

11262

15

2 ej.

Universidad Nacional Autónoma De México

División de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina
Sede Centro

Instituto Mexicano del Seguro Social

Efecto del extracto de *Staphylococcus aureus* en la expresión de L-Selectina Y LFA-1, en neutrófilos de pacientes con asma bronquial no alérgica.

Proyecto de investigación para la obtención del grado de
Maestría en Ciencias Medicas

Presenta:

Dr. Enrique Rojas Ramos

Asesor:

M. en C. Salvador Martínez-Cairo Cueto

Co-asesores:

M. en C. Nelly Cisneros González

Dr. José Moreno Rodríguez

Lugar donde se realizó la investigación:

Unidad de Investigación Médica en Reumatología e Inmunología, Servicio de Alergia e Inmunología, Hospital de Especialidades CMN S. XXI IMSS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

25/9/86



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION
Subdivisión de Maestrías y Doctorados

Of. No. 479/EJG/MEMK/97

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
Director General de Administración Escolar
U.N.A.M.
Presente

At'n: Lic. Antonio Díaz García.

Informo a usted que el (la) C. ENRIQUE ROJAS RAMOS
aspirante al grado de MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
con la tesis titulada "Efecto del extracto de Staphilococcus aureus en la
expresión de L-Selectina y Alfa 1, en neutrófilos de pacientes con asma
bronquial no alérgica".

será examinado (a) en el aula de exámenes de grado "Dr. Luis Castelazo Ayala" (Edificio de la Unidad de Posgrado, primer piso, costado sur de la Torre II de Humanidades) por el jurado constituido por los siguientes sinodales:

PRESIDENTE:	DR. JOSE DANTE AMATO MARTINEZ
SECRETARIO:	DR. JOSE RAMON PANIAGUA SIERRA
PRIMER VOCAL:	DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ
SEGUNDO VOCAL:	DRA. NELLY CISNEROS GONZALEZ
TERCER VOCAL:	DR. SALVADOR MARTINEZ-CAIRO CUETO (TUTOR)
SUPLENTE:	
SUPLENTE:	

En cumplimiento con los Artículos 18 y 19 del Capítulo I, Título II, del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la U.N.A.M.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 8 de diciembre de 1997.

Vo. Bo.

DR. HUGO ARECHIGA U.
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación

Vo. Bo.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
Director de la Facultad
de Medicina

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIAL Y MÉTODOS	9
PROCEDIMIENTO	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	15
REFERENCIAS	19
ANEXOS Y GRÁFICOS	24

RESUMEN

Antecedentes. La inflamación de la vía aérea es el componente más importante en la patogénesis del asma bronquial, ésta se caracteriza por la activación de neutrófilos a través de moléculas de adhesión. Son fundamentales en este proceso L-selectina (CD62-L) y LFA-1 (CD11a). Asimismo se ha sugerido que el extracto de *Staphylococcus aureus* (Sa) puede modificar la expresión de algunas moléculas de adhesión.

Material y Métodos: Diseño del Estudio; experimental.

Objetivos: Determinar el efecto del extracto de Sa, sobre la expresión de las moléculas de adhesión L-selectina y LFA-1 en neutrófilos de pacientes con asma bronquial moderada, no alérgica.

Grupo de estudio: Neutrófilos de pacientes con asma bronquial moderada no alérgica, con y sin estímulo de Sa.

Características de los pacientes elegidos: hombres y mujeres, entre 15 y 35 años de edad, no fumadores, que utilizaron broncodilatadores y esteroides inhalados, sin inmunoterapia previa, sin enfermedades autoinmunitarias y sin de diabetes mellitus.

Mediciones: Se determinaron las moléculas de adhesión CD 62-L y el CD 11 a mediante citometría de flujo expresadas en la superficie de neutrófilos.

Resultados: La mediana de la expresión de la molécula CD 62L aumentó con el estímulo del extracto bacteriano, en pacientes asmáticos de 2444 (CI 1966, CS 3627, RC1661) a 6285.5 (CI 5243, CS 7203, RC 1960) y la mediana de la expresión de la molécula CD 11a disminuyó con el estímulo del extracto bacteriano, en pacientes asmáticos 9910.5 (CI 9765, CS 9961, RC 196) a 7670 (CI 7125, CS 8291, RC 1166). La mediana de la expresión de la molécula CD 62L aumentó con el estímulo del extracto bacteriano, en sujetos sanos de 593 (CI 361, CS 929, RC 568) a 1113 (CI 910, CS 1240, RC 330) y la mediana de la expresión de la molécula CD 11a disminuyó con el estímulo del extracto bacteriano, en sujetos sanos de 9850 (CI 9741, CS 9898, RC 157) a 9808.5 (CI 9693, CS 9890, RC 197) [CI.- Cuartil Inferior, CS.- Cuartil Superior, RC.- Rango Cuartilar].

Conclusiones: Concluimos que el extracto de (Sa) puede modificar la expresión de las moléculas de adhesión LFA-1 y L-selectina en neutrófilos, y esta regulación puede involucrar al estado de activación basal del neutrófilo. Sin embargo, es necesario explorar los mecanismos por los cuales se puede llevar a efecto esta modificación.

