

11262

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DEL AYUNO AGUDO SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA,
FAGOCITICA Y MICROBICIDA DE MACROFAGOS
EN UN MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

T E S I S

Que presenta

CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA

Para obtener:

EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

México D.F.

1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

CAPITULO	PAGINAS
I INTRODUCCION	4 - 5
II ANTECEDENTES	6 - 18
1) Privación aguda de alimento	6 - 8
2) Infección aguda, magnitud de las respuestas metabólicas	8 - 10
3) Infección aguda-respuesta inmune (sistema monocito-macrófago)	10 - 18
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV HIPOTESIS	20
V OBJETIVOS	21
VI MATERIAL Y METODOS	22 - 31
A) Modelo de ayuno	22
b) Obtención de macrófagos perito- neales	22 - 23
c) Definición de variables	23
d) Quimiotaxis	24 - 25
e) Quimioluminiscencia	25 - 26
f) Producción de CO_2 (actividad de la vía monofosfato)	26 - 29
g) Capacidad bactericida	29 - 31
h) Tamaño de la muestra	31
VII DISEÑO GENERAL	32

VIII ANALISIS ESTADISTICO	33
IX RESULTADOS	34 - 36
X DISCUSION	37 - 41
XI CONCLUSIONES	42
FIGURA No. 1	43
FIGURA No. 2	44
FIGURA No. 3	45
FIGURA No. 4	46
FIGURA No. 5	47
FIGURA No. 6	48
FIGURA No. 7	49
BIBLIOGRAFIA	50 - 56
APENDICE	57 - 67

I

INTRODUCCION

En los últimos 20 años, múltiples estudios han establecido que las deficiencias nutricionales específicas o mixtas de evolución crónica producen defectos en la respuesta inmune e incrementan la susceptibilidad a las infecciones (1-7). Por otra parte hay varias situaciones clínicas en las que los pacientes son sometidos a ayuno parcial o total por periodos variables de tiempo, como es el caso de algún tipo de postoperados, traumatizados de cráneo, pacientes con insuficiencia respiratoria aguda y en general pacientes que llegan a los servicios de terapia intensiva por padecimientos agudos, en los cuales se ha reportado incremento de la susceptibilidad a las infecciones (8-12). Por lo general esto se atribuye a factores intrahospitalarios o de los microorganismos; además hay estudios clínicos y de laboratorio que indican que las respuestas hormonales, metabólicas y bioquímicas que se desencadenan ante un proceso infeccioso con el fin de producir una adecuada respuesta inmune son capaces de inducir desnutrición aguda (13,14). Algunos grupos, especialmente cirujanos cuyos pacientes postoperados cursan con déficit energético agudo frecuentemente y con sepsis como la principal complicación postoperatoria y causa de muerte, han sido los primeros en plantear el efecto que puede tener el ayuno agudo en la integridad de la respuesta inmune, como una causa del hospedero, que contribuye a incrementar la susceptibilidad a las infecciones en pacientes sometidos a privación parcial o total aguda de alimento (8,9). Sin embargo

los reportes sobre desnutrición aguda y su repercusión sobre los diferentes mecanismos de defensa son controversiales y escasos. El sistema monocito-macrófago (mó), con su diversidad funcional es primordial como defensa ante microorganismos intracelulares y como secretor de mediadores que inducen respuestas orgánicas conocidas como de fase aguda ante la infección, con el fin de desencadenar la respuesta inmune (15). Este sistema puede ser uno de los primeros afectados por el ayuno agudo (16-26).

ANTECEDENTES1) PRIVACION AGUDA DE ALIMENTO Y RESPUESTA INMUNE:

En 1975 Lukazewycz, Martínez y Murphy (16) reportaron que ratones sometidos a ayuno por 2 días a los que se les administró células linfocíticas malignas singénicas Ib no fueron capaces de rechazarlas, al contrario del grupo testigo. En 1975, este mismo grupo (17) describió un modelo sencillo para la investigación del efecto del ayuno sobre la inmunidad mediada por células contra linfocitos malignos y no encontró alteraciones, pero dentro de las observaciones del trabajo, describe que con 3 días de ayuno el peso del timo de estos animales fué significativamente menor que el de los animales que recibieron alimentación normal, así también disminuyó en un 65 a 90 % el número de células mononucleares viables obtenidas de bazo y hasta en un 50 % la cuenta total de leucocitos periféricos. Meakins (18) en 1977, reportó pruebas de hipersensibilidad tardía alteradas en pacientes con sepsis y trauma y lo asocia como indicador de falla inmunológica adquirida en forma aguda, pero de ninguna manera estos datos pueden relacionarse con deficiencia nutricional aguda. Wing y Young (19) en 1980 describen un modelo de desnutrición en ratones sometidos a ayuno por 72 h y retados con L.monocytógenes con 95 % de sobrevivencia vs 5% de sobrevivencia en el grupo control con alimentación normal, y sugirieron que el ayuno protegió a los animales contra la infección de L.monocytógenes. Pero ese mismo grupo, en 1983, repitió el trabajo usando

Toxoplasma gondi como reto y los resultados fueron totalmente inversos (20) lo que sugiere que el efecto anterior fué selectivo para L. monocytógenes. En 1980 Saxena y cols (21) estudiaron la actividad de células mononucleares NK de bazo de ratones sometidos a ayuno y encontraron que la actividad citotóxica disminuyó a los 6 días de haber sometido a los ratones a ayuno y sugirieron que esto podía ser por efecto de algún supresor ya que al incubar las células NK con células de bazo de ratones normales se recuperaba la función y la recuperación con realimentación fué total a los 8 días. Meakins y cols (8) en 1982 reportaron que la muerte en sus unidades de cuidados intensivos quirúrgicos correlacionaba con gran déficit energético agudo y su principal causa de muerte fué sepsis; esto los motivó a trabajar esta línea de investigación y en 1984 Nohr, Christou, Meakins y col (22) publicaron los resultados de un estudio sobre inmunidad humoral en pacientes postoperados en los cuales midieron la respuesta de producción de anticuerpos a la aplicación de toxoide tetánico y encontraron que la respuesta fué disminuida en relación al grupo testigo. En 1984 Shenib y col (23) publicaron un estudio sobre la capacidad fagocítica y microbicida de macrófagos alveolares de ratas sometidas a ayuno, contra Pseudomonas aeruginosa marcada con timidina tritiada, y encontraron una capacidad fagocítica disminuida, pero capacidad microbicida normal a partir de 48 h de ayuno, y la recuperación de la función fagocítica fué total hasta después de 4 semanas de realimentación. En 1985 Christou reportó (24) que un déficit en la prueba de hipersensibilidad retardada en piel se asociaba a incremento en el riesgo de sepsis

y muerte en pacientes quirúrgicos. Nuevamente este grupo, también en 1985, (25), reportó un estudio del efecto del ayuno agudo sobre la respuesta inmune humoral y respuesta de hipersensibilidad tardía en piel en un modelo animal experimental en ratas, encontrando ambas deficientes después de 3 días de ayuno, y después de 7 días de realimentación, aún cuando se demostró mejoría de las funciones no se habían recuperado ad integrum. Por otra parte, en 1986, este mismo grupo efectuó un estudio en pacientes postoperados sometidos a períodos variables de ayuno por su mismo problema de base, donde se les midió la respuesta humoral a la aplicación de vacuna de neumococo (antígeno polisacárido) y se encontró que no existía diferencia entre el grupo testigo y el problema (26).

En resumen, el abordaje y las conclusiones sobre el efecto del ayuno agudo sobre algunos aspectos de la respuesta inmune han sido escasos, no secuenciales y se podrían considerar controversiales.

2) INFECCION AGUDA-MAGNITUD DE LAS RESPUESTAS METABOLICAS:

El proceso infeccioso agudo produce pérdida de peso que en algunos casos puede llegar a producir desnutrición aguda por sí mismo y esto se debe a las respuestas que se despiertan en el individuo infectado. La infección generalizada, a excepción de diferencias leves y dependiendo del tipo de microorganismo causal, se acompaña de una serie de respuestas bioquímicas, hormonales y metabólicas altamente predecibles (13,14); algunas se inician en el período de incubación y la gran mayoría se

desencadenan junto con la fiebre. Estas respuestas de fase aguda a la infección se han descrito ampliamente por Beisel (13) y otros (14): Hay fiebre que incrementa los índices metabólicos celulares causando un 7 % de incremento en el índice metabólico basal por cada grado Fahrenheit que aumente la temperatura corporal, lo que aumenta el gasto energético, además como consecuencia de la fiebre hay sudoración donde se pierden nutrientes (27,28); otro factor durante la infección que afecta el estado nutricional es la anorexia que disminuye la captación de nutrientes (29,30); Las respuestas hormonales se caracterizan con incremento en la producción de glucocorticoides, mineralocorticoides, hormona del crecimiento, glucagon, insulina entre otras (14,29,31), y esto se traduce en alteración en el metabolismo de proteínas con catabolía en músculo para la obtención de aminoácidos necesarios en la síntesis de nuevas proteínas como enzimas, proteínas de fase aguda, inmunoglobulinas y también utilización de estos aminoácidos como energéticos ya que la gluconeogénesis también se incrementa; esta respuesta resulta en balance nitrogenado negativo (32-37); en un adulto la reserva calórica como carbohidratos solo son 1000 Kcal y esto se consume en 12-24 hrs de metabolismo y en un niño en 8-12 h (14,38-40), por lo que por fuerza ante un estado de infección aguda se utilizarán otros nutrientes como fuente de energía; la mayor reserva energética la tenemos en forma de lípidos, sin embargo ante un proceso infeccioso agudo las alteraciones en el metabolismo de lípidos difieren según el agente causal; en las infecciones por Gram negativos se describe que incrementan los niveles séricos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), una

respuesta variable de ácidos grasos libres pero hay disminución de la capacidad de depuración sérica de triglicéridos con baja actividad de la lipoproteína-lipasa, lo que sugiere menor utilización de las grasas y mayor catabolismo de proteínas con fines energéticos; en sepsis por Gram positivos incrementa las lipoproteínas séricas y la hipertrigliceridemia es menor (41-43). Los diferentes minerales pueden perderse o secuestrarse y las vitaminas tienen utilización acelerada (13,14). Todo esto ocurre con el fin de montar una adecuada respuesta inmune contra el microorganismo invasor; de tal manera que el establecer un adecuado mecanismo de defensa implica incremento en la demanda de nutrientes y calórica.

3) INFECCION AGUDA- RESPUESTA INMUNE:

Esta respuesta inmune la podemos dividir de manera muy general en: Sistema humoral, fagocítico y el mediado por células. La forma como estos sistemas responden ante un proceso infeccioso no es tan sencilla, la realidad es que depende del tipo de agente invasor, lo que activa un sistema u otro, pero en general hay una actividad combinada, interactuando con predominio de alguno, según sea el caso de la etiología. En la inmunidad humoral básicamente tenemos: el sistema de complemento que al fijarse hace que se liberen factores quimiotácticos, anafilotoxinas entre otros, influyendo sobre la respuesta inflamatoria y atrayendo a las células fagocíticas; también se encuentra la producción de anticuerpos, los cuales pueden actuar en forma específica contra el agente invasor o como opsonizantes. El sistema celular comprende a las células T que al activarse producen mediadores

como las linfocinas que actúan sobre otras células que a fin de cuentas serán las efectoras de la función. Por último se menciona a las células fagocíticas las cuales son básicamente los polimorfonucleares neutrófilos y las células del sistema monocito - macrófago; estas células son atraídas primero hacia el sitio adecuado y al encontrarse con el antígeno ya preparado (opsonización) pueden fagocitarlo y proceder por mecanismos microbicidas oxidativos o no oxidativos a su destrucción (44,45).

