el sistema anhidrasa carbonica.

Otra consecuencia del estallido respiratorio es el aumento en la producción de H_2O_2 que posee tambien una acción bactericida, este se produce desde la oxidación del NADPH, este reduce oxígeno a superóxido, el cual cambia al H_2O_2 por la superóxido dismutasa. El NADPH es regenerado del derivado hexosa monofosfato. Por esta vía la actividad del NADPH oxidasa termina en la máxima producción de H_2O_2 .

Los fagocitos monocitares tambien se someten al estallido respiratorio asociado a la fagocitosis.

El sistema oxígeno dependiente frecuentemente es referido como el sistema H_2O_2 -MPO-haluro, aunque se sabe que la ausencia de la MPO no afecta grandemente la actividad bactericida, ya que el H_2O_2 es tóxico por si mismo (bacterias sin catalasa), y puede generar radicales extremadamente reactivos, tal como el radical OH. El sistema peroxidasa- H_2O_2 -haluro, tambien se lleva a cabo en los eosinófilos, con la peroxidasa llamada Eosinófilo peroxidasa (EPO). Este sistema bactericida funciona igual que en los neutrofilos pero en estos es mas eficiente la habilidad bactericida, quizá esto se atribuye a que los eosinófilos tienen un bajo potencial fagocítico.

El sistema H_2O_2 -MPO-haluro produce agentes tóxicos que pueden atacar a los MOs por varias vías. Como el cloro como haluro se forma el ácido hipocloroso, el cual es un potente agente bac-

tericida. El hipoclorito generado también forma oxígeno singlete contribuyendo a la toxicidad. El HOCl una vez en la vacuola fagocítica puede reaccionar con proteínas formando agentes de cloración como: Cl⁺, N-cloroamino, N-cloroamida.

El oxígeno singlete es formado también por otras interacciones del anión superóxido con el H⁺, OH⁻ y H₂O₂.

Otra reacción del H₂O₂ es con el anión superóxido, el cual ejerce citotoxicidad a través de su producto, el radical OH⁻ en la reacción de Haber-Weiss o este producto también puede ser producido del H₂O₂ con el hierro, en la reacción de Fenton.

Los componentes citoplasmáticos están protegidos del exceso del H₂O₂, por la catalasa y por el sistema glutatión, en el cual la oxidación del glutatión reducido y oxidado, resulta en la utilización del H₂O₂ para que el derivado hexosa monofosfato reoxida al NADPH. Así la producción del H₂O₂ por los PMN, es un arma de doble filo, críticamente involucrada en la defensa del hospedero y lesión de las bacterias.

El oxígeno singlete generado del sistema MFU-H₂O₂-haluro, es muy reactivo por su especial afinidad para atacar a los compuestos que tienen dobles ligaduras. La fagocitosis de la bacteria está asociada con la emisión de pequeñas cantidades de luz, es posible que el ¹O₂ puede estar causando la excitación secundaria de otras partículas para provocar la difusa formación de luz (CL). La CL también es inducida por péptidos de formilmetionina, éstos son formados en la bacteria y, es probable que su acción represente una importante respuesta fisiológica. Los oxidantes que intervienen en la reacción oxidativa de la CL son el Oxígeno

molecular a el H₂O.

Los monocitos así como los neutrófilos liberan O₂ generan CL durante la fagocitosis, esta liberación del oxígeno superóxido puede ser inducida en los monocitos por sustancias solubles capaces de alterar la membrana, tales como la fosfolipasa C y el ristato acetato ferrol. El interferón como linfocina, juega un papel importante en la activación de los monocitos junto con el CA transitorio, que facilita que el interferón realice su función en el mejoramiento del estado respiratorio.

La destrucción intracelular por monocitos es estimulada por factores como suero, interacción de su receptor CD3 con el CD3 de la bacteria, por la parte Fc de la IgG con el receptor Fc de la membrana del monocito. Además la IgG y el C₃ tienen efecto en la liberación de enzimas lisosomales. La fagocitosis juega un papel esencial en el daño a tejidos y en la protección citotóxica.

El sistema dependiente de oxígeno puede ser inhibido por la endotoxina lipopolisacárido que reduce la función de PMN humanos por disociación del metabolismo de glucosa, en el consumo de oxígeno y de la actividad bactericida. Sin embargo, la disminución observada en la actividad bactericida no es el resultado de una fagocitosis disminuida. Otro factor inhibitorio es la hemoglobina (principal acarreador de oxígeno), esto puede ser debido a la remoción de oxígeno en el medio circundante de los PMN por la hemoglobina reducida.

La oxina, agente bacteriense lipofílico, puede dañar a las células por ligamiento de metales intracelulares esenciales, ha-

ciéndolos inaprovechables para las reacciones metabólicas. El mecanismo por el cual sucede este proceso no es bien conocido.

La elastasa es un componente importante en la acción bactericida, ayuda a la potencialización de los dos sistemas: dependiente e independiente de oxígeno.

Por otro lado, se ha estudiado que en algunos estados patológicos se requieren de preparaciones de inmunoglobulinas, como agentes terapéuticos. Una preparación de éstas es la SRK-Ig, para aplicación intravenosa, esta presenta actividad opsonica cuando existe deficiencia de Acs, también facilita la opsonización y destrucción de bacterias por neutrófilos cuando interactúa con el C'.

Otra preparación de Ig es la IGIVs (intravenosa), importante contra enfermedades infecciosas, inhibe la fiebre inducida por LPS e inhibe la producción de factores pirógenicos endógenos esto puede ser por el volumen de Acs y por el contenido de IgG en la preparación.

La adición de preparaciones de gama globulina, como fuente de opsoninas, incrementa la actividad fagocítica de muchos individuos inmunodeficientes.

Por otro lado, vemos que paraproteínas como IgA se puede dar una inhibición de la ingestión en los PMN, esto puede ser debido a la interferencia de los receptores de los PMN para opsonizar.

El C' actúa sobre los lípidos o lipoproteínas de la pared celular de las bacterias. La unión de C' a los LPS se lleva a -

cabo en la región B del lípido de la molécula.

Las bacterias de forma S (lisa) no tienen afinidad por el C₁, son capaces de unirse a C₁ cuando la porción del azúcar del LPS, es reducido.

El C₂ y la activación de la vía clásica, son necesarias para la destrucción óptima de *Staphylococcus* por los PMN, pero no para *E. coli*.

El hallazgo de la actividad bactericida deficiente en algunos recién nacidos, ha sido asociado a los bajos niveles de C₁ y C₄.

La vía alterna del C₃ puede ser activada por la superficie bacteriana de polisacáridos independientes de Aca, así como por el ácido teicoico de la pared celular de las bacterias.

Los once componentes de la APC, son capaces de destruir a *E. coli* en ausencia total de Igs u otros factores del suero. La destrucción es asociada a distintos cambios morfológicos de la bacteria, pero no a su desintegración. La adición de Igs al sistema genera un efecto positivo sobre esta destrucción.

Existe una alta incidencia de defectos en la opsonización de levaduras, en niños con infecciones recurrentes o enfermedades atópicas, debido a la activación defectuosa de la APC. Este defecto parece ser hereditario.

La interacción entre proteínas del suero y MQs, lleva a la generación de factores quimiotácticos y promueve la ingestión de MQs por los PMN y monocitos.

La función de las Igs de suero hipogamaglobulinémico en la destrucción de bacterias, depende de la reconstitución de este.

por la adición de Igs.

Los componentes del C' y Acs son necesarios para la destrucción óptima en suero de ciertas bacterias, como para *Capsulotropha* SA.

La unión del suero con antibióticos, muestra una interacción cooperativa para los mecanismos de defensa del hospedero, - que explica porqué los antibióticos son más deficientes in vivo que in vitro.

Se cree que los antibióticos actúan alterando la permeabilidad de la membrana externa, aumentando la concentración intracelular del antibiótico a un nivel bactericida.

Por otro lado las bacterias B(+) y G(+), se comportan como mitógenos y estimulan a los linfocitos T y B humanos, para elaborar anticuerpos, proliferar y producir Acs.

Para que la respuesta inmune mediada por células se lleve a cabo, se necesita la participación de las células T cooperadoras las cuales reconocen al Ag procesado en el contexto de Ag de clase II del MHC.

La interacción física entre las células T y B, es necesaria para que se de la producción de Acs a un Ag específico. De esta interacción resulta la lisis en el caso de células blancas y la sensibilidad a linfocinas derivadas de las células T en el caso de las células B.

En esta interacción intervienen las moléculas: LFA-1, L3T4, thy-1.2 y la molécula I-a.

Tanto el IFN- γ y la IL-2, promueven la proliferación y diferenciación de las células secretoras de Igs de células B. El me-

canismo por el cual el IFN- γ ejerce esta actividad sobre las células E, no es aun conocida, pero se propone que pueda tener actividad BCGF, aumentar la liberación de IL-1 o bien incrementar la expresión de receptores en la célula E.

En cuanto a métodos para medir la actividad bactericida, se han desarrollado diversas técnicas cuyo fundamento está basado en: tinción (añadida de acridina, azul de metileno, NBT), densidad óptica, inhibición de crecimiento, medición del crecimiento bacteriano por la producción del ^{14}C , liberación de DNA y métodos basados en la CL.

Los métodos que utilizan la tinción son: a) rápidos, b) producen resultados cuantitables y c) en general usan pequeñas cantidades de células. Pero tienen la desventaja de ser aplicables sólo para grandes MOs como las levaduras y no para bacterias, además de presentar confusión al observar el color de ciertos MOs con el colorante usado. Miden la actividad microbicida, fagocitica intracelular y el porcentaje de destrucción.

Los ensayos que utilizan la densidad óptica, tienen la ventaja de ser rápidos y eliminan la desventaja del método en placa en donde hay error al efectuar el conteo de MOs muertos, o bien, la interferencia que provoca la aglutinación de las bacterias, sin embargo, es incapaz de discriminar entre las bacterias que sobreviven intracelularmente. Miden actividad fagocitica y porcentaje de destrucción.

Los métodos cuyo fundamento versa en la inhibición de crecimiento, son muy aplicables para medir la actividad bactericida del suero, requieren pequeñas cantidades de este, son de fácil

manejo. No obstante, presenta error visual en la determinación del punto final, sobre todo en MÓs de difícil crecimiento. Proporcionan información sobre la actividad bactericida y bacteriostática.

Una variante de estos métodos, es la medición del crecimiento bacteriano por la producción del $^{14}CO_2$ y la liberación de DNA de los MÓs, ambos evitan los errores de los métodos de inhibición del crecimiento, el primero, puede ser estandarizado, simplificado y automatizado; el segundo no es funcional para MÓs -- que presentan resistencia a la degradación necesaria para la liberación de DNA, además de no detectar la destrucción intracelular. Ambos métodos miden la actividad fagocítica.

Por otro lado, utilizando la CL para medir la actividad fagocítica, se requieren pequeñas cantidades de células, se pueden utilizar un amplio rango de MÓs, a diferencia de los métodos de dilución en tubo y tinción, pero el instrumento para medir la CL es costoso y pueden existir subpoblaciones con diferentes actividades metabólicas y funcionales que alteren la respuesta quimioluminiscente celular. La CL puede usarse para medir la actividad fagocítica.

VI) CONCLUSIONES

La actividad bactericida de los PMN, es el resultado de la acción conjunta de diversos mecanismos, como el sistema dependiente o independiente de oxígeno.

En este último, vemos la importancia que tienen cada una de las sustancias que intervienen en él, como la LF, BPI, las defensinas, proteínas cationicas, Fosfolipasa A₂ y Proteínas liposomales, las cuales ejercen su actividad directamente en la estructura bacteriana, haciendo así que se provoque la destrucción de MO.

Es poco conocida la naturaleza de los sistemas autóctonos, a través de los cuales se lleva a cabo el daño en la pared celular de las bacterias, sin embargo, estos estudios nos han permitido conocer, que existen ciertos componentes de las células con características propias, y que poseen selectividad sobre ciertos MO, ayudando así a la defensa del hospedero. Así como la LF y En que tienen acción quimiotáctica sobre las células sanguíneas; el PSF y la Tuftsin, que estimulan la fagocitosis.

El sistema dependiente de oxígeno, es también muy importante en la defensa del hospedero contra MO, a través de sus productos tóxicos formados durante las reacciones producidas en este sistema, teniendo así una importancia especial el sistema H₂O₂ - MPO-Halógenos, la producción de O_2 , la producción de OH⁻ (por la reacción de Haber-Weiss o reacción Fenton), además a la regulación que se tiene del peróxido de hidrógeno por enzimas como la catalasa y la GSH.

Se sabe que para que la destrucción de la bacteria sea efec

tiva, se necesita del sistema MPO, así, los PMN que carecen de esta enzima tienen deficiencias en la destrucción de la bacteria sin embargo, en la ausencia de esta enzima, el estallido respiratorio aumenta, debido a un incremento de los productos de reducción del oxígeno.

La descomposición exotérmica de un peróxido, genera directamente compuestos carbonilo en un estado electrónicamente excitado y ello forma la base de casi toda la CL orgánica.

La producción de luz puede ser usada para determinar la cantidad de bacterias fagocitadas, permitiendo así observar la eficiencia de las células fagocíticas y por consiguiente la actividad bactericida.

Los monocitos son significativamente menos activos que los neutrofilos en la elaboración del anión superóxido y en la generación de CL.

La actividad bactericida del leucocito se debe tanto a los componentes lisosómicos como a otros productos metabólicos, sin embargo, en los monocitos (M₁), solo es posible el mecanismo dependiente de oxígeno.

Los PMN pueden ser más activos que los MNs o AMs, en la adhesión e ingestión de las bacterias, aunque la velocidad de destrucción intracelular es similar para ambas células, las bases para estas diferencias aún no son conocidas, pero posiblemente se deba a su alta densidad de receptores en su superficie de los PMN. La cinética de la fagocitosis por los PMN y MN cambia significativamente al variar la fuente opsonica.

La fracción Fc de la IgG y el C3b del C' estimulan la des--

trucción en los monocitos, vía receptores específicos, sobre la superficie de la célula.

La actividad microbicida de los eosinófilos, no es tan representativa como lo es la de los neutrófilos, sin embargo, los eosinófilos contribuyen en la defensa contra un MO, liberando componentes por medio del sistema peroxidasa.

Sustancias como la fosfatasa alcalina, parece no estar involucrada en la actividad bactericida, ya que en estudios hasta ahora disponibles, los resultados indican, que la deficiencia en la actividad fagocítica de individuos con deficiencia en LAP, -- también tenían otras disfunciones. Mas estudios son necesarios para definir la función de esta enzima.

Aun cuando el incremento en la temperatura favorece al hospedero en la destrucción de ciertos MO, también le proporciona desventaja frente a otros MO. Por lo que con los datos disponibles no se puede afirmar algún efecto de esta variable sobre la destrucción de bacterias.

En ausencia de un fragmento de bazo, o de cierta cantidad de hierro, o un organismo con tumores, se presenta como consecuencia un número de disfunciones celulares que afectan la defensa del hospedero.

Además de la función esencial que tienen las IgG en la respuesta inócupe, existen preparaciones de estas IgG que presentan actividad bactericida funcional, y que pueden servir como un valioso terapéutico o profiláctico en pacientes con inmunodeficiencia.

Las estructuras por las que se une el C1 a las bacterias son los LPS y proteínas de la membrana externa. En la vía alterna la activación ocurre por los polisacáridos independientes de Acs, así como por el ácido teicoico de la pared celular de las bacterias.

El C2 es importante para la destrucción optima de S. aureus.

La eficiencia de la APC puede ser reconstituida *in vitro* con seis proteínas purificadas (C2, Bf, Df, EIM, C3b, INA y properdina). Esto no excluye que otros factores reguladores existan en el suero humano y que modulen la activación de la APC.

Son necesarios más estudios bioquímicos para identificar las fracciones del suero (o actividades), en la ausencia de suero atópico para entender, si los resultados pueden ser útiles para el diagnóstico, prevención y posible terapia de los defectos de opsonización en la vía alterna.

Existe una buena correlación entre la destrucción mediada por suero y la acción de la vía clásica dependiente de Acs.

Es importante el efecto bactericida que tienen los antibióticos en el suero humano, ya que tienen efectos directamente sobre la bacteria, provocando así una destrucción más eficiente.

Tanto los linfocitos B como los T, son importantes en la respuesta inmune frente a una bacteria, debido a que poseen receptores en sus membranas que les permiten interactuar con el Ag y consecuentemente entre ellas mismas, logrando la activación, proliferación y producción de Acs, para el Ag en cuestión.

El conocimiento de estos mecanismos y la cooperación de cada elemento participante, nos lleva a conocer más profundamente

la respuesta inmune normal de las células sensitivas frente a una bacteria, ya que los conocimientos de los mecanismos normales, serán útiles para resolver problemas en las patologías, donde el sistema inmune está fuertemente impedido.

La respuesta inmune es pues, el resultado de la acción conjunta de sistemas microbianos y componentes, cuya acción es vital, logrando así que el animal sea inmune por un defensor maravilloso de nuestro organismo.

Todas las técnicas descritas tienen ventajas y desventajas, que pueden ser aprovechadas por el investigador de acuerdo al interés del estudio. Es también importante notar que en general -- pueden utilizarse todas las células fagocíticas para casi todas las técnicas, con la excepción de monocitos y/o M ϕ , las cuales -- presentan dificultad en su separación.

Son necesarios más estudios para perfeccionar estas técnicas, y lograr que sean métodos fáciles, rápidos y menos costosos. De tal forma que sean accesibles a la mayor parte de los laboratorios y por consiguiente la valoración de la actividad fagocítica, sería un dato clínico importante en las patologías relacionadas con la disfunción de las células fagocíticas.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Laporta Z. Marcia, Silva M.N. Lourdes, Scallity R. G., Igarbel y Trabulsi R. Luiz; 1976. Flagella coding for drug resistance and localized adherence to HeLa cells in enteropathogenic *Escherichia coli* O55:H and O55:H₆. Infection and Immunity. 51 (2); 715-717.
- 2) Joiner Keith, Brown John, Hammer Carl, Warren Keith y Frank Michael; 1983. Studies on the mechanism of bactericidal resistance to Complement mediated killing. The Journal of Immunology. 130 (2); 845-849.
- 3) Jamlin B. L., Spector S., Rodrick E.G. y Friedman H.; 1961. Differential Complement Activation and Susceptibility to Human Serum Bactericidal Action by Various Species. Infection and Immunity. 42 (3); 1157-1190.
- 4) Joiner A. Keith, Fries P.Louis y Frank H.Michael; 1983/1987. Studies of antibody and complement function in host defense against bacterial infection. Immunology Letters. 19: 197-202.
- 5) Reynard M. Allen y Beck E. Mary; 1976. Flagellin-Mediated Resistance to the Bactericidal Effects of Normal Rabbit Serum. Infection and Immunity. 14 (1); 643-650.
- 6) Odueru A. Joseph, Wiseman M. Gordon y Ronald K.Allan; 1983. Role Lipopolysaccharide and Complement in Susceptibility of *Haemophilus ducreyi* to Human Serum. Infection and Immunity. 50 (2); 495-499.
- 7) Rose H. Anthoni, Ph.D; Microbiología química. Editorial Alhambra. 2a. Edición española; pp: 80-91, 94-100; 1977.
- 8) Braude; Microbiología clínica. Editorial Panamericana, 1a Edición. México. pp:535-540; 1984.
- 9) Ortiz Ortiz, Librado; Inmunología. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Méx.D.F.; pp: 136-150, 75-80, 29-35, 7-13; 1967.

- 10) Baruj Benacerraf, M.D., Unanue R. Emil, M. D.; Textbook of -
Immunology. Editado por Williams and Williams, Baltimore/Lon-
don, 1.a Edición; pp: 49-52, 76-80, 100, 265, 267; 1979. --
- 11) Davidson Israel, M.D., Bernard Henry John, M.D.; Diagnosti-
co Clínico por el Laboratorio. Editorial Salvat Editores --
S.A. 6a Edición Barcelona (España); pp: 152-161; 1983.
- 12) Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg, Wod; Tratado de microbiolo-
gía con inmunología y genética molecular. Editorial Salvat-
Editores, 2a reimpresión Barcelona (España); pp: 671-674. --
751, 533-547, 433-466, 671-678; 1979.
- 13) Seistad E. Michael, Szlianek Dorothy y Lehrer I. Robert; 1984.
Purification and Antibacterial Activity of Antimicrobial --
Peptides Rabbit Granulocytes. Infection and Immunity. 45 --
(1); 150-154. ---
- 14) Elsbach Peter, Weiss Jerrold, Franson C. Richard, Quagliata-
Beckerditte Susan, Schneider Abia y Harris Lesley; 1979. ---
Separation and Purification of a Potent Bactericidal/Permea-
bility Increasing Protein and Closely Associated Phospholi-
pase A2 from Rabbit Polymorphonuclear Leukocytes. The Jour-
nal of biological chemistry. 254 (21); 11000-11009.

- 15) Weiss Jerrold, Elsbach Peter, Olsson Inge y Odeberg Hakant;
1978. Purification and Characterization of a Potent Bacte-
ricidal and Membrane Active Protein from the Granules of --
Human Polymorphonuclear Leukocytes. The Journal of Biologi-
cal chemistry. 253 (8). 2664-2672.

- 16) Elsbach Peter y Weiss Jerrold; 1985. Oxygen-dependent and -
oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of -
neutrophils. Immunology Letters. 11 (3-4); 159-163.

- 17) Tedesco Francesco, Rottini Giandomenico, Roncelli Lucia, --
Basaqila Marina, Menegazzi Renzo y Patriarca Pierluigi; ---
1986. Bactericidal Activities of Human Polymorphonuclear --
Leukocyte Proteins against Escherichia coli O111:B4 coated
with C5 or C6. Infection and Immunity. 54 (1); 250-254.

- 18) Rozenberg-Anska M., Salters C.E.M., Strijp Van G.A.J., Geuze
J.J. y Verhoef J.; 1985. Electron Microscopic Study of Phag-
ocytosis of Escherichia coli by Human Polymorphonuclear --
Leukocytes. Infection and Immunity. 50 (3); 852-859.

- 19) Kowalska Mariola y Denys Andrzej; 1980. Bactericidal Properties of Lysosomal Proteins Obtained from Human Polymorphonuclear Leucocytes (PMNL) Examined *in vitro*. I. Characteristics of Obtained Fractions of Lysosomal Proteins. *Zentralbl. Bakteriol* (53), 171 (1); 55-63.
- 20) Kowalska Mariola, Denys Andrzej y Scydlovska Teresa; 1981. II. Morphological Estimation of cells treated with Lysosomal Proteins. *Zentralbl. Bakteriol* (53), 171 (1); 64-68.
- 21) Denys Andrzej, Kowalska Mariola y Bralor Jerry; 1980. III. Examinations *in vivo*. *Zentralbl. Bakteriol* (53), 171 (1); 69-72.
- 22) Cross S. Alan y Lowell H. George; 1987. Stimulation of Polymorphonuclear Leucocyte Bactericidal Activity by Supernatants of Activated Human Mononuclear Cells. *Infection and Immunity*. 22 (2); 592-597.
- 23) Rosen Henry y Klebanoff 1979. Bactericidal Activity of a Superoxide anion-generating system. *Journal. Experimental Medical*. 149 (1); 27-39.
- 24) Arnold R. Roland, Cole F. Michael, McShea R. Jerry; 1977. A Bactericidal Effect for Human Lactoferrin. *Science*. 197; 265-268.
- 25) Sullen J.J. y Armstrong J.R.; 1979. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*. 36 (4); 701-191.
- 26) Ward C. Gilon, Hammond S. Jeffrey y Bullen J. John; 1986. Effect of Iron Compounds on Antibacterial Function of Human Polymorphs and Plasma. *Infection and Immunity*. 51 (3); 723-730.
- 27) Laforce F. Marc y Boose S. Dorothy 1987. Release of Lactoferrin by Polymorphonuclear Leucocytes after Aerosol Challenge with *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 55 (9); 2293-2295.
- 28) Ambruso R. Daniel y Johnston S. Richard; 1981. Lactoferrin Enhances Hydroxyl Radical Production by Human Neutrophils, Neutrophil Particulate Fractions, and an Enzymatic Generating System. *J Clin Invest*. 67 ; 352-360.

- 29) Macson D.L., M.D., Heremans J.F., M.D. y Schonne C.; 1969. Lactoferrin an iron-binding protein of neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* 130: 643-655.
- 30) Koivuranta-Vaara Paivi, Banda Diane y Golstein M. Inc.; 1987. Bacterial-Lipopolysaccharide-Induced Release of Lactoferrin from Human Polymorphonuclear Leukocytes: Role of Monocyte-Derived Tumor Necrosis Factor. *Infection and Immunity.* 55 (12): 2956-2961.
- 31) Green Ira, Kirkpatrick H. Charles y Balos G. David.; 1971. Lactoferrin-Specific Localization in the Nuclei of Human Polymorphonuclear Neutrophilic Leukocytes. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 137; 1311-1317.
- 32) Ambruso R. Daniel, Sasada Masataka, Nishiyama Hidaki, Kubo Hiomi, Komiyama Atsushi y Allen H. Robert.; 1984. Defective Bactericidal Activity and Absence of Specific Granules in Neutrophils from a Patient with Recurrent Bacterial Infections. *Journal of Clinical Immunology.* 4 (1): 23-30.
- 33) Oseas Ronald, Yang Hsin-Hsin, Lachner I. Robert y Boxer A. Laurence.; 1981. Lactoferrin: A Promoter of Polymorphonuclear Leukocyte Adhesiveness. *Blood.* 57 (5); 939-945.
- 34) Bortner A. Carol, Miller D. Richard y Arnold E. Roland.; 1986. Bactericidal Effect of Lactoferrin on *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity.* 51 (2); 373-377.
- 35) Borregaard.; 1984. Bactericidal mechanisms of the human neutrophil. *Scand J. Haematol.* 52; 225-230.
- 36) Clifford F. Dennis y Repine E. John.; 1982. Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 49; 143-149.
- 37) Klebanoff S.D., Valles M.A., Harlan J.M., Sparks L.H. y Gamble J.R.; 1986. Stimulation of neutrophils by TNF. *J. Immunol.* 136; 4220-4225.
- 38) Rechcigi Miloslav y Evans H. Warren.; 1963. Role of Catalase and Peroxidase in the Metabolism of Leucocytes. *Nature.* 197 (4897); 1001-1002.

- 39) Odeberg H. y Olsson I.; 1976. Microbicidal Mechanisms of Human Granulocytes: Synergistic Effects of Granulocyte Elastase and Myeloperoxidase on Chymotrypsin-like Cationic Protein. *Infection and Immunity*. 14 (6); 1276-1283.
- 40) Peterson K. Phillip, Verhoef Jan, Schmelting David y Gure B. Paul.; 1977. Kinetics of Phagocytosis and Bacterial Killing by Human Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes. *The Journal of Infectious Diseases*. 136 (1) 502-509.
- 41) Klebanoff J. Seymour, M.D., Ph.D.; 1979. Oxygen Metabolism and the Toxic Properties of Phagocytes. *Annals of Internal Medicine*. 93; 430-439.
- 42) Repine E. John, Clawson C.C. y Brannigan B. Richard.; 1976. Regional pattern of bactericidal activity of neutrophils deficient in granules, myeloperoxidase, and alkaline phosphatase. *J. Lab. Clin. Med.* 88 (5); 758-765.
- 43) Hakim-J.; 1980. Physiology and pathology of bactericidal activity in human polymorphonuclear neutrophils. *Revue Presse-Med.* 9 (37); 2241-2245.
- 44) Babig G. Theodore y Babier M. Bernard. 1977. The Glutamine Oxidase Responsible for the Respiratory Burst in Human Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 252 (18); 9070-9074.
- 45) Murata Teizo, Sullivan R. James, Sawyer W. Daniel y Mandell L. Gerald.; 1987. Influence of Type and Opsonization of Ingested Particle on Intracellular Free Calcium Distribution and Superoxide Production by Human Neutrophils. *Infection and Immunity*. 55 (9); 1784-1791.
- 46) Johnston B. Richard.; 1978. Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages. *Federation Proceedings*. 37 (13); 2759-2764.
- 47) Root R.K., Metcalf J., Gshine N. y Chance B.; 1973. H₂O₂ Release from Human Granulocytes During Phagocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 55 ; 940-955.
- 48) Segal A.W.; 1984. How do phagocytic cells kill bacteria? *Medical Biology*. 62; 81-84.

- 49) Gabay C. Joella, Heiple M. Jeanne, Cohn A. Zanvil y Nathan F. Carl.; 1986. Subcellular location and properties of ---- bactericidal factors from human neutrophils. J. Exp. Med. -- 164: 1407-1421. ---
- 50) Modrakowski M.C. y Spitznagel J.K.; 1979. Bactericidal --- Activity of Fractionated Granule Contents from Human Poly-- morphonuclear Leukocytes: Antagonism of Granule Cationic -- Proteins by Lipopolysaccharide. Infection and Immunity. 25 (2); 597-602. --
- 51) Hoidal R. John, Schenling David y Peterson E. Phillip.; --- 1981. Phagocytosis, Bacterial Killing, and Metabolism by -- Purified Human Lung Phagocytes. The Journal of Infectious - Diseases. 141 (1); 61-71. ---
- 52) Cooper M. Robert, DeChatelet R. Lawrence, McCall E. Charles et al.; 1972. Complete Deficiency of Leukocyte Glucose-6---- Phosphate Dehydrogenase with Defective Bactericidal Activi- ty. The Journal of Clinical Investigation. 51 : 769-776. ---
- 53) Dijkmans A.C. Ben, Leigh D.J. Peter, Braet G.P. Armando y Van Furth Ralph.; 1985. Effect of Bacterial Competition on the Opsonization, Phagocytosis, and Intracellular Killing - of Microorganisms by Granulocytes. Infection and Immunity. 49 (1); 219-224. ---
- 54) Pennington E. James, Rossing H. Thomas y Boerth W. Lisa.; - 1983. The Effect of Human Alveolar Macrophages on the Bactericidal Capacity of Neutrophils. The Journal of Infec- tious Diseases. 148 (1); 101-109. ---
- 55) Tasaka Kachio y Hamashima Yoshihiro.; 1979. Function of Pha- gocytosis and Intracellular Killing of Peripheral Neutro---- phils in Kawasaki disease. Acta Path. Jap. 28 (2); 247-255. --
- 56) Modrakowski M.C., Cooney M.H., Martin L.E. y Spitznagel J.K. 1979. Bactericidal Activity of Fractionated Granule Contents from Human Polymorphonuclear Leukocytes. Infection and Immu- nity. 23 ; 587-591. ---
- 57) Modrakowski M.C., Goodrum K.J. y Spitznagel J.K.; 1981. --- Bactericidal Activity of Fractionated Granule Contents from Human Polymorphonuclear Leukocytes" Studies with Leukocytes from Normal Individuals. Infection and Immunity. 33 (2); -- 643-645. ---

- 58) Lehninger L. Albert.; *Biochimica*. Ediciones Omega. S.A. 2a Edicion. Barcelona. pp: 216,500,514. 1982.
- 59) Odeberg M. y Olsson I.; 1976. Mechanisms for the microbicidal Activity of Cationic Proteins of Human Granulocytes. *Infection and Immunity*. 14 (6); 1269-1276.
- 60) Shafer W.M., Martin L.E. y Spitznagel J.H.; 1984. Cationic Antimicrobial Proteins Isolated from Human Neutrophil Granulocytes in the Presence of Diisopropyl Fluorophosphate. *Infection and Immunity*. 40 (1); 17-25.
- 61) Farley . Monica. Shafer M. William y Spitznagel H. John.; 1987. Antimicrobial Binding of a Radiolabeled Cationic Neutrophil Granule Protein. *Infection and Immunity*. 55 (6); 1526-1539.
- 62) Shafer M. William. Dhunka C. Victor y Martin E. Larry.; 1985. Antigonococcal Activity of Human Neutrophil Cathepsin G. *Infection and Immunity*. 54 (1); 184-188.
- 63) Gennaro Renato, Dolzani Lucilla y Romeo Domenico.; 1985. Potency of Bactericidal Proteins Purified from the Large Granules of Bovine Neutrophils. *Infection and Immunity*. 40 (2); 634-690.
- 64) Henson M. Peter.; 1971. The Immunologic Release of constituents from neutrophil leukocytes. *The Journal of Immunology* 107 (6); 1535-1546.
- 65) Ishibashi Yoshio y Yamashita Tatsunisa.; 1985. Identification of Precursor of Phagocytosis-Stimulating Factor in Guinea Pig Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and Immunity*. 50 (2); 500-505.
- 66) Sanders M. Virginia, Snyder M. Jeanne, Uhr W. Jonathan y Vitetta S. Ellen.; 1986. Characterization of the Physical Interaction between antigen-specific B and T cells. *The Journal of Immunology*. 137 (8); 2395-2404.

- 67) Rasanen Liisa, Lehto Maili, Jokinen I. y Aarvimmi H.; 1966
Bacteria are Polyclonal T-dependent stimulants of Immunoglobulin Formation. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. 94; 131-136. --
- 68) Selsted E. Michael y Harwig L.S. Sylvia.; 1987. Purification Primary Structure, and Antimicrobial Activities of a Guinea Pig Neutrophil Defensin. Infection and Immunity. 55 (9); -- 2281-2286. --
- 69) Issekutz C. Andrew, Lee Kam-Yin y Biggar W. Douglas.; 1979. Enhancement of Human Neutrophil Bactericidal Activity by -- Chemotactic Factors. Infection and Immunity. 24 (2); ---- 295-301. --
- 70) Proctor A. Richard.; 1979. Endotoxin In Vitro Interactions with Human Neutrophils: Depression of Chemiluminescence, -- Oxygen Consumption, Superoxide Production, and Killing. -- Infection and Immunity. 25 (3); 912-921. --
- 71) DeChatelet R. Lawrence, Shirley S. Pamela, McCall E. Charles y Bass A. David.; 1974. Dissociation of Leukocyte Alkaline Phosphatase from the Bactericidal Activity of Neutrophils. Infection and Immunity. 23 (1); 94-98. --
- 72) Andrews C. Patricia, Farnes Cindy y Krinsky I. Norman.; 1984 Comparison of Myeloperoxidase and Hemi-Myeloperoxidase with Respect to Catalysis, Regulation, and Bactericidal Activity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 228 (2); ---- 439-442. ---
- 73) Klein C. David y Weller L. Joan.; 1970. Myeloperoxidase: -- Contribution to the Microbicidal Activity of Intact ---- Leukocytes. Science. 169; 1095-1097. ---
- 74) Kapp Alexander, Freudenberg Marina y Galanos Chris.; 1987. Induction of Human Granulocyte Chemiluminescence by Bacterial Lipopolysaccharides. Infection and Immunity. 55 (3); - 758-761. --
- 75) Rosen Henry y Klebanoff J. Seymour.; 1976. Chemiluminescence and Superoxide Production by Myeloperoxidase-Deficient - Leukocytes. The Journal of Clinical Investigation. 58; 50-60

- 76) Johnston B. Richard, Lehmyer E. Joyce y Guthrie A. Linda.; 1976. Generation of Superoxide anion and Chemiluminescence by Human Monocytes during Phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G. J. Exp. Med. 143; 1951-1959
- 77) Hill R. Harry, Hogan A. Nancy, Eide J. James y Hemming G.-- Val.; 1977. Evaluation of Nonspecific (Alternative Pathway) Opsonic Activity by Neutrophil Chemiluminescence. Int.Archs Allergy appl. Immun. 53; 490-497.
- 78) Horen D. Tim, English Denis y McPherson A. Thomas.; 1982. - Association of Neutrophil Chemiluminescence with Microbicidal Activity. Clinical Immunology and Immunopathology. 32; 259-269.
- 79) Rua Mendez, Leticia., 1986. Bioluminescencia y Quimiolumi-- niscencia, aspectos basicos y su aplicacion en la inmunologia. Tesis de Licenciatura de QFB. Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlan", Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex. pp:
- 80) Proctor A. Richard.; 1979. Endotoxin In Vitro interactions with Human Neutrophils Depression of Chemiluminescence, Oxygen Consumption, Superoxide Production, and Killing. Infection and Immunity. 25 (3); 912-921.
- 81) Jong C. Elaine, Henderson R. William y Klebanoff J. Seymour 1980. Bactericidal Activity of Eosinophil Peroxidase. J. -- Immunol. 124 (3); 1376-1382.
- 82) Migler Regina, DeChatelot R. Lawrence y Bass A. David.; -- 1978. Human Eosinophilic Peroxidase: Role in Bactericidal - Activity. Blood. 51 (3); 445-453.
- 83) DeChateler R. Lawrence, Migler A Regina, Shirley S. Pamela, et al.; 1978. Comparison of Intracellular Bactericidal Activities of Human Neutrophils and Eosinophils. Blood. 52 (3); 609-617.
- 84) Leigh J.C. Peter, Van Den Barselaar Th. Maria, Van Zwet L. Theda, et al.; 1979. Requirement of Extracellular Complement and Immunoglobulin for Intracellular Killing of Micro-Organisms by Human Monocytes. J. Clin. Invest. 63 (4); 772-784.