ANTECEDENTES

El asma es un padecimiento pulmonar crónico que afecta a personas de todas las edades; puede ser grave y en algunas ocasiones puede provocar la muerte. Los reportes sugieren que la morbilidad y la mortalidad se están incrementando, aunque los motivos de esto aún no son claros. La prevalencia del asma se ha incrementando en Estados Unidos, Reino Unido, Nueva Zelanda y Australia; los índices de mortalidad y la tendencia de la misma varían ampliamente, pero aparentemente se está incrementando en muchos países, en donde hay datos disponibles. El incremento en la morbilidad y la mortalidad del asma son de interés internacional, porque esto ocurre al mismo tiempo en que los avances científicos tienden a mejorar el entendimiento del asma y proveen nuevas terapias (1).

El asma bronquial se define como un conjunto de episodios recurrentes de sibilancias o disnea, caracterizados por un aumento significativo de la resistencia al flujo aéreo, con períodos total o parcialmente libres de síntomas de forma espontánea o después del tratamiento y una reducción de las resistencias en las vías aéreas (2). No existen estudios epidemiológicos que aporten datos sobre la incidencia real del asma bronquial, si bien, se acepta que entre 10 y el 12% de la población se encuentra afectada por este padecimiento. La edad de comienzo predomina entre los 2 y 4 años de edad. La incidencia en el sexo masculino es aproximadamente el doble que en el femenino. Sin embargo, las cifras se igualan hacia la pubertad y en la adolescencia predominan las mujeres, y esto es más evidente en la edad adulta (3-6).

El asma bronquial se clasifica en alérgica (atópica o extrínseca) y no alérgica (no atópica o intrínseca). Es más frecuente la de tipo alérgico aproximadamente en 90% de los pacientes menores de 16 años, 70% de los pacientes menores de 30 años y 50% de los pacientes mayores de 30 años. Además se clasifica de acuerdo a la gravedad de los síntomas en leve, moderada y grave (Figura 1). Todos los pacientes con asma experimentan empeoramiento de sus síntomas por infecciones del tracto respiratorio superior o bronquitis. En la mayoría de estos casos no existe una evolución satisfactoria (7-8).

La obstrucción de la vía aérea en asociación con el asma es un fenómeno complejo que involucra broncoespasmo, edema, formación de moco e inflamación. El componente inflamatorio del asma contribuye, no sólo a la obstrucción bronquial, sino también a la hiperrespuesta, siendo esta la principal característica del padecimiento. Recientemente se ha determinado que esta inflamación (aguda y crónica) de la vía aérea es el componente más importante en la patogénesis del asma bronquial. El mecanismo iniciador del proceso inflamatorio en el asma bronquial es la activación de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células epiteliales; con la subsecuente liberación de mediadores de la inflamación (mediadores vasoactivos, mediadores quimiotácticos, enzimas, factores activadores, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, neuropéptidos y moléculas de adhesión [Figura 2]), seguida por un nuevo reclutamiento y una nueva activación dentro de la mucosa, de esta forma se produce un proceso infiltrativo persistente. Aunque la vía aérea de asmáticos crónicos es infiltrada por basófilos y linfocitos, también los eosinófilos y neutrófilos tienen gran importancia en este proceso. Un área de gran interés para entender este proceso infiltrativo es la posibilidad de que participen dos mecanismos fundamentalmente: la liberación de moléculas quimioatrayentes específicas para neutrófilos y eosinófilos, y la interacción selectiva de moléculas de adhesión celular entre eosinófilos, neutrófilos y el endotelio (9-14).

En la perpetuación del proceso inflamatorio los eosinófilos, neutrófilos y células epiteliales, no sólo actúan como efectores, sino que también generan proteínas, como citocinas y moléculas de adhesión que promueven el proceso inflamatorio. El daño endotelial y la modificación en la arquitectura bronquial, resulta de esta compleja interacción entre células inflamatorias y mediadores provocados por estímulos externos, en consecuencia, dichos factores provocan los clásicos hallazgos histopatológicos del asma bronquial (15).

El reclutamiento de células inflamatorias del torrente sanguíneo, al tejido extravascular es un proceso crítico en la defensa del huésped. En estudios por microscopía intravital se ha establecido una secuencia de eventos involucrados en la migración celular a los sitios de inflamación. En respuesta al estímulo extravascular, se generan señales que activan leucocitos (neutrófilos) y células endoteliales, en consecuencia una o ambas inician la adhesión. Las fuerzas adhesivas involucran interacciones entre la fuerza de rozamiento, el

flujo sanguíneo y el rodamiento del neutrófilo a lo largo de la pared basal para realizar la migración transendotelial o diapedésis (Figura 3a) (16-17).

Las moléculas de adhesión regulan la migración de leucocitos sanguíneos y su acumulación en el lugar de la inflamación, son expresadas en la superficie de leucocitos y células endoteliales y median la interacción entre estas células en eventos tempranos de la respuesta inflamatoria. Existen tres tipos de familias de moléculas de adhesión: selectinas, integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las integrinas y selectinas en leucocitos median la adhesión de células circulantes al endotelio. La migración de leucocitos a sitios de inflamación se inicia por moléculas de la familia de las selectinas, la activación de integrinas aparece de acuerdo a requerimientos subsecuentes, por la localización celular y la diapedésis dentro del tejido [Figura 3b]. La agregación de neutrófilos requiere principalmente de la participación de L-selectina (CD 62 L) y de la beta -2 integrina (LFA-1)(18-22).

Algunos reportes sugieren que la L-selectina es el resultado de la activación del neutrófilo, ya sea por la liberación de calcio intracelular, por la producción de superóxido, por la inducción de mRNA, mediante el estímulo de IL-8 (interleucina 8) o por TNF-a (factor de necrosis tumