



55
2e1

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"ADAPTACION Y ESTANDARIZACION DE
MICROTECNICAS; MUERTE INTRACELULAR Y
FAGOCITOSIS PARA SU APLICACION EN
NEONATOS SANOS A TERMINO"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA VIRGINIA ROSALIA GOMEZ GONZALEZ



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.

INDICE

RESUMEN	2
CAPITULO I INTRODUCCION	
i) Mecanismos de Defensa Inmunológicos	4
ii) Ontogenia de los Polimorfonucleares (PMN)	9
iii) Monocitos y Macrófagos	11
iv) Etapas de la Fagocitosis	13
v) Disfunción de Fagocitos	35
vi) Fagocitosis en el Neonato	38
vii) Importancia de las Técnicas de Estudio de la Fagocitosis en el Neonato	42
CAPITULO II OBJETIVOS, MATERIAL Y METODOS	
Objetivos	51
Material	52
Métodos:	
1) Método para Muerte Intracelular	55
2) Método para Fagocitosis	57
3) Criterios de Selección de Participantes	59
4) Obtención de la Cepa de <i>Candida albicans</i>	61
5) Métodos Estadísticos	62

CAPITULO III RESULTADOS

a)	Análisis del Barrido del Espectro Visible del Colorante Amarillo de Tetrazolio (MTT)	69
b)	Análisis de la Estabilidad del MTT en función del tiempo	71
c)	Obtención de Leucocitos	73
d)	Obtención del Suero Pool Humano Normal	73
e)	Análisis de la Relación entre el número de Levaduras Vivas y la Reducción que producen del MTT	76
f)	Esterilidad de los Reactivos	80
g)	Modificaciones en la Concentración de Polimorfonucleares (PMN) en la Técnica de Muerte Intracelular	81
h)	Efectos de la Agitación, Albúmina y Partículas de Acido Desoxicolico en la Eficiencia de la Técnica de Muerte Intracelular	83
i)	Eliminación de los Sistemas Enzimáticos de los PMN	87
j)	Microtécnica Final para Evaluar Muerte Intracelular	87
k)	Microtécnica Final para Evaluar Fagocitosis por Reducción del Colorante Nitroazul de Tetrazolio (NBT)	90
l)	Datos y Resultados de los Adultos muestreados para la Microtécnica de Muerte Intracelular	94
m)	Datos y Resultados de los Neonatos muestreados para la Microtécnica de Muerte Intracelular	94

n)	Datos y Resultados de los Adultos muestreados para la Microtécnica de Fagocitosis	96
o)	Datos y Resultados de los Neonatos muestreados para la Microtécnica de Fagocitosis	97
p)	Parámetros Estadísticos de los Datos	98
q)	Comparación Estadística de las Medias de las Muestras	99
r)	Intervalo Permisible de Valores para las Medias de las Muestras	103

CAPITULO IV DISCUSION Y CONCLUSIONES

Discusión	111
Conclusiones	117

APENDICES A Y B

Apéndice A .- Preparación de Reactivos	119
Apéndice B .- Abreviaturas Utilizadas	123

BIBLIOGRAFIA	126
---------------------------	-----

RESUMEN

RESUMEN

El nacimiento representa la primera y más importante exposición del organismo humano a un mundo lleno de estímulos antigénicos, muchos de ellos patógenos. En la etapa neonatal la madurez del sistema inmune es menor comparada con la de los adultos y niños mayores, a ello se debe su mayor predisposición a las infecciones bacterianas y fúngicas; es por esto que los mecanismos inespecíficos juegan un papel crucial en esta etapa en la defensa del organismo ya que la destrucción final de microorganismos invasores se lleva a cabo por fagocitosis y activación del complemento. Para evaluar la función fagocítica en el neonato se propuso la adaptación de la técnica original de Levitz y Diamond (J. Infec. Dis. 1985, 152: 938-945) a una microtécnica que no utilice más del 2 % del volumen sanguíneo del neonato y complementar este estudio con la evaluación de la fagocitosis por reducción de NBT en microtécnica también. Asimismo se propuso establecer por estas microtécnicas las diferencias en % de M.I., % de Fag. e Ind.Fagocítico entre PMN de adultos y de recién nacidos. Para la evaluación de las microtécnicas se seleccionaron 16 recién nacidos bajo los criterios de selección propuestos para este estudio. Los resultados fueron los siguientes:

	RECIEN NACIDOS	ADULTOS
% M.I. PROMEDIO	43.95	44.56
% FAG. PROMEDIO	38.96	39.00
IND. FAG. PROMEDIO	1.71	1.73

Se concluye que desde el punto de vista celular éstos parámetros son iguales para PMN de adultos y neonatos.

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1) Mecanismos de Defensa Inmunológicos.

El nacimiento representa la primera y más importante exposición del organismo a un mundo lleno de estímulos antigénicos, muchos de ellos patógenos para el ser humano; debido a esto el organismo desarrolla una capacidad de respuesta inmune hacia estos estímulos. Esta respuesta depende del estado de madurez del sistema inmune, de la resistencia individual, la herencia genética y racial, el estado nutricional y la edad, entre otros (1,2).

Esta capacidad de respuesta puede resumirse de la siguiente manera: (1,3,4,5)

MECANISMOS
DE
DEFENSA
INMUNO-
LOGICA

MECANISMOS INESPECIFICOS.

Estos mecanismos representan una inmunidad natural o innata del organismo el cual no necesita haber estado en contacto previo con el estímulo antigénico y actúa indiscriminadamente contra cualquier estímulo. Se dividen en: a) Mecánicos (tos, estornudo, lagrimeo, salivación, micción, defecación, descamación de la piel.)

b) Dependientes del pH: ácido en el sudor y en la vagina.

c) Proteínas bactericidas o bacterioestáticas: Espermina presente en el semen, Lisozima en saliva y lágrimas, producción de Interferón, acción lítica del complemento.

d) Mediadores del proceso inflamatorio.

e) FAGOCITOSIS.

MECANISMOS ESPECIFICOS.

Estos mecanismos representan una inmunidad adquirida o adaptativa, los cuales actúan contra el estímulo antigénico específicamente. Se dividen en:

I) Inmunidad Humoral.- Mediada por anticuerpos específicos producidos por los linfocitos B, contra el agente causal o sus productos, existe la: i) Inmunidad Pasiva.- Estado

temporal de resistencia debido a la administración de suero protectores o a la transferencia de inmunoglobulinas ii) Inmunidad Activa.- Estado permanente de resistencia

debido a la exposición directa del organismo a los antígenos (infección o vacunación). Se crea una memoria inmunológica protectora.

II) Inmunidad Celular.- Mediada por linfocitos T, los cuales al activarse por medio de antígenos específicos y otros estímulos, producen mediadores llamados linfocinas que tienen implicaciones sobre las células T efectoras, entre otras y actúan en combinación con los macrófagos y en la cooperación entre linfocitos T y B.

Cuadro 1.- MECANISMOS DE DEFENSA INMUNOLOGICA.

En la etapa neonatal la madurez del sistema inmune, en general, es menor que la de los adultos, esto se refleja en una producción tardía de inmunoglobulinas, por ello a los recién nacidos se les transfiere pasivamente a través de la vía placentaria un nivel de IgG < 89 % en comparación con la de la madre, en tanto son capaces de producir las propias. Estas inmunoglobulinas transferidas desaparecen en el transcurso de los dos a seis primeros meses de vida, mientras que las inmunoglobulinas del recién nacido aparecen alrededor del segundo mes de vida alcanzando niveles normales entre un año y cuatro años de edad o incluso mucho después (6,7).

Esta madurez del sistema inmune también se refleja en los mecanismos de defensa inespecíficos del recién nacido. Dentro de estos mecanismos, la fagocitosis juega un papel crucial en la defensa del organismo, pues la destrucción final de microorganismos invasores se lleva a cabo por éste mecanismo y por activación del complemento (2,3,6,7).

No se puede hablar de una separación tajante entre los mecanismos específicos e inespecíficos de defensa y sus mediadores, ambos mecanismos interactúan a varios niveles, comparten funciones, complementan acciones y tienen como único fin la defensa de la integridad del organismo., por estas razones es imposible hablar por separado por ejemplo, del proceso de fagocitosis y de la reacción de inflamación ya que ambos están estrechamente relacionados, así tenemos que en la reacción de inflamación no sólo interviene el sistema inmune sino también el sistema complemento, el sistema de

coagulación, el sistema de cininas y el sistema fibrinolítico. En el diagrama 1 se muestran los eventos que suceden en la reacción de inflamación y la interacción de los mecanismos específicos e inespecíficos (2,3,5,8).

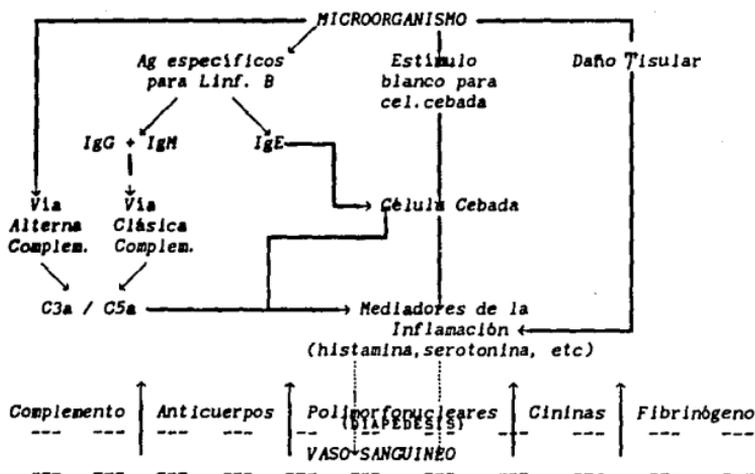


Diagrama 1 .- REACCION DE INFLAMACION

La liberación de histamina y cininas provoca: vasodilatación, incremento de la permeabilidad capilar, aumento de la quimioquinesis y causan retracción de las células endoteliales, mientras que la activación del sistema complemento produce anafilotoxinas que son factores quimiotácticos para las células fagocíticas, las cuales son atraídas por éstos factores al sitio de la inflamación incrementando con esto la fagocitosis del microorganismo invasor. Todos estos eventos en su conjunto causan los síntomas clínicos de la inflamación: dolor, tumor, calor y rubor (1,2,3,5).

La fagocitosis se lleva a cabo en el organismo humano por los monocitos de sangre periférica, los macrófagos tisulares y por los polimorfonucleares, éstos últimos son los más importantes debido a que se encuentran en mayor cantidad, sus sistemas microbicidas son muy potentes y eficaces, son los primeros en actuar en una primoinfección o infección aguda (9,10). Una ausencia de estas células fagocíticas implica quedar inerte y a merced de las infecciones, es por esto que su producción y maduración son tan importantes en la etapa neonatal ya que en esta etapa son éstas células las que se encargarán de la defensa del organismo.

11) Ontogenia de los Polimorfonucleares (PMN).

Los PMN (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) se originan en médula ósea y comparten un origen común con las células cebadas, llamados todos en conjunto "granulocitos"; todos ellos se derivan de una célula progenitora llamada *mieloblasto*, la cual se encuentra en médula ósea. El *mieloblasto*, ya comprometido para evolucionar hacia neutrófilo, pasa por varias etapas de maduración; la primera etapa es el *promielocito* en la cual se producen los gránulos azurófilos o primarios los cuales contienen mieloperoxidasa, hidrolasa ácida, lisozima, elastasa, catepsinas y glucosidasas ácidas. El *promielocito* prolifera y da lugar al *mielocito*, en esta etapa aparecen los gránulos específicos o secundarios los cuales aparecen primeramente en la zona del Aparato de Golgi, pero a medida que se desarrollan se extienden hacia el citoplasma; estos gránulos contienen lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina y lactoferrina. El *mielocito* es la última etapa capaz de división celular, por lo que las granulaciones azurófilas disminuyen por célula y las granulaciones específicas aumentan, convirtiéndose finalmente en un neutrófilo maduro un 80% de gránulos específicos y un 20% de gránulos azurófilos. La siguiente fase es el *metamielocito* que posee un núcleo dentado en forma de riñón, cromatina condensada y pocos cambios citoplasmáticos. Le sigue la fase de *neutrófilo en banda* los cuales presentan cromatina condensada en forma alargada, en esta fase comienza una constricción parcial del núcleo hasta que se forma un filamento delgado entre los lóbulos del núcleo,

a partir de este momento puede considerarse como un *neutrófilo segmentado* o *polimorfonuclear*, última etapa de la maduración (1,3,11,12,13).

Los neutrófilos representan del 50 al 70 % de los leucocitos circulantes en sangre periférica en el ser humano normal adulto de raza blanca y en los individuos de raza negra es alrededor del 65 % . Los neutrófilos presentan un tamaño de 10-12 μm en frotis y de 7-9 μm en cortes, su núcleo posee de 2 a 5 lóbulos unidos por filamentos delgados de cromatina que se arreglan en forma de E, Z o S, tienen una vida media de 6-20 hrs. en sangre periférica y en los tejidos en condiciones de equilibrio aproximadamente de 4-5 días, son producidos a una velocidad de $1.6 \cdot 10^9$ células/Kg día; el tiempo de maduración desde metamielocito hasta polimorfonuclear se lleva aproximadamente 6.5 días; poseen marcadores y receptores de superficie para la fracción Fc de las inmunoglobulinas IgG1 e IgG3, para las fracciones C3a, C3b y C5a del complemento y para CR1 y CR3 que son receptores relacionados con la adherencia y la fagocitosis (1,3,12,14,15). También presentan propiedades de adherencia al vidrio y al plástico (1).

III) Monocitos y Macrófagos.

Los monocitos y macrófagos poseen también capacidad fagocítica, éstas células representan la segunda línea de defensa del sitio lesionado. Los monocitos migran de sangre periférica al sitio dañado, mientras que los macrófagos se encuentran en: tejido conjuntivo (histiocitos), en hígado (Células de Kúpffer), en pulmones (macrófagos alveolares), en bazo (macrófagos fijos y libres), en ganglios linfáticos ((macrófagos fijos), en médula ósea (macrófagos), en cavidades serosas (macrófagos pleurales y peritoneales), en cerebro (microglia) y en riñón (macrófagos mesangial intraglomerular). Los monocitos y macrófagos poseen propiedades de adherencia al vidrio y plástico, presentan receptores de membrana para fracciones Fc de IgG₁, IgG₃ e IgE, también para las fracciones del complemento C_{3b}, para pequeñas cantidades de HLA-DR y para interferón γ (1,3,9,12,16).

Los macrófagos además de su función fagocítica juegan un papel muy importante en la inmunidad mediada por células, se involucran en la iniciación de la respuesta inmune al ser uno de sus papeles importantes la presentación de antígenos a los linfocitos T, son responsables del procesamiento del antígeno y de la producción de IL-1. También producen prostaglandinas, factores del sistema complemento y del sistema de coagulación, necesarios en los procesos de inflamación y fiebre; una vez activados los macrófagos, por exposición a ciertas linfoquinas, su capacidad fagocítica se ve aumentada (1,2,3,9).

Algunas propiedades de los macrófagos activados en comparación con los macrófagos normales son: (1)

- Aumento del tamaño.
- Aumento de la actividad mitótica.
- Aumento de la actividad de la membrana rizada.
- Aumento de la adherencia al vidrio.
- Aumento de la utilización de la glucosa a través de la vía de la hexosamonofosfato (HMF).
- Producción y liberación de colagenasa.
- Mayor producción de activador del plasminógeno y de las prostaglandinas.
- Aumento del influjo de Calcio.
- Aumento del monofosfato de guanosina cíclico (GMPc).
- Aumento del número de gránulos citoplasmáticos.
- Aumento de fagocitosis de partículas recubiertas con IgG y C_{3b}.
- Aumento de la Pinocitosis.
- Aumento de la destrucción bacteriana.
- Inhibición y destrucción de tumores.
- Mayor actividad fagocítica.

iv) Etapas de la Fagocitosis.

A diferencia de la pinocitosis, definida como la captación de partículas de diámetro inferior a 10 nm observada en otros tipos celulares, la fagocitosis es realizada exclusivamente por las células fagocíticas, ver figura 1 (5).

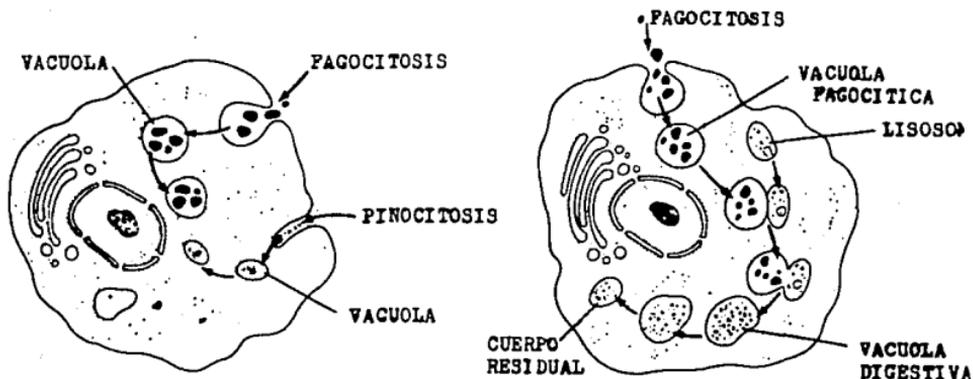


Figura 1.- FAGOCITOSIS Y PINOCITOSIS.

Para que se efectue la fagocitosis con éxito deben de realizarse una serie de etapas secuenciales interrelacionadas entre sí, las cuales se pueden dividir en: A) Quimiotaxis, B) Reconocimiento (opsonización), C) Ingestión y formación del fagosoma, D) Desgranulación y E) Destrucción Intracelular, ver figura 2 (1).

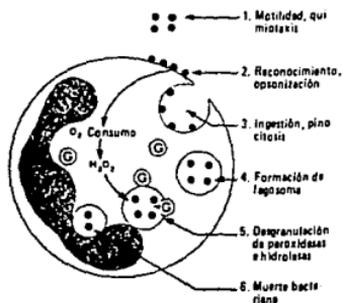


Figura 2 .- ETAPAS DE LA FAGOCITOSIS.

A) QUIMIOTAXIS.

La quimiotaxis es el proceso por el cual las células fagocíticas son atraídas al sitio dañado o a su vecindad. No sólo las cininas atraen a las células fagocíticas al sitio lesionado, también existen componentes humorales que actúan como factores quimiotácticos provenientes de la vía alterna o de la vía clásica del complemento. La activación del sistema complemento produce, por fragmentación de los componentes C_3 y C_5 , las fracciones C_{3a} , C_{3b} , C_{5a} y C_{5b} , además de la formación del complejo activo C_{678} . Los fragmentos C_{3a} , C_{5a} y el complejo C_{678} son factores quimiotácticos para los neutrófilos, siendo C_{5a} diez veces más activo que C_{3a} , aunque el efecto neto final es casi el mismo dada la mayor concentración de C_{3a} . Tanto C_{3a} como C_{5a} son "anafilotoxinas" y causan contracción muscular débil, incrementan la permeabilidad vascular, provocan la desgranulación de células cebadas,

estimulan en los PMN la producción de leucotrienos, especialmente B₄ que prolonga la permeabilidad del endotelio y activan a los mecanismos bactericidas del fagocito (1,3,7,10,16).

El reclutamiento de los fagocitos mononucleares hacia la zona dañada se lleva a cabo por factores quimiotácticos liberados por los Linfocitos T sensibilizados con antígenos, uno de éstos factores es el factor de inhibición de leucocitos (LIF) (3), que impide su migración de la zona dañada.

B) RECONOCIMIENTO.

Uno de los mecanismos por los que las células fagocíticas vencen los factores antifagocíticos para reconocer a los microorganismos invasores es gracias a las opsoninas, que son anticuerpos o factores del sistema complemento, las cuales tienen la característica de unirse a la superficie del microorganismo promoviendo con esto la inmunoadherencia a las células fagocíticas; esto hace a los microorganismos más susceptibles de ser ingeridos por los fagocitos. La inmunoadherencia se lleva a cabo gracias a los receptores de membrana que presentan los fagocitos para las opsoninas.

Existen tres mecanismos diferentes por los cuales puede ocurrir la opsonización:

- 1) La opsonización puede ser inespecífica a través de la vía alterna del complemento. En este caso el fragmento C_{3b} se une al microorganismo debido a los polisacáridos presentes en su membrana

celular y así se desencadena la activación del complemento que finaliza con la destrucción del microorganismo (1,3,7,10,11,16).

2) El anticuerpo específico por sí sólo puede opsonizar al microorganismo, sobre todo cuando éstos no presentan receptores adecuados para las células fagocíticas o cuando los microorganismos no activan por sí mismos al complemento y requieren de anticuerpos específicos para ser fagocitados como: *M. leprae* , *T. gondii* , *M. tuberculosis* , *R. prowasekii*, *C. psittaci*, etc. El anticuerpo específico se une al microorganismo por la fracción Fab dejando la fracción Fc libre para unirse a los receptores de membrana presentes en las células fagocíticas, actuando el anticuerpo como un puente entre el microorganismo y el fagocito. Este mecanismo es más eficiente que el anterior (1,3,4,7,12,16).

3) El tercer mecanismo de opsonización es a través del anticuerpo específico actuando junto con el complemento por la vía clásica. Se necesitan dos IgG o una IgM unidas al microorganismo para que se fije la fracción C1 a estas y así comenzar la activación por vía clásica del complemento. Este es el mecanismo de opsonización más eficiente que se conoce (1,3,16).

En el diagrama 2 se presenta la acción análoga de las vías clásica y alternativa del complemento.

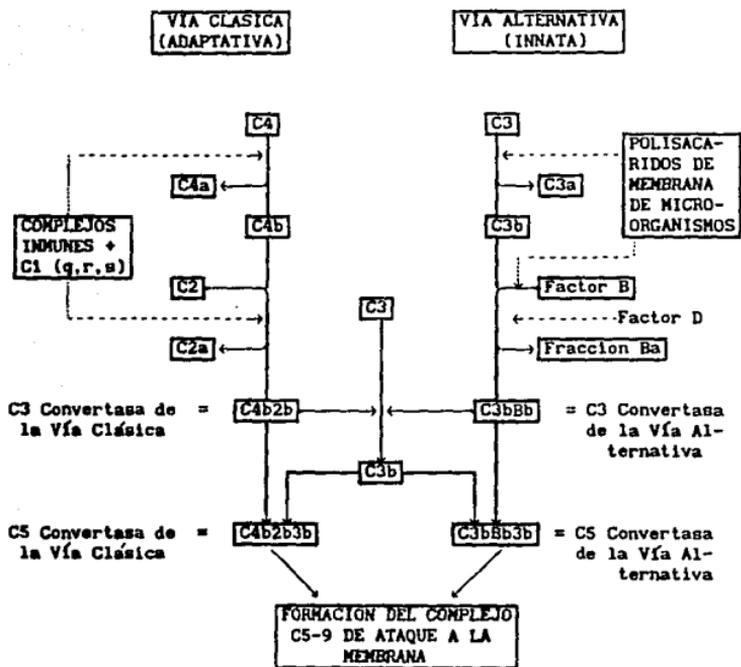


Diagrama 2 .- VIAS CLASICA Y ALTERNATIVA DEL SISTEMA COMPLEMENTO.

C) INGESTION.

Los neutrófilos, monocitos y macrófagos son fagocitos activos que obtienen su energía a través de la vía de la hexosamonofosfato (HMF). Solamente los macrófagos alveolares la obtienen via la fosforilación oxidativa. Una serie de cambios metabólicos ocurren en los polimorfonucleares durante la fagocitosis. El metabolismo del PMN y los cambios que ocurren se observan en el diagrama 3 (1).

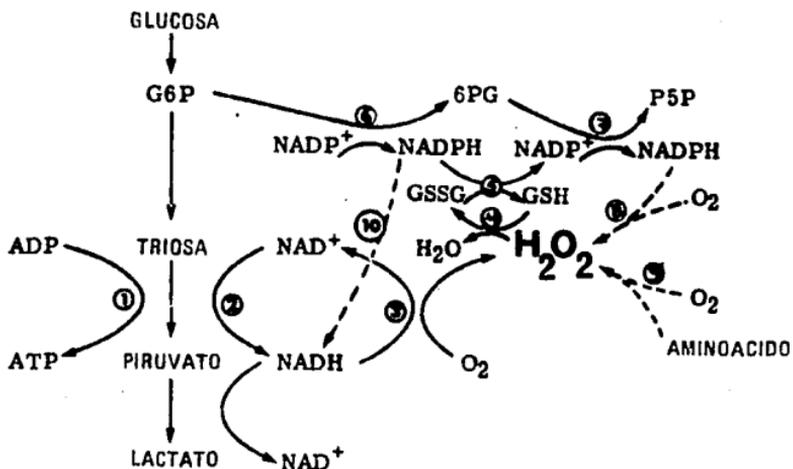


Diagrama 3 .- CAMBIOS METABOLICOS EN EL PMN DURANTE LA FAGOCITOSIS.

Durante la fagocitosis se presenta un aumento de la glucólisis y un flujo de glucosa hacia la vía de la hexosamonofosfato con el objeto de proveer a la célula de la energía necesaria para llevar a cabo la fagocitosis, también se produce ácido láctico lo cual hace que el pH se vuelva ácido y esto estimula la desgranulación y se aumenta el consumo de O_2 , éstos y otros eventos conducen a la formación de H_2O_2 , el cual esta involucrado en la muerte intracelular de las bacterias. Las reacciones numeradas son: (1) se produce ATP para la ingestión de partículas mediante la degradación de glucosa a lactato. (2) La glucólisis produce también NADH a partir de NAD^+ ; (3) el NADH y el O_2 catalizado por la NADH-oxidasa, reaccionan formando H_2O_2 . (4) Este H_2O_2 a su vez estimula la vía alterna de la hexosamonofosfato (HMF) oxidando el glutatión reducido (GSH) en una reacción catalizada por la glutatión-peroxidasa. (5) El glutatión oxidado (GSSG) es reducido durante la oxidación del NADPH, catalizado por la glutatión-reductasa. (6) El flujo de glucosa a través de la vía de la HMF catalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) y por la (7) 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (6PGD) generan NADPH a partir de $NADP^+$. (8) Otras fuentes de H_2O_2 provienen de la NADPH oxidasa y (9) de las reacciones catalizadas por la aminoácido-oxidasa. (10) Los datos obtenidos del estudio de los PHNs deficientes en G6PD apoyan el concepto de la existencia de transhidrogenasas que catalizan esta reacción (17).

En la figura 3 se observa a la partícula o microorganismo uniformemente cubierto por las opsoninas, las cuales se adhieren a sus receptores específicos localizados en la membrana de la célula fagocítica. En el dibujo central y derecho se observa como la interacción de los receptores adicionales con el resto de las opsoninas guía el movimiento de la membrana plasmática del fagocito para que se lleve a cabo la ingestión secuencial y circunferencial, quedando finalmente un fagosoma en el interior del fagocito, fagosoma que por ende presentará una membrana plasmática invertida al interior del fagocito. El fagosoma se separa y desplaza por mediación de los microtúbulos y microfilamentos (7,10,16).

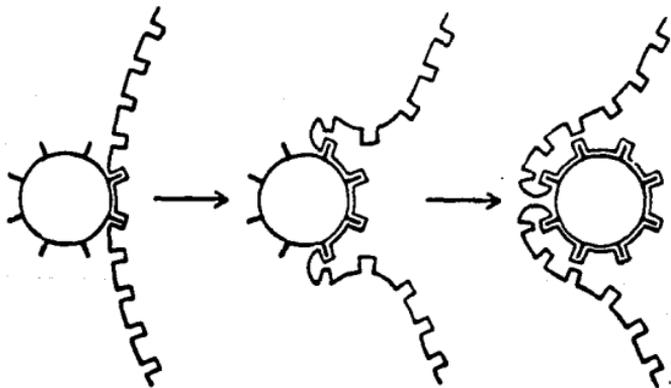


Figura 3.- "MECANISMO DE CIERRE".

La unión del fagocito con el microorganismo estimula la organización y coordinación de los microtúbulos y microfilamentos hacia el sitio de la unión. Estos elementos están constituidos por: la proteína tubulina, microfilamentos de actina y miosina, actina unida a proteínas, un cofactor protéico que estimula la actividad de la ATPasa dependiente de Mg^{2+} y gelsolina que es una proteína reguladora dependiente de Ca^{2+} . El movimiento de sustratos en la membrana plasmática es el resultado de los fenómenos de gelificación y contracción que involucran a estas cinco proteínas. La polimerización de actina es un fenómeno necesario para que se lleve a cabo la fagocitosis, la locomoción, la adherencia y la desgranulación con éxito (1,3,7,10,16).

Durante esta etapa también se ve aumentada la síntesis de lípidos con el objeto de proveer al fagocito de la membrana celular necesaria para la formación del fagosoma (36).

También se ha encontrado una correlación entre el ángulo de contacto, entre los fagocitos y los microorganismos al momento de la ingestión, y la facilidad para ser fagocitado un microorganismo. Ángulos mayores de 18° indican que el microorganismo es fácilmente ingestado, por ejemplo: *Shigella flexneri* (18.1°); *Staphilococcus aureus* (18.7°); *Salmonella typhimurium* (rugosa 20°); *Neisseria gonorrhoeae* (26.7°), etc. En cambio los ángulos menores de 18° pertenecen a bacterias que resisten la fagocitosis como: *Haemophilus influenzae* (grupo b 17.6°); *E.coli* (grupo O111 17.2°); *Klebsiella pneumoniae* (17°); *S.aureus* (cepa Smith 16.5°), etc.

Estos ángulos se deben a las propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas que presenta cada bacteria por lo que es importante no tomar en cuenta el valor absoluto del ángulo, sino su valor comparado con el ángulo de las células fagocíticas. Bacterias más hidrofóbicas que los fagocitos pueden ser fácilmente fagocitadas (ángulos $> 18^\circ$), mientras que las bacterias más hidrofílicas que los fagocitos (ángulos $< 18^\circ$) son resistentes a la fagocitosis. De aquí se desprende otra observación importante y es que cuando la bacteria presenta un ángulo de contacto mayor respecto al del PMN, generalmente la bacteria presenta baja virulencia, a no ser que presente otros mecanismos de patogenicidad independientes de la facilidad con que es fagocitada como *L.monocytogenes* , *N.gonorrhoeae* y *M.butyricum* que pueden sobrevivir intracelularmente. Las bacterias con bajo ángulo de contacto con respecto a los PMN son virulentas, entre ellas se encuentran los microorganismos encapsulados; ejemplo de esto es *S.aureus* (cepa Smith) la cual posee una cápsula pronunciada, siendo más hidrofílica (16.5°) y resiste fuertemente la fagocitosis, después de la descapsulación adquiere un ángulo de 26° y se convierte en fácilmente fagocitable (37), lo que demuestra el factor de virulencia de las cápsulas bacterianas y la necesidad de la opsonización.

D) DESGRANULACION.

El fagosoma hace contacto primeramente con los gránulos específicos que vierten su contenido dentro de éste y luego lo hacen los azurófilos, dando lugar a la muerte y disolución de los microorganismos. Como sucede en la quimiotaxis y en la ingestión, los microfilamentos y los microtúbulos son importantes en la dirección y fusión de los fagosomas con los gránulos cuyo contenido se observa en el cuadro 2 (1,2,3,10,17,18).

GRANULOS AZUROFILOS (1^o)

mieloperoxidasa *
hidrolasa ácida *
lisozima *
elastasa *
catepsinas
glucosidasas ácidas *

GRANULOS ESPECIFICOS (2^o)

lisozima *
colagenasa
fosfatasa alcalina *
gelatinasa
lactoferrina *

- * Enzimas que intervienen en la muerte intracelular.-

Cuadro 2.- CONTENIDO DE LOS GRANULOS DE LOS PMN.

Se ha observado una marcada desintegración del citoplasma en las células fagocíticas, con pérdida parcial de membranas fagosomales, vacuolización de fagosomas con material granular dentro del citoplasma y destrucción del núcleo, lo que sugiere autodigestión enzimática; aunque en la mayoría de los monocitos se observa lisis celular con pérdida de enzimas, no sucede esto en igual magnitud para los PMN pues son más resistentes a sus propias enzimas (8).

Una vez dentro de la célula, el destino de una partícula ingerida va a depender de su naturaleza, existen tres posibilidades: a) la

célula no la digiere y la elimina al exterior, b) la célula digiere y destruye a la partícula y c) la partícula o microorganismo destruye a la célula y puede tomar una posición intersticial en los tejidos (2).

En la segunda opción si la célula digiere a la partícula es gracias a las enzimas presentes en sus gránulos o lisosomas, aunque no todas las enzimas presentes en los lisosomas intervienen en la muerte intracelular, sólo las marcadas con asterisco en el cuadro 2; el resto de las enzimas posee una función digestiva más que microbicida (18).

La desgranulación también puede ocurrir por exocitosis durante la ingestión o por la pérdida de los fagosomas inmóviles unidos a la membrana celular; éstos eventos no son tan relevantes como otro tipo de exocitosis, por ejemplo cuando la partícula a ingerir es demasiado grande el contenido de los gránulos y lisosomas es liberado hacia la partícula o microorganismo que esta causando el daño tisular. Esto es benéfico en el caso de la reacción de eosinófilos contra schistosomas, pero en el caso de la "fagocitosis frustrada" es todo lo contrario.

En la fagocitosis frustrada sucede una reacción de Hipersensibilidad tipo III, mediada por el eventual depósito de complejos inmunes en las células del huésped; las células diana recubiertas por anticuerpos o por fracciones del complemento, activan los mecanismos de reconocimiento de las células fagocíticas dando comienzo al proceso de fagocitosis. Como generalmente las partículas recubiertas son demasiado grandes (ej. células del basamento) los neutrófilos no pueden ingerirlas "frustrándose" su intento y entonces liberan el contenido de sus gránulos hacia el exterior causando daño a

las células de la vecindad. Como ejemplo de este proceso tenemos a la Enfermedad del Suero, al Lupus Eritematoso Sistémico y a la Artritis Reumatoide (3).

E) DESTRUCCION INTRACELULAR.

Las consecuencias de la fagocitosis son diferentes para microorganismos intracelulares o extracelulares. Para un microorganismo intracelular representa la oportunidad de sobrevivir; pero para un microorganismo extracelular, el cual carece del equipo necesario para su reproducción intracelular, representa el principio del fin. Para evitar este fin los microorganismos extracelulares han desarrollado sustancias antifagocitarias como por ejemplo: a) Cápsulas, b) Proteína M estreptocócica, c) Fimbrias, d) Proteína A estafilocócica, e) Citotoxinas (estreptolisinas O y S; leucocidina estafilocócica, leucocidina pseudomónica) y f) Proteasas.

Los mecanismos por los cuales los microorganismos pueden evitar ser digeridos son: 1) evitar el encuentro con los fagocitos secretando toxinas y/o sustancias que eviten la reacción de inflamación o de quimiotaxis; 2) producción de cubiertas celulares que evitan la adherencia de los fagocitos a ellos (ej. cápsula de *Neisseria spp* y proteína M de *S.pyogenes*) a menos que se encuentren recubiertos por anticuerpos específicos; 3) una vez fagocitados los microorganismos aún pueden resistir la destrucción intracelular previniendo la fusión de los lisosomas con los fagosomas (ej. *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* y *Chlamydia psittaci*); 4) resistencia intrínseca de

la pared celular por su capacidad para neutralizar a las proteínas bactericidas, al H_2O_2 o al ión superóxido; 5) algunos microorganismos son capaces de escapar de los fagolisosomas quedando libres en el citoplasma, donde son inmunes al ataque de los mecanismos bactericidas (ej. *Mycobacterium leprae*, *Rickettsia prowazekii*, *Trypanosoma cruzi*), así el resultado es la muerte de la célula fagocítica y el microorganismo invade los tejidos vecinos. Sin embargo cuando algunos de éstos microorganismos se encuentran recubiertos por anticuerpos específicos no logran escapar de la destrucción intracelular (1,2,3,16,18,19,20).

Si bien es cierto que no todos los microorganismos son destruidos por el huésped de la misma forma, lo que sí es cierto es que la destrucción intracelular es uno de los mecanismos más importantes en la defensa inmunológica y que los mecanismos microbicidas que utilizan los polimorfonucleares están mejor caracterizados que los de los monocitos y macrófagos. Los mecanismos microbicidas de los neutrófilos humanos pueden dividirse en dos categorías como muestra el cuadro 3 (1,18).

SISTEMAS MICROBICIDAS DEL NEUTRÓFILO

I.- Independientes de Oxígeno

- a) proteínas catiónicas
- b) pH ácido
- c) lisozima
- d) lactoferrina
- e) histonas nucleares
- f) elastasa

II.- Dependientes de Oxígeno

- i) Mediados por mieloperóxidasa
 - a) mieloperoxidasa
 - b) peróxido de hidrógeno
 - c) pH ácido
 - d) cofactor oxidable
- ii) Independientes de mieloperóxidasa
 - a) peróxido de hidrógeno
 - b) anión superóxido
 - c) radical hidroxilo
 - d) oxígeno singulete

Cuadro 3

I.- SISTEMAS INDEPENDIENTES DE OXIGENO.

Estos mecanismos son independientes del "estallido respiratorio" y son importantes debido a que algunos microorganismos pueden ser destruidos bajo condiciones anaerobias, aunque la actividad microbicida se ve reducida bajo estas condiciones. Para que se lleven a cabo los siguientes mecanismos se requiere forzosamente de la fusión de los gránulos con el fagosoma (1,10,21).

a) Proteínas Catiónicas.

Al momento de ingerir el fagocito al microorganismo parece que existe una fase en la cual el pH del medio se eleva primeramente antes

de caer y tornarse ácido, la proteína catiónica fagocitina, presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y en algunos de los macrófagos, es más tóxica bajo condiciones alcalinas por lo que es la primera en actuar contra la capa bilipídica exterior de la membrana de las bacterias Gram-negativas como *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, etc.

b) pH ácido.

Se ha reportado una acidez dentro del fagosoma alrededor de pH=4. Esta acidez puede ser consecuencia de la producción de ácido láctico debido a la glucólisis o se puede deber a la producción de ácido carbónico debido a la presencia de anhidrasa carbónica. Los polisacáridos microbianos tiene un papel importante en esta acidez debido a un intercambio iónico. Algunos microorganismos pueden ser destruidos entre 10 y 15 minutos debido a esta acidificación.

c) lisozima.

El pH ácido es óptimo para la actividad de la lisozima, que se encuentra tanto en los gránulos primarios como en los secundarios, y actúa rompiendo enlaces β 1-4 del mucopéptido que constituye la pared celular de bacterias Gram (+). Algunas de éstas insensibles al ataque de la lisozima se vuelven sensibles bajo la presencia de ácido ascórbico o de H_2O_2 .

d) lactoferrina.

La lactoferrina se encuentra dentro de los gránulos específicos y puede inhibir el desarrollo microbiano debido a que forma quelatos con

el fierro libre y priva a las bacterias de éste elemento, el cual es esencial para su desarrollo.

e) histonas nucleares.

Presentan actividad antimicrobiana directa. Estas histonas son liberadas en los tejidos vecinos por la muerte y autólisis de las células.

f) elastasa.

La elastasa de los gránulos primarios se inserta a los mucopéptidos de las paredes de ciertas bacterias y es más importante en la digestión de microorganismos muertos, que en su destrucción.

II. - SISTEMAS DEPENDIENTES DE OXIGENO.

i) Mediados por mieloperoxidasa (MPO).

El mecanismo de acción microbicida del sistema mediado por MPO implica la reacción del H_2O_2 con el fierro de los grupos prostéticos hemo de la MPO, para producir complejos enzima-sustrato con fuerte capacidad oxidativa (1,10,22,23,24).

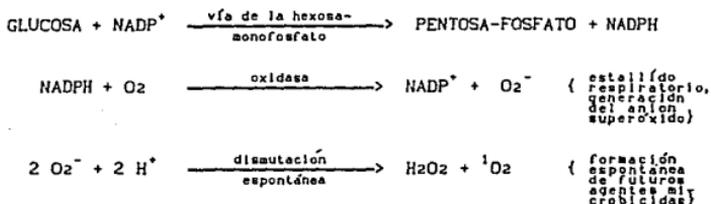
a) Mieloperoxidasa.

La mieloperoxidasa, presente en los gránulos azurófilos, se libera al fusionarse con el fagosoma. En presencia de peroxidasa (o bajo algunas circunstancias catalasa de peroxisomas), el H_2O_2 generado del metabolismo del neutrófilo más haluros es transformado a hipohaluros, generando sustancias de tipo oxidante tóxicas para bacterias y virus (36).

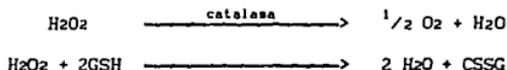
Algunos individuos presentan en sus monocitos deficiencias congénitas de mieloperoxidasa lo cual conlleva a una deficiente actividad bactericida. Los macrófagos tisulares no poseen peroxidasa.

b) Peróxido de Hidrógeno

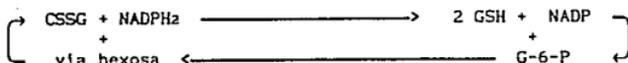
El H₂O₂ surge del metabolismo del neutrófilo según la siguiente reacción:



Algunos microorganismos paradójicamente pueden proporcionar el H₂O₂ que medie su propia destrucción, entre ellos el neumococo y algunos estreptococos ya que éstos microorganismos están clasificados como productores de ácido láctico y su oxidación terminal está mediada por flavoproteínas que oxidan el O₂ a H₂O₂; como carecen de catalasa el H₂O₂ se acumula y puede ser usado en el sistema destructor mediado por MPO (49). Para evitar el daño celular, los neutrófilos y macrófagos poseen dos sistemas para destruir el H₂O₂, uno es la catalasa y otro las reacciones enzimáticas mediadas por glutatión, como se observa enseguida:



El glutatión reducido es regenerado por reacciones acopladas, esto estimula el flujo de G-6-P en la vía de las hexosas.

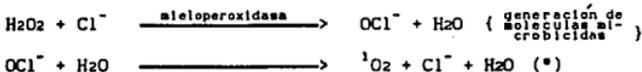


c) pH ácido.

El sistema mediado por mieloperoxidasa posee un pH ácido óptimo de 4.0 a 4.5, condición que se cumple dentro de la vacuola fagocítica.

d) Cofactor Oxidable.

Estos pueden ser fluoruros, cloruros, bromuros y yoduros. El neutrófilo posee cloruros en su interior en cantidades considerables por encima de lo que requiere para la participación de éste en las reacciones mediadas por MPO:



Con un pH ácido es posible que se forme ácido hipocloroso, el cual posee propiedades bactericidas que podrían actuar a nivel de:

- oxidación de los grupos sulfhidrilos con inactivación enzimática
- oxidación de yoduros a yodo con daño directo a las proteínas microbianas, incluyendo enzimas.
- producción de oxígeno singulete (${}^1\text{O}_2$) la cual es un estado excitado del oxígeno y que discutiremos más adelante.

- formación de cloraminas (R-N-Cl) como aminas, amidas e imidas.

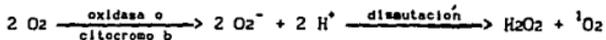
Los yoduros presentes en suero en concentraciones menores de $1\mu\text{g}/\text{dl}$ o bajo la forma de Triyodotironina (T3) y Tetrayodotiroxina (T4), ligadas a la membrana al degradarse y liberar ion yoduro pueden causar daño microbiano por mecanismos análogos a las dos últimas reacciones (sustituyendo cloruros por yoduros) y por peroxidación de los lípidos.

ii) Independientes de mieloperoxidasa.

Para que se lleven a cabo estos eventos no es necesaria la fusión de los gránulos o lisosomas con el fagosoma, es probable que una enzima (oxidasa presente en la membrana del fagosoma) o tal vez un citocromo b, sean los responsables de la reducción del O_2 al ion superóxido. Esta reacción se lleva a cabo espontáneamente después de la ingestión del microorganismo o partícula y la consiguiente formación del fagosoma.

a) Peróxido de hidrógeno.

El H_2O_2 en concentraciones elevadas puede ser por sí mismo microbicida, aunque eso depende de la capacidad del microorganismo para destruirlo ya sea por producción de catalasa o peroxidasa. La formación del peróxido de hidrógeno es:

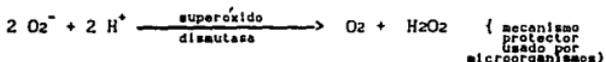


b) Anion Superóxido.

La formación de este anion O_2^- es como se observa en la primera parte de la última reacción o por reacción acoplada al metabolismo:



El anion superóxido es por sí mismo un bactericida débil y actúa directamente sobre los microorganismos, aunque existen algunos que pueden resistir su actividad microbicida gracias a la superóxido-dismutasa.



El anion superóxido puede actuar como reductor cuando reduce al citocromo c ó reduce compuestos como los colorantes nitroazul de tetrazolio (NBT) o amarillo de tetrazolio (MTT), aquí el ion superóxido pierde un electrón y se convierte en O_2 y puede actuar también como oxidante cuando gana un electrón frente a la epinefrina y forma H_2O_2 . Este anion predomina a pH alcalino.

c) Radical Hidroxilo.

Si el ion superóxido es un bactericida débil y en combinación con el peróxido de hidrógeno produce el radical OH^- que resulta ser uno de los productos más tóxicos para algunas bacterias. Este radical es producido por PMN como por monocitos de la siguiente manera:



d) Oxígeno singulete.

Cuando los PMN intactos son incubados con partículas se observa un fenómeno llamado "quimioluminiscencia", la emisión de luz de color rojo débil; este mecanismo involucra la generación de una molécula de oxígeno singulete ($\Delta g \text{ } ^1\text{O}_2$ o $^1\text{O}_2$). Este tipo de oxígeno está en un estado electrónicamente excitado generado por la absorción de energía que emite un cuanto de luz al regresar a su estado basal, durante la oxidación de los microorganismos ingeridos. La quimioluminiscencia no se observa en ausencia de fagocitosis, en personas con enfermedad granulomatosa crónica y disminuye en las personas con deficiencia de MPO (25).

La quimioluminiscencia puede cuantificarse y se correlaciona con la oxidación de glucosa a través de la derivación de la hexosamonofosfato. Por lo tanto es un método sensible, útil, continuo y no destructivo para medir la actividad microbicida del neutrófilo (26).

v) *DISFUNCION DE FAGOCITOS.*

Los trastornos de los fagocitos se dividen en extrínsecos e intrínsecos. En los primeros se incluyen las deficiencias de opsoninas secundarias debidas a deficiencias de inmunoglobulinas y de factores del complemento, supresión del número total de fagocitos por inmunosupresores, interferencia de la función fagocítica por corticoesteroides, supresión de neutrófilos circulantes por Ac específicos y quimiotaxis anormal de los neutrófilos por deficiencia del complemento. Los intrínsecos se relacionan con deficiencias enzimáticas de la vía metabólica necesaria para la destrucción de los microorganismos, los trastornos por estos factores se resumen a continuación: (1,2,7,27).

ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRONICA. Es una enfermedad crónica hereditaria ligada al sexo. La deficiencia enzimática de esta enfermedad se piensa radica en la NADH o en NADPH oxidasa o en NADH reductasa. Esta deficiencia provoca una disminución en el consumo de oxígeno, abatiendo la utilización de glucosa por la vía HMF, poca producción de H_2O_2 y en consecuencia poca producción del ion superóxido. Mayor susceptibilidad a *C.albicans*, *E.coli*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.marcescens* y *pseudomonas*.

DEFICIENCIA DE GLUCOSA-6-FOSFATODESHIDROGENASA Existe actividad deficiente de NADH o de NADPH oxidasas con disminución de la actividad de la vía de la HMF y disminución de la producción de H_2O_2 . Los PMN no destruyen al microorganismo a la velocidad normal.

DEFICIENCIA DE MIELOPEROXIDASA Existe deficiencia de mieloperoxidasa pero hay un consumo normal de oxígeno, de la vía de la HMF y de la producción de H₂O₂. Mayor susceptibilidad a infecciones por candida y estafilococos.

SINDROME DE CHEDIAK-HIGASHI Trastorno autosómico recesivo de sistemas múltiples con inclusiones granulares gigantes en leucocitos y plaquetas. Anomalías en la quimiotaxis y muerte intracelular, pero el consumo de O₂, producción de H₂O₂ y la vía de la HMF son normales. Susceptibilidad mayor a estreptococos y pneumococos.

SINDROME DE JOB. Variante de la Enfermedad Granulomatosa Crónica, trastornos de abscesos recurrentes fríos producidos por estafilococos en la piel, ganglios linfáticos y tejido subcutáneo con pocos signos de infección y de respuesta inflamatoria.

DEFICIENCIA DE TUFTSIN. Deficiencia familiar del tetrapéptido estimulante de la fagocitosis (tre-lis-pro-arg) producido aparentemente en el bazo por desdoblamiento de una inmunoglobulina. Este tetrapéptido fué descubierto en la Universidad de Tufts, de allí su nombre.

SINDROME DEL LEUCOCITO PEREZOSO Respuesta quimiotáctica deficiente de los PMN con neutropenia, respuesta inflamatoria y migración al azar de leucocitos anormales. Susceptibilidad a infecciones bacterianas graves.

IgE ELEVADA, QUIMIOTAXIS Hombres y mujeres presentan desde la
ANORMAL, ECZEMA E infancia eczema, infecciones recurrentes
INFECCION RECURRENTE. en forma de abscesos y neumonia; los
responsables son los *S.aureus* y estreptococos beta-hemoliticos del
grupo A. Los niveles de IgE son 12 veces mayores de lo normal. Las
etapas de la fagocitosis se encuentran normales excepto la
quimiotaxis.

vi) FAGOCITOSIS EN EL NEONATO.

Hasta antes de 1960 pocos estudios se realizaron acerca de la fagocitosis en el neonato. En la mayoría de estos estudios se observó una deficiencia relativa de la actividad fagocítica del recién nacido en comparación con la de niños mayores y adultos; estos estudios variaban considerablemente desde la partícula usada en el ensayo hasta la utilización de suero autólogo u homólogo y la concentración de este en el ensayo, especialmente la utilización de sangre total en estos primeros ensayos hacía imposible una evaluación de la eficiencia de la inmunidad celular y humoral por separado (28).

En 1952 Matoth (28) demostró que la actividad fagocítica, hacia los gránulos de almidón, era igual para los leucocitos de adultos que para los de cordón umbilical de neonatos a término siempre y cuando se incubaran con una concentración de suero mayor del 10 % ; en presencia de concentraciones menores al 10 % la actividad fagocítica de los PMN de neonatos era menor que la de los adultos. Gluck (28) en 1957 encontró que los PMN de neonatos prematuros ingeren cantidades normales de partículas de tinta de la India en presencia de suero adulto, pero esta actividad disminuye cuando se realiza con suero autólogo. Una posible explicación para estos dos procesos anteriores sería que la disminución de actividad fagocítica se deba a factores humorales (falta de, o baja concentración de inmunoglobulinas o complemento) más que a factores celulares . Miyamoto (28) en 1965 realizó un estudio en neonatos prematuros usando sangre total y

estreptococos muertos encontrando que los PMN de neonatos prematuros eran menos fagocíticos que aquellos provenientes de neonatos a término en la primera semana de vida. Aparentemente todo indicaba que el sistema inmune del recién nacido se encontraba deficiente tanto cualitativa como cuantitativamente, lo cual repercutía en una predisposición hacia las infecciones (28).

Actualmente se ha observado, en relación a los aspectos cuantitativos, que todos los neonatos carecen de un número adecuado de células progenitoras de granulocitos en médula ósea por lo que en casos de septicemia neonatal el número de PMN en sangre periférica puede ser insuficiente (29,30).

También se han demostrado numerosas anomalías cualitativas en los PMN de neonatos, especialmente en situaciones de estrés, de bajo peso al nacer, de pretérmino, de infección o de desnutrición (31). Estas anomalías incluyen: disminución en la capacidad de deformación de la membrana, disminución en la respuesta quimiotáctica, disminución en la movilidad y locomoción (debido a una falta de polimerización de la proteína actina), disminución del reconocimiento u opsonización debido a una producción tardía de inmunoglobulinas, especialmente de IgM específica (6,7), disminución en la formación de fagosomas, disminución en la desgranulación, disminución de la ingestión, disminución en la expresión del receptor C3b, disminución en la adherencia y defectos en el metabolismo oxidativo, lo cual finalmente se traduce en una incapacidad por parte de los PMN para

fagocitar y destruir a los microorganismos causantes de la infección (27,32,33). Se cree que esta incapacidad para fagocitar se encuentra más relacionada con una inmadurez en la producción de factores inmunes humorales, que finalmente realizan la opsonización de microorganismos o partículas, que con defectos intrínsecos de los PMN (30,32,33).

Las infecciones que generalmente se presentan en los neonatos son provocadas por microorganismos que normalmente no son tan virulentos para los adultos, a menos que los adultos se encuentren inmunocomprometidos; algunos de estos microorganismos comunes en infecciones neonatales son: *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli*, *L.monocytogenes*, estreptococos del grupo B y *C.albicans*. Los neonatos desarrollan infecciones en lugares periféricos como piel, pulmones y tejidos subcutáneos, es aquí donde los PMN son de suma importancia en la defensa de éstas áreas (33).

Con respecto a *C.albicans* si bien es cierto que los linfocitos juegan un papel muy importante en la defensa del organismo, el papel de los neutrófilos en contra de este microorganismo es crítico ya que ellos lo destruyen o limitan su proliferación antes de que se desarrolle una respuesta de tipo celular en contra de esta levadura. *C.albicans* es una levadura saprófita que habita normalmente en el sistema digestivo humano, la exposición del organismo a este microorganismo comienza desde el principio de la vida lactante.

Durante el embarazo aproximadamente el 25% de las mujeres presentan infecciones vaginales por candida y alrededor del 5% de los

recién nacidos presentan candidiasis bucal, que normalmente desaparece durante el primer mes de vida (2,7). Al final del primer año de vida casi todos los niños han sido expuestos a *C.albicans*, y aproximadamente el 60 % de los niños mayores de un año de edad pueden dar una respuesta retardada en 48 horas a la inyección intradérmica de antígeno de *C.albicans* para la prueba cutánea. Los sistemas oxidativos y no oxidativos de los PMN son activos contra *C.albicans*, parece ser que las pseudohifas poseen un receptor que se une a la membrana de los PMN iniciando así los mecanismos microbicidas oxígeno dependientes (1,2,7,18,34,35,36).

vii) *IMPORTANCIA DE LAS TECNICAS DE ESTUDIO DE LA FAGOCITOSIS EN EL NEONATO.*

Dada la susceptibilidad y predisposición que presentan los neonatos a contraer infecciones, debido a su inmadurez inmunológica, se hace necesario poseer métodos adecuados, sensibles y reproducibles para evaluar la función fagocítica y la capacidad microbicida de los PMN, esto tiene como fin diferenciar con certeza una disfunción fagocítica de una función normal o de una función inmadura con el objeto de aplicar los tratamientos correctos a los recién nacidos o niños pequeños que presenten problemas de infecciones repetitivas, o aplicar medidas preventivas en neonatos con riesgo de infección.

Existen varias pruebas para evaluar las diferentes etapas de la fagocitosis en los PMN. Particularmente nos interesamos por evaluar las etapas de ingestión y de muerte intracelular, sobre todo esta última ya que conlleva al objetivo final de los fagocitos, destruir a los microorganismos extraños y patógenos al organismo del neonato.

Las pruebas para la etapa de ingestión proporcionan un medio rápido y simple para evaluar el proceso fagocitario global; a veces el término fagocitosis se usa como sinónimo de ingestión por lo que el término "Índice Fagocítico" que denota el número de partículas promedio ingeridas por fagocito debería llamarse en realidad "Índice de Ingestión". Los métodos para la evaluación de la ingestión de partículas por ensayos celulares son: 1) cuenta directa de partículas fagocitadas mediante microscopía ordinaria, 2) estimación de la radioactividad fijada a la célula después de la ingestión de una

partícula marcada y 3) medición de algún lípido fácilmente teñible extraído de la célula después de la ingestión (1).

Estas pruebas se ven afectadas por la presencia de: factores humorales (opsoninas) que intensifican la captación de partículas, la presencia de suero que contiene factores de coagulación, la necesidad de agitación constante o volteo de células y de las partículas para aumentar al máximo el contacto y la captación de estas últimas, el tipo o tamaño de las partículas empleadas y finalmente la proporción en que se encuentren las partículas en relación con los fagocitos (1).

En nuestro caso se escogió una prueba de cuenta directa de partículas fagocitadas mediante microscopía ordinaria (43), la prueba es la de reducción del colorante cloruro de nitrosul de tetrazolio (NBT); este colorante es un compuesto hidrosoluble de color amarillo claro que forma formazán, un colorante de color azul intenso cuando se encuentra en su forma reducida. Los neutrófilos pueden reducir el colorante después de la ingestión de partículas, subsiguiente a la explosión de energía generada a través de la derivación de la vía de la HMF. El colorante reducido se puede medir mediante un espectrofotómetro después de su extracción de los neutrófilos con el solvente orgánico piridina, si la prueba se realiza cuantitativamente o como se mencionó anteriormente, en nuestro caso se observó al microscopio el número de partículas ingeridas por cada fagocito, realizándose la prueba de forma cualitativa (1,38).

El mecanismo por el cual se reduce el NBT esta íntimamente ligado con los eventos metabólicos, el consumo de oxígeno, la formación del

H₂O₂ y del ion superóxido (1,10,24,38), para más detalle referirse a:
Sistemas Microbicidas del Neutrófilo - II b) Anion Superóxido.

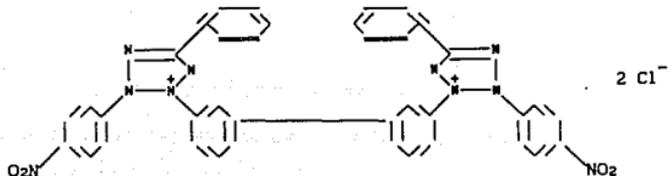


Figura 4.- Cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT)

Para evaluar la etapa de muerte intracelular las pruebas más usadas son: la reducción del azul de tetrazolio cuantitativa y la de muerte intraleucocitaria. En cuanto a la primera prueba si bien es cierto que una incapacidad para reducir el colorante NBT responde a una anomalía importante de los sistemas antimicrobianos del neutrófilo (ejemplo de ello es la Enfermedad Granulomatosa Crónica), esto no confirma que todas las partículas que fueron ingeridas fueron destruidas, así mismo se han reportado resultados falsos positivos y falsos negativos para esta prueba en numerosas enfermedades, con lo cual su uso queda restringido (1,39).

Para la prueba de muerte intraleucocitaria existen varias opciones; primeramente la prueba más generalizada es la de la capacidad bactericida de los neutrófilos para la cepa 502A de

Staphylococcus aureus en la cual se incuban PMN con bacterias (relación 1:5) más opsoninas de suero fresco en agitación; después son destruidas las bacterias que no fueron ingeridas y se toman alícuotas de la mezcla a diferentes tiempos. Se liberan los microorganismos intracelulares evaluándose, por diluciones seriadas y siembra en placa, el número de microorganismos viables. Para un individuo normal adulto se produce casi una reducción bi-logarítmica en la cantidad de *S. aureus* viable intracelular una hora después de la incubación. Esta técnica tiene como inconveniente el tiempo utilizado en su realización y una mayor factibilidad de error por contaminación microbiana (1).

Otra técnica utilizada para la evaluación de la destrucción intracelular es la descrita por Smith y Rommel en 1977 (40) y la modificación de ésta técnica reportada por Bellinati-Pires et. al. en 1989 (41). En esta técnica se utilizan PMN, una cepa Cowan I de *S. aureus* (relación 1:50) y un suero pool humano normal; se incuban estos tres elementos en agitación y después de un lapso de tiempo se termina la fagocitosis con una solución de Hanks helada. Se centrifuga y el botón se tinte con naranja de acridina; después de un minuto se lava, centrifuga y se observa una gota de la solución al microscopio con fuente de luz ultravioleta a inmersión. Las bacterias viables se observan de color verde, mientras que las muertas se observan de color rojo-amarillo.

El colorante naranja de acridina tinte los núcleos y gránulos lisosomales de los neutrófilos, por lo que son fácilmente

distinguibles de otras células. Se reporta el % de muerte intracelular encontrándose un valor promedio de 52.9 % \pm 17.5 % para adultos sanos (41). Esta técnica es menos utilizada que la anterior, requiere de equipo un poco más sofisticado y de una concentración elevada de PMN (10×10^6 /ml).

La técnica que se propone para la evaluación de la muerte intracelular (MI) en los neonatos se basa en la técnica original de Levitz y Diamond reportada en 1985 (42); los autores se plantean como objetivo demostrar la utilidad de este método para evaluar la viabilidad de varias especies de hongos, entre ellas *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*; es cierto que existen otros métodos para evaluar la MI pero cuando se aplican al estudio de hongos no son del todo útiles, ya sea por el tiempo que requieren para su realización, por su costo, porque no hacen distinción entre hongos vivos y muertos o porque en el caso de técnicas de tinción no puede eliminarse del todo la subjetividad del observador. Con este método reportan un 80.3 % de MI para *C. albicans* llevada a cabo por PMN de adultos sanos contra un 70.5 % de MI para el mismo microorganismo con técnicas de dilución y siembra en placa, por lo que concluyen que con su método obtienen una valoración más eficaz de la muerte intracelular para hongos.

Asimismo este método ha sido utilizado con PMN de adultos en otros estudios realizados en el Laboratorio de Inmunología, del Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto

Nacional de Perinatología (INPer) por Arredondo J.L., Del Rey P.G., Orrantía G.R. y Lara S.J. (51) con buenos resultados. Esto nos llevo a concebir la idea de utilizar este mismo método para evaluar la MI en los neonatos, de esta manera se obtendrían parámetros comparables entre las dos poblaciones. De principio se planteaban varias modificaciones a la técnica para su aplicación a neonatos, siendo la más importante la disminución en la cantidad de muestra utilizada en la prueba, ya que no puede obtenerse de los recién nacidos más del 2 % de su volumen sanguíneo. Se planteó esta posibilidad para la adaptación de la técnica aunque siempre bajo el mismo fundamento, el cual se observa en el diagrama 4.

El método se basa en la reducción del colorante amarillo de tetrazolio, comunmente conocido como MTT, (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio). Este colorante que es hidrosoluble de color amarillo es reducido por el metabolismo de hongos vivos, tal vez a través de un mecanismo de transhidrogenasas (17,38), a un color púrpura cuya intensidad puede evaluarse con un espectrofotómetro a 570 nm. El sistema que se propone es incubar PMN con levaduras vivas *C. albicans* (relación 1:2) y suero pool humano normal en agitación; después se lisan los PMN liberándose las levaduras vivas que no fueron destruidas, se agrega el MTT en concentración conocida y se incuban en agitación; finalmente se extrae el MTT-formazán (forma reducida) con isopropanol y se valora la reducción producida en el MTT, la cual es proporcional al número de

SISTEMA PARA EVALUAR MUERTE INTRACELULAR

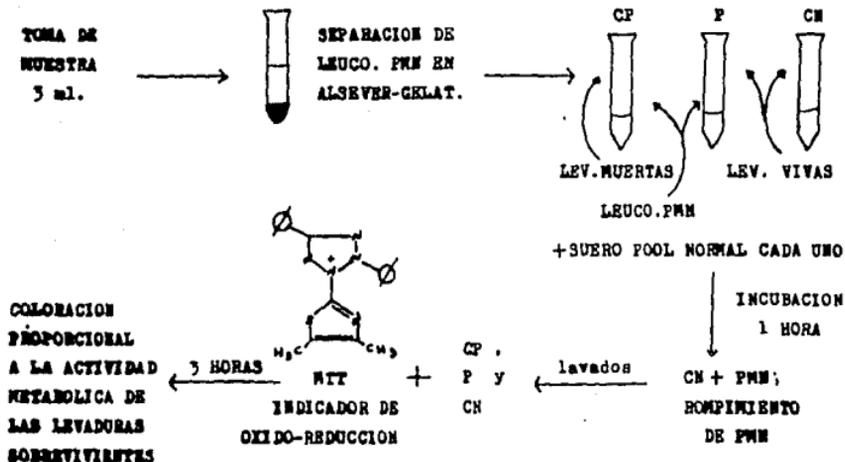


Diagrama 4

CP = Control Positivo

P = Problema

CN = Control Negativo

MIT = Amarillo de Tetrazolio

PMN = Polimerfonucleares

Lev. = Levaduras

levaduras vivas restantes y por diferencia puede calcularse el % de levaduras destruidas o en otras palabras el % de muerte intracelular. Este método nos ofrece una información más precisa de qué tan eficientemente están funcionando los sistemas microbicidas del neutrófilo, no requiere de equipo especial y el resultado se obtiene en un lapso relativamente corto, aproximadamente 10 hrs.

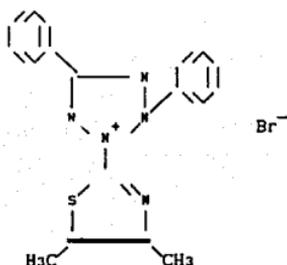


Figura 5.- Bromuro de amarillo de tetrazolio (MTT)

En virtud de la colonización en el intestino del lactante *C. albicans* es el primer hongo potencialmente patógeno que ataca a los niños con inmunidad defectuosa mediada por células o con defectos quimiotácticos de los neutrófilos; esto es una razón más para la elección de la técnica de reducción de MTT para la realización de este trabajo (2,7,28).

CAPITULO II

OBJETIVOS, MATERIAL Y METODOS

O B J E T I V O S

1) ADAPTAR Y ESTANDARIZAR LAS TECNICAS PROPUESTAS, PARA EL ANALISIS DE MUERTE INTRACELULAR Y FAGOCITOSIS, A MICROTECNICAS PARA SU APLICACION EN NEONATOS.

2) ESTABLECER POR ESTAS MICROTECNICAS LAS DIFERENCIAS EN PORCENTAJE DE MUERTE INTRACELULAR Y PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS ENTRE POLIMORFONUCLEARES DE ADULTOS SANOS Y DE NEONATOS SANOS A TERMINO.

M A T E R I A L

Pipetas Automáticas de 0-250 μ l.

Pipetas serológicas de 0.1, 1, 2, 5 y 10 ml.

Pipetas Pasteur

Asa de Siembra

Aplicadores de madera

Gradillas

Tubos Pyrex de 13 x 100

Tubos cónicos de vidrio Eppendorf estériles de 15 ml.

Tubos Pyrex de 13 x 100 con tapón de rosca estériles

Cámara de Neubauer ó hematocitómetro

Jeringas desechables de 3, 5 y 10 ml.

Portafiltros para jeringa y filtros Millipore de 0.22 μ m poro.

Centrifuga clínica

Microscópio simple

Incubadora bacteriológica

Potenciómetro

Refrigerador

Nefelómetro Láser Behring

Balanza analítica

Baño de agua con agitación (baño metálico)

Espectrofotómetro Coleman Jr. II (referencia de Dididium)

REACTIVOS QUIMICOS

Fosfato de Sodio (dibásico) Sigma

Fosfato de Sodio (monobásico) Sigma

Azida de Sodio Sigma

Acido Clorhidrico 1N Sigma

Hidróxido de Sodio 1N Sigma

Carbonato de Sodio 1N Sigma

Cloruro de Sodio Sigma

Acido Desoxicólico Sigma

Safranina Merk

Alcohol etílico Sigma

Azul Tripano Sigma

Alcohol isopropílico Sigma

Heparina

Citrato trisódico Sigma

Acido Cítrico Sigma

Dextrosa Merk

MTT (bromuro de amarillo de tetrazolio) Sigma Clave-M2128

NBT (cloruro de azul de tetrazolio) Sigma Clave-840-A

Agua destilada estéril

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Papa Dextrosa (PDA) Merk

Agar Sangre de Carnero (ASC)

Medio Minimo Esencial (MEM) Sigma

Agar Harina de Maiz Merk

REACTIVOS BIOLÓGICOS

Cepa de 24 hrs. de *Candida albicans* en PDA

Sangre heparinizada de neonatos y adultos

Suero *pool* de donadores sanos

Sueros anti-C₃ y anti-C₄ Behring para nefelómetro Láser

Suero humano control Behring para nefelómetro Láser

M E T O D O S

Para la preparación de soluciones y reactivos favor de remitirse al Apendice A.

Los métodos usados pueden dividirse en cinco: 1) el utilizado para la estandarización en la adaptación de la microtécnica de muerte intracelular, 2) el usado para la adaptación a microtécnica de fagocitosis, 3) los criterios seguidos en la selección de los neonatos y adultos para la obtención de los valores de referencia para muerte intracelular y fagocitosis, 4) la obtención de la cepa de *C. albicans* usada en las técnicas y 5) los métodos estadísticos utilizados en el análisis de los resultados. Se trataran cada una por separado.

1) METODO PARA MUERTE INTRACELULAR.

Para la técnica de muerte intracelular se siguió como referencia la descrita por Levitz y Diamond en 1965 (42), de la cual se modificaron diversas condiciones para lograr su estandarización a microtécnica; las modificaciones se describen con detalle en el capítulo III de resultados. Una descripción detallada de la técnica original se da a continuación:

La muestra es sangre periférica humana tomada con heparina de la cual se extraen por sedimentación con dextrán los leucocitos; después de la sedimentación se realiza una lisis hipotónica rápida de eritrocitos remanentes.

Se resuspenden 2.5×10^6 leucocitos/ml más 5×10^6 levaduras vivas/ml en 1 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) con 10 % de suero autólogo en tubos cónicos de 15 ml. Se mezclan e incuban por una hora con agitación a 37°C . Para el tubo control negativo (CN) se añaden los leucocitos después de la incubación con el objeto de simular un sistema donde no haya sucedido la MI (máxima reducción); para el control positivo (CP) se añaden levaduras muertas en lugar de las vivas con el objeto de simular un sistema donde todas las levaduras hayan sido muertas por los leucocitos (no reducción). Después de la hora de incubación se agrega a cada tubo 300 μl de ácido desoxicólico al 2.5 % en solución salina normal (SSN), se agita vigorosamente con el objeto de lisar a los leucocitos, se agregan 10 ml. de SSN y se centrifuga a 1000 g por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y las levaduras se lavan 2 veces con 10 ml de agua destilada. Finalmente se resuspenden en 1 ml de MEM con 0.5 ml del colorante de tetrazolio MIT diluido 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) de un original de 5 mg/ml, se incuban los tubos en agitación durante 3 horas a 37°C . Pasado este periodo se extrae el MIT-formazán formado por las levaduras sobrevivientes de la siguiente manera: se centrifugan los tubos, se descarta el sobrenadante y el botón se resuspende en 400 μl de alcohol isopropílico acidificado con HCl al 0.04 M, esto es con el objeto de solubilizar al MIT-formazán. Después de 5 minutos se agitan vigorosamente los tubos y se centrifugan a 1000 g por 5 minutos, se toman 300 μl de cada sobrenadante, se colocan en micro pocillos de fondo plano y se lee la absorción de cada pocillo a

570 nm contra un blanco de MEM más MTT tratado igual que los tubos problema y controles.

El % de muerte intracelular se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{ M.I.} = 1 - \left(\frac{\text{Abs. Problema} - \text{Abs. Control Positivo}}{\text{Abs. Control Negativo} - \text{Abs. Control Positivo}} \right) \cdot 100$$

.....Ecuación 1

2) METODO PARA FAGOCITOSIS.

La técnica original de fagocitosis que se adaptó a microtécnica fué la siguiente (43):

Se obtienen 5 ml de sangre venosa con heparina, se depositan sobre 2 portaobjetos perfectamente limpios y se incuban en atmósfera húmeda a 37°C durante 30 minutos. Por otra parte 2 tubos con levaduras muertas (LM) cada uno, se lavan y ajustan a una concentración de 5 · 10⁶ LM/ml, se opsonizan en incubación durante 30 minutos con 1 ml de suero autólogo, después de este período se lavan las levaduras 2 veces con SAF y se resuspenden en 2.5 ml de MEM más 0.5 ml de Nitroazul de tetrazolio (NBT) al 0.1 % en SSN. Después de la incubación los portaobjetos se lavan suavemente con SAF y se colocan nuevamente en la cámara húmeda, el contenido de los tubos se vierte sobre los portaobjetos y se incuban 20 minutos a 37°C.

Finalmente los portaobjetos se vuelven a lavar suavemente con SAF y se tñen con safranina al 0.5 % en etanol/agua durante 10 minutos. Se dejan secar los portaobjetos y se observan a inmersión en microscopio ordinario.

Se cuentan como células que fagocitaron aquellas que presentan levaduras de color azul intenso en su citoplasma, también se cuentan las levaduras fagocitadas por cada célula. Las células que redujeron el NBT a través de su metabolismo activo son las que poseen levaduras azules en su interior y las no ingeridas se observan rosas en la perifería o incluso alrededor de las células fagocíticas.

El % de fagocitosis y el Índice de Ingestión se calculan de la siguiente manera:

$$\% \text{ Fag.} = (\text{No. células que fagocitaron} / \text{Total de cél. contadas}) \cdot 100$$

.....Ecuación 2

$$\text{Ind. de Ingestión} = \text{No. total lev. ingeridas} / \text{No. de cél. que fagocitaron}$$

.....Ecuación 3

3) CRITERIOS DE SELECCION DE PARTICIPANTES.

CRITERIOS DE INCLUSION DE NEONATOS.

Neonatos sanos a término con edad gestacional de 37 a 41.6 semanas sin importar la edad de las madres.

Neonatos sanos a término sin importar el sexo, que hayan sido obtenidos por parto eutócico o cesárea programada.

Neonatos con índice de Apgar mayor de 7 al minuto y de 7 a los 5 minutos, con índice de Silverman menor de 3.

Neonatos trasladados al Servicio de Alojamiento Conjunto con peso y talla adecuados a su edad gestacional.

CRITERIOS DE EXCLUSION DE NEONATOS.

Neonatos cuyas madres hayan estado durante los 20 días anteriores al parto o que actualmente estén bajo tratamiento de antibióticos, corticoesteroides o anticonvulsivos.

Neonatos cuyas madres presenten alteraciones endocrinológicas o inmunológicas.

Neonatos cuyas madres presenten infección o que potencialmente puedan estar infectadas.

Neonatos cuyas madres presentaron ruptura de membranas de más de 12 horas anteriores al parto.

Neonatos con malformaciones congénitas mayores o genopatas.

Neonatos con sufrimiento fetal crónico o agudo.

Neonatos con asfixia al momento de nacer o que se encuentren con ventilación asistida.

Neonatos que hayan sido catalogados como sanos que desarrollen algún proceso infeccioso dentro de las primeras 72 horas de vida extrauterina.

Neonatos infectados o que potencialmente pudieran estarlo.

CRITERIOS DE INCLUSION DE ADULTOS.

Adultos sanos entre 20 y 40 años de edad sin importar el sexo, peso o talla.

CRITERIOS DE EXCLUSION DE ADULTOS.

Adultos que hayan estado durante los 20 días anteriores a la toma de la muestra o que actualmente estén bajo tratamiento de antibióticos, corticoesteroides o anticonvulsivos.

Adultos que hayan tomado alimentos en un lapso de 2 horas o menos antes de la toma de la muestra.

Adultos que presenten problemas infecciosos o de desnutrición.

Adultos mujeres que se encuentren en estado de gravidez o en el período menstrual, pues durante este período el sistema inmune se deprime, al igual que durante el embarazo.

4) OBTENCION DE LA CEPA DE *Candida albicans*

Como siguiente paso se aisló una cepa de *Candida* de un caso clínico con leucorrea; se le practicaron pruebas bioquímicas para determinar su especie con los siguientes resultados (12,44):

TUBO GERMINATIVO: (+); DEXTROSA: (+); MALTOSA: (+); SACAROSA: (+).
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS EN AGAR HARINA DE MAIZ: Micelio ramificado con clamidosporas

Se determinó que la cepa aislada fué *Candida albicans*. La cepa de *C. albicans* es sembrada en agar papa dextrosa (PDA) 24 hrs antes de montar la técnica. Las colonias se cosechan en SAF lavándose 3 veces con éste, después en una dilución 1:10 en azul tripano se cuentan las levaduras y se ajustan a la concentración deseada en MEM, debe observarse por lo menos un 90 % de viabilidad en la cepa.

Las levaduras muertas de *Candida albicans* se obtienen cosechándolas en SAF con azida de sodio al 1% . Se matan en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión y 120°C. Se ajustan a una concentración de $5 \cdot 10^6$ LM/ml en SAF, se guardan a 4°C. Cuando se van a utilizar se lavan 3 veces con SAF para eliminar la azida de sodio, se ajustan a la concentración deseada en MEM para la técnica de muerte intracelular y sólo son lavadas y resuspendidas en MEM para la técnica de fagocitosis.

5) METODOS ESTADISTICOS.

El cálculo de los parámetros estadísticos, de los intervalos permisibles de valores para la media y el cálculo de los coeficientes de variación de las técnicas se realizó de acuerdo con las ecuaciones 4, 5, 6, 7, 8 y 9. El estudio de la validez estadística de los resultados de las muestras estudiadas se realizó en base a los datos obtenidos de curtosis, sesgo y tercer momento. Si la muestra presenta una distribución normal se le aplicará una prueba para diferencias de varianzas con una distribución F y para la comparación de las medias se usará una distribución de t de Student; si por el contrario las muestras no presentan características de una distribución normal entonces se les aplicará la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

1) Cálculos de Media, Varianza, Desviación Estándar y Error Estándar de la Media.

El cálculo de la media simple se realizó: (45,46,47)

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

.....Ecuación 4

donde n es el número de eventos, pruebas o pacientes que componen nuestra muestra y Xi el valor obtenido para cada uno de ellos.

Para el cálculo de la varianza y de la desviación estándar se utilizaron fórmulas que implican una corrección para valores muestrales n-1 en el denominador, esto se debe esencialmente a que si

se usase n en vez de $n-1$ se estaría subestimando la varianza poblacional (45,46,47).

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$$

VARIANZA
PARA MUESTRAS

....Ecuación 5

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

DESVIACION
ESTANDAR PARA
MUESTRAS.

.....Ecuación 6

Suponiendo que los resultados se comporten como en una distribución normal, que la media de la muestra sea igual a la media de la población y que dado el tamaño de la muestra la dispersión en los datos sea menor que la que se presenta en una población entonces podemos aplicar la fórmula del error estándar de la media; esta corrección a la desviación estándar implica tomar en cuenta el tamaño de la muestra (45,46,47,48).

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

ERROR ESTANDAR
DE LA MEDIA

.....Ecuación 7

También se utiliza este valor del error estándar de la media (corregida por un coeficiente de la distribución de t de Student de acuerdo al tamaño de nuestra muestra), para calcular los valores máximo y mínimo permisibles de la media muestral.

ii) Cálculo del Coeficiente de Variación.

El coeficiente de variación de la técnica se calcula (46):

$$\% \text{ C.V.} = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

COEFICIENTE DE
VARIACION

.....Ecuación 8

Para muestras pequeñas se realiza una corrección basada en el tamaño de la muestra como se observa en la siguiente ecuación (45):

$$\% \text{ C.V.}^{\circ} = \left(1 + \frac{1}{(4n)} \right) \% \text{ C.V.}$$

.....Ecuación 9

iii) Comparación de medias y varianzas.

Para establecer una comparación entre los valores de las medias simples obtenidas de neonatos y de adultos se proponen las hipótesis siguientes (47,48,49,50):

a) Hipótesis nula : La media de los neonatos es igual a la de los adultos. $H_0: \bar{X}_A = \bar{X}_B$

b) Hipótesis alternativa : La media de los neonatos es diferente de la de los adultos. $H_1: \bar{X}_A \neq \bar{X}_B$

Para establecer la veracidad de una u otra hipótesis se aplica la siguiente fórmula basada en las correcciones hechas para muestras pequeñas, siempre y cuando la muestra presente características de una distribución normal y las varianzas sean iguales (46,48,49,50):

$$t = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{\left(\frac{(N_A - 1) s^2_A + (N_B - 1) s^2_B}{N_A + N_B - 2} \right)^{1/2} \left(\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B} \right)}$$

VALOR DE t EXPERIMENTAL

.....Ecuación 10

donde: N_A = número de valores de la serie A
 s^2_A = varianza de la serie A
 \bar{X}_A = media de la serie A

y: N_B = número de valores de la serie B
 s^2_B = varianza de la serie B
 \bar{X}_B = media de la serie B

Este valor experimental se confronta con valores de t en tablas de una curva de t de Student con el mismo número de eventos y bajo la probabilidad escogida para el estudio. Existen 2 posibilidades:

Si t experimental \leq t tablas \rightarrow Ho es verdadera $\therefore \bar{X}_A = \bar{X}_B$

Si t experimental \geq t tablas \rightarrow H1 es verdadera $\therefore \bar{X}_A \neq \bar{X}_B$

Para evaluar si existen o no diferencias entre los valores de varianza de los neonatos y la de los adultos se utiliza la siguiente ecuación, siempre y cuando la muestra presente una distribución normal (46,47,48):

$$F = \frac{s^2_A}{s^2_B}$$

VALOR DE F EXPERIMENTAL

.....Ecuación 11

Donde S^2A es la varianza de serie A, S^2B es la varianza de la serie B y F es el valor experimental que se obtiene al dividir la varianza mayor entre la menor.

Este valor experimental se confronta con valores de F en tablas con el mismo número de eventos y bajo la probabilidad escogida para el estudio

Se presentan 2 posibilidades:

$$\text{Si } F_{\text{experimental}} \leq F_{\text{tablas}} \rightarrow S^2A = S^2B$$

$$\text{Si } F_{\text{experimental}} \geq F_{\text{tablas}} \rightarrow S^2A \neq S^2B$$

También gracias a la ecuación 11 es posible calcular el intervalo permisible de valores para la varianza muestral.

Si las muestras no presentan una distribución normal entonces se elige la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, la cual no es tan poderosa como las pruebas paramétricas descritas anteriormente pero presenta otras ventajas como: 1) no asume la normalidad de la muestra, 2) es sencilla en los cálculos matemáticos y 3) la probabilidad de presentar un error de tipo I es igual que en las técnicas paramétricas (48,49,50).

Para realizar la prueba de Mann-Whitney se combinan los valores obtenidos de las muestras, en este caso los valores obtenidos de adultos y neonatos para fagocitosis por ejemplo; se ordenan los datos en forma creciente y se numeran en orden progresivo señalando a qué

muestra corresponde el dato. Se selecciona la muestra más pequeña y se suman todos los números atribuidos a sus datos, el total de la suma se llama S. Al número total de eventos en la muestra pequeña escogida se le llama n y al número de eventos de la otra muestra se le llama m.

Con estos datos se aplica la ecuación (48,49,50):

$$U = S - \frac{n(n+1)}{2}$$

.....Ecuación 12

Los valores que puede tomar U van desde 0 hasta nm; usándo tablas para los valores mínimos que puede asumir U, según la probabilidad que se escogio para el estudio y los valores de n y m, se puede calcular el valor máximo de U con la ecuación (49):

$$U_{\max} = nm - U$$

.....Ecuación 13

Si el valor calculado de U para la muestra se encuentra entre los valores mínimo y máximo de U entonces las medias de las muestras son iguales y se acepta la hipótesis nula (47,48,49,50).

CAPITULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

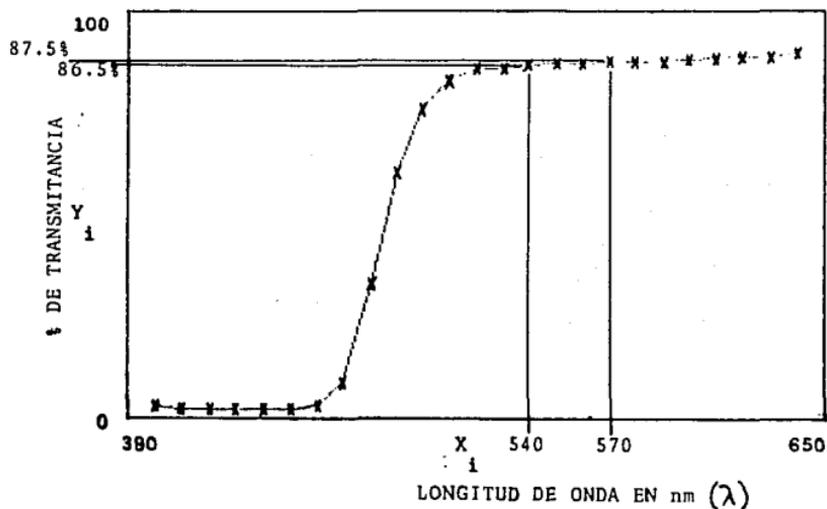
a) ANALISIS DEL BARRIDO DEL ESPECTRO VISIBLE DEL COLORANTE AMARILLO DE TETRAZOLIO (MTT).

Primeramente se estudió el espectro de absorción del MTT ya que la longitud de onda utilizada en la técnica original es de 570 nm y el filtro con que se cuenta en el laboratorio es de 540 nm. Este barrido del espectro se realizó por duplicado existiendo 6 semanas de diferencia entre ambas lecturas, utilizando la misma muestra de MTT y obteniéndose las mismas lecturas para los duplicados, según se ilustra en la tabla siguiente:

<u>λ en nm</u>	<u>% de Transmitancia</u>	<u>λ en nm</u>	<u>% de Transmitancia</u>
400	3	520	86
410	2	530	86
420	2	540	86.5
430	2	550	87
440	2	560	87
450	2	570	87.5
460	3	580	87.5
470	8.5	590	87.5
480	32.5	600	88
490	60	610	88.5
500	76	620	89
510	83	630	89

En la gráfica 1 se muestra la relación entre la λ en nm (abscisas) y el % de transmitancia (ordenadas). Las lecturas de 540 y 570 nm son respectivamente 86.5 % T y 87.5 % de T, lo que proporciona una eficiencia del 98.85 % con respecto al segundo, por lo tanto se

concluye que se puede utilizar el filtro de 540 nm para la lectura de la reducción del MTT, sin pérdida sustancial del % de transmitancia y por consiguiente manteniendo la sensibilidad reportada en la técnica original.



Gráfica 1.- ANALISIS DEL BARRIDO DEL ESPECTRO VISIBLE PARA MTT

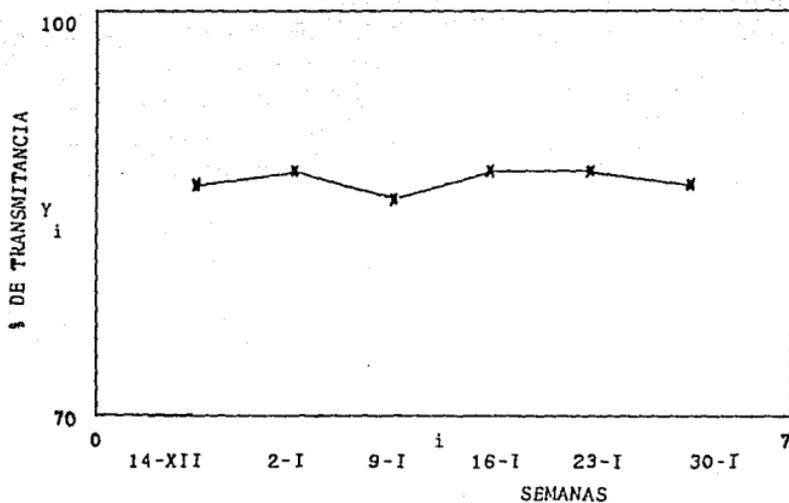
Se observa prácticamente el mismo % de transmitancia para la λ a 540 nm y la λ reportada en la técnica original de 570 nm.

b) ANALISIS DE LA ESTABILIDAD DEL MTT EN FUNCION DEL TIEMPO.

Surgió también la necesidad de conocer la estabilidad del reactivo MTT, ya que de la confiabilidad de este reactivo depende en mucho el éxito de la técnica propuesta para evaluar la muerte intracelular, pues es a través de la reducción de este reactivo que se cuantifican los resultados de la muerte intracelular; además debido a su alto costo debe de optimizarse su uso. Se preparó una solución concentrada de MTT de 5 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) la cual se almacenó a 2-4°C. Para llevar a cabo la lectura de la estabilidad se usó la misma solución concentrada durante un período de 6 semanas. Los resultados se observan en la gráfica 2. (Ver página siguiente)

De los resultados de la gráfica 2 se desprende que el reactivo de MTT usado durante el lapso de 6 semanas presentó una lectura media en % de transmitancia de 87.33 % , con una desviación estándar de 0.816 y un coeficiente de variación de 0.93 % , por lo que se considera confiable este reactivo por lo menos dentro de éste lapso. Esta conclusión dio lugar a la decisión de preparar el reactivo de MTT concentrado, fraccionarlo en frascos viales de 2 ml con 250 µl del MTT y mantener los frascos a - 20°C hasta el momento de su utilización, renovando el lote de frascos viales cada 6 semanas.

<u>SEMANAS</u>	<u>% de Transmittancia</u>
1	87
2	88
3	86
4	88
5	88
6	87



Gráfica 2 .- ANALISIS DE LA ESTABILIDAD DEL MTT EN FUNCION DEL TIEMPO.

Se observa que durante 6 semanas no existe variación significativa (C.V. = 0.93 %) de la estabilidad de la solución concentrada de MTT.

c) OBTENCION DE LEUCOCITOS

Los leucocitos utilizados en las técnicas propuestas fueron finalmente obtenidos por diferencia de gradiente de densidad agregando un volumen de 2 a 3 ml de sangre heparinizada del paciente a tubos estériles que contienen 3 ml de alsever-gelatina, en lugar de hacer la separación como se realiza en las técnicas originales con dextrán. Se prefiere hacer esta separación con alsever en vez de con dextrán ya que el primero es menos tóxico y, dada la cantidad pequeña de la muestra, se protege la viabilidad de los PMN. Después de 45 minutos de incubación a 37°C se separa la capa superior rica en leucocitos, se realiza una lisis rápida de los eritrocitos restantes con agua destilada estéril y se lavan 2 veces con solución alsever. Se observan al microscopio ordinario en el hematocitómetro en una dilución 1:10 con azul tripano al 0.2 %, se cuantifican los PMN vivos y se ajusta la suspensión de leucocitos a la concentración deseada de PMN en MEM; es importante la viabilidad que presenten los PMN pues sólo se trabajará con muestras que presenten una viabilidad mayor o igual al 70 %, pues con viabilidades menores la concentración de PMN vivos no son suficientes para montar ambas técnicas por triplicado.

d) OBTENCION DEL SUERO POOL HUMANO NORMAL

Dado que el interés radica en evaluar la eficiencia de la etapa de ingestión y de muerte intracelular de los PMN en cuanto a efectos

celulares se refiere se debía asegurar que las funciones humorales se llevasen a cabo con la mayor eficacia posible y en igualdad de condiciones, pues se sabe que existe una deficiencia de inmunoglobulinas y complemento en los neonatos (32,33) por lo que se decidió utilizar para la opsonización de levaduras un suero homólogo preparado a partir de la recolección del suero sobrante de las pruebas para donadores adultos realizadas por el Laboratorio de Inmunología del INPer, de esta forma también se evitaba una variante más en la técnica al ser el suero opsonizante igual para todas las pruebas, tanto de adultos como de neonatos.

Los sueros seleccionados para formar el *pool* fueron negativos para todas las pruebas siguientes :

PRUEBA	METODO	CASA COMERCIAL
Ac. vs. Ag VIH -----	ELISA por Competencia	Behring
Ag. Superf. Hepatitis B -----	ELISA por captura de Ag	Organón
Hudlesson - (Ac.vs.B.abortus) -	Aglutinación -----	Bigaux
	en placa	
Detección de Reagina -----	VDRL -----	Merk
Sifilítica	floculación	
	en placa	

Los sueros seleccionados no fueron descomplementados, ni son específicos contra *C.albicans* por lo que la fuente de opsoninas son las fracciones del complemento C3 y C4. Se valoró la concentración de estas fracciones en el suero *pool* por método de nefelometría de rayo láser de la siguiente manera:

PROTEÍNA	Dil.Est.	Dil.á-S	Dil.M o C	Vol.Est, M o C	Vol.á-S
C ₃	1:20-1:320	1:5	1:101	100 µl	200 µl
C ₄	1:2.5-1:40	1:5	1:21	100 µl	200 µl

Se agitan suavemente y se incuban 1 hr. a Temperatura ambiente.

Dil.Est. = dilución del estándar; Dil.á-S = dilución del antisuero
 Dil.M o C = dilución de la muestra o del control
 Vol.Est, M o C = volumen usado de la dilución del estándar,
 de la muestra o del control
 Vol.á-S = volumen usado de la dilución del antisuero

Los resultados en concentraciones fueron:

	SUERO POOL	SUERO CONTROL	SUERO ESTANDAR	VALOR REFERENCIA
C ₃	116.67 mg/dl	87.00 mg/dl	67.00 mg/dl	55 - 120 mg/dl
C ₄	61.75 mg/dl	21.40 mg/dl	13.10 mg/dl	20 - 50 mg/dl

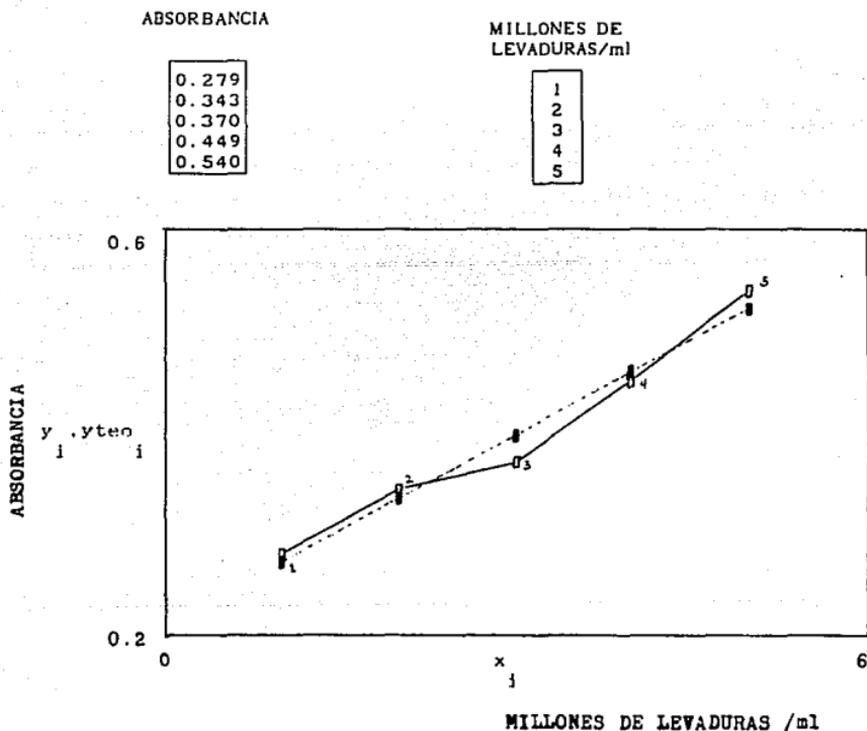
Suero pool = sueros recolectados de donadores
 Suero control = suero comercial de concentración conocida
 Suero estándar = suero comercial con el cual se realiza la curva tipo

Después de estas pruebas el suero pool fue fraccionado en frascos viales con 2 ml cada uno, congelados y utilizados al momento de montar las técnicas. Se usó un frasco por muestra.

e) ANALISIS DE LA RELACION ENTRE EL NUMERO DE LEVADURAS VIVAS Y LA
REDUCCION QUE PRODUCEN DEL MTT.

Se deseaba conocer los valores de absorbancia de la reducción de MTT por *C.albicans* a concentraciones pequeñas de levaduras por lo que se realizaron 2 curvas complementarias con el objeto de saber si a estas concentraciones de levaduras los valores de absorbancia seguan una curva de Lambert y Beer. Dado que la ley de Lambert y Beer relaciona la absorbancia (A) con la concentración de la muestra (C) según la ecuación $A = c C l$, donde c y l son constantes, (c = coeficiente de extinción y l = longitud de la celda) es de esperar que si se cumple dicha ley, se obtendra una recta al graficar los valores de A contra los de C. La gráfica 3 se realizó con una concentración 1:20 de MTT de una solución original de 5 mg/ml y en la gráfica 4 se utilizó una dilución 1:30 de MTT. En ambas gráficas se observa que el coeficiente de correlación es aproximadamente de 1, lo cual nos asegura una buena predicción de los valores de absorbancia a concentraciones bajas de levaduras.

Gráfica 3.- ANALISIS DE LA REDUCCION DE MTT (1:20) POR *C.albicans*
 ABSORBANCIA CONTRA CONCENTRACION DE LEVADURAS / ml



-○- curva experimental

-■- curva teórica (ajuste por mínimos cuadrados)

Coficiente de Correlación de la Curva = 0.98415

Ecuación de la Curva Teórica: $y = 0.0628 X + 0.2078$

Gráfica 4.- ANALISIS DE LA REDUCCION DE MTT (1:30) POR *C.albicans*

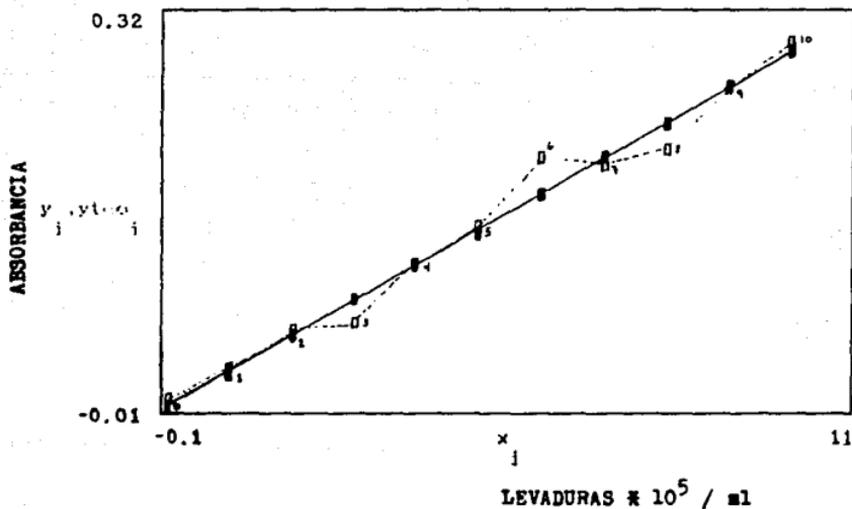
ABSORBANCIA CONTRA CONCENTRACION DE LEVADURAS / ml

LEVADURAS $\times 10^5$ / ml

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

ABSORBANCIA

0.021
0.057
0.063
0.113
0.137
0.199
0.194
0.207
0.255
0.295



---□--- curva experimental

—■— curva teórica (ajuste por mínimos cuadrados)

Coefficiente de Correlación de la Curva = 0.992

Ecuación de la Curva Teórica: $y = 0.029 X - 0.004$

Se utilizaron diferentes concentraciones de MTT en las gráficas ya que a menores concentraciones de levaduras menor es la cantidad de MTT que necesita ser reducido, con la ventaja de que a diluciones mayores se optimiza el uso de este colorante.

De los resultados que se obtuvieron se puede pensar que la relación de 2 levaduras por cada PMN planteada en la técnica original se conserva al reducir el número de levaduras, por ello se puede reducir el número de PMN utilizados en la técnica propuesta para evaluar MI, por lo tanto se concluye que sí se puede detectar la reducción producida en el MTT hasta por $1 \cdot 10^5$ LV, siguiendo el comportamiento de la ecuación empírica, y en consecuencia se puede reducir el número de PMN empleados y el número de levaduras conservando la relación de 2 levaduras por cada 1 PMN.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

f) ESTERILIDAD DE LOS REACTIVOS.

Después de una serie de experimentos donde se varío la concentración de PMN y de levaduras realizados con el objeto de reducir la cantidad de PMN utilizados en la técnica de MI, como se verá más adelante, se obtuvieron los siguientes resultados :

SISTEMA	LEVADURAS MILLON/ml	PMN MILLON/ml	RELACION PMN:LEV	CONCEN. MTT mg/ml	ABSORBAN. A 540 nm
A	CP	LM 2	1	0.250	0.293
	P	LV 2	1		0.708
	CN	LV 2	---		0.757
B	CP	LM 2	1	0.250	0.527
	P	LV 2	1		0.740
	CN	LV 2	---		0.926

CP = control positivo ; P = problema ; CN = control negativo
 LM = levaduras muertas ; LV = levaduras vivas
 PMN = polimorfonucleares de adultos sanos; LEV = levaduras
 MTT = amarillo de tetrazolio

Tabla 1

Los resultados muestran valores muy altos de absorbancia no esperados para la reducción del MTT a las concentraciones usadas de levaduras vivas con base en las gráficas 3 y 4 por lo que se pensó en una posible reducción inespecífica, por ello se realizó un frotis de cada uno de los controles y problema comprobándose la presencia de contaminación bacteriana por Bacilos Gram (-). Para evitar esta situación se tomaron varias medidas: 1) preparar todos los reactivos

con agua destilada estéril; 2) esterilizar todo el material de trabajo; 3) probar la esterilidad de los reactivos preparados sembrándolos en agar sangre de carnero durante 48 hrs. a 37°C, para la utilización de estos reactivos no debe existir crecimiento alguno; 4) esterilizar los reactivos factibles de serlo después de su preparación; 5) comprobar la esterilidad de los reactivos cada semana, 6) utilizar para el lavado de células y levaduras agua destilada estéril; 7) lavar los tubos cónicos con mezcla crómica, esterilizándolos después y 8) trabajar en condiciones de esterilidad, corrigiendo así esta anomalía en los valores de absorbancia inespecífica.

g) MODIFICACIONES EN LA CONCENTRACION DE POLIMORFONUCLEARES EN LA TECNICA DE MUERTE INTRACELULAR.

Para la adaptación de la técnica de MI se realizaron varios ensayos modificando las concentraciones de levaduras, de PMN, la concentración de MTT y la relación leucocitos:levaduras. Los resultados de estos ensayos se resumen en la tabla 2.

El sistema I se efectuó siguiendo el fundamento de la técnica original de Levitz y Diamond y los valores presentados en este sistema I son el resultado del trabajo realizado por Arredondo J.L., Del Rey P.G. y Lara S.J. (51) al aplicar esta prueba de MI en adultos sanos.

RESULTADOS DE LA ADAPTACION DE LA TECNICA DE MUERTE INTRACELULAR

SISTEMA	LEVADURAS MILLON/ml	NEUTROFILOS MILLON/ml	RELACION PMN:LEV	CONCEN.* MTT mg/ml	% MUERTE INTRACEL.
I	CP LM = 5	PMN = 2.5	1:2	0.500	45.00
	P LV = 5	PMN = 2.5			
	CN LV = 5	-----			
II	CP LM = 5	PMN = 2	1:2.5	0.500	23.30
	P LV = 5	PMN = 2			
	CN LV = 5	-----			
III	CP LM = 5	PMN = 2.5	1:2	0.250	37.40
	P LV = 5	PMN = 2.5			
	CN LV = 5	-----			
IV	CP LM = 2	PMN = 1	1:2	0.250	40.70
	P LV = 2	PMN = 1			
	CN LV = 2	-----			
V	CP LM = 1	PMN = 0.5	1:2	0.160	50.30
	P LV = 1	PMN = 0.5			
	CN LV = 1	-----			

Tabla 2

CP = control positivo ; P = problema ; CN = control negativo
 LM = levaduras muertas ; LV = levaduras vivas ;
 PMN = leucocitos polimorfonucleares de adultos sanos
 * = La concentración original del MTT fué de 5 mg/ml; en los sistemas I y II se usó una dilución 1:10, en los sistemas III y IV se usó una dilución 1:20 y en el sistema V se usó una dilución 1:30, todas las diluciones fueron hechas con solución amortiguadora de fosfatos (SAF).

De los resultados obtenidos se concluye que la mayor eficiencia la obtuvimos en el sistema V al trabajar con $5 \cdot 10^5$ PMN/ml y una relación 1 PMN:2 levaduras, así mismo se mejoró la eficiencia con una concentración más baja de MTT, por lo que se infiere la posibilidad de aplicar esta prueba al caso de los recién nacidos donde la cantidad de muestra que se puede obtener es pequeña. Finalmente el sistema utilizado en la técnica de muerte intracelular fue el sistema V.

h) EFECTOS DE LA AGITACION, ALBUMINA Y PARTICULAS DE ACIDO DESOXCICOLICO EN LA EFICIENCIA DE LA TECNICA DE MUERTE INTRACELULAR.

Con el objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica de MI se determinó observar los efectos que causaban en ésta:

- i) la incubación con agitación
 - ii) la utilización de tubos cónicos con y sin recubrimiento de albúmina
 - iii) la presencia de partículas de ácido desoxicólico,
- para observar éstos efectos se montaron sistemas iguales al Sistema V de la Tabla 2.

i) Incubación con agitación.

Se montaron dos sistemas idénticos incubándose uno de ellos con agitación y el otro sin agitación a 37°C . Los resultados fueron:

	CP	P	CN	% MI
Sin agitación	0	0.089	0.137	40
Con agitación	0	0.132	0.229	43

CP = control positivo ; P = problema ; CN = control negativo

De estos resultados se concluye que el valor de % MI con agitación es ligeramente mayor que el de sin agitación, esto se debe a que con agitación constante se aumenta la probabilidad de encuentro entre los PMN y las levaduras, aunque ambos valores de MI no son mayormente afectados por la agitación. En cuanto a los valores de absorbancia se refiere, éstos sí se ven afectados, ya que son mayores con agitación y son los valores esperados para las concentraciones de levaduras con las que se esta trabajando. Esto nos habla de la importancia que tiene la agitación constante para que se lleve a cabo una buena reducción del MTT por parte de las levaduras vivas (38).

ii) Utilización de tubos cónicos con y sin recubrimiento de albúmina.

Para esta prueba se recubrieron tubos cónicos estériles con una solución de albúmina al 10 % , se dejaron secar y se montaron dos sistemas iguales, uno utilizando estos tubos y otro con tubos sin recubrir.

Los resultados fueron:

	CP	P	CN	% MI
Sin albúmina	0	0.147	0.440	66.5
Con albúmina	0	0.154	0.440	64.8

CP = control positivo ; P = problema ; CN = control negativo

Se sabe que para que los PMN puedan fagocitar deben estar adheridos a una superficie, con la adición de albúmina se esperaba que esa adherencia aumentase y en consecuencia la MI. Se observa en los resultados que si bien los valores de absorbancia se ven aumentados no sucede así con los de % MI, ambos valores son similares; además los valores de absorbancia no son los esperados para las concentraciones de levaduras con que se está trabajando. Recordemos que entre las propiedades de los PMN se encuentra su adherencia al vidrio (3) por lo que se concluye que la utilización de albúmina en los tubos es irrelevante y sólo puede causar interferencia en la reducción del MTT.

iii) Presencia de partículas de Acido Desoxicólico.

La técnica original de MI utiliza una solución de ácido desoxicólico al 2.5 % en SSN, esto significa una solución saturada del ácido con una cantidad de partículas en suspensión que deben ser eliminadas en el paso de los lavados. Se planteó usar el ácido desoxicólico filtrado y centrifugado con el objeto de eliminar las partículas en suspensión antes de agregarlo a los sistemas. Se montaron dos sistemas iguales por triplicado para este ensayo, en unos se usó el ácido saturado y en otros un ácido filtrado, centrifugado y libre de partículas; los resultados fueron:

	CP	INTERVALO	CN	pH	% CV
Acido Desoxicólico saturado	0	0.065-0.375		4.5 - 5.6	70.5
Acido Desoxicólico filtrado	0	0.215-0.256		4.5 - 5.6	8.7

CP = control positivo CN = control negativo
 % CV = porcentaje del coeficiente de variación

Se observa que al utilizar el ácido desoxicólico saturado se obtiene un intervalo grande de valores para el CN y un alto coeficiente de variación, esto se debe a que a pesar de los lavados no es posible eliminar totalmente las partículas en suspensión del ácido y éstas aumentan las lecturas de absorbancia. Por otro lado los valores bajos de absorbancia se pueden atribuir a una pérdida de levaduras vivas al momento de los lavados por adherencia a las partículas del ácido. Es importante conservar el pH del ácido que se utiliza pues es éste finalmente el responsable de la lisis de los PHN, lo cual es su objetivo. La lisis se logra reduciendo los extremos de los ácidos grasos que componen la membrana plasmática evitando así su polimerización (17). Con el ácido desoxicólico filtrado y centrifugado también se obtienen variaciones pero éstas no llegan al 10 %, por lo que considerando que se trabaja con sistemas vivos es aceptable esta variación; con esto se demostró que el ácido filtrado y centrifugado presenta menos interferencia y mayor eficiencia.

1) ELIMINACION DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS DE LOS POLIMORFONUCLEARES.

El objeto de los lavados es eliminar los residuos de PMN después de su lisis, entre estos residuos se encuentran todos los sistemas enzimáticos. Es importante eliminar aquellos que podrían interferir con la reducción del MTT, por ello se probó la actividad enzimática de los sobrenadantes de los lavados frente a peróxido de hidrógeno, debido a la presencia de peroxidasas en los lisosomas de PMN, con los siguientes resultados:

ACTIVIDAD ENZIMATICA FRENTE A H ₂ O ₂ al 1%	1° lavado	2° lavado	3° lavado
	+++	++	--

+++ = muy activo ; ++ = moderadamente activo ; -- = no actividad (escala cualitativa)

Con esto se comprueba la efectividad de los lavados para eliminar los residuos y evitar con esto interferencias en la reducción del MTT por parte de los sistemas enzimáticos de los PMN, por lo tanto se considera que tres lavados son suficientes para este paso.

j) MICROTÉCNICA FINAL PARA EVALUAR MUERTE INTRACELULAR

Después de estudiar todos los parámetros anteriores y realizando las modificaciones necesarias antes descritas se llegó a la microtécnica final para evaluar MI el cual se describe con detalle a continuación:

La muestra es sangre periférica venosa de adultos sanos y de neonatos sanos a término seleccionados según los criterios de selección propuestos para este estudio. La muestra (de 2 a 3 ml de sangre) se toma con heparina y luego se traspasa a tubos estériles que contengan alsever-gelatina al 3 % . Los leucocitos se extraen por el método descrito en el inciso c) de este Capítulo III.

Para montar los sistemas se resuspenden en tubos cónicos de 15 ml estériles 5×10^5 PMN vivos/ml más 1×10^6 levaduras vivas/ml con 0.1 ml de suero pool normal (inciso d Capítulo III) y se completa el volumen a 1 ml con MEM. Se mezclan e incuban durante una hora con agitación a 37°C. Para el tubo control negativo se añaden los PMN después de la incubación con el objeto de simular un sistema donde no suceda muerte intracelular de las levaduras, en este sistema se observará la máxima reducción del MTT; para el control positivo se añaden levaduras muertas en lugar de las vivas con el objeto de simular un sistema donde todas las levaduras hayan sido destruidas por los PMN, en este sistema no se espera reducción del MTT; tanto las levaduras muertas como las vivas se obtienen por el método 4 descrito en el Capítulo II.

Después de la hora de incubación se agrega a cada tubo 300 µl de ácido desoxicólico al 2.5 % en SSM filtrado y centrifugado libre de partículas en suspensión (pH = 4.5 - 5.6), se agitan vigorosamente los tubos con el objeto de lisar a los PMN; se agregan 10 ml de SSM estéril, se agitan y se centrifugan los tubos a 1000 g por 10 minutos.

Se descarta el sobrenadante y las levaduras presentes en el botón se lavan 2 veces con 10 ml de agua destilada estéril. Finalmente se resuspende el botón en 1 ml de MEM con 0.5 ml del colorante de tetrazolio MTT con una dilución 1:30 en SAF de un original de 5 mg/ml, se incuban los tubos en agitación durante 3 horas a 37°C.

Pasado este periodo se extrae el MTT-formazán formado por las levaduras sobrevivientes de la siguiente manera: se centrifugan los tubos, se descarta el sobrenadante y el botón se resuspende en 400 µl de alcohol isopropílico acidificado con HCl al 0.04 M, esto es con el objeto de solubilizar al MTT-formazán. Después de 5 minutos se agitan vigorosamente los tubos y se centrifugan a 1000 g por 5 minutos, se toman 250 µl de cada sobrenadante, se colocan en micropocillos de fondo plano y se lee la absorción de cada pocillo a 540 nm contra un blanco de MEM más MTT tratado igual que los tubos problema y controles. El % MI se calcula por la ecuación 1. Es muy importante recordar que se debe trabajar toda la técnica en condiciones de esterilidad.

k) MICROTÉCNICA FINAL PARA EVALUAR FAGOCITOSIS POR REDUCCIÓN DEL COLORANTE NITROAZUL DE TETRAZOLIO (NBT).

Si se toma en cuenta que la muestra es de 2 a 3 ml de sangre periférica, que en cualquier método de obtención de PMN la eficiencia no es del 100 % y especialmente que se desea aplicar simultáneamente la prueba de muerte intracelular y fagocitosis a los neonatos, entonces se presenta el problema de montar una técnica para evaluar la fagocitosis en la que se utilicen muy pocos PMN, ya que la mayor parte de éstos se usan en la técnica de MI.

Basándose en la técnica original (43) se propuso adaptarla a una superficie más pequeña que la del portaobjetos común y utilizar un concentrado de PMN en vez de la sangre total con el fin de usar una menor cantidad de PMN y también menor cantidad de volumen en el cual están contenidos los PMN después de su extracción con alsever-gelatina y de los lavados. Finalmente la superficie seleccionada fue la de los orificios de un portaobjetos de inmunofluorescencia los cuales pueden contener alrededor de 50 μ l de la suspensión de PMN obtenidos según el inciso c de este Capítulo III. Este método es útil cuando la cantidad de muestra es pequeña y en consecuencia el número de PMN también lo es, ya sea que se encuentren en sangre total o en una suspensión concentrada, como la que se usó en esta microtécnica.

Para poder reutilizar los portaobjetos de inmunofluorescencia primeramente fueron lavados en mezcla crómica, luego lavados con dextrán, secados al horno y esterilizados. Al no observarse resto

alguno de inmunofluorescencia quedaron listos para la realización de la microtécnica de fagocitosis.

La suspensión de PMN que se usó en esta microtécnica ofrece una concentración, una vez cosechados, de 1.5 a 3 millones de PMN/ml; de la cual se obtiene alrededor de 72,500 a 150,000 PMN en 50 μ l, aunque no todas las células se adhieren a la superficie del orificio. Las levaduras muertas usadas en esta microtécnica se obtienen según el inciso 4 del Capítulo II obteniendo así una relación de 1.6 a 3.5 levaduras muertas por cada PMN. El suero utilizado para la opsonización de las levaduras es el suero pool descrito en el inciso d del Capítulo III.

Con esta modificación la superficie de contacto entre los PMN y las levaduras se reduce considerablemente en la siguiente proporción:

	PORTAOBJETOS COMUN	ORIFICIO DE UN PORTAOBJETOS DE INMUNOFLUORESCENCIA
SUPERFICIE DE CONTACTO	1,875.00 mm ²	38.4846 mm ²
EL ORIFICIO ES 48.72 VECES < QUE EL PORTAOBJETOS COMUN EL ORIFICIO REPRESENTA EL 2.05 % DE LA SUPERFICIE DEL PORTAOBJETOS		

Esta reducción en la superficie de contacto tiene una repercusión directa en la probabilidad de encuentro de los PMN y levaduras, y en consecuencia en los valores de fagocitosis, repercusión de la cual se hablará más adelante; aunque también presenta la gran ventaja el poder trabajar 3 o 4 muestras a la vez en un solo portaobjetos de inmunofluorescencia, además de poder correr múltiples ensayos para

cada muestra, lo que equilibra la poca cantidad de PMN. La microtécnica final para esta prueba se describe a continuación:

Se ponen 50 μ l de la suspensión de PMN (Inciso c del Capítulo III) en un orificio del portaobjetos de inmunofluorescencia, se incuban los portaobjetos en cámara húmeda durante 20 min. a 37° C. Por otro lado se opsoniza 1 ml de las levaduras muertas (Inciso 4 del Capítulo II) con 0.5 ml del suero pool normal (Inciso d del Capítulo III) durante 30 min a 37° C.

Después de la incubación el portaobjetos se lava suavemente con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) estéril y las levaduras se lavan dos veces con 5 ml de SAF estéril. Las levaduras se resuspenden en 0.5 ml de MEM con 100 μ l de NBT al 0.1 % en SAF estéril, de esta suspensión se toman 50 μ l y se añaden al orificio donde se colocó la suspensión de PMN. Se incuban los portaobjetos en cámara húmeda 7 min a 37° C.

Pasado este período se lava suavemente el portaobjetos con 5 ml de SAF estéril y se tinte con safranina al 5 % en etanol durante 10 min, se deja secar y se lee al microscopio ordinario en inmersión. Se cuentan 200 células; las que presenten levaduras de color azul en su citoplasma se cuentan como células que se fagocitaron, también se cuentan las levaduras totales contenidas en las células que se fagocitaron. Se reporta el % de fagocitosis y el índice fagocítico por medio de las ecuaciones 2 y 3. Hay que recordar que la microtécnica debe ser trabajada en condiciones de esterilidad para evitar contaminación y reducción inespecífica del NBT. En el diagrama 5 se presenta el método simplificado para esta microtécnica.

SISTEMA PARA EVALUAR FAGOCITOSIS

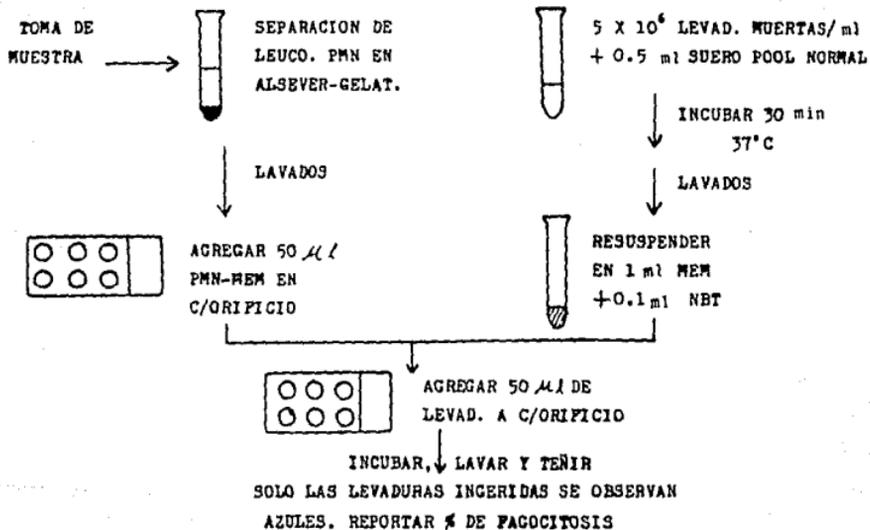


Diagrama 5

PMN = Polimorfonucleares

NBT = Nitroazul de Tetrazolio

Levad. = Levaduras

l) DATOS Y RESULTADOS DE LOS ADULTOS MUESTREADOS PARA LA MICROTECNICA DE MUERTE INTRACELULAR

Los adultos fueron escogidos según los criterios de selección propuestos para llevar a cabo este estudio. El porcentaje de muerte intracelular se calculó con la ecuación 1 y los resultados fueron:

DONADOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEXO	Mas	Fem							
% M. I.	39.81	51.16	50.42	42.35	55.65	45.16	28.25	38.07	50.23

DATOS Y RESULTADOS DE LOS ADULTOS MUESTREADOS PARA LA PRUEBA DE MUERTE INTRACELULAR

Tabla 3

m) DATOS Y RESULTADOS DE LOS NEONATOS MUESTREADOS PARA LA MICROTECNICA DE MUERTE INTRACELULAR

Los neonatos fueron escogidos según los criterios de selección propuestos para llevar a cabo este estudio. El porcentaje de muerte intracelular se calculó con la ecuación 1 y los resultados fueron:

NEONATO	SEXO	VIA DE NACI- MIENTO	SEMANA DE GESTACION	VIABILIDAD DE PMN	% MUERTE INTRACEL.
1	masc	cesárea	39.0	75.0 %	65.34
2	fem	parto	40.0	87.7 %	65.09
3	fem	parto	41.4	93.4 %	52.50
4	fem	cesárea	40.1	95.0 %	74.44
5	masc	parto	39.0	100.0 %	38.90
6	fem	parto	39.0	80.0 %	36.50
7	masc	parto	41.6	95.0 %	50.70
8	masc	parto	38.5	87.0 %	35.00
9	fem	parto	41.1	98.0 %	30.60
10	masc	parto	39.5	100.0 %	26.10
11	masc	parto	39.0	84.4 %	45.90
12	fem	cesárea	38.0*	88.0 %	56.80
13	fem	cesárea	41.1	84.9 %	22.80
14	fem	cesárea	42.2&	78.9 %	45.30
15	masc	parto	38.4	80.0 %	29.12
16	fem	parto	40.3	81.4 %	28.18

* = hipertrófica

& = postérmino

DATOS Y RESULTADOS DE LOS NEONATOS MUESTREADOS PARA
LA PRUEBA DE MUERTE INTRACELULAR

Tabla 4

n) DATOS Y RESULTADOS DE LOS ADULTOS MUESTREADOS PARA LA MICROTECNICA
DE FAGOCITOSIS

Los adultos fueron escogidos según los criterios de selección propuestos para llevar a cabo este estudio. El porcentaje de fagocitosis y el índice de ingestión fueron calculados con las ecuaciones 2 y 3 respectivamente. Los resultados fueron:

DONADOR	SEXO	% DE FAGOCITOSIS	INDICE DE INGESTION
1	fem	22.41	1.53
2	masc	43.40	1.98
3	masc	72.70	2.30
4	masc	52.90	1.00
5	masc	38.50	1.50
6	masc	48.20	1.30
7	masc	20.00	1.20
8	masc	25.50	2.30
9	masc	28.70	1.70
10	fem	30.60	2.00
11	masc	38.60	1.80
12	masc	39.40	1.70
13	masc	28.30	1.90
14	masc	36.55	1.22
15	fem	59.36	2.52

DATOS Y RESULTADOS DE LOS ADULTOS MUESTREADOS PARA
LA PRUEBA DE FAGOCITOSIS

Tabla 5

o) DATOS Y RESULTADOS DE LOS NEONATOS MUESTREADOS PARA LA MICROTECNICA
DE FAGOCITOSIS

Los neonatos fueron escogidos según los criterios de selección propuestos para llevar a cabo este estudio. El porcentaje de fagocitosis y el índice de ingestión fueron calculados según las ecuaciones 2 y 3 respectivamente. Los resultados fueron:

NEONATO	SEXO	VIA DE NACI- MIENTO	SEMANA DE GESTACION	VIABILIDAD DE PMN	% FAGO- CITOSIS.	INDICE DE INGESTION
1	fem	cesárea	40.1	95.0 %	58.62	1.91
2	masc	parto	38.5	87.0 %	48.70	1.60
3	fem	parto	41.1	98.0 %	26.04	1.50
4	masc	parto	39.5	100.0 %	42.54	2.20
5	masc	parto	39.0	84.4 %	32.20	1.52
6	fem	parto	39.4	82.8 %	13.60	1.30
7	fem	parto	38.0	88.0 %	19.73	2.26
8	masc	parto	----	92.0 %	48.27	1.40
9	masc	cesárea &	42.2	99.0 %	29.80	1.13
10	masc	parto	38.6	88.0 %	54.70	1.43
11	fem	parto	37.6	82.0 %	48.30	1.30
12	masc	parto	39.4	-----	45.10	3.00

* = hipertrófico

& = postérmino

DATOS Y RESULTADOS DE LOS NEONATOS MUESTREADOS PARA
LA PRUEBA DE FAGOCITOSIS

Tabla 6

p) PARAMETROS ESTADISTICO DE LOS DATOS.

La media simple, la varianza, la desviación estándar, el % de coeficiente de variación y el % de coeficiente de variación corregido fueron calculados por medio de las ecuaciones 4, 5, 6, 8 y 9 respectivamente. Los valores para curtosis, sesgo y tercer momento se obtuvieron a partir de los datos anteriores gracias al programa computarizado MicroStat de análisis estadístico. Los resultados para ambas microtécnicas se presentan en la tabla 7. También se presentan los resultados para muerte intracelular obtenidos por Arredondo J.L. y Del Rey P.G. (51) pero con la técnica original, la cual llamamos macrotécnica (42,43) para diferenciarla de la adaptación a microtécnica hecha en este trabajo. Los resultados son:

	MICROTECNICA		MACROTECNICA
	RECEN NACIDOS	ADULTOS	ADULTOS
% M.I. PROMEDIO	43.95	44.56	45.00
VARIANZA	246.49	71.06	31.36
DESVIACION ESTANDAR	15.70	8.43	5.60
% COEF. DE VAR. INICIAL	35.72	18.92	12.44
% COEF. DE VAR. CORREGIDO	36.27	19.44	12.64
TERCER MOMENTO	1537.02	- 300.69	- - -
CURTOSIS	2.06	2.56	- - -
SESGO	0.43	- 0.59	- - -
X FAGOCITOSIS PROMEDIO	38.96	39.00	84.40
VARIANZA	205.63	211.41	38.44
DESVIACION ESTANDAR	14.34	14.54	6.20
X COEF. DE VAR. INICIAL	36.80	37.29	7.34
X COEF. DE VAR. CORREGIDO	37.56	37.91	7.46
TERCER MOMENTO	- 1031.56	2225.34	- - -
CURTOSIS	1.93	3.02	- - -
SESGO	- 0.39	0.80	- - -

Tabla 7

	MICROTECNICA		MACROTECNICA
	RECEN NACIDOS	ADULTOS	ADULTOS
INDICE FAGOCIT. PROMEDIO	1.71	1.73	- - -
VARIANZA	0.2894	0.1989	- - -
DESVIACION ESTANDAR	0.538	0.446	- - -
X COEF. DE VAR. INICIAL	31.46	25.78	- - -
X COEF. DE VAR. CORREGIDO	32.11	26.20	- - -
TERCER MOMENTO	0.16	0.00	- - -
CURTOSIS	3.65	2.07	- - -
SESGO	1.22	0.11	- - -

Tabla 7

q) COMPARACION ESTADISTICA DE LAS MEDIAS DE LAS MUESTRAS.

En una distribución normal perfecta el valor esperado para la curtosis es igual a 3, mientras que el valor para el sesgo va de - 0.5 a 0.5 (52). Como se observa en la tabla 7 los valores que se obtienen para estos parámetros en la microtécnica de MI muestran que la curtosis se aleja en una unidad del valor esperado para una curva de distribución normal, tanto para neonatos como para adultos, mientras el sesgo se encuentra en el intervalo deseado; con estos valores para curtosis y sesgo no es posible afirmar que nuestros datos siguen una distribución normal, aunque no se descarta la posibilidad de que al aumentar el tamaño de la muestra si la sigan.

Para el caso de fagocitosis se observa que la curtosis para los adultos nos da un valor igual al de una distribución normal mientras que el sesgo se aleja del valor de la normalidad; en cambio con los

neonatos aparece el fenómeno contrario, la curtosis se aleja considerablemente del valor de la curva normal mientras que el sesgo se encuentra en el intervalo deseado.

Al igual que para la prueba de MI no es posible afirmar con estos parámetros que nuestros valores siguen una distribución normal, tomando en cuenta y con reserva que el tamaño de la muestra es muy pequeño.

En el caso del índice fagocítico para los recién nacidos la curtosis y el sesgo se alejan de los valores deseados y los adultos muestran una curtosis alejada pero un sesgo dentro del intervalo de valor esperado para una curva normal, por lo tanto tampoco en este caso no es posible afirmar que nuestros valores siguen una distribución normal y al igual que con las pruebas anteriores afirmar esto significaría analizar nuestros datos de forma errónea provocando con esto un aumento del error de tipo I, estadísticamente hablando, o sea rechazar una hipótesis que es verdadera, en este caso la hipótesis nula.

Con base en lo anterior el análisis de las medias muestrales se realizó a través del método estadístico no paramétrico de Mann-Whitney (48,49,50). El análisis se aplicó a los tres resultados reportados: % de muerte intracelular, % de fagocitosis e índice fagocítico.

Para realizar este análisis se procede a combinar los datos de neonatos y adultos de cada prueba reportada por separado, se ordenan y enumeran en orden creciente todos los datos (neonatos y adultos), se suman todos los números atribuidos a la muestra más pequeña, suma que

se nombra S. A la muestra con el menor número de datos se le llama n y a la muestra con mayor número de datos se nombra m.

Con el valor de S se aplica a cada prueba la ecuación 12 lo que nos da el valor experimental de U. Después se busca en tablas el valor mínimo que puede tomar U bajo el mismo número de datos que se esta analizando y con una $p < 0.05$. El valor máximo de U se calcula aplicando la ecuación 13. La prueba se interpreta de la siguiente manera:

Si $U_{\text{mínima}} < U_{\text{experimental}} < U_{\text{máxima}}$ \rightarrow hipótesis nula = verdadera \therefore No existe diferencia entre las medias de las muestras analizadas.

Los resultados del análisis anterior se muestran en la tabla 8.

	NEONATOS	ADULTOS
MUERTE		
INTRACELULAR	16	9
MUESTRA	m	n
S (suma total)	203	122
U experimental (Ec. 12)	67	77
U mínima (Tablas a $p < 0.05$)	43	43
U máxima (Ec. 13)	101	101
FAGOCITOSIS	12	15
MUESTRA	n	m
S (suma total)	174	204
U experimental (Ec. 12)	96	84
U mínima (Tablas a $p < 0.05$)	56	56
U máxima (Ec. 13)	180	180
INDICE FAGOCÍTICO	12	15
MUESTRA	n	m
S (suma total)	158.5	219.5
U experimental (Ec. 12)	80.5	99.6
U mínima (Tablas a $p < 0.05$)	56	56
U máxima (Ec. 13)	180	180

Tabla 8

Por lo que se concluye que se acepta la H_0 (media de neonatos = media de adultos) para los tres parámetros valorados, ya que en todas las pruebas realizadas la U experimental se encuentra entre los valores de U mínima de Tablas y U máxima calculada.

r) INTERVALO PERMISIBLE DE VALORES PARA LAS MEDIAS DE LAS MUESTRAS.

Para encontrar los intervalos permisibles de valores de la media, tanto para neonatos como para adultos, para ambas microtécnicas se utiliza el error estándar de la media corregido por un factor de la distribución t de Student. Se sabe que para poder aplicar estos cálculos a los datos obtenidos es condición que éstos presenten una distribución normal o que se acerquen a ella; aunque no se puede afirmar que los datos obtenidos en este trabajo siguen este tipo de distribución se decidió realizar estos cálculos, suponiendo que los resultados no están demasiado lejos de una distribución normal, por lo tanto asumiendo una distribución normal se presenta una primera aproximación a los valores de referencia para las medias muestrales de cada microtécnica.

Una prueba estadística no paramétrica no es capaz de realizar este tipo de cálculos (48,49,50), por ello se utilizó una prueba paramétrica suponiendo que si se aumentara de tamaño la muestra lo más probable es que siguiese una distribución de tipo normal, pero para efectos de este trabajo es suficiente con esta primera aproximación.

Los intervalos se calcularon de la siguiente manera (45,46):

a) Se calculó primero el error estándar de la media según la ecuación 7 para cada técnica.

b) Utilizando tablas con los valores de t de Student para muestras pequeñas, con una $p \leq 0.05$ para una curva de dos colas y con los grados de libertad de cada técnica se obtiene un factor de

corrección el cual multiplica al error estándar de la media.

c) Este nuevo valor obtenido se suma y resta dos veces al valor de la media para encontrar el intervalo permisible corregido.

Para muerte intracelular los resultados fueron:

	NEONATOS	ADULTOS
# de Eventos	16	9
Grados de Libertad	15	8
\bar{X} X M.I.	43.95	44.56
S de M.I.	15.70	8.43
Sx de M.I. (Ec.7)	3.92	2.81
t Tablas con $p \leq 0.05$		
(factor de corrección para $S_{\bar{x}}$)	2.131	2.306
$S_{\bar{x}}$ corregida	8.3641	6.4798
\bar{X} X M.I. - / + 2 veces S	12.55 - 75.35	27.69 - 61.42
\bar{X} X M.I. - / + 2 veces		
$S_{\bar{x}}$ corregida	27.22 - 60.67	31.60 - 57.51

Tabla 9

Finalmente el intervalo para neonatos es: 27.22 - 60.67 % MI y para los adultos es de 31.60 - 57.51 % MI; de acuerdo a las limitaciones ya expuestas y sólo como valores que se esperarían en experimentos similares con comportamiento de una distribución normal.

Para fagocitosis los resultados fueron:

	NEONATOS	ADULTOS
# de Eventos	12	15
Grados de Libertad	11	14
\bar{X} % Fagocitosis	38.96	39.00
S _d de Fagocitosis	14.34	14.54
Sx de Fag. (Ec.7)	4.13	3.63
t Tablas con $p \leq 0.05$ (factor de corrección para Sx)	2.201	2.145
Sx corregida	9.1112	7.7970
\bar{X} % Fag. - / + 2 veces S	10.28 - 67.64	9.92 - 68.08
Sx corregida	20.73 - 57.18	23.40 - 54.59

Tabla 10

El intervalo para neonatos es: 20.73 - 57.18 % Fagocitosis y para los adultos es de 23.40 - 54.59 % Fagocitosis de acuerdo a las limitaciones ya expuestas y sólo como valores que se esperarían en experimentos similares con comportamiento de una distribución normal.

Para índice fagocítico los resultados fueron:

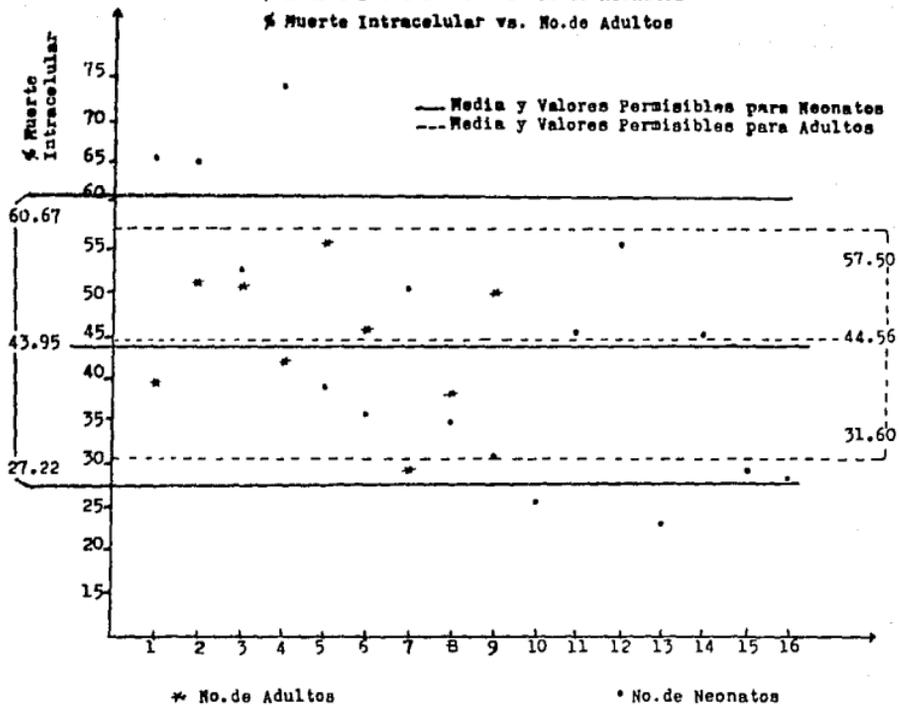
	NEONATOS	ADULTOS
# de Eventos	12	15
Grados de Libertad	11	14
\bar{X} Índice Fagocítico	1.71	1.73
S Índice Fagocítico	0.538	0.446
Sx de Ind.Fag. (Ec.7)	0.1553	0.1115
t Tablas con $p \leq 0.05$		
(factor de corrección para \bar{Sx})	2.201	2.145
\bar{Sx} corregida	0.3418	0.2391
\bar{X} Ind.Fag. - / + 2 veces S	0.634 - 2.786	0.838 - 2.622
\bar{X} Ind.Fag. - / + 2 veces		
\bar{Sx} corregida	1.026 - 2.393	1.251 - 2.208

Tabla 11

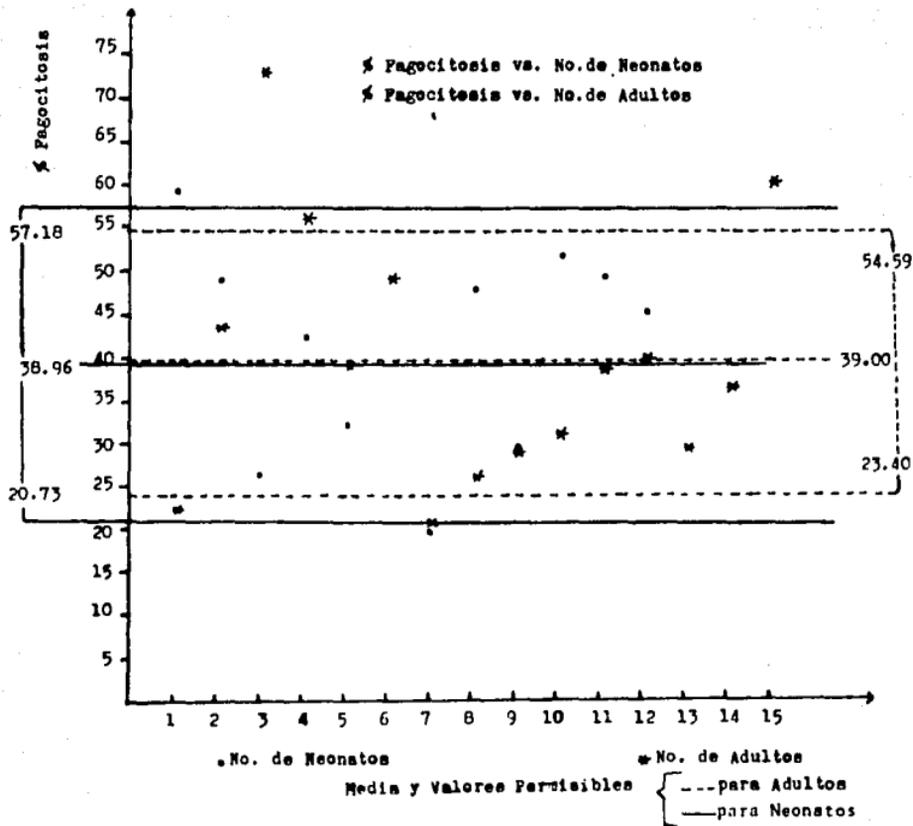
Los intervalos del índice fagocítico para neonatos y adultos respectivamente son: 1.026 - 2.393 y 1.251 - 2.208 de acuerdo a las limitaciones ya expuestas y sólo como valores que se esperarían en experimentos similares con comportamiento de una distribución normal.

Los valores permisibles para las medias muestrales para % de muerte intracelular, % de fagocitosis e índice fagocítico se presentan en las gráficas 5, 6 y 7 respectivamente, con las correcciones hechas para muestras pequeñas.

* Muerte Intracelular vs. No.de Neonatos
 * Muerte Intracelular vs. No.de Adultos



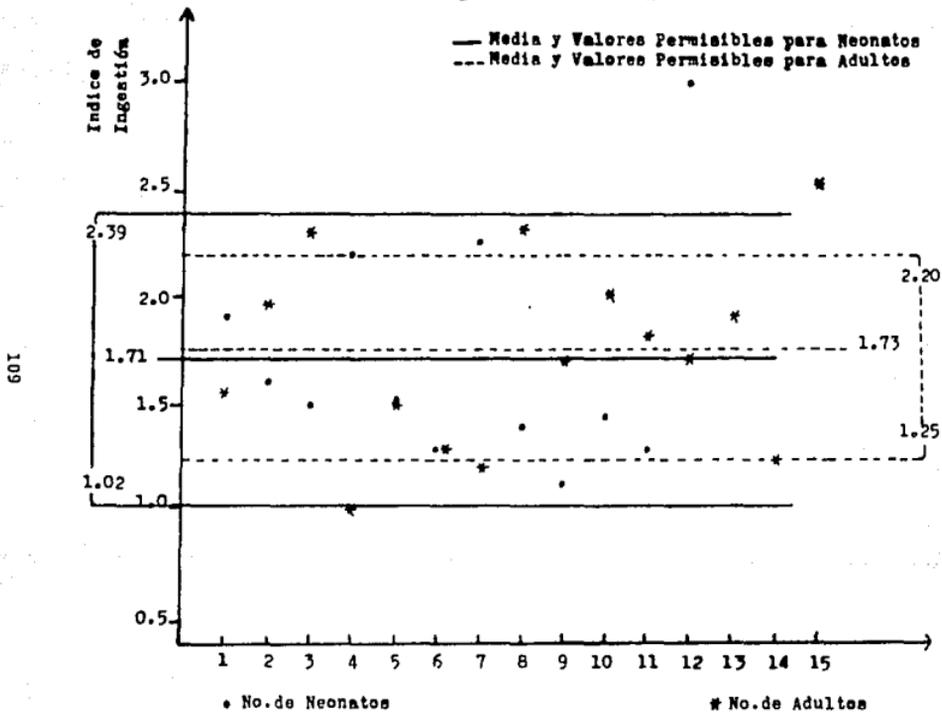
Gráfica 5



Gráfica 6

Indice de Ingestión vs. No.de Neonatos

Indice de Ingestión vs. No.de Adultos



Gráfica 7

CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIONES

D I S C U S I O N

La adaptación a microtécnicas de los métodos de muerte intracelular y fagocitosis reúnen las características necesarias para su aplicación a neonatos dada la pequeña cantidad de muestra (2 a 3 ml de sangre) que se requiere para su ejecución.

La variación obtenida en las microtécnicas adaptadas es alrededor del 35 % lo cual es normal dentro de este tipo de estudios (41) en los que se trabaja con sistemas biológicos y donde se trata de reproducir *in vitro* sistemas que emulen fenómenos que suceden *in vivo*, por lo que después de tomar en cuenta las manipulaciones y cambios sufridos por las células fagocíticas, el % de coeficiente de variación obtenido para las microtécnicas es el esperado para métodos de prueba con células vivas.

La sensibilidad de la microtécnica de muerte intracelular queda de manifiesto por el coeficiente de correlación (0.99) obtenido en la reducción del MIT a bajas concentraciones de éste y de levaduras; este coeficiente nos asegura una excelente linealidad en el sistema propuesto para medir la eficiencia de los mecanismos microbicidas del PMN en contra de *C.albicans*. Sin embargo con el fin de aumentar la reproducibilidad de la microtécnica de muerte intracelular se recomienda que este tipo de estudios se realicen por triplicado, con el equipo adecuado para una microtécnica y en condiciones estrictas de esterilidad.

La microtécnica de fagocitosis se propone en este caso como un complemento de la prueba de muerte intracelular, ambas en conjunto nos proporcionan mucho más información acerca de los mecanismos microbicidas del PMN que individualmente pues cada técnica evalúa diferentes sistemas oxidativos, siendo más sensible el sistema indicador del MTT ya que se valora espectrofotométricamente a diferencia de la fagocitosis en la cual influye la subjetividad del observador. Las diferencias obtenidas en los valores de adultos para la microtécnica de % de fagocitosis en comparación con la macrotécnica se deben no sólo a la reducción en el número de células utilizadas en la microtécnica sino también a la reducción del área de adherencia con lo cual se reduce notablemente la probabilidad de contacto entre los PMN y las levaduras. Así mismo la reducción en el número de PMN usados obliga a cuidar las pocas células ya adheridas al área de contacto y evitar que se presente en ellas el fenómeno de autólisis, es por esto que los tiempos de incubación se redujeron e indirectamente, la probabilidad de que suceda una mayor ingestión de levaduras por parte de los PMN también disminuyó. Por todas estas razones es que la técnica de fagocitosis fué adaptada en función de la microtécnica de muerte intracelular y se presenta más como una prueba cualitativa que cuantitativa, a diferencia de la de muerte intracelular.

En los resultados obtenidos de neonatos, tanto en la microtécnica de fagocitosis como en la de muerte intracelular, no se observó correlación alguna entre el % de viabilidad de los PMN al momento de

trabajar con ellos y los valores obtenidos para % de muerte intracelular, % de fagocitosis e índice fagocítico.

Así mismo tampoco se observó correlación entre el sexo de los neonatos, la vía de nacimiento o la semana de gestación y los parámetros antes mencionados, por lo que se concluye que éstos parámetros (% Muerte Intracelular, % Fagocitosis e Índice Fagocítico) son independientes de las condiciones del neonato, bajo los criterios de selección de éstos para la realización de este estudio.

El estudio se restringe a las características de las técnicas propuestas destacando en ello el sistema indicador usado y su concentración, la cantidad de células PMN utilizadas y la célula blanco empleada, en este caso la levadura *C. albicans*.

Los resultados obtenidos en ambas microtécnicas nos muestran que las células fagocíticas de los neonatos son capaces de llevar a cabo la muerte intracelular y la fagocitosis con la misma eficiencia que en el adulto cuando la fuente de opsoninas es igual y constante para ambos (suero pool normal). Esta aseveración se comprueba a través de la aceptación de la hipótesis nula (Media de Neonatos = Media de Adultos) con la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney.

La diferencia entre adultos y neonatos en cuanto a eficiencia para llevar a cabo la muerte intracelular y la fagocitosis reportada por otros autores se debe a que en la etapa neonatal el sistema inmune específico no está del todo desarrollado y existe una deficiencia o ausencia de anticuerpos específicos, por lo que la etapa de reconocimiento no se verifica con la misma eficacia que en los

adultos, siendo esta etapa de reconocimiento crítica al momento de nacer; es por ello que se piensa que esas diferencias se deben más a efectos humorales que celulares (32,33).

Sin embargo la mayor dispersión observada para los neonatos en la varianza y el intervalo de valores permisibles para media muestral en ambas microtécnicas respecto a los valores obtenidos de estos mismos parámetros para los adultos se debe a que los PMN de neonatos presentan diferentes estadios de madurez (53); esto refleja el hecho fisiológico conocido como "leucocitosis del recién nacido" en el cual probablemente exista un estímulo inicial para desarrollar un primer mecanismo de respuesta celular inespecífico al momento de nacer (primera exposición a antígenos). Esta leucocitosis decae después de las primeras doce horas de vida extrauterina por lo que los resultados obtenidos en los neonatos deben tomarse con la reserva de que éstos fueron muestreados entre las 0 y 48 horas de vida. Como se observa en las gráficas 5, 6 y 7 los valores permisibles de la media para los neonatos siempre abarcan el intervalo de valores permisibles para los adultos en el caso de los tres parámetros evaluados (% MI, % Fag. e Ind. Fag.). Este hecho confirma que entre los PMN de neonatos existen más diferencias cuantitativas y cualitativas (29) que entre los PMN de adultos.

Al evaluarse los resultados obtenidos para las microtécnicas se debe tomar en cuenta que el tamaño de las muestras fue pequeño y que tampoco es posible estudiar todos los factores que pueden influir en la respuesta inmune del recién nacido como son: el parto con fórceps,

el síndrome de aspiración de meconio, la presencia asintomática de glucosa en sangre, el uso de oxitocina durante el parto, etc (53).

Dado el pequeño tamaño de las muestras estudiadas no se puede afirmar categóricamente que éstas se comportan de acuerdo con una distribución normal, para ello se debe aumentar el tamaño de las mismas; es por esto que para lograr un análisis estadístico correcto de muestras pequeñas no debe asumirse una distribución de este tipo si no se cuenta con los suficientes elementos para ello, pues de lo contrario solo se logrará aumentar la probabilidad de cometer errores de tipo I o sea el rechazar la hipótesis nula cuando ésta es verdadera.

Finalmente la adaptación a microtécnicas de los métodos propuestos no sólo justifica la realización de este trabajo sino también su probable aplicación futura a lactantes y niños pequeños donde la muestra sanguínea que puede obtenerse de ellos también es pequeña; sobre todo en el caso de niños que presentan infecciones recurrentes en los cuales se requiere de otras pruebas de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, hemocultivo, etc.) para lograr un diagnóstico clínico acertado.

La utilidad de las microtécnicas de muerte intracelular y fagocitosis no sólo se contempla para su aplicación en estudios de tipo transversal y en estados de salud o enfermedad, sino también como un posible seguimiento de la maduración del sistema inmune humano, tanto en sus aspectos humorales como celulares, desde las etapas más

tempranas de vida hasta antes de la adolescencia completando con esto todo un ciclo de investigación en el área de la inmunología neonatal e infantil.

CONCLUSIONES

1) La técnica de muerte intracelular se adaptó a microtécnica con excelente sensibilidad, lo cual se refleja en la linealidad del sistema indicador y en la cantidad tan pequeña de células PMN necesarias para llevarla a cabo.

2) Las microtécnicas de muerte intracelular y fagocitosis pueden llevarse a cabo simultáneamente empleando de 2 a 3 ml de sangre periférica, lo cual las hace recomendables para el estudio de los mecanismos fagocíticos en el neonato.

3) La fagocitosis considerada como la ingestión de partículas por los fagocitos es igual para neonatos y adultos cuando la fuente de opsoninas es la misma y constante para ambos.

4) La muerte intracelular considerada como la destrucción de partículas por los fagocitos es igual para neonatos y adultos cuando la fuente de opsoninas es la misma y constante para ambos.

5) Se presenta una mayor dispersión en la muerte intracelular y en la fagocitosis en los neonatos respecto a los adultos, lo cual se debe muy probablemente a los diferentes estadios de madurez que presentan los polimorfonucleares de neonatos, tendiendo más hacia los estadios inmaduros.

APENDICES

A Y B

A P E N D I C E A
PREPARACION DE REACTIVOS

PREPARACION DE SOLUCION SALINA NORMAL (SSN)

Se disuelven 0.850 g de NaCl por cada 100 ml de agua estéril.

PREPARACION DE LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF)

Solución A		Solución B	
NaH ₂ PO ₄ (monobásico)	4.14 g	Na ₂ HPO ₄ (dibásico)	4.26 g
NaCl	7.00 g	NaCl	7.00 g
H ₂ O	1000 ml	H ₂ O	1000 ml

Mezclar 12.5 ml de la solución A más 37.5 ml de la solución B, ajustar pH = 7.2 con HCl 1N ó con NaHCO₃ 1N. Se puede usar NaN₃ al 1% como conservador (12).

PREPARACION DE MEDIO MINIMO ESENCIAL (MEM)

Este medio ya viene preparado comercialmente. Se prepara disolviendo 45.9 g de este medio en 5 litros de agua destilada, ajustandose el pH = 7.2. Después se filtra en esterilidad con un filtro Millipore de poro 0.22 µm estéril. Se guarda en refrigeración.

PREPARACION DE ALSEVER-GELATINA

Glucosa	20.50 g
Citrato trisódico * 2H ₂ O	8.00 g
Ac. Citrico * H ₂ O	0.55 g
NaCl	4.20 g
H ₂ O	1000 ml

Añadir gelatina bacteriológica al 3 % . calentar suavemente hasta disolución total. Se esteriliza en el autoclave a 10 lb durante 20 min. Luego se agregan 2.5 ml de esta solución a tubos estériles de 13 x 100 con tapón de rosca y se guardan en refrigeración. Para la toma de la muestra se calientan suavemente los tubos hasta fundir la gelatina (35).

PREPARACION DE AMARILLO DE TETRAZOLIO (MTT) (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio)

Se disuelven 5 mg de MTT por cada ml de SAF. Se fracciona en viales con 250 µl del concentrado que se guardan en congelación. En la práctica se usa una dilución 1:30 en SAF de este concentrado, probándose su estabilidad cada semana.

PREPARACION DEL ACIDO DESOXICOLICO (5a-ac. colico-3',12' diol)

Se disuelven 2.5 g de este reactivo en 100 ml de solución salina normal, se deja reposar toda la noche, despues se centrifuga a 1 000 g

durante 15 minutos dos veces, finalmente se filtra en papel Watmann # 40. La solución debe quedar libre de partículas con un pH final de 4.9 - 5.6 , se guarda en refrigeración.

PREPARACION DE AZUL TRIPANO

Se prepara una solución al 0.2 % de azul tripano en solución salina al 0.85 % estéril, en la práctica se usa una dilución 1:10 en SSN de ésta solución.

PREPARACION DE CLORURO DE NITRO AZUL DE TETRAZOLIO MONOHIDRATADO (NBT)

En solución salina al 0.85 % se prepara una solución al 0.1% de NBT. Se fracciona en frascos viales con 0.2 ml de NBT, se guardan en congelación hasta el momento de su uso.

PREPARACION DE ALCOHOL ISOPROPILICO 0.04M HCl

Se necesitan 1.460 g/mol de HCl en 1000 ml de alcohol para obtener una solución 0.04 M. El ácido clorhídrico es líquido por lo tanto se divide la masa entre su densidad para obtener los mililitros necesarios para esta solución. Se guarda en refrigeración.

$1.460 \text{ g/mol} + 1.185 \text{ g/ml} = 1.230 \text{ ml/mol}$ en 1 litro de Agua

PREPARACION DE SAFRANINA

Se disuelven 5 g de safranina en 10 ml de etanol, se deja reposar una noche, se filtra y luego se agregan 90 ml de agua estéril, para una concentración final al 5 % .

A P E N D I C E B
ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
a-S	antisuero
ASC	Agar Sangre de Carnero
C	Suero Control
C3a	} Fracciones del Componente C3 del Sistema Complemento
C3b	
C5a	} Fracciones del Componente C5 del Sistema Complemento
C5b	
CP	Control Positivo
CN	Control Negativo
C.V.	Coefficiente de Variación
X C.V.	Coefficiente de Variación en Porcentaje
Dil.	Dilución
Est.	Suero Estándar
Fag.	Fagocitosis
X Fag.	Porcentaje de Fagocitosis
GMPC	Guanosin Monofosfato cíclico
HMF	Vía de la Hexosammonofosfato
Ind.de Ing.	Indice de Ingestión
Ind. Fag.	Indice Fagocítico
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
LM	Levaduras Muertas
LV	Levaduras Vivas

λ	Longitud de onda en nanómetros
M	Muestra
Macrof.	Macrófagos
MEM	Medio Esencial Mínimo
M.I.	Muerte Intracelular
X M. I.	Porcentaje de Muerte Intracelular
Mo.	Microorganismo
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Amarillo de Tetrazolio
NBT	Azul de Tetrazolio
P	Suero Problema
PDA	Agar Papa Dextrosa
PMN	Célula Polimorfonuclear
Rel.	Relación o Proporción
R.N.	Recién Nacido
SAF	Solución Amortiguadora de Fosfatos
SSN	Solución Salina Normal
X T	Porcentaje de Transmitancia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fudenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Wells JV. *Inmunología Clínica*. Ed. El Manual Moderno, México, 1980.
- 2.- Larralde C. *Inmunopatología*. En: Pelayo C, Arias-Stella J, Perez Tamayo R, Carbonell LM. *Texto de Patología*. Prensa Médica Mexicana, México, 1970; Cap. VII :99-170.170.
- 3.- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. The CV Mosby Company, St Louis-Washington DC-Toronto, 2^o ed., 1989.
- 4.- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Reviuw of Medical Microbiology*. Lange Medical Publications, Los Altos-California, 1972.
- 5.- Spence AP, Mason EB. *Human Anatomy and Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park-California, 1979.
- 6.- Del Rey PG, Calderón JE. *El Sistema Inmune en la Relación Materno Fetal*. En: Calderon JE, Arredondo G JL, Karchmer S, Nasrallah E. *Conceptos Actuales en Infectología Perinatal*. INPer, México, 1988; Cap. II:7-20.
- 7.- Nathan GD, Osby AF. *Hematology of Infancy and childhood*. WB Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto, 1974.
- 8.- Robbins LS. *Tratado de Patología*, Ed. Interamericana, México, 3^o ed., 1968.
- 9.- Lara S.J. *Papel de los fagocitos en Infecciones*. *Infectología*, 1988; 7: 325-326.
- 10.- Matus Mexia JA. *Los Neutrófilos como mecanismo de defensa*. Tesis Fac. de Química, U.N.A.M., 1985.

- 11.- Bach JF, Lesavre Ph. *Inmunología*. Ed. Masson,SA., Barcelona, España, 1983.
- 12.- Davidsohn I, Bernard HJ. *TOOD-SANFORD Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*. Salvat Editores SA., España 6^o ed., 1979.
- 13.- Rapaport SI. *Introducción a la Hematología*. Salvat Editores SA., España, 1977.
- 14.- Sobotta, Hammersen F. *Histology*. Lea & Febiger Ed., Philadelphia U.S.A.- Munich Germany, 1976.
- 15.- Leeson TS, Leeson CR. *Histología*. Ed. Interamericana, México 2^o ed., 1970.
- 16.- Horwitz MA. *Phagocytosis of Microorganisms*. Reviews of Infectious Diseases, 1982; 4 : 104-123.
- 17.- Orten MJ, Neuhaus WO. *Human Biochemistry*. The CV Mosby Company, St Louis-Washington DC-Toronto, 10^o ed.,1982.
- 18.- Spitznagel KJ. *Microbial Interactions with Neutrophils*. Reviews of Infectious Diseases, 1983; 5 : S806-S822.
- 19.- Moulder JW. *Comparative Biology of Intracellular Parasitism*. Microbiological Reviews, 1985; 49 : 298-337.
- 20.- Edelson PJ. *Intracellular Parasites and Phagocytic Cells: Cell Biology and Pathophysiology*. Reviews of Infectious Diseases, 1982; 4 : 124-135.
- 21.- Spitznagel JK, Shafer WM. *Neutrophil Killing of Bacteria by Oxygen-Independent Mechanism: A Historical Summary*. Reviews of Infectious Diseases, 1985; 7 : 398-403.

- 22.- McRipley RJ, Sbarra AJ. *Role of the Phagocyte in Host-Parasite Interactions. XI.Relationship between stimulated oxidative metabolism and hydrogen peroxide formation, and intracellular killing.* Journal of Bacteriology 1967; 94 : 1417-1424.
- 23.- McRipley RJ, Sbarra AJ. *Role of the Phagocyte in Host-Parasite Interactions. XII.Hydrogen peroxide-myeloperoxidase bacterial system in the phagocyte.* Journal of Bacteriology 1967; 94 : 1425-1430.
- 24.- Roltt I, Brostoff J, Male D. *Immunology.* Mosby Grover Ed. New York 1985 : 175-179.
- 25.- Castellan GW. *Fisicoquímica.* Ed.Addison-Wesley Iberoamericana SITESA. México 2^o ed., 1987.
- 26.- Solberg CO, Kalager T, Hill HR, Glette J. *Polymorphonuclear Leucocyte Function in Bacterial and Viral Infections.* Scand. J. Infect Dis. 1982; 14 : 11-14.
- 27.- Qule PG, Hetherington SV. *Patients with disorders of phagocytic cell function.* Pediatrics Infectious Disease, 1984 ; 3 : 272-280.
- 28.- Miller ME, Stiehm ER. *Phagocytic, opsonic and immunoglobulin studies in newborn.* Medical Progress, 1973 ; 119 : 43-63.
- 29.- Christensen RD, Harper TE, Rothstein G. *Granulocyte-macrophage progenitor cell (CFU-GM) in term and preterm neonates.* J. Pediatr. 1986 ; 109 : 1047-1051.
- 30.- Mitchell SC. *Neonatal Neutrophil Host Defence.* Am. J. Dis. Child, 1989 ; 143 : 45-47.

- 31.- Soria C, Arbo A, Basurto G, Santos JL. Capacidad de reconocimiento opsonico de los neutrófilos PMN de niños desnutridos. Memorias del XIV Congreso Internacional de Infectología, 1° al 4 Nov. de 1989, Acapulco, Gro., México.
- 32.- Blondi A, Poli G, Parravicini C, et al. Mononuclear Phagocyte Function in the Perinatal Period. En: Burgio, Hanson, Ugazio, eds: *Immunology of Neonate*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1987 ; Cap VI : 59-66.
- 33.- Hill HR, Sacchi F. Mechanisms of Abnormal Neutrophil Function in the Human Neonate: Prospects for Therapy. En: Burgio, Hanson, Ugazio, eds: *Immunology of Neonate*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1987 ; Cap VII : 67-75.
- 34.- McNamara MP, Wiessner JH, Collins-Lech C, Hahn BL, Sohnle PG. Neutrophil death as a defence mechanisms against Calicins infections. *The Lancet*, 1988 ; Nov 19 : 1163-1165.
- 35.- Campell DH et al. *Immunology. A laboratory Text for Instruction and Research*. WA Benjamin Inc., 2^o ed.. New York, 1970.
- 36.- Lehninger AL. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. New York 1982.
- 37.- Del Rey GP. Factores de la superficie bacteriana que interfieren con la fagocitosis. Tesis Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Inst. Politécnico Nal. 1978.
- 38.- ALDRICH CHEMICAL Co. *Catalog and Handbook*. Wisconsin, U.S.A. 1989.

- 39.- Segal AW. *Nitroblue Tetrazolium Test*. Lancet, 1974; 2 : 1250.
- 40.- Smith DL, Rommel F. *A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro*. J. Immunol. Methods, 1977; 17 : 241.
- 41.- Bellinati-Pires R, Melki SE, Colleto GMDD, Carneiro-Sampaio. *Evaluation of a fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions*. J. Immunol. Methods, 1989; 119 : 189-196.
- 42.- Levitz SM, Diamond RD. *A rapid colorimetric assay of fungal viability with the Tetrazolium Salt MTT*. J of Infec. Dis., 1985; 152: 938-945.
- 43.- Van Furth R, Van Zwet TL, PCJ-Leijh. *In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes*. En: Cellular Immunology Vol.2, Applications of Immunological Methods, Edited by DM Weir, Blackwell Scientific Publications, 1985.
- 44.- Schlegel HG. *Microbiología General*. Ed. Omega, Barcelona, España, 1980.
- 45.- Sakal RR, Rohlf FJ. *Biometry*, Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco 2^o ed., 1981.
- 46.- Barnett RN. *Clinical Laboratory Statistics*, Ed. Little Brown and Company, Boston 2^o ed., 1979.

- 47.- Ostle Bernard. *Estadística Aplicada . Técnicas de la Estadística Moderna*. Ed. Limusa, México 1979.
- 48.- Mansfield Edwin. *Statistics for Business and Economics*. Ed. W.W. Norton and Company, New York - London 2^o ed., 1980.
- 49.- Richards LE, LaCava JJ. *Business Statistics, Why and When*. Ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 1978.
- 50.- W.Lutz. *Statistical Methods as Applied to Immunological Data*. En: *Handbook of Experimental Immunology, Vol.3 Appendix 2, Applications of Immunological Methods*, Edited by DM Weir, Blackwell Scientific Publications, 1985.
- 51.- Arredondo JL, Del Rey GP, Orrantía GR, Lara SJ. *Efecto de la Dieta Suplementada con Lectina sobre la Fagocitosis de Calbicans, por Leucocitos de Pacientes Infectados con VIH*. (En revisión).
- 52.- *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs and Mathematical Tables*. Edited by M. Abramowitz and I.A. Stegun, U.S. Department of Commerce, Nat. Bureau of Standards, Washington 1985.
- 53.- Monroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. *The neonatal blood count in health and disease. I Reference values for neutrophilic cells*. *J. of Pediatrics*, 1979; 95: 89 - 98.