Con fines de éste protocolo, se considera necesario una mayor revisión sobre el sistema monocito-macrófago. Este tiene una gran diversidad funcional y las células que lo componen tienen un origen común en médula ósea a partir de una célula precursora pluripotencial desde donde se van a diferenciar hacia monoblasto, promonocito, monocito y de este hacia macrófago; en los tejidos el macrófago se encuentra en estado normal, de acuerdo a su hábitat como: células de Kupffer en hígado, macrófagos pleurales y alveolares en pulmón, histiocito en piel, osteoclastos, células microgliales, células sinoviales tipo A, macrófagos libres y tisulares linfáticos. En estado inflamatorio se encuentran como: macrófago exudado, activado, células epiteliodes y células gigantes multinucleadas. Todos los macrófagos surgen por maduración de los monocitos circulantes que emigran de la sangre y por la proliferación de macrófagos inmaduros estimulados (45,46). El índice basal de producción de monocitos humanos es de 7×10^6 /Kg/h, en estados de inflamación alcanzan 28×10^6 /Kg/h, en médula ósea viven 16-60 h, el depósito en sangre es de 2.7×10^6 /ml y su vida media en sangre es de 8 a

71 h, pero en ratón es de 22 h (45), aunque se ha reportado que en ratas infectadas por Salmonella, la cinética de monocitos se modifica (47,48). Agentes citotóxicos como la azatioprina y los esteroides producen disminución de los monocitos circulantes periféricos (49,50).

Este sistema tienen cuando menos 5 funciones principales:

A) INTERACCIÓN CON LINFOCITOS T Y B MEDIANTE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTIGENO (46, 51-53):

B) MECANISMOS DE DEFENSA EN EL HUESPED CONTRA AGENTES INFECCIOSOS (PARTICULARMENTE CONTRA ORGANISMOS INTRACELULARES):

Metchnikoff observó que los fagocitos mononucleares de animales que resistían a ciertas infecciones bacterianas tenían incrementada su capacidad para digerir y matar estos organismos y en 1970 Mackaness (54) propuso el término macrófago activado para estas células con aumento de la capacidad microbicida, tumorocida, fagocitosis, adherencia a superficies de plástico y vidrio, transporte de glucosa, glucosamina y leucina, niveles de adenilciclasa, GMPc, contenido enzimático lisosomal, oxidación de Glucosa-1-¹⁴C liberación de prostaglandinas, de colágena, factor citotóxico y activador de plasminógeno (46). Existen estudios sobre el incremento de la actividad fagocítica y microbicida de θ activados ante infecciones experimentales con patógenos intracelulares como: Micobacterias, Salmonella, Toxoplasma, Listeria, Leishmania, entre otros (55-57). Para que una célula fagocítica llegue al sitio del proceso inflamatorio, para poder fagocitar e incluso desencadenar su actividad microbicida contra el agente invasor, tiene que migrar, ya sea de la sangre hacia los tejidos o dentro de estos mismos. Esto ocurre por la

capacidad de la célula para reconocer un gradiente quimiotáctico a través de su membrana celular, que cambia la actividad eléctrica transmembrana y se traduce en una señal hacia el interior de la célula produciéndose cambios en sus concentraciones iónicas que activan sus sistemas de microtúbulos intracelulares con capacidad contráctil que inducen a la célula a migrar hacia el gradiente de quimioattractante, el cual está relacionado con el sistema de complemento C5a, C3b, leucotrieno b4 y productos del metabolismo del ácido araquidónico vía lipooxigenasa (58,59). Una vez que llega al sitio afectado tiene que reconocer y enlazarse al microorganismo, esto ocurre en la gran mayoría de la veces por el fenómeno de opsonización que sufre la partícula extraña; las dos principales clases de opsoninas son los anticuerpos séricos específicos y los fragmentos del componente del complemento. Los anticuerpos se enlazan al antígeno por su porción variable Fab y al mismo tiempo la porción Fc del anticuerpo se enlaza a un receptor en la membrana de la célula fagocítica y de esta manera el anticuerpo hace un puente entre el microorganismo y el receptor; tanto IgG como solo para MØ pueden mediar fagocitosis por este mecanismo, IgG e IgM activan complemento y de manera secundaria favorecen la opsonización (60,61). El complemento puede enlazarse directamente a las superficies bacterianas sin la intervención del anticuerpo y actúa como ligando enlazando de manera covalente a la superficie del microorganismo y al mismo tiempo de manera no covalente a receptores específicos de la célula fagocítica y de esta manera se promueve la fagocitosis (62,63). Una vez que el

microorganismo ya esta adherido a la célula fagocítica, es introducido a esta mediante la formación de un fagosoma, el cual se unirá a un lisosoma formando un fagolisosoma y en el interior de este se desencadenan mecanismos microbicidas oxidativos y no oxidativos que alteran las membranas en condiciones optimas ocasionan la muerte del microorganismo (46). El mecanismo microbicida dependiente de oxígeno, conocido como estallido respiratorio, consiste en desencadenar una serie de actividades metabólicas ante un estímulo en la membrana de la célula fagocítica que activa la enzima NADH oxidasa que reducirá el oxígeno molecular a agua, con la formación de intermediarios altamente reactivos como singletes de oxígeno (O^1) y radicales de oxígeno como el ión superóxido (O^2-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Cuando el oxígeno acepta un solo electrón se convierte a O^1 . La reducción del oxígeno por dos electrones produce H_2O_2 , el cual se puede formar directamente por reducción divalente del oxígeno molecular o por reducción univalente del O^1 . La reducción del H_2O_2 resulta en la formación de radicales hidroxilo (OH^1) altamente reactivos. El O^1 es un estado altamente excitado de oxígeno, el cual es formado cuando un electron es trasladado a un orbital de mas alta energia con una inversión del spin y esto ocurre por la interacción de varios productos de reducción de oxígeno (O^1 , OH^1 , H_2O_2). El exceso de energia de estos productos inestables de oxígeno puede ser disipado por decaimiento térmico, emisión de luz el fenómeno de quimioluminiscencia o reacción química (64-67). Se ha propuesto que la quimioluminiscencia tanto de PMNs como de mó, puede estar condicionada por la relajación de los O^1 como describimos

previamente o según Cheung y col (68) la estimulación de la membrana celular durante el evento fagocítico induce la liberación de ácido aráquidónico de los fosfolípidos de la membrana, los cuales sufren oxidación en las vías de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa. La oxidación del ácido aráquidónico se facilita, por la intervención de las especies oxidativas derivadas del oxígeno y los metabolitos de estas reacciones pueden ser los causantes de la emisión de luz. Este fenómeno de quimioluminiscencia puede medirse mediante la agregación de sondas quimioluminogénicas tales como el luminol que amplifican el fenómeno de producción de luz durante la fagocitosis. Por lo tanto la actividad fagocítica tanto de leucocitos PMNS como de *mó* puede medirse indirectamente al cuantificar la emisión de luz por estas células ante un estímulo (67,69,70). Los productos inestables de oxígeno descritos previamente, son altamente tóxicos para las membranas celulares incluyendo las bacterianas y también pueden potencializar su acción al interactuar con el sistema de haluros y mieloperoxidasa, enzima que no se encuentra en los macrófagos maduros (15,46,64), lo que provocará la actividad microbicida como evento final de la fagocitosis en este tipo de células. Como consecuencia de todos estos procesos bioquímicos que se desencadenan durante el estallido respiratorio se incrementa el consumo de glucosa-6-fosfato por la vía de la hexosa monofosfato la cual restituye el NADPH y al final permite la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y el oxígeno sirve para oxidar glutatión por acción de la glutatión peroxidasa; de la vía hexosa

monofosfato se obtiene como producto final CO_2 . De tal manera que al incrementar la actividad fagocítica, incrementa la producción de peróxido de hidrógeno y por lo tanto se activa mas la vía de la hexosa monofosfato (71).

C) RETIRAR CELULAS DANADAS O VIEJAS Y DEBRIDAR MATERIAL NO METABOLIZABLE (34).

D) MECANISMO DE DEFENSA DEL HUESPED CONTRA NEOPLASIA:

Se ha reportado que los monocitos humanos describen de manera espontánea actividad citostática y citotóxica contra células tumorales in vitro y que las linfoquinas obtenidas de cultivos in vitro de células linfoideas estimuladas con fitohemaglutinina, PPD o Corynebacterium parvum, aumentan de manera importante la actividad tumoricida de monocitos humanos (46,56,72).

E) SECRECION DE SUSTANCIAS QUE INCREMENTAN O DISMINUYEN LA ACTIVIDAD DE OTRAS CELULAS:

En los últimos 5 años ha cobrado mayor importancia esta función del sistema monocito-macrófago y ya se han reportado cerca de 100 sustancias, las cuales son secretadas por estas células; entre las mas comunes podemos encontrar: enzimas, componentes del complemento, factores quimiotácticos, reguladores de la síntesis de proteínas por otras células, proteínas enlazadoras, nucleósidos, factores promotores de la replicación como la Interleucina-1 (IL-1) y factores inhibidores (73).

La IL-1 es una monocina que ha recibido nombres como pirógeno endógeno, factor activador de linfocitos, mediador endógeno de leucocitos, factor de células mononucleares entre otros, este término se escogió porque se considera que esta

sustancia transmite señales entre diferentes poblaciones de linfocitos. Es una sustancia soluble sintetizada y liberada por los fagocitos mononucleares activados, y para que esto ocurra es necesario que estas células estén en contacto con el agente inductor por un periodo de tiempo; estos agentes inductores pueden ser microorganismos y sus productos como: endotoxinas, exotoxinas, peptidoglicanos, reacción antígeno anticuerpo, entre otros; se ha documentado que las respuestas a la IL-1 son: fiebre, la liberación de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos por células endoteliales y fibroblastos que actúan sobre médula ósea e inducen neutrofilia y producción de colágena, también se incrementa la liberación de reactivos de fase aguda como proteína C reactiva, haptoglobina, alfa-1-antitripsina; incrementa la liberación de aminoácidos por el músculo, activación de células NK; activa células T, lo que incrementa la liberación de anticuerpos y de linfocinas, IL-2, que actuarán sobre células efectoras y se supone que esto se produce a través de estimulación de la membrana de las células por IL-1 resultando en la liberación de ácido araquidónico precursor de prostaglandinas que inducen la liberación de leucotrienos, sustancias responsables o mediadores de estas respuestas (74-80). Otro mediador producido por el sistema monocito macrófago es la caquectina conocida también como factor necrozante de tumores (TNF). Es un péptido muy parecido a la IL-1 desde el punto de vista estructural y funcional ya que las respuestas a este mediador son muy semejantes a las producidas por IL-1; como fiebre, adherencia de polimorfonucleares, hematopoyeisis, gran catabolia de proteínas, incrementa la

gluconeogénesis, por su acción sobre lipoproteín lipasa inhibe la depuración de lípidos en plasma y por último también se ha descrito que incrementa la producción de reactantes de fase aguda (81-84).

Si recordamos los cambios orgánicos mencionados previamente que se presentan ante un proceso infeccioso agudo; son muy semejantes a los que son inducidos por estos mediadores. De tal manera que el incremento de la demanda metabólica y de nutrientes en los estados de infección aguda es producto de estos mediadores producidos por células activadas del sistema monocito-macrófago (15).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para desarrollar la defensa ante un proceso infeccioso agudo, se necesita incrementar la demanda metabólica y de nutrientes y esto ocurre por la activación del sistema monocito-macrófago y la producción de sus mediadores que se traduce en la inducción de respuestas orgánicas. Si un individuo se somete a privación aguda de alimento, su capacidad de reserva disminuye y se consume ante la falta de aporte; y si en estas circunstancias se encuentra ante un estado de infección aguda, esto puede repercutir sobre la capacidad de establecer una adecuada respuesta inmune. Considerando que la función del sistema monocito-macrófago es importante como desencadenante de toda esta cascada, podría ser uno de los primeros sistemas alterados. Ante la poca y controversial información que existe a este respecto, el propósito de este estudio fue de evaluar el efecto del ayuno agudo sobre un aspecto específico de la respuesta inmune como es la capacidad migratoria, fagocítica, microbicida y el metabolismo oxidativo fagocítico de macrófagos en un modelo animal experimental.

IV

HIPOTESIS

En ratas sometidas a ayuno agudo disminuye la capacidad migratoria, fagocítica y metabólica asociado a fagocitosis y la capacidad microbicida de los macrófagos, estudiada in vitro en presencia de suero de ratas normales y en presencia de suero de las propias ratas con ayuno.

V

OBJETIVO

- 1.- Determinar la actividad quimiotáctica, in vitro, de macrófagos de ratas sometidas a ayuno agudo usando suero autólogo y suero de ratas normales como quimioatrayente.
- 2.- Medir la capacidad fagocítica global y la actividad metabólica asociada a fagocitosis de macrófagos de ratas sometidas a ayuno agudo usando suero autólogo y suero normal como fuente de opsoninas.
- 3.- Determinar la capacidad microbicida (usando Salmonella typhimurium), de macrófagos de ratas sometidas a ayuno agudo usando suero autólogo y suero normal como fuente de opsoninas.

VI

MATERIAL Y METODO

Para todos los ensayos se usaron ratas Wistar de sexo masculino de 7-8 semanas de edad ya que por estandarización previa fué la edad mínima donde se obtuvo 95 a 100 % de sobrevivencia después de someter a los animales a privación total de alimento durante 72 h (ver cuadro No.1)

A) MODELO DE AYUNO: Todos los animales se sometieron a privación total de alimento a excepción de agua a libre demanda durante un periodo de 72 h (19-22,24,25) . Los animales se pesaron al principio y todos los días de ayuno en la misma báscula y a la misma hora y se mantuvieron aislados en cajas metabólicas.

B) OBTENCION DE MACROFAGOS (MØ) PERITONEALES: Las ratas se anestesiaron con éter y se les introdujo por inyección en la cavidad peritoneal 15 ml de solución balanceada de fosfatos (HBSS), pH 7.2, se les dió masaje peritoneal por 5', se procedió a sangrar a los animales por punción cardíaca e inmediatamente después, con técnica estéril se efectuó incisión abdominal y con pipeta Pasteur se recolectó el líquido de cavidad peritoneal, el cual se introdujeron tubos de vidrio de 20 ml con tapón de rosca, manteniéndolos a 4 C (85). A este material se le agregó Hypaque-Ficoll 2.5 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 25';

posteriormente, se deshecho el sobrenadante y se lavaron las células con HBSS en 2 ocasiones y el botón obtenido se ajusto a 1 ml con HBSS. Se procedió a determinar el número de células viables/ml, para lo cual se tomó una alícuota de 20 ul para la técnica de exclusión de colorante azul de tripano, contando el número en un hematocitómetro de Neubauer. Durante estandarización previa se fijaron láminas para tinción de wrigth y de esterasa inespecifica y se determinó que con esta técnica se obtiene 96-98 % de mononucleares de los cuales solamente un 10-12 % son linfocitos.

C) LAS VARIABLES (DEPENDIENTES) A MEDIR FUERON:

VARIABLE Y UNIDAD DE MEDIDA	TECNICA
1) Migración en <u>um</u>	Quimiotaxis en microcámara de Boyden
2) Capacidad fagocítica Pico de cpm log10	Quimioluminiscencia
3) Metabolismo Oxidativo de fagocitosis (via Hexosa monofosfato-VHM). Indice de producción de CO_2 .	Producción de $^{14}CO_2$
4) Capacidad Bactericida contra <u>S.Typhimurium</u> . (% de muerte bacteriana a los 60' y 120' de) de incubación.	Microtécnica modificada de Quie (determinación de UFC viables)

Los estudios de las funciones de $m\delta$, se realizaron in vitro, aunque la condición o maniobra (el ayuno) se aplicó en el modelo animal in vivo, del cual se obtuvieron los $m\delta$. Para mantener las condiciones elementales necesarias in vivo para las funciones a estudiar, se utilizó suero autólogo (SA) (de la propia rata

sometida a ayuno y cuyos m^o se estaban estudiando) y de suero de ratas testigo que recibieron dieta normal y consideradas como ratas normales (SN), como quimioatrayente o fuente de opsoninas en la determinación de la actividad migratoria, fagocítica y microbicida de los m^o in vitro.

D) QUIMIOTAXIS:

Se utilizó la técnica de microcámara de Boyden, que determina la migración in vitro de las células estudiadas, en este caso células mononucleares. Para este fin se usaron:

- CELULAS MONONUCLEARES (2×10^6 /ml)
- SN Y SA ACTIVADOS CON ZIMOSANO (partículas de S. cerevisiae el cual es activador de C3b y C5a)
- FILTRO DE NITRATO DE CELULOSA (MICROPORE) DE 8 micras de diámetro.
- UNA MICROCAMARA DE BOYDEN.

En los pozos inferiores de la cámara se colocó el quimioatrayente por duplicado, se usaron las variables SN, SA y como control HBSS; el filtro de nitrato de celulosa se introdujo en una solución de medio de Gey-Hepes con albúmina y se procedió a colocarlo por encima de los pozos inferiores; la porción superior de la cámara se colocó por encima de la porción inferior con ajuste y en los pozos superiores se colocaron las células $140,000$ (70 ul), se incuban a 37°C durante 90', posteriormente se retira el filtro de la cámara, se introduce en alcohol/agua 1:1 durante una h y después se procede a la tinción del filtro por la técnica de hematoxilina y deshidrataciones progresivas con diferentes

alcohóles y se lee la migración por la técnica de Zigmound y Hirsch (86,87).

E) QUIMIOLUMINISCENCIA:

Durante la capacidad fagocítica de una célula se desencadena actividad metabólica; el estímulo en la membrana de la célula fagocítica activa una oxidasa que transforma el oxígeno molecular (O_2) en ión superóxido (O_2^-) y este espontáneamente se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Durante esta actividad metabólica se desprenden productos inestables de oxígeno de alta energía en forma de fotones de luz y esto puede captarse en forma de partículas beta en un contador de centelleo líquido. A este fenómeno se le llama quimioluminiscencia y la técnica de su medición determina de manera indirecta la actividad fagocítica (67,69-71).

Para esta técnica se utilizaron:

CELULAS MONONUCLEARES 2×10^6 /ml
PARTICULAS DE ZIMOSANO (partículas de S. cerevisiae), como partícula a fagocitar, a una concentración de 10 mg/ml opsonizado con SN y SA al 40 % *.

LUMINOL (5-amino-2, 3 dihydro-1, 4 phtalazinedione; SIGMA) a una concentración de 4 mM preparado por sonicación y almacenado en solución en frasco cubierto, para proteger de la luz. Se utilizó como amplificador de la emisión de luz, que resulta de la producción de radicales de oxígeno durante la fagocitosis.

En viales de centelleo líquido de 10 ml, se colocaron células 400,000 (200 ul), mas 150 ul de luminol y 150 ul de zymo-

sano (un vial con zimosano opsonizado con SN y otro con SA) y se ajustó el volumen a 1 ml con HBSS. Como testigo de la prueba se usaron viales sin zimosano. Los viales se introdujeron en un contador beta de centelleo líquido Packard R300 y se determinó la actividad quimioluminiscente de las células en cuentas por minuto (cpm), usando el pico máximo de actividad para expresar resultados.

* Estandarización de actividad opsonónica del SN para la técnica de quimioluminiscencia. Como se puede observar en el cuadro No. 2, se realizaron 10 pruebas con el sistema completo: mó, luminol, variando exclusivamente la concentración de SN para opsonizar el zimosano con 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 % y 60 % de SN y se determinó el pico máximo de cpm en cada grupo. Como las varianzas de los resultados no fueron homogéneas, se determinó una diferencia general ($p < 0.01$) utilizando una prueba de varianza no paramétrica, de Friedman. Los mó del grupo de 40% de SN exhibieron el pico de cpm mal alto ($p < 0.05$) mediante la prueba U de Mann Whitney con 4.7 vs 3.2 (0%) 4.1 (10%), 4.5 (20%), 4.6 (30%) y 4.6 (50%). El testigo negativo de la prueba fue un sistema sin células que nos dió un valor basal de 1.9. Por lo que se decidió utilizar SN al 40% como fuente de opsoninas para esta prueba.

F) PRODUCCION DE ¹⁴CO :

Como se menciona previamente, la actividad fagocítica desencadena muchas vías metabólicas en las células para la elaboración de los productos tóxicos capaces de tener actividad

bactericida como el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno, que además pueden potencializar su acción mediante el sistema de mieloperoxidasa y haluros; sin embargo, si el H_2O_2 escapa de la vacuola fagocítica tiene que ser degradado ya que sería también altamente tóxico para la célula misma. Para contrarrestar esta eventualidad existen mecanismos de defensa de la célula para metabolizar el H_2O_2 : la catalasa, que es capaz de desdoblarlo a agua y oxígeno molecular y la otra vía es a través del ciclo de la hexosa monofosfato. Esta vía utiliza Glucosa-6-fosfato (G-6-P) que es oxidada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa convirtiéndola en una pentosa y CO_2 en esta reacción el NADP acepta el hidrógeno perdido y se transforma en NADPH, mismo que se usa tanto para la formación de O_2 y H_2O como también de sustrato de la glutatión deshidrogenasa (GSSG-DH) para reducir el glutatión oxidado. Este último puede ser oxidado de nuevo por acción de la glutatión peroxidasa usando H_2O_2 como donador del oxígeno, de tal manera que esta se transforma en agua; por lo tanto al incrementar la actividad fagocítica y formación de mas H_2O_2 se tendrán que activar mas las vías metabólicas como VHM. Para medir la actividad de la VHM, se utilizó la técnica de producción de $^{14}CO_2$, (71,88,89) la cual consiste en:

CELULAS 10^7 /ML

ZIMOSANO (como partícula a fagocitar) 50 mg/ml opsonizado con SN y SA al 40 % *

GLUCOSA marcada con ^{14}C en la posición número 1 (G-1- ^{14}C).

PAPEL FILTRO DE FIBRA DE VIDRIO (Bellco microharvester) de 3 cm de diámetro.

HIDROXIDO DE POTASIO AL 10 % (KOH)

ACIDO CLORHIDRICO 2 N. (HCL)

En tubos de cultivo Corning de 50 ml se mezclaron: G-1-¹⁴C
0.25 uCi (500 ul), Zimosano 200 ul y células mononucleares ⁶10
(100 ul) y se ajustó el volumen a un ml con HBSS. Inmediatamente
después de la colocación de las células, cada tubo es cubierto
con un papel parafina que contiene adherido un papel filtro de
fibra de vidrio de 3 cm de diámetro, al cual se le agrega 400 ul
de KOH y se cubre el tubo con el papel filtro hacia el interior
del mismo y por encima se sella el tubo con la tapa de rosca.
Tubos sin zimosano se prepararon como testigo de la prueba; todos
los tubos se incubaron en rotación a 37 °C, a los 60 min se le
agregó al contenido un ml de HCl por inyección a través de la
pared del tubo, sellando el orificio de entrada con plastilina y
se deja en incubación 30 min más, al término de este tiempo, se
retiró el filtro se introdujo en un vial con 5 ml de tolueno y se
determinó las cpm producidas (promedio de 30 min de conteo). Se
expresó los resultados como:

$$\text{INDICE DE PRODUCCION } ^{14}\text{CO}_2 = \frac{\text{CPM CELULAS CON ZIMOSANO}}{\text{CMP CELULAS SIN ZIMOSANO}}$$

* Estandarización de actividad opsonónica de SN para la técnica
de producción de ¹⁴CO₂: como se puede ver en el cuadro no. 2 se
realizaron 10 pruebas ² con el sistema completo: m⁶, 0.25 uCi de
G-1-¹⁴C y zimosano, variando la concentración con 0%, 2.5%, 5%,
10%, 20%, y 30% de SN como fuente de opsoninas en diferentes

viales. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Friedman demostrando diferencia general ($p < 0.01$). El índice de producción de CO_2 en los grupos de 10%, 20% y 30% fue similar ($p > 0.05$) con 5, 4.7 y 5 respectivamente y a su vez fueron significativamente más altos que los que produjeron los más de los grupos con concentraciones menores de 10% ($p < 0.05$ U de Mann Whitney). El testigo negativo de la prueba fue un vial sin células. Por estos resultados decidimos utilizar una concentración de 10% de SN como fuente de opsoninas en esta prueba.

G) CAPACIDAD BACTERICIDA:

Para la determinación de esta función se utilizó una microtécnica modificada de Quie (90), la cual ya fue estandarizada en nuestro laboratorio para S. aureus (91) y previamente procedimos a la estandarización para S. typhimurium, con determinación de la cinética de crecimiento bacteriano.

Se decidió utilizar S. typhimurium como bacteria a fagocitar, debido a su característica de ser un microorganismo intracelular contra el cual el sistema monocito macrófago juega un papel predominante como bactericida in vivo (48).

Para realizar esta técnica se utilizó:

CELULAS MONONUCLEARES 5×10^6

S. typhimurium, la cual se dejó crecer por un periodo de 18 h. en caldo de agar soya tripticasefina a $37^\circ C$ (fase log de crecimiento), a la mañana siguiente, la bacteria se lavó con HBSS

y se determinó una concentración de 10^8 /ml mediante correlación con escala de Mc Farland, determinado la densidad óptica por espectrofotometría, posteriormente se procedió a opsonizar la bacteria con SN y SA al 10%*, lo que dejó una concentración final de la bacteria de 10^7 .

En microplacas de titulación se mezclan 4.0×10^5 células (80 ul), mas 8.0×10^5 bacterias (80 ul) opsonizadas con SN y SA al 10% (se preparan pozos por separado con SN o con SA), relación célula:bacteria 1:2. Se prepararon pozos por duplicado y se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 60 y 120 (min de incubación), las cuales se diluyeron 1:1000 y se sembraron 100 ul en placas de agar soya tripticasa que se dejaron incubando durante toda la noche y al día siguiente se lee el número de UFC viables y se expresa el resultado en forma de % de mortalidad de las bacterias a los 60 y 120 min de incubación.

* Estandarización de actividad opsonica del suero en la técnica de capacidad microbicida contra Salmonella typhimurium: como se puede observar en el cuadro no. 4, se realizaron 8 pruebas con el sistema completo: $m\delta$ y S.typhimurium, pero se varió en diferentes viales 0%, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20% la concentración de SN como opsonizante. Por un análisis de Friedman se determinó una diferencia general ($p < 0.01$). Los $m\delta$ del grupo de 10% y 15% de SN, exhibieron capacidad bactericida similar ($p > 0.05$ U de Mann Whitney) con 67.8% y 63.4% respectivamente y fueron significativamente mas altas que la capacidad bactericida exhibida por los $m\delta$ en presencia de concentraciones menores del 10% de SN

como opsonizantes, los cuales estuvieron en un rango de 22.5 % y 51 % e inclusive la utilización de concentración de 20 %, solo permitió una capacidad bactericida del 47% de estos m^o. En base a estos resultados se utilizó una dilución de 10 % de SN como fuente de opsoninas.

H) TAMANO DE LA MUESTRA:

Tomando en cuenta un α de significancia de 0.05, β de 0.2 y tratando de encontrar una diferencia de cuando menos el 25 % entre las funciones de los m^o de las ratas testigo y las ratas sometidas a ayuno, tenemos que cuando menos debemos contar con 12 ensayos completos para comprobar nuestra hipótesis (94).

VII

DISEÑO GENERAL

Teniendo en cuenta el tamaño de la muestra necesario se decidió utilizar un total de 60 ratas Wistar de sexo masculino de las características ya descritas, las cuales se dividieron al azar en un grupo de 40 animales que se sometió a ayuno y otro de 20 ratas que recibieron alimentación normal. A las 72 h los animales se sacrificaron, previa obtención de m^o peritoneales y sangre. Macrófagos del 50 % de los animales del grupo de ayuno sirvieron para realizar las pruebas de quimiotaxis (QTX) y capacidad bactericida (CB), y el otro 50 % para realizar pruebas de quimioluminiscencia (QL) y de producción de CO_2 . Cada uno de los animales del grupo testigo sirvió para la realización de todas las pruebas de función de macrófagos. En el grupo de ayuno las pruebas se realizaron en presencia de SN y de SA. Se excluyeron del estudio las ratas que murieron antes de completar las 72 h de protocolo de alimentación y aquellas que se contaminaron macroscópicamente con sangre al momento del lavado peritoneal (ver figura no. 1).

Los Resultados se pueden resumir en :

	GRUPO DE AYUNO Quimioattractante		TESTIGO
QTX	SN	SA	SN
	Fuente de opsoninas		
QL	SN	SA	SN
¹⁴ CO	SN	SA	SN
² CB	SN	SA	SN

VIII

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Nuestros grupos de análisis fueron tres en cada función estudiada a los que se les efectuó prueba de homogenización de varianzas, para determinar si se realizaba análisis paramétrico (anova 1) o no paramétrico (Kruskal-Wallis) para determinar diferencias entre 3 o mas grupos no pareados. Si la diferencia existía se determinó por t de student o U de Mann Whitney según el caso. El análisis del factor suero normal vs suero autólogo se efectuó por T de student para muestras pareadas o Wilcoxon dependiendo de pruebas de distribución normal. Se tomó en cuenta un alfa de significancia de 0.05 (92,93).

Todos los resultados se expresaron en promedio mas, menos error estándar ($\bar{x} \pm ES$) ya que esto permitirá hacer un análisis rápido al lector de límites de confianza en los resultados (92,93)

RESULTADOS:

De las 20 ratas iniciales en el grupo testigo, una muestra se excluyó por contaminación macroscópica con sangre, y otra por pérdida del material colectado de lavado peritoneal por ruptura accidental del tubo de ensayo. Por lo tanto el No. total de ensayos realizados fué de 18. De las 40 ratas sometidas a ayuno 4 murieron antes de completar 72 h de ayuno, los 36 animales restantes se distribuyeron al azar en 2 grupos con 18 ratas. Un grupo para la evaluación de actividad quimiotáctica y de capacidad bactericida de sus m^o y el otro para la evaluación de quimiolumiscencia y actividad de la vía hexosa monofosfato (producción de ¹⁴CO₂). Del primer grupo se excluyeron 3 muestras por contaminación macroscópica con sangre; del segundo grupo también se excluyó una muestra por contaminación macroscópica con sangre y 2 por ruptura accidental del tubo que contenía el material de lavado peritoneal. De tal manera que al final, se incluyeron 15 ensayos por cada grupo de ratas sometidas a ayuno.

Al inició del protocolo de trabajo, el peso promedio de las ratas de ambos grupos fué similar 178.6 ± 2.15 gm 178.3 ± 2.5 (p=0.23). A las 24 h de ayuno, las ratas de ese grupo disminuyeron significativamente el peso de 175.8 ± 2.15 g a 155.02 ± 1.8 g (p < 0.01), los animales del grupo testigo pesaron 181.4 ± 2.42 g. A las 48 h de ayuno, el peso de las ratas del grupo de ayuno fué 142.1 ± 1.8 g y el grupo testigo fué 184.8 ± 2.5 . A las 72 h las ratas sometidas a ayuno pesaron 125.9 ± 1.9 g con

una pérdida significativa de peso ($p < 0.0001$) respecto del peso inicial y las ratas del grupo testigo pesaron 189.1 ± 2.8 g. (ver cuadro no. 5 y figura no. 2).

El número de $m\phi$ obtenidos por lavado peritoneal en las ratas sometidas a ayuno fué de $7.1 \times 10^6 \pm .29$; significativamente menor ($p < 0.0001$) que el obtenido en las ratas del grupo testigo que fué de $25.4 \times 10^6 \pm .29$ (ver cuadro no. 6 y figura no. 3.)

La migración al azar (utilizando solución HBSS como quimioatrayente) de los $m\phi$ de ratas sometidas a ayuno fué de 39 ± 1.6 , similar a la exhibida por los $m\phi$ de las ratas testigo que fué de 36.8 ± 1.4 ($p = .25$). La GTX de los $m\phi$ de las ratas sometidas a ayuno fué de 50.5 ± 2.22 μ m en presencia de SN como quimioatrayente y de 44 ± 2 μ m en presencia de SA, siendo significativamente mas alta ($p < 0.01$) la GTX exhibida por los $m\phi$ de los animales del grupo testigo la cual fué de 63.5 ± 2.4 μ m (ver cuadro no. 7 y figura no. 4.)

La actividad fagocítica de los $m\phi$, medida por el método de QL, en los animales sometidos a ayuno fué de $4.5 \pm .03$ cuando se usó SA para opsonizar el zimosano, incrementando a $4.6 \pm .04$ ($p < 0.05$) cuando se usó SN como fuente de opsoninas sin embargo ambos resultados fueron significativamente menores ($p < 0.01$) que la QL exhibida por los $m\phi$ de las ratas testigo que fué de $4.9 \pm .04$. (Ver cuadro no 8 y figura no. 5).

La actividad metabólica de la vía de la hexosa monofosfato medida a través del índice de producción de $^{14}CO_2$ durante la actividad fagocítica de los m^o de las ratas sometidas a ayuno fué de 3.6 ± 0.17 al usar SN como fuente de opsoninas del zimosano, significativamente mas alta ($p < 0.05$) que el 2.9 ± 0.22 producido al usar SA como opsonizante, pero ambos índices son significativamente mas bajos ($p < 0.01$) que el producido por los m^o de las ratas testigo que fué de 4.6 ± 0.16 . (ver cuadro no. 9 y figura no.6).

Finalmente, la capacidad bactericida contra S.typhimurium de los m^o de las ratas sometidas a ayuno a los 60 min de incubación fué de 22.1 ± 2 cuando se utilizó SA como fuente de opsoninas y cuando se utilizó SN con éste mismo fin, la capacidad bactericida de estos macrófagos se incrementó ($p < 0.05$) a 34.5 ± 2.7 , la cual fué similar al 37.7 ± 1.6 ($p < 0.05$) que fué la capacidad bactericida exhibida por los m^o de las ratas del grupo testigo. Cuando se estudio esta función a los 120 min de incubación, los m^o de las ratas del grupo de ayuno tuvieron capacidad bactericida de 38.8 ± 1.9 al utilizar SA como fuente de opsoninas y se incrementó significativamente ($p < 0.05$) a $46.4 \pm$ al opsonizar la bacteria con SN, sin embargo ambos valores son significativamente menores ($p < 0.01$) que la actividad bactericida exhibida por los m^o de las ratas testigo que fué de 62.8 ± 1.1 . (ver cuadro no. 10 y figura no. 7).

DISCUSION

La privación aguda de alimento en este modelo experimental, condicionó pérdida de peso de un 30 % aproximadamente en las ratas wistar de 7 a 8 semanas de edad, lo que se considera un estado de desnutrición aguda. El número de m^o obtenidos por lavado peritoneal disminuyó por efecto de la privación aguda de alimento, estos resultados son semejantes a los descritos por Martínez D. en 1975 (16,17), respecto a la obtención de un menor número de células mononucleares obtenidas de bazo y sangre periférica en ratones sometidos a ayuno por 72 h, sin embargo no es posible dilucidar con nuestros resultados si el problema es disminución o inhibición de la producción así como de la migración de estas células hacia la cavidad peritoneal, ya que no utilizamos ningún estímulo en cavidad peritoneal para intentar obtener mayor número de m^o, con en el fin de evitar estimular intrínsecamente a los m^o antes de evaluar las funciones de QTX, actividad fagocítica por QL y ¹⁴CO₂ y de capacidad bactericida.

2

La actividad funcional de los m^o estudiada, en general, disminuyó significativamente por efecto de la privación aguda de alimento. Este defecto en la función de m^o se corrige parcialmente en presencia de suero de ratas normales.

Así tenemos que la migración al azar no fue afectada por el ayuno agudo, sin embargo cuando utilizamos como estímulo

quimioatrayente suero de la propia rata sometida a ayuno, la migración de los $m\phi$ de estas ratas se incrementó discretamente respecto de la migración al azar. Estos resultados sugieren que el ayuno agudo pudo afectar la producción de las sustancias quimioatrayentes o disminuir la actividad de las mismas en el suero, así como también puede estar afectando directamente al $m\phi$ en su capacidad de responder a un estímulo migratorio. Con este modelo no podemos concluir si la privación aguda de alimento induce algún factor que disminuye directamente la capacidad del suero para estimular la migración de las células fagocíticas, ya que no contamos con resultados de la migración de los $m\phi$ de ratas testigo ante suero de ratas sometidas a ayuno como fuente de factores quimioatrayentes, debido a que no fué el objetivo de este trabajo, sin embargo se considera obligada esta pregunta como seguimiento inmediato de este trabajo. La utilización de suero normal como estímulo mejoró la migración de los $m\phi$ de las ratas sometidas a ayuno, lo que sugiere que la actividad quimioatrayente del suero, si fué afectada por el ayuno. Por otra parte, esta corrección del defecto de migración de los $m\phi$ ante suero normal no fué suficiente para igualar la migración exhibida por los $m\phi$ de las ratas testigo, lo que indica que la privación aguda de alimento también afectó algún factor del $m\phi$ como célula, para responder al estímulo y poder migrar.

De igual manera la actividad fagocítica de los $m\phi$ disminuyó por efecto de la privación aguda de alimento, tanto al medir la actividad de quimioluminiscencia como la actividad de la vía hexosa monofosfato a través de la producción de ¹⁴CO. Así mismo,

el menor pico de quimioluminiscencia y el menor índice de producción de ¹⁴CO se obtuvo de los ²mó de ratas sometidas ayuno cuando se utilizó suero de la propia rata como fuente de opsoninas para el zimosano, que fué la partícula a fagocitar. La utilización de suero normal como fuente de opsoninas incrementó el pico de quimioluminiscencia y la producción de ¹⁴CO por los ²mó de las ratas sometidas a ayuno, lo que sugiere que la capacidad opsonica del suero fué afectada por el ayuno. Sin embargo, el incremento de esta función en presencia de suero normal aún esta significativamente disminuida respecto del pico de quimioluminiscencia y producción de ¹⁴CO exhibidos por los ²mó de las ratas testigo. La alteración en la fagocitosis de los ²mó, parece ser combinada, ya que hay disminución de la capacidad opsonica del suero que se corrige parcialmente con suero normal, lo que también indica que existe algún efecto del ayuno sobre el ²mó mismo, que resulta en disminución de su capacidad fagocítica.

La condición de ayuno agudo disminuyó la capacidad bactericida contra S. typhimurium de los ²mó/ cuando se evaluó a los 60 min de incubación de la bacteria con estas células y al utilizar suero autólogo como fuente de opsoninas. La utilización de suero normal para opsonizar a la bacteria corrigió totalmente la alteración previamente descrita. De manera similar, el ayuno agudo disminuyó la capacidad bactericida cuando se evaluó ésta misma función con un tiempo de incubación de 120 min y utilización de suero autólogo. Por otra parte la utilización de suero normal como fuente de opsoninas para la bacteria corrigió parcialmente esta alteración. El hecho de una corrección total de la disminución de la capacidad bactericida contra S. typhimurium,

al usar suero normal como fuente de opsoninas en el periodo corto de incubación y solamente parcial en el periodo largo, puede explicarse si tomamos en cuenta, que para la adecuada actividad bactericida, intervienen factores como la propia actividad lítica del suero, la actividad opsónica del mismo, y la capacidad de la célula fagocítica per se para destruir a la bacteria. La actividad lítica del suero puede tener implicación importante como mecanismo bactericida mas temprano, pero en este caso la concentración de suero utilizada fué del 10% lo que brindó una cantidad adecuada para opsonización de la bacteria, pero no es suficiente para atribuir la mayor actividad bactericida durante este tiempo de incubación. Una explicación para estos resultados, es que en el periodo corto de incubación se esta detectando la actividad bactericida máxima que puede expresar el m^o en condiciones de ayuno, y su implicación sobre la capacidad opsónica del suero es lo que determinó la diferencia, de ahí que se pueda corregir con la utilización de suero normal como fuente de opsoninas. Por lo tanto, la corrección parcial del defecto, cuando se evaluó esta función durante un tiempo de incubación de 120 min, apoya aún más que la privación aguda de alimento disminuyó también la capacidad intrínseca del m^o para matar a la S. typhimurium, ya que durante la prolongación de la incubación el mayor número de bacterias muertas dependía directamente de la adecuada función de los mecanismos microbicidas del m^o per se.

En resumen, la condición de privación aguda de alimento en este modelo experimental, no implica solo deficiencia en nutrientes, sino probablemente un estado multifactorial de

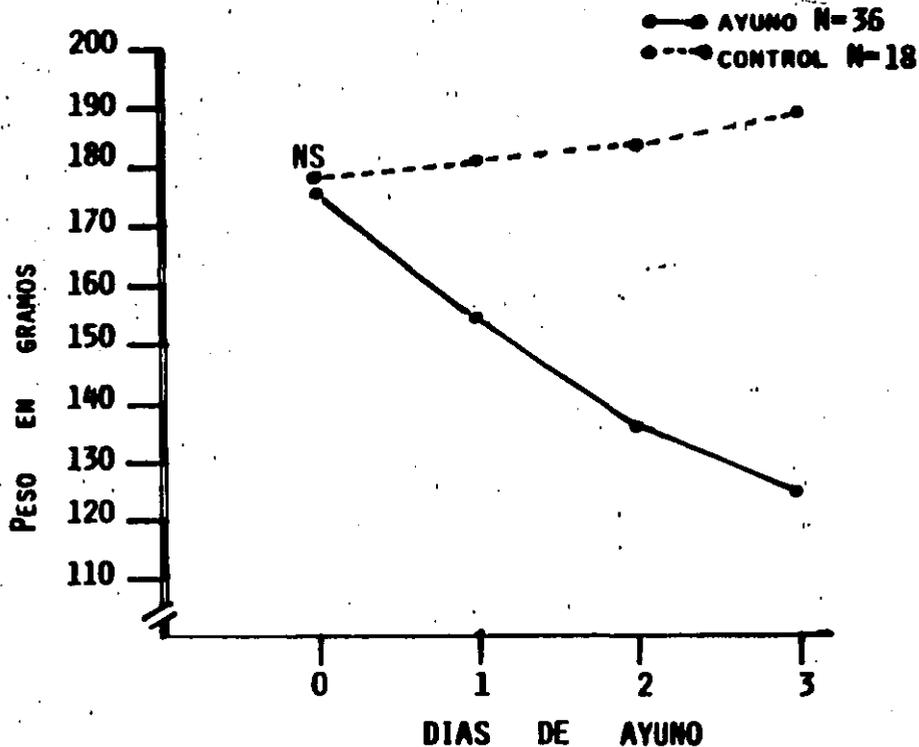
alerta del individuo. La disminución de la función fagocítica estudiada de manera general in vitro pudo presentarse por varios factores que no podemos definir con este modelo, solo podemos evidenciar que el fenómeno existe. Las perspectivas de investigación inmediatas deben relacionarse a: 1) Modelo animal experimental de sepsis en condiciones de ayuno agudo con diferentes retos bacterianos (S. typhimurium, S.aureus, entre otros), 2) Estudio de las funciones fagocíticas in vitro en *mé* de ratas normales en presencia de suero de ratas sometidas a ayuno, para dilucidar si existe algún factor inhibitor en el suero 3) Medir longitudinalmente los niveles de monocinas como IL-1 y TNF en el suero de las ratas sometidas a ayuno y de las ratas normales, ya que estas monocinas juegan papel preponderante en la activación inicial de los *mé* y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria de fase aguda. Una posibilidad para definir si es el déficit energético agudo lo que induce el fenómeno sería someter el mismo modelo animal a sobrealimentación y posteriormente a privación aguda de alimento de tal manera que aún con una pérdida de peso del 30 % los animales todavía conserven peso adecuado para su edad y realizar la evaluación de la función de *mé* in vitro de estas ratas. Por último se debe estudiar la capacidad funcional de los *mé* de pacientes sometidos a privación aguda de alimento por diferentes causas, correlacionarla con el grado de déficit energético agudo que estos pacientes presenten y con la presencia o no de infección como complicación. Lo que nos permitiría acercarnos mas a la evidencia de que la disminución de la función de los *mé* es una de las causas que predisponen a infección en condiciones de privación aguda de alimento.

CONCLUSIONES

En este modelo animal experimental, la privación aguda de alimento disminuyó la actividad funcional de los $m\phi$, evaluada en capacidad migratoria (quimiotaxis), actividad fagocítica (pico máximo de cpm de quimioluminiscencia), actividad metabólica asociada a fagocitosis (vía hexosa monofosfato por la producción de $^{14}CO_2$) y capacidad bactericida contra S. typhimurium. Esta deficiencia funcional de los $m\phi$ producida por el ayuno, se corrigió parcialmente en presencia de SN, pero aún fue significativamente menor que la actividad funcional de los $m\phi$ del grupo testigo. Por lo tanto el ayuno agudo disminuyó la actividad quimioatrayente y opsónica del suero, así como a la actividad celular intrínseca del $m\phi$. Estos resultados sugieren que la disminución en la función de los $m\phi$ puede ser uno de los mecanismos por el cual se incrementa la susceptibilidad a las infecciones en condiciones de privación aguda de alimento.

FIGURA No. 2

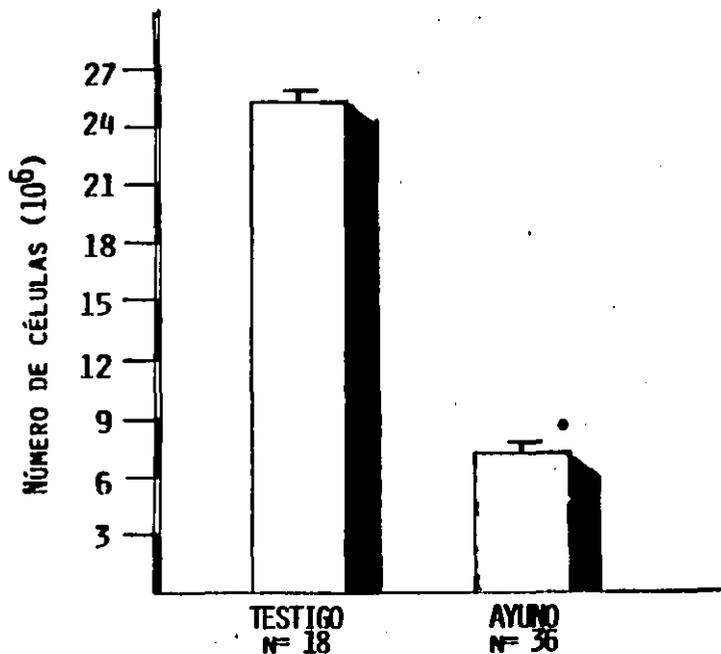
EFFECTO DEL AYUNO POR 72 HORAS
SOBRE EL PESO DE LAS RATAS



NS= $P > 0.05$ T DE STUDENT PARA MUESTRAS NO PAREADAS.

FIGURA No. 3

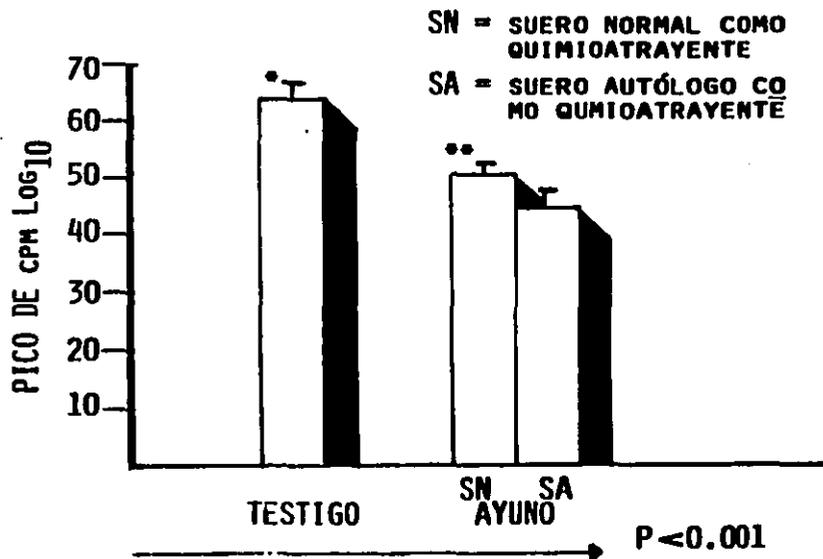
EFFECTO DEL AYUNO AGUDO SOBRE EL NUMERO DE CELULAS
MONONUCLEARES OBTENIDAS POR LAVADO PERITONEAL



$P < 0.01$ T DE STUDENT PARA MUESTRAS NO PAREADAS

FIGURA No. 4

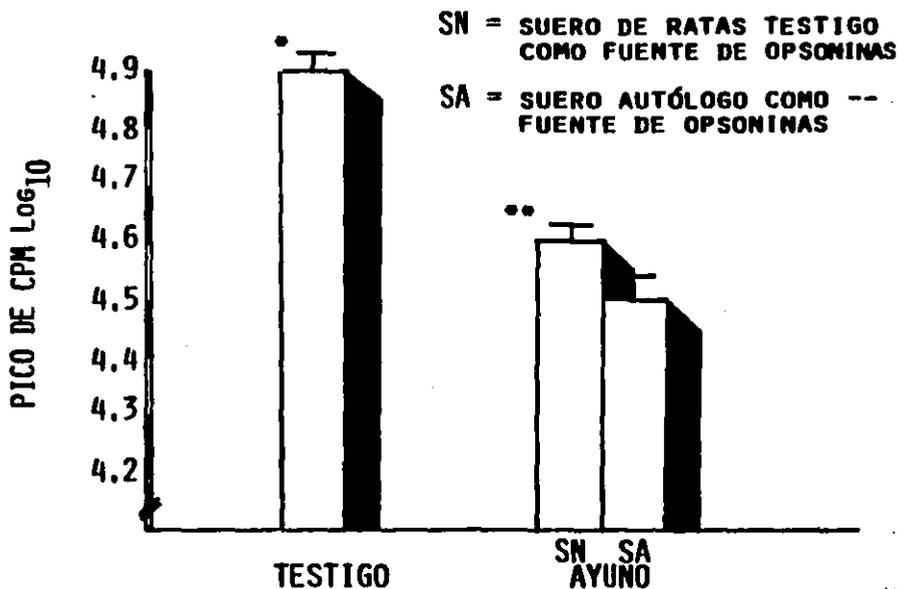
EFFECTO DEL AYUNO AGUDO SOBRE LA
ACTIVIDAD MIGRATORIA DE MACROFAGOS



*P < 0.001 TESTIGO VS AYUNO SA (U. DE MANN
P < 0.01 TESTIGO VS AYUNO SN WHITNEY)
**P < 0.05 AYUNO SN vs SA (WILCOXON)

FIGURA No. 5

EFFECTO DEL AYUNO AGUDO SOBRE LA
ACTIVIDAD FAGOCITICA DE MACROFAGOS
(PICO MÁXIMO DE CPM DE QUIMIOLUMINISCENCIA)



→ P < 0.01
KRUSKAL - WALLIS

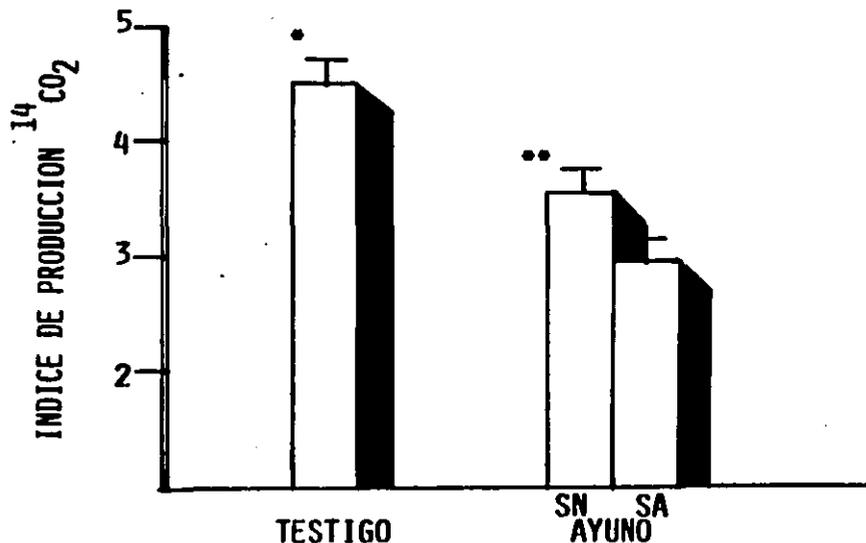
*P < 0.001 TESTIGO VS AYUNO SA (U DE MANN WHITNEY)

P < 0.01 TESTIGO VS AYUNO SN

**P < 0.01 AYUNO SN VS SA (WILCOXON)

FIGURA No. 6

EFFECTO DEL AYUNO AGUDO SOBRE LA ACTIVIDAD METABOLICA ASOCIADA A FAGOCITOSIS (ACTIVIDAD DE LA VIA HEXOSA-MONOFOSFATO)



→ P < 0.01

KRUSKALL - WALLIS

*P < 0.001 TESTIGO VS AYUNO SA (U DE MANN WHITNEY)

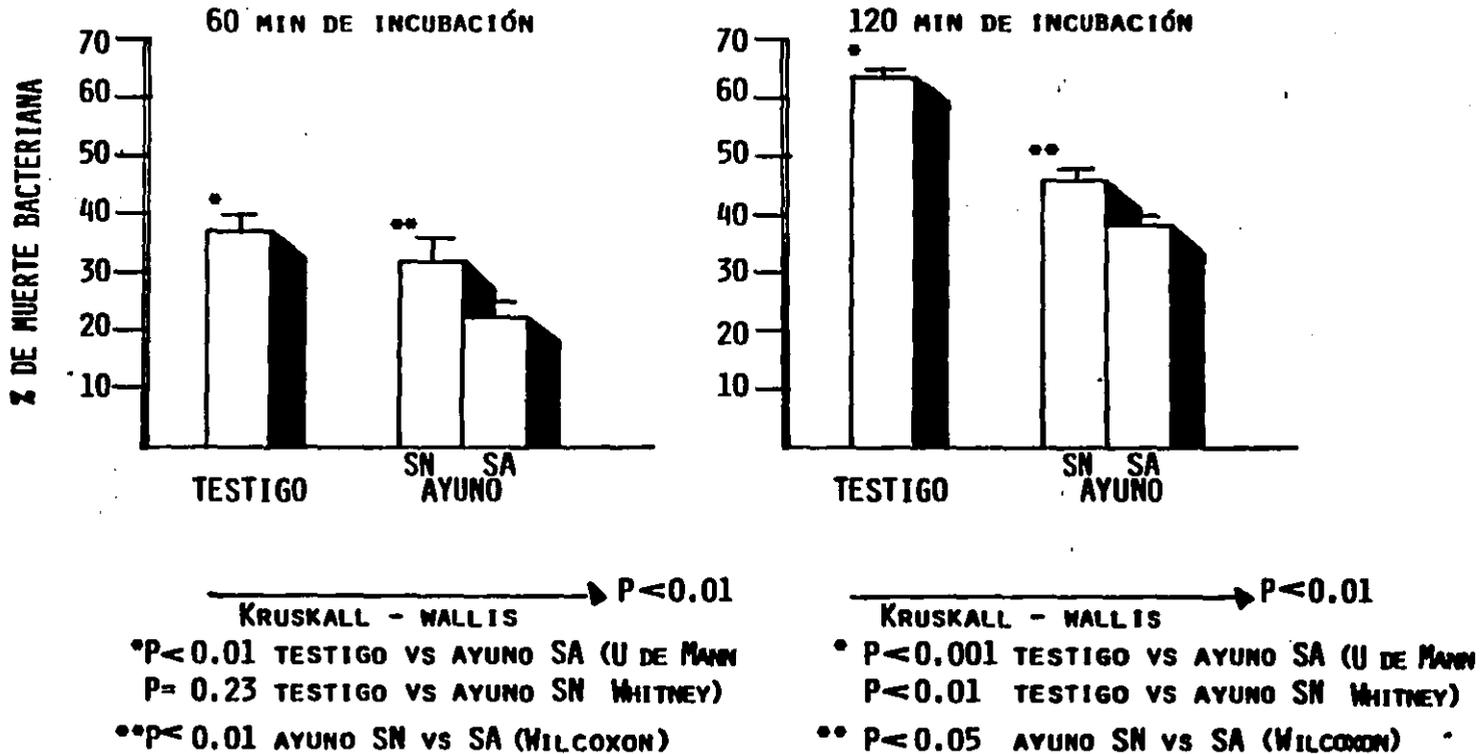
P < 0.01 TESTIGO VS AYUNO SN (U DE MANN WHITNEY)

**P < 0.05 AYUNO SN VS SA (WILCOXON)

FIGURA No. 7

EFFECTO DEL AYUNO AGUDO SOBRE LA CAPACIDAD
BACTERICIDA DE MACROFAGOS CONTRA S. THYPMURIUM

SN = SUERO DE RATAS TESTIGO COMO FUENTE DE OPSONINAS
SA = SUERO AUTÓLOGO COMO FUENTE DE OPSONINAS



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bistrrian B R: Interaction of nutrition and infection in the hospital setting. *Am j Clin Nutr*, 1977; 30: 1228-1232.
- 2.- Santos J I, Vitale J: Relación entre desnutrición-infección-inmunidad. *Infectología*, 1982; 4: 259-273.
- 3.- Roster F T, Curlin G E, Aziz K M A, Haque A: Synergistic impact of measles and diarrhea on nutrition and mortality in Bangladesh. *Bull. WHO*, 1981; 59: 901-908.
- 4.- Santos J I, Hill H R, Kumate J: Nutrition infection interacciones: Report on a clinical study interrelating infection and nutrition in Mexican children. Presented in V international congress of infectious diseases. November 1980, Mexico city Mex.
- 5.- Watson R R: Nutrition and immunity. *J Dis Child*, 1981; 48: 443-446.
- 6.- Stiehm E R: Immunity humoral in malnutrition. *Fed Proc*, 1980; 39: 3093-3097.
- 7.- Keusch G T, Cruz J, Torun B, Urrutia J I, Smith H. Jr, Flores R, Goldstein A L: Immature circulating lymphocytes in malnourished Guatemalan Children, *J Pediatr Gastroenter*. 1987; 6: 387-391.
- 8.- Ing A F M, Meakins J L, Mc Lean APH, Christou N V: Determinants of suceptibility to sepsis and mortality malnutrition vs a nergy. *J Surg Res*. 1982; 32: 249-255.
- 9.- Nähr E W, Meakins J L: Biological response modifiers. In, Meakins J L editor: *Surgical infections in critical care medicine*, 1985, Churchil Livingstone, P P 309-307.
- 10.- Pingleton S K, Gary S Harmon: Nutritional management in acute respiratory failure. 1987; 257: 3094-3099.
- 11.- Pingleton S K: Complication of acute respiratory failure. *Med Clin North Am*. 1983; 67: 725-746.
- 12.- Driver A G, LeBrun R R: Iatrogenic malnutrition in patients receiving ventilatory support. *JAMA*, 1980; 244: 2195-2196.
- 13.- Beisel W R: magnitude of the host nutritional responses to infection. *Am Clin Nutr*, 1977; 30: 1236-1247.
- 14.- Keusch G T: Nutrition as a determinant of host responses to infection and the metabolic sequellae of infectious diseases. *Am Infect Dis*, 1979; 2: 265-303.
- 15.- Johnston RB: Monocytes and macrophages. *N Engl J Med*, 1988; 318:747-752.