- 85) Kemmerich Bernd, Small J. Gloria y Pennington E. James.; -- 1979. Relation of Cytosolic Calcium to the Microbicidal Activation of Blood Monocytes by Recombinant Interferon. --
- 86) Futch S. William y Schook B. Lawrence.; 1985. Dissection of Macrophage Tumoricidal and Protozoacidal Activities Using T-E11 Hybridomas and Recombinant Lymphokines. Infection and Immunity. 50 (3); 709-715.
- 87) Fujiki Tetsuro y Tanaka Atsushi.; 1988. Antibacterial Activity of Recombinant Murine Beta Interferon. Infection and Immunity. 56 (3); 548-551.
- 88) Leijh P.C.J. y Van Furth R.; 1982. Membrane Stimulation and Intracellular Killing by Monocytes. Immunobiol. 161 (3-4); 345-351.
- 89) Hohn C. David, Ponce Bruce, Burton R. William, et al. 1977. Antimicrobial Systems of the Surgical wound. Am. J. Surg. 133 (5); 597-600.
- 90) Mosher F. Deane, M.D.; 1980. Fibronectin. Prog. Hemostasis Thromb. 5; 111-141.
- 91) Mosher F. Deane, M.D. y Fucht T. Leo.; 1981. Fibronectin: - Review of its Structure and Possible Functions. The Journal of Investigative Dermatology. 77 (2); 175-188.
- 92) Hynes O. Richard y Yamada M. Kenneth.; 1982. Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. The Journal of Cell Biology. 95; 369-377.
- 93) Richter H. y Hormann H.; 1983. A large cathepsin D-derived fragment from the central part of the fibronectin subunit - chains. Febs Letters. 155 (2); 317-320.
- 94) Van De Water L., Destree T. A. y Hynes O. R.; 1983. Fibro-- nectin Binds to Some Bacteria but Does Not Promote Their -- Uptake by Phagocytic Cells. Science. 220; 201-204.
- 95) Froman Gunnar, Sultalski M. Lech, Faris Ahmad, et al.; 1984 Binding of Escherichia coli to Fibronectin. The Journal of Biological Chemistry. 259 (23); 14899-14905.

- 76) Kautsja Pentti, Vainio Tapio, Vuorio Matti, Hiltunen S. Erilinen.; 1985. Attachment of Staphylococci and Streptococci on Fibronectin, Fibronectin Fragments, and Fibrinogen bound to a Solid Phase. *Infection and Immunity*. 50 (1): 77-81.
- 97) Mäke Ingemar, Eylon Cecilia, Medstrand Isobel y Rubin Kristofer. *Infection and Immunity*. 51 (2): 670-704.
- 98) Nealon J. Timothy, Beachey H. Edwin, Courtney S. Harry y Simpson Andrew.; 1985. Release of Fibronectin-Lipoteichoic Acid Complexes from Group A Streptococci with Penicillin. *Infection and Immunity*. 51 (2): 809-835.
- 99) Wikstrom Maude y Linde Anders.; 1986. Ability of Oral Bacteria to Degrade Fibronectin. *Infection and Immunity*. 51 (2): 707-711.
- 100) Hasty L. David y Simpson W. Andrew.; 1987. Effects of Fibronectin and Other Salivary Macromolecules on the Adherence of *Escherichia coli* to Buccal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 55 (9): 2195-2197.
- 101) Alitalo Kari, Hoy Tapani y Vaheri Antti.; 1989. Fibronectin is Produced by Human Macrophages. *J. Exp. Med.* 151: 692-697.
- 102) Norris A. David, Clark R.A.F., Swigart M. Laura, Huff J. Clark, et al.; 1990. Fibronectin Fragments are chemotactic for Human Peripheral Blood Monocytes. *The Journal of Immunology*. 129 (4): 1612-1618.
- 103) Baughn E. Robert.; 1986. Antibody-Independent Interactions of Fibronectin, C1q, and Human Neutrophils with *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*. 54 (2): 456-464.
- 104) Hakansson Lena y Venge Per.; 1985. The Combined action of Hyaluronic acid and fibronectin stimulates neutrophil migration. *The Journal of Immunology*. 135 (4): 2735-2739.
- 105) Proctor A. Richard, Prendergast Edward y Mosher F. Deane.; 1982. Fibronectin Mediates Attachment of *Staphylococcus aureus* to Human Neutrophils. *Blood*. 59 (4): 681-687.

- 106) Vandendriucke-Gravio M.J.E., Christina, Thirssen H.W.M., --
Henricus y Verhoef Jan.; 1985. Phagocytosis of Staphylococci by Human polymorphonuclear leukocytes is enhanced in the presence of Endothelial Cells. *Infection and Immunity*. 50 (1); 259-264.
- 107) Simpson W. Andrew, Hasty D.L., Mason J.M. y Erachev E.H.; 1982. Fibronectin-Mediated Binding of Group A Streptococci to Human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*. 37 (2); 805-810.
- 108) Proctor A. Richard, Testor A. Jacquelyn, Vann H. James y Husher F. Deane.; 1985. Role of Fibronectin in human monocyte and macrophage bactericidal activity. *Infection and Immunity*. 47 (3); 629-637.
- 109) Sorvillo John, Gigli Irma y Pearlstein Edward.; 1985. Fibronectin binding to complement subcomponent C1q. *Biochem. J.* 226; 207-219.
- 110) Sorvillo John, Gigli Irma y Pearlstein Edward.; 1985. Requirements for the binding of human plasma fibronectin to the C1q subunit of the first component of complement. *The Journal of Immunology*. 131 (3); 1400-1404.
- 111) Sorvillo M. John, Gigli Irma y Pearlstein Edward.; 1986. The effect of fibronectin on the processing of C1q- and C3b/i1-coated immune complexes by peripheral blood monocytes. *The Journal of Immunology*. 136 (7); 1023-1026.
- 112) Fomcier G. Christine, O'Shea John, Chused Thomas, et al.; 1984. Studies on the fibronectin receptors of human peripheral blood leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 159; 137-151.
- 113) Proctor A. Richard.; 1987. Fibronectin: An enhancer of Phagocyte Function. *Reviews of Infectious Diseases*. 9 sup 4; 412-419.
- 114) Proctor A. Richard.; 1987. Fibronectin: A brief overview of its structure, function and physiology. *Reviews of Infectious Diseases*. 9 sup 4; 317-321.
- 115) McKeown-Longo J. Paula.; 1987. Fibronectin-Cell surface Interactions. *Reviews of Infectious Diseases*. 9 sup 4; 322-34

- 116) Prosser A. Richards; 1937. The Anticoagulant Properties of Fibrinogen. Evidence for the Importance in Disease of the High Polymer of Infectious Diseases. *J. supp 4: 335-340.*
- 117) W. Faza y Levin Steiner; 1937. Importance of Glucose Tolerance curves in determining the clinical role of Fibrinogen and the Fibrinoid. *Reviews of Infectious Diseases. J. supp 4: 341-359.*
- 118) Prosser A. Andrew, Courtney E. and Mary Gray; 1937. Interaction of Fibrinogen with Pathogens: The Role of Fibrinogen as a Receptor for Anticoagulant Properties. *Ann. Repts. of Infectious Diseases. J. supp 4: 361-369.*
- 119) Hasell J.; 1937. Role of Fibrinogen in Infective Stomatitis. *Review of Infectious Diseases. J. supp 4: 369-371.*
- 120) Sacco E. Robert; 1937. Role of Fibrinogen in the Pathogenesis of Syphilis. *Reviews of Infectious Diseases. J. supp 4: 371-376.*
- 121) Wylie J. David; 1937. Fibrinogen in Parasitic Diseases. *Reviews of Infectious Diseases. J. supp 4: 381-389.*
- 122) Calderone A. Richard, Schell W. Michael; 1937. Role of Fibrinogen in the Pathogenesis of Candidal Infections. *Reviews of Infectious Diseases. J. supp 4: 400-403.*
- 123) Keski-Oja Jorma, Haafanen Arno y Jalkonen Ilkka; 1937. - Fibrinogen and viral pathogenesis. *Review of Infectious Diseases. J. supp 4: 404-411.*
- 124) Grossman E. Jeffrey; 1937. Plasma Fibrinogen, and Fibrinogen Therapy in sepsis and critical illness. *Review of Infectious Diseases. J. supp 4: 420-430.*
- 125) Sebac Jerry, Reed F. William y Williams E. Ralph; 1937. - Effect of Temperature on bacterial killing by serum and by polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity. 16 (3): 947-954.*
- 126) Mc Dowell D.; 1923. The effect of different temperatures and humidities on the resistance of rats to pneumococcus infection. *Am. J. Hyg. 3: 521-540.*

- 127) Merkiel K., Prokopowicz J. y Krawczak J.; 1978. The depressing effect of tumour on bactericidal capacity of plasma and leukocytes. *Folia Haematol.* 105 (4); 497-501.
- 128) Welch D. William, PhD., Rose M. David, M.D. y Carlson Randy.; 1982. Reduced hemoglobin as an inhibitor of human polymorphonuclear leukocyte bacterial killing. *Surgery.* -- 91 (1); 75-80.
- 129) Hohn C. David, M.D., Mackay D. Ronald, et al.; 1976. Effect of O₂ tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro. *Surg Forum.* 27 (62); 18-20.
- 130) Zabihreh Dehghan, Thakur L. Mathew, Malech L. Harry, et al. 1979. Indium-111-Labeled human polymorphonuclear leukocytes: Viability, random migration, chemotaxis, bactericidal capacity, and ultrastructure. *J. Nucl. Med.* 20; (7); 741-747.
- 131) Moore L. Linda, D. Ph., Humbert R. James y M.D.; 1984. Neutrophil bactericidal dysfunction towards oxidant radical-sensitive microorganisms during experimental iron deficiency. *Pediatric Research.* 18 (7); 684-688.
- 132) Harper A. Harold.; *Manual de química fisiológica.* Editorial Manual Moderno S.A. 5a Edición. México D.F. pp: 246-247. -- 1976.
- 133) Bass D.A., DeChatelet L.R., Burk R.F., et al.; 1977. Polymorphonuclear leukocyte bactericidal activity and oxidative metabolism during glutathione peroxidase deficiency. *Infection and Immunity.* 18 (1); 78-84.
- 134) Strauss R.K., B.D. Paul, A.A. Jacobs y A. Sbarra.; 1977. The role of the phagocyte in host-parasite interactions. Leucocyte glutathione reductase and its involvement in phagocytosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 135; 265-271.
- 135) De Catelet R. Lawrence, Shirley S. Pamela y McPhail C. Linda.; 1976. Normal leukocyte glutathione peroxidase activity in patients with chronic granulomatous disease. *The J. of Pediatrics.* 89 (4); 598-600.

- 136) Foote S. Christopher, Gayne E. Thomas y Lehrer I. Robert.; 1983. Assessment of chlorination by human neutrophils. --- Nature. 301 (24); 719-718.

- 137) Klebanoff J. Seymour y Rosen Henry.; 1978. Ethylene --- formation by polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. -- 148 (2); 499-506.

- 138) Segal W. Anthony, Garcia C. Rodolfo y Harper M. Angela.; - 1983. Iodination by stimulated human neutrophils. Biochem. J. 210; 215-225.

- 139) Fennellin H. Robert y Leibfarth K. June.; 1979. Studies of the effects of pregnancy serum on polymorphonuclear leukocyte functions. Arthritis and Rheumatism 21 (3) 316-324.

- 140) Lau Tien H., Hardy G. Mark y Altman R.P.; 1981. Decreased pulmonary alveolar macrophage bactericidal activity in --- splenectomized rats. Journal of Surgical Research. 34 (4); 568-571. --
- 141) Fiotta Anna, Fortunato Adriana, Dos Santos Conceicao, et al.; 1981. Serum bactericidal reaction by the alternative pathway of complement: Potentiation by target multiplicity and modulation by serum factors. Infection and Immunity. 33 (3); 704-709.

- 142) Siccardi G. Antonio, Fortunato Adriana, Manconi Massimo. - et al.; 1981. Defective bactericidal reaction by the alternative pathway of complement in atopic patients. Infection and Immunity. 33 (3) 710-713.

- 143) Schreiber D. Robert, Morrison C. David, Podack K. Eckhard, et al.; 1979. Bactericidal activity of the alternative --- complement pathway generated from 11-isolated plasma proteins. J. Exp. Med. 149; 870-882.

- 144) Soothill J.F. y Harvey A.M.; 1977. A defect of the alternative pathway of complement. Clin exp. Immunol. 27; 30-33.

- 145) Wardlaw C. Alastair y PhD.; 1962. The complement-dependent bacteriolytic activity of normal human serum. J. Exp. Med. 115; 1231-1249.

- 146) Rother Klaus, Rother Ursula, Petersen Friedrich Kurt., et al.; 1964. Immune bactericidal activity of complement. --- Journal Immunology. 92; 319-330.
- 147) Falmlad Jan y Hvalk Anna.; 1978. Ageing doe not change --- blood granulocyte bactericidal capacity and levels of complement factors 3 and 4. Gerontology. 24; 351-355.
- 148) Reine E. John, M.D., Davies F. Scott, et al. 1979. Effect of C2-deficiency on the bactericidal activity and chemiluminescence responses of human neutrophils in vitro. Chest. - 75 (2); 252-254.
- 149) Ihara Izumi, Ueda Hiroyuki, Suzuki Atsushi y Kawakami Masaya.; 1982. Physicochemical properties of a new bactericidal factor, Ra-Reactive Factor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 107 (4); 1185-1190.
- 150) Kawakami Masaya, Ihara Izumi, Ihara Setsunosuke, et al.; - 1984. A group of bactericidal factors conserved by vertebrates for more than 300 million years. The Journal of Immunology. 132 (5); 2578-2581.
- 151) Vogt W., Von Zabern I., Heese D., et al. 1986/1987. Generation of an activated form of human C5 (C5b-like C5) by --- oxygen radicals. Immunology Letters. 14; 209-215.
- 152) Lobs Michael y Clas Felicitas.; 1986/1987. Antibody-inde--- pendent killing of gram-negative bacteria via the classical pathway of complement. Immunology Letters. 14; 200-206
- 153) Edwards S. Morven, Buffone J. Gregory, Fuselier A. Pamela. et al.; 1983. Deficient Classical complement pathway activity in newborn sera. Pediatr. Res. 17 (2); 685-688.
- 154) Kato Kyoko y Bito Yukio.; 1978. Relationship between bactericidal action of complement and fluidity of cellular membranes. Infection and Immunity. 19 (1) 12-17.
- 155) Marodi Laszlo, Leigh C.J. Peter, Braat Armando, et al.; --- 1985. Oposnic activity of cord blood sera against various species of microorganism. Pediatric Research. 19 (5); --- 433-436.

- 156) Cialdella I. Joyce, Vavra J. James y Marshall P. Vincent.; 1986. Susceptibility of bacteria to serum lysis or phagocytosis following growth in subinhibitory levels of lindolamidine or spectinomycin related antibiotics. The Journal of Antibiotics. 37 (2); 978-980.
- 157) Brodersen Allan y Flournoy D.J.; 1985. Innate Bactericidal and bactericidal activity of normally sterile human body fluids. Meth. and Find Exptl Clin Pharmacol. 7 (11); 585-597.
- 158) Ingham H.R., Sisson R. Penelope, Middleton L. Rosemary, et al.; 1981. Phagocytosis and killing of bacteria in aerobic and anaerobic conditions. J. Med. Microbiol. 14(4); 391-396.
- 159) Wilson E. Mark, Burstein Robert, et al.; 1985. Sensitivity of Capnocytophaga species to bactericidal properties of human serum. Infection and Immunity. 50 (1); 123-129.
- 160) Shaw Stephen, Smith L. Arnold, Anderson Porter y Smith H. David.; 1976. The paradox of Hemophilus influenzae type B bacteremia in the presence of serum bactericidal activity. The Journal of Clinical Investigation. 59 (4); 1019-1029.
- 161) Dutcher B.S., Reynard A.M., Beck M.E. y Cunningham R.K.; 1978. Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. Antimicrobial agents and chemotherapy. 13 (5); 820-825.
- 162) Tono-Oka T., Matsumoto T., Imai K. y Matsumoto S.; 1985. Effect of gamma-globulin preparations on phagocytic function of whole blood. Biomedicine and Pharmacotherapy. 39 (9-10); 477-481.
- 163) Fischer W. Gerald, Hunter W. Kenneth, Hemming S. Val., et al.; 1983. Functional antibacterial activity of a human intravenous immunoglobulin preparation: in vitro and in vivo studies. Vox Sang. 44 (5); 296-299.
- 164) Iwata Masayuki, Shimozato Ichiro, Tokiwa Hiroshi y Tsubura Eiro.; 1987. Antipyretic activity of a human immunoglobulin preparation for intravenous use in an experimental model of fever in rabbits. Infection and Immunity. 55 (3); 547-554.