- 16.- Lukasewycs O A, Martinez D, Murphy W H: Immune mechanisms in leukemias: Evaluation of immunocompetent cell populations. *J Immunol*, 1975, 114: 1491-1496
- 17.- Martinez D, Cox S, Lukasewycs O A, Murphy W H: Immune mechanisms in leukemias: Suppression of cellular immunity by starvation. *J N Cancer Int*, 1975; 55: 935-939.
- 18.- Meakins J L, Pietsch J B, Roubelick O: Delayed hypersensitivity: Indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Am Surg*, 186: 241-250.
- 19.- Wing E J, Young J B: Acute starvation protects mice against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 1980; 28: 771.
- 20.- Wing E J, Barczynski L K; Bochmen S M: effect of acute nutritional deprivation on immune function in mice. I. Macrophages. *J Immunol*, 1983; 3: 543-550.
- 21.- Saxena R K, Saxena O B, Adlen W H: Regulation of natural killer activity in vivo: Part I-loss of natural killer activity during starvation. *Indian J Exp Biol*, 1980; 18: 1383-1386.
- 22.- Nohr C W, Christou N V, Rode H, Garden J, Meakins J L: In vivo and in vitro humoral immunity in surgical patients. *Am Surg* 184; 200: 373-380.
- 23.- Shennib H, Chu-Jeng R, Mulder D S, Leugh J O: Depression and delayed recovery of alveolar macrophages function during starvation and refeedings. *Surg Gynecol*, 1984; 158: 535-539.
- 24.- Christou N.V: Host defense mechanisms in surgical patients: a correlative study of the delayed hypersensitivity skin test response granulocyte function and sepsis in 2202 patients. *Can J Surg*, 1983; 28: 39-49.
- 25.- Nohr C W., Tchervenk J I, Meakins J L. Christou N V.: Malnutrition and humoral immunity: Short-term acute nutritional deprivation. *Surg*, 1985; 98: 769-776.
- 26.- Nohr C W, Laher D A, Meakins J L. Chistou N V: In vivo and in vitro humoral immunity in surgical patients: Antibody response to pneumococcal polysaccharide. *Surg*, 1986; 100: 229-237.
- 27.- Keusch G T: The consequences of fever. *Am J Clin Nutr*, 1977; 30: 1211-1214.
- 28.- Beisel W R, Scebocinski P Z.: Mediador endógeno de fiebre, relacionado a respuestas hormonales y metabólicas. en *Fiebre*, Lipton J M. (ed Raven, New York, 1988 p 39.)

- 29.- Beisel W R: Effects of infection on nutritional status and immunity. Fed Proc, 1980; 39: 3105-3108.
- 30.- Mata L J; Kramal R A, Urrutia JJ, Garcia B.: Effect of infection on food intake and the nutritional state: perspective as viewed from the village. Am J Clin Nutr 1977; 30: 1215-1227.
- 31.- Smith I M, Kennedy L R, Karlsson M H, Johnson V L, Bunmester L F: Adrenergic mechanisms in infection III. - and B- receptor blocking agents in treatment. Am J Clin Nutr, 1977; 30: 1285-1288.
- 32.- Beisel W R, Wannemacher R W Jr.: Gluconeogenesis, Ureagenesis, y Ketogenesis during sepsis. JPEN, 1980; 4: 277-285.
- 33.- Long C L, Shiller W R, Blakemore, Geiger B A, del O M, Henderson B S.: Muscle protein catabolism in the septic patient as measured by 3 methylhistidine excretion. Am J Clin Nutr, 1977; 30: 1349-1352.
- 34.- Long C L, Jeevonandam M, Kius B M, Kinney J M: Whole Body protein synthesis and catabolism in septic man. Am J Clin Nutr, 1977; 30: 1340-1344.
- 35.- Wannemacher R W Jr.: Key role of various individual aminoacids in host responses to infection. Am J Clin Nutr. 1977; 30: 1269-1280.
- 36.- Roseblatt S. George H A, Clowen Jr., George BC, Hirsch E, Lindberg B.: Exchange aminoacids by muscle and liver in sepsis. Arch Surg, 1983; 118: 167-175.
- 37.- Conejero R, Lorenzo A, Arnal F, Garcia J.: Significance of the changes in plasma amino-acids levels in meningococcal infection. Care Med, 1987; 13: 337-341.
- 38.- Long C L.: Energy balance and carbohydrate metabolism in infection and sepsis. Am J Clin Nutr, 1977; 30: 1301-1310.
- 39.- Wannemacher R W, Beall F A, Canonico P G, Dinterman R E, Hadick C L, Neufeld H A.: Glucose and alanine metabolism during bacterial infections in rats and rhesus monkeys. Metabolism, 1980; 39: 201.
- 40.- Black P R, Brooks D C, Bessey P G, Wolfe R R, Wilmore D W: Mechanism of insulin resistance following injury. Ann Surg. 1982; 196: 420.
- 41.- Canonico P G, Ayala E, Rill W L, Lihle J S.: Effects of pneumococcal infection on rat liver microsomal enzyme and lipogenesis by isolates hepatocyte. Am J Clin Nutr, 1977; 30: 1359-1362.

- 42.- Neufeld H A, Kaminski M V, Wannemacher R W: Effect on inflammatory and non inflammatory stress on ketone bodies and free fatty acids in rats. *Am J Clin Nutr*, 1977; 30: 1357.
- 43.- Masoro EJ: Fat metabolism in normal and abnormal states. *Am J Clin Nutr*, 1977;30:1311-1320.
- 44.- Bryant N J: Laboratory immunology and serology. Second ed. by W R Sanders company, 1986 Ontario Canada.
- 45.- Wenb Z: Células fagocíticas: Funciones quimiotácticas y efectores de los macrófagos y granulocitos. *Inmunología básica y clínica*. Ed. by Stites D P; Stobo J A; Fudenberg H H; Wells J V; y ed. México. El manual moderno, S.A. de C.V. 1982, pp 112-127.
- 46.- Sharma S A: The macrophages. *Clin Immunol Allerg*, 1986; 6: 1-28.
- 47.- Pitt J. Biology of the monocyte and macrophage. A review. *Malnutrition and the immune response* . Edited by Suskind R M. New York. Raven press, 1977, pp 225-230.
- 48.- Volkman A, Ciollins F M: The cytokinetics of monocytosis in acute salmonella infection in the rat. *J Exp Med*, 1977; 139: 266-277.
- 49.- Vanfurth R, Gassmannae, Diesselhoff-Den-Dulk MMC: The effect of azathioprine (Inmuran) on the cell cycle of promonocyte and the production of monocytes in the bone marrow. *J Exp Med* , 1975; 141: 531-546.
- 50.- Watson R R: Stress caused by dietary changes: Costicosteroid production, a partial, explanation for immunosuppression in the malnourished: Nutrition, disease persistence, and immunefunction. Edited by Watson R R. New York. Marcel Dekker, Inc. 1984, pp 273-281.
- 51.- Oppenheim J J, Leventhal B G, Hersh E M: The transformation of column-purified lymphocytes with no specific and specific antigenic stimuli. *J Immunol*, 1968; 101: 262-270.
- 52.- Ziengle K H, Unanue E R: Identification of a macrophage antigen processing event required for I-region retracted antigen presentation to T lymphocyte. *J Immunol*, 1981; 127: 1869-1875.
- 53.- Allen P M, Unanue E R: Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J Immunol*, 1984; 132: 1077-1079.
- 54.- Mackares G B: The monocytes and cellular immunity. *Seminars in Hematology*, 1970; 7: 172-184.

- 55.- Skamene E, Gross P: Role of macrophage in resistance against infectious diseases. *Clin Immunol Allerg*, 1983; 3: 539-560.
- 56.- Lu Chy, Unanue E R: Macrophage ontogeny: Implications for host defence, T lymphocyte differentiation, and the acquisition of self tolerance. *Clin Immunol Allerg*, 1985; 5: 253-269.
- 57.- Wu-Hsieh B, Howard D H: Inhibition of growth of histoplasma capsulatum by lymphokine stimulated macrophages. *J Immunol*, 1984; 32: 259-384.
- 58.- Zigmund S H, Hirsch J G: Leukocyte locomotion and chemotaxis *J Exp Med*, 1973; 137: 387-410.
- 59.- Snyderman R, Goetzl E: Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 1981; 213: 830-837.
- 60.- Root R K, Ryan J L: Humoral Immunity and complement. In: Principles and practice of infectious diseases; GL Mandell, GR Douglas y, JE Bennett, eds. New York: Wiley Medical, 1985; pp 31-57.
- 61.- Horowitz M A: Phagocytosis of microorganisms. *Rev Infect Dis*, 1982; 4: 201-225.
- 62.- Johnston R B, Klempner M R, Alper C A et al: The enhancement of bacterial phagocytosis by serum; The role of complement components and two cofactors. *J Exp Med*, 1969; 129: 1275-1290.
- 63.- Joiner K A, Brown E J, Frank MM: Complement and Bacteria: Chemistry and Biology in host defense. *Ann Rev Immunol*, 1984; 2: 461-491.
- 64.- Johnston R B Jr., Goazik C A: Increases ²O₂ production by Immunologically Activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* 1978; 701: 115-127.
- 65.- Rosen H, Klebanoff S J: Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. *J Exp Med*, 1979; 149: 27-39.
- 66.- Nguyen A T, Golub R, Fevillen-Fieux M N, Descamps-Latscha Modulation the human granulocyte and monocyte chemiluminescence responses; evidence for distinct free radical generation systems *Immunol*, 1983; 12: 47-55.
- 67.- Nelson RD, Mills EL, Simmons RL, Quie PG: Chemiluminescence response of phagocytizing human monocytes. *Infect Immun*, 1976; 14: 129-134.
- 68.- Cheung K, Archiblad A, Robinson MF.: The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. *J Immunol*, 1983; 130: 2324-2329.

- 69.- Selveraj RJ, Sbarra AJ, Thomas GB, Cetrulo CL, Mitchell GW: A microtechnique for studying chemiluminescence response of phagocytes using whole blood and its application to the evaluation of phagocytes in pregnancy. *J Reticuloend Soc*, 1982;31:3-16.
- 70.- Robinson P, Wakefield D, Breit SN, Easter JF, Penny R: Chemiluminescent response to pathogenic organisms: Normal human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 1984;43: 744-752.
- 71.- Johnston R B Jr.: Enhancement of phagocytosis associated oxidative metabolism as a manifestation of macrophage activation. *Lymphokines* 1981; 3: 33-56.
- 72.- Meltzer MS: Tumor cytotoxicity by lymphokine-activated macrophages: Development of macrophages tumoricidal activity requires a sequence of reaction. *Lymphokines*. edited by Pick E, New York Academic Raven Press, 1981, pp 319-343.
- 73.- Natham C F: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*, 1987; 79: 319-326.
- 74.- Dinarello C A: Interleukin-1 *Rev Infect Dis*, 1984; 6: 51-95.
- 75.- Dinarello C A, Wolf S M: Molecular Basis of fever in humans. *Am J Med*, 1982; 72: 799-819.
- 76.- Dinarello C A, Cannon J G, Wolf S M. New concepts in fever pathogenesis. *Rev Infect Dis*, 1988; 10: 168-189.
- 77.- Florma A L: Interleukin-1 monitorius of acute infections. *Pediatr Infect Dis J*, 1985; 4: 450-452.
- 78.- Baracos V, Roderman HP, Dinarello CA, Goldberg AM. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leucocytic pyrogen (Interleukin-1). *N Engl J Med*, 1983;308:553-558.
- 79.- Zsebo KM, Yvschenkoff VN, Schiffer S, Chang david, McCall E, Dinarello CA, Brown MA, Altrock B, Bagby G Jr.: Vascular Endothelial cells and granulopoiesis.: Interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*, 1988;71:99-103.
- 80.- Kanschanski K, Lin N, Adamson JW. Interleukin-1 Stimulates fibroblast to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J.Clin.Invest*; 1988; 81:92-97.
- 81.- Beutler B, Mahoney J, Letrang N, Pekala P, Cerami A.: Purification of cachectin, a lipoprotein lipasa-suppressing hormonal secreted by endotoxin induced raw 264.7 cells. *J*

Exp Med, 1985;161:984-995.