- 165) Van Epps C. Dennis, Reed Kathleen y Williams C. Ralph.; 1978. Suppression of Human PMN bactericidal activity by human IgG paraproteins. Cellular Immunology. 24 (2); 363-376.
- 166) Griffiss J. McLeod y Goroff K. Diana.; 1983. IgA blocks IgM and IgG-initiated immune lysis by separate molecular mechanisms. The Journal of Immunology. 130 (6); 2882-2884.
- 167) Simpson D.W., Roth R. y Loose L.D.; 1979. A rapid, inexpensive and easily quantified assay for phagocytosis and microbicidal activity of macrophages and neutrophils. J. of Immunological Methods. 29 (3); 221-226.
- 168) Phillips W.A., Shelton M.J. y Hosking C.S.; 1979. A simple micro-assay for neutrophil bactericidal activity. Journal of Immunological Methods. 26 (2); 187-191.
- 169) King W. John., M.D. y McCall E. Charles.; 1980. Simplified neutrophil hexose monophosphate shunt assay on whole blood Am.J.Clin.Pathol. 74 (1); 88-93.
- 170) Quie, P.G., 1969. Arch. Environ Hith 12; 849.
- 171) Quie, P.G., White J.G., Holmes E. y Good R.A.; 1967. J. Clin. Invest. 46; 668.
- 172) Hirsch J.G. y Strauss B.; 1964. J. Immunol. 92; 145.
- 173) Hosking C.S., Fitzgerald M.G. y Shelton M.J.; 1977. Aust. Paediat. J. 13 (suppl) 56.
- 174) Cline M.J.; 1973. J. Lab. Clin Med. 81; 311.
- 175) Brune K.L., Schmid, Blatt M. y Minder B.; 1973. Nature. - 245; 209.
- 176) Lehrer R.I. y Cline M.J.; 1969. J. Bacteriol. 70; 996.
- 177) Schmid L. y Brune K.; 1974. Infection and Immunity. 10; 1120.

- 178) Tono-Oka Tatsuhiro, Ueno Norihiro, et al.; 1983. Chemiluminescence of whole blood. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 29; 66-75.
- 179) Easmon C.S.F., Cole P.J. et al.; 1980. The measurement of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent chemiluminescence. *Immunology*. 41; 67-73.
- 180) Welch D. William.; 1980. Correlation between measurements of the Luminol dependent chemiluminescence response and bacterial susceptibility to phagocytosis. *Infection and Immunity*. 30 (2); 370-374.
- 181) Tono-Oka Tatsuhiro, Matsumoto Takahide, Ueno Norihiro, et al.; 1983. Chemiluminescence of whole blood. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 29; 333-340.
- 182) Lee Smith David y Rommel Fred.; 1977. A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro. *Journal Immunological Methods*. 17 (3-11); 241-247.
- 183) Olling E., Elgefors B.; 1980. A rapid method of Leukocytic bactericidal activity (LBA). *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* 24; 48-49.
- 184) Friedlander M. Arthur.; 1979. DNA Release as a direct measure of microbicidal killing by phagocytes. *Infection and Immunity*. 22 (1); 148-154.
- 185) Peck Richard.; 1985. A one-plate assay for macrophage bactericidal activity. *Journal of Immunological Methods*. 82 (1); 131-140.
- 186) Morris Hooke Gene, Deschner P. Max, et al.; 1978. Ideal Target organism for quantitative bactericidal assays. *Infection and Immunity*. 20 (2); 406-411.
- 187) Klasternsky J. 1983. The bactericidal activity in serum and its prognostic clinical value. *Infection*. 11 suppl 2; 593-596.
- 188) Reller Barth L. y Stratton W. Charles; 1977. Serum Dilution Test for bactericidal activity. *J. Infect. Dis.* 136 (2); 196-204.

- 189) D'Antonio G. Richar, Canargo E. Edwaldo, Godra Thomas, et al.; 1982. Rapid Radiometric Serum Test for Antibiotic activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 21 (2): 236-240. --
- 190) Prober G. Charles, Dougherty S. Susan., et al. 1979. Comparison of a micromethod for performance of the serum bactericidal test with the standard tube dilution method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 16 (1): 4a-48. --
- 191) Robinson Ann, PhD., Bartlett C. Raymond, et al; 1985. Anti microbial synergy testing based on antibiotic levels, --- minimal bactericidal concentration, and serum bactericidal activity. *Am. J. Clin. Pathol.* 24 (3); 328-332. ---
- 192) Stratton C.W. y Keller L.E. 1977. Serum dilution test for bactericidal activity. I. Selection of a physiologic diluent. *J. Infect. Dis.* 136: 197-198. ---
- 193) Jacques V. Yvonne, B.A. y Bainton F. Dorothy.; 1978. Changes in pH within the phagocytic vacuoles of human neutrophils and monocytes. *Laboratory Investigation*. 39 (3); 179-184. --
- 194) Cern Petr y Lepper I Robert.; 1984. Phagolysosomal pH of - human neutrophils. *Blood*. 63 (1); 88-95. ---
- 195) Chanu'a R.K.; 1973. Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. *Archives of Disease in Childhood* 48; 864-866. ---
- 196) Weinberg D. Eugene.; 1974. Iron and Susceptibility to ---- Infectious Disease. *Science*. 184; 952-953. ---
- 197) Maddaus A. Michael, M.D., Wells L. Carol., et al.; 1988. - Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. *Ann. Surg.* --- 207 (4); 387-398. ---
- 198) Aoki N. y Ohno Y.; 1987. Enhancement of the b-cell response to *Staphylococcus aureus* Cowan strain 1 by natural ---- human gamma interferon. *Immunology*. 60 (1); 51-55. ---

- 199) Migliori R.J., Hoffman E., Debo E., et al.; 1961. Regulation patterns of white cells; generation and structure of the inflammatory response. Transplantation P. proceedings. 19 (1): 338-341.
- 200) Fryna Jim Glad M.D., Ernst M., et al.; 1966. Immunoglobulin production of human lymphocytes stimulated by Staphylococcus aureus Cowan I and pokeweed mitogen: differential effects of recombinant interferon. Immunology. 57 (4): 485-487.
- 201) Bach Francoise Jean; Immunology. Wile. Medical Publication. 1a. Edicion. pp:540-550. 1978.
- 202) Fürdenberg Hugh H; Stites P. Daniel; Caldwell L. Joseph; et al. Manual de Inmunología Clínica. Editorial manual Mcdermo. S.A. Mexico, D.F., 2a. Edicion. pp 120-140. 1960.
- 203) Kennedy C. Ronald, Melnick L. Joseph.; 1965. Anticorpos e Inmunidad. Cientific American. 2 (120): 30-39.
- 204) Ciscar Ruiz, Federico y Farreras Valenti, Pedro. Diagnostico Hematologico. Tomo I. Editorial Jms. Barcelona. 3a Edicion. pp 2-5. 17. 1972.