- 82.- Beutler B, Cerami A: Cachectin more than a tumor necrosis factor. N Engl J Med, 1987;316:379-385.
- 83.- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Berheim RG, Beutler A, et al.: Tumor necrosis factor cachectin is an endogenous pyrogen and induces production of IL-1. J Exp Med, 1986; 163:1433.
- 84.- Tracey KJ, Lowry SF Cerami A.: Cachectin: A Hormone that triggers acute shock and chronic cachexia.: J Infect Dis, 1988;157:413-420.
- 85.- Taylor ML, Rico BG, Benitez MT, Castro AM, Polito AG, Toriello C: Infección In vitro de Histoplasma capsulatum en macrófagos peritoneales de ratas. Bol Soc Mex Mic, 1984; 19: 327-341.
- 86.- Richards KL, Mc Cullough J: A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. Immunological Communications, 1986;13:49-62.
- 87.- Falk W, Goodwin R, Leonard EJ: A 48 well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J Immunol Med, 1980;33:239-247.
- 14
- 88.- Keusch GT, Douglas SD, Midvan D, Hirschman SZ: C- Glucose oxidation in whole blood: A clinical assay for phagocyte function. Infect Immun, 1976;129-134.
- 89.- Keusch GT, Douglas SD, Braden K, Geller SA: Antibacterial functions of macrophages in experimental protein-calorie malnutrition. I. Description of the model, morphologic observations, and macrophages surface IgG receptors. J Infect Dis, 1976;138:125-133.
- 90.- Quie PG, Mills EL: Granulocyte microbicidal activity in investigation of phagocytes in diseases. ed, by Douglas SD; Quie PG; Churchill Livingston, vol 3 New York 1981; pag 62-65.
- 91.- Arbo AH: Incremento de la función de polimorfonucleares, mediado por Clindamicina. Tesis de Maestría UNAM, 1988.
- 92.- Shefler WC: Bioestadística. Editorial Fondo Educativo Panamericano. 1981 México D.F.
- 93.- Siegel S: Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta. Editorial Trillas, 1974, México D.F.
- 94.- Brown GW: Sample Size. Am J Dis Child, 1988;142:1213-1215.

APENDICE

CUADRO No. 1

ESTANDARIZACION MODELO DE AYUNO

SEMANAS DE EDAD DE LAS RATAS	% DE MORTALIDAD				% DE PERDIA DE PESO A LAS 72 H
	TIEMPO DE AYUNO (HORAS)	0	24	48	
3-4	N = 10	70	90	100	---
5-6	N = 10	10	40	40	32
7-8	N = 10	0	0	0	30
9-10	N = 8	0	0	0	24
11-12	N = 8	0	0	0	18

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO No. 2

ESTANDARIZACION DE QUIMIOLUMINISCENCIA

N = 10 (x±es)

MØ + ZIMOSANO OPSONIZADO (% SN)

SIN CELULAS	(0%)	(10%)	(20%)	(30%)	(40%)*	(50%)*
85	1867	14163	32603	35204	46245	39821
±10	±389	±1284	±4071	±3528	±3775	±4840
(1.9)**	(3.2)	(4.1)	(4.5)	(4.5)	(4.7)	(4.6)

Diferencia general determinada por análisis de varianza de Friedman

* P < 0.01 U De Mann Whitney

** Log

10

CUADRO No. 3

ESTANDARIZACION PRODUCCION DE ¹⁴CO₂
N = 10

% DE OPSONIZACION DEL ZIMOSANO
CON SUERO NORMAL

	SIN CE- LULAS	2.5	5	10*	20*	30*
¹⁴ cpm de CO ₂ en presencia de zimosano (FAGOCITANDO)	17.9 ±2.4	226 ±11.7	406.3 ±19.2	771 ±28	733 ±25	728 ±20
¹⁴ cpm de CO ₂ en ausencia de zimosano (REPOSO)		133.3 ±5.8	145.7 ±4.8	154 ±7	154 ±5	145 ±3
INDICE		1.9	2.8	5	4.7	5

Diferencia general determinada por análisis de varianza de Friedman (p < 0.01)

* p < 0.01 U de Mann Whitney

CUADRO No. 4

ESTANDARIZACION DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA

N = 8

% DE OPISONIZACION DE LA BACTERIA CON SUERO NORMAL.	0	2.5	5	10	15	20
% DE MUERTE BACTE- RIANA A LOS 120 m DE INCUBACION	22.8	26	51	67.8	63.4	47

CUADRO No. 5

PESO (gramos) DE LAS RATAS SOMETIDAS A AYUNO

GRUPO DE AYUNO				GRUPO TESTIGO					
No.	BASAL	24 h	48 h	72 h	No.	BASAL	24 h	48 h	72 h
1	168	145	130.3	117	1	166.4	169.5	170.8	172.3
2	169	145.4	131.5	124	2	174	177.2	179.5	181.5
3	166.5	144.8	132.3	120.5	3	156.2	161.3	164.9	169.7
4	178	154.8	139.7	130.11	4	161.3	166	169	173.5
5	171.5	151	139.4	122.4	5	174.8	177.5	180	182.9
6	167.8	148.5	133.6	114	6	184	188	192.7	198.5
7	187.5	163.1	152.5	135	7	177	178.5	179.2	180.5
8	195	171.5	156.4	141	8	163	165.5	173	177
9	171	154.6	141.6	125	9	182	187	191	195
10	166.5	150.7	135.4	121.4	10	188	191	194.3	196
11	152.2	135.2	120	105.2	11	188.5	192	197.7	205
12	163	148.3	129.5	112	12	187	188.6	190	193
13	157.3	137	129.8	106	13	174	177	182	187.2
14	180	155.7	140.8	115	14	187	191.5	196.8	205.3
15	169	148	136.5	113	15	190.5	193	197.5	205
16	175.5	155.5	144	123.7	16	185.5	186.5	188	191.2
17	200	172	164.8	141	17	179.3	181	183	185.7
18	188.6	168.5	151	135	18	191	194.5	198	205
19	192	165	153.5	129.2					
20	155	141	132	125.2					
21	172	154	140	129.3					
22	167	151	139	124.2					
23	181.200	156	145.8	136					
24	187.5	163.5	153.5	156					
25	159.5	138	126	116.4					
26	166.9	165	150	136.7					
27	181.7	163	149.2	133.5					
28	182.5	160.5	148	135.4					
29	191.3	173.5	160	150.3					
30	194.7	168	156.5	134.2					
					<hr/>				
					X ± ES				
					178.3	181.4	184.8	189.1	
					± 2.5	± 2.42	± 2.5	± 2.6	

X ± ES			
175.8	155.02	142.1	125.9
± 2.15	± 1.8	± 1.8	± 1.9

CUADRO No. 6

No. DE MACROFAGOS OBTENIDOS POR LAVADO PERITONEAL

No.	TESTIGO	(X 10 ⁶)	AYUNO
1	55.6		5.5
2	19.3		7.2
3	19.8		6.8
4	21.2		5.5
5	26.1		6.8
6	28.5		7.9
7	34.9		3.9
8	42.0		7.9
9	31.8		4.4
10	23.0		7.2
11	28.2		6.5
12	12.8		6.8
13	14.5		7.4
14	12.3		7.6
15	21.6		8.5
16	23.2		4.4
17	31.0		9.3
18	19.4		8.5
19			8.8
20	<u>25.4 ± .28</u>		7.8
21	(X ± ES)		8.2
22			8.5
23			7.3
24			8.2
25			7.5
26			9.5
27			6.5
28			7.3
29			9.0
30			3.8
			<hr/>
			7.1 ± .28
			(X ± ES)

CUADRO No. 7

QUIMIO TAXIS
MIGRACION (um)

No.	TESTIGO	AYUNO	TESTIGO	AYUNO	
	(QUIMIOATRAYENTE)				
	HBSS	HBSS	(SN)	(SN)*	(SA)**
1	47.5	30	70	60	45
2	30	40	40	40	45
3	35	35	62.5	50	40
4	42.5	40	52.5	65	45
5	40	42.5	57.5	60	50
6	35	42.5	65.5	55	50
7	35	45	57.5	40	50
8	35	35	67.5	47.5	45
9	30	35	55	57.5	45
10	45	27.5	60	45	35
11	30	32.5	55	47.5	37.5
12	40	40	67.5	55	42.5
13	47.5	45	60	55	47.5
14	47.5	35	77.5	35	42.5
15	50	37.5	80	45	40
16	30		80		
17	42.5		70		
18	40		65.5		
X ± ES	39 ± 1.6	36.8 ± 1.4	63.5 ± 2.4	50 ± 2.2	44 ± 2.8

* SN = SUERO NORMAL
 ** SA = SUERO AUTOLOGO
 HBSS = SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS

CUADRO No. 8

ACTIVIDAD FAGOCITICA cpm DE QL (Log)
10

No.	TESTIGO	AYUNO	
		ZA*	ZN**
1	5.06	4.75	4.86
2	5.04	4.37	4.66
3	5.06	4.62	4.64
4	5.07	4.62	4.66
5	5.03	4.58	4.63
6	5.07	4.44	4.49
7	5.04	4.26	4.40
8	5.00	4.32	4.42
9	4.65	4.36	4.41
10	4.60	4.32	4.40
11	4.75	4.53	4.38
12	4.70	4.58	4.56
13	4.87	4.53	4.66
14	4.67	4.44	4.63
15	4.62	<u>4.43</u>	<u>4.49</u>
16	4.84		
17	4.73		
18	<u>4.75</u>		
X± ES	4.9 ± .04	4.5 ± .03	4.6 ± .04

* ZIMOSANO OPSONIZADO CON SA
** ZIMOSANO OPSONIZADO CON SN

CUADRO No. 9

ACTIVIDAD METABOLICA DE MACROFAGOS VIA HEXOSA-MONOFOSFATO

(INDICE DE produccion de ¹⁴CO₂)

GRUPO TESTIGO

GRUPO DE AYUNO

No.	ZIMOSANO SN	ZIMOSANO SN	ZIMOSANO SA
1	3.7	3.4	4.5
2	3.2	3.0	5.5
3	3.4	2.9	4.2
4	4.9	4.3	4.3
5	4.2	4.0	4.1
6	3.9	3.7	4.4
7	3.6	2.9	5.3
8	3.0	1.9	4.2
9	3.2	2.1	4.1
10	3.3	3.5	4.2
11	4.3	3.5	4.5
12	2.6	1.7	4.4
13	2.7	2.0	3.9
14	2.4	1.9	3.9
15	4.3	3.7	6.2
16	5.4		
17	4.8		
18	3.5		
X ± ES	4.5 ± .2	3.56 ± .2	2.97 ± .2

CUADRO No. 10

CAPACIDAD BACTERICIDA (%) CONTRA S. typhimurium DE
LOS MACROFAGOS EN CONDICIONES DE AYUNO

No.	TESTIGO		AYUNO			
	TIEMPO DE INCUBACION					
	60'	120'	60'		120'	
	(SN)	(SN)	(SN)	(SA)	(SN)	(SA)
1	45	64	53	31	56	35
2	42	65	32	14	46	24
3	29	68	28	26	64	42
4	34	63	24	15	41	39
5	30	61	27	17	55	31
6	30	62	47	32	36	50
7	43	63	51	32	43	54
8	41	53	42	29	34	49
9	42	64	25	17	41	31
10	24	60	20	12	40	32
11	54	68	43	20	58	47
12	53	68	34	33	46	45
13	33	54	29	27	46	41
14	32	62	20	19	45	37
15	30	68	22	22	48	35
16	33	66				
17	35	58				
18	35	60				
X± ES	37.06 ± 2.07	63.6 ± 1.1	31.8 ± 2.7	22.11 ± 2.03	46.4 ± 1.9	38.8 ± 1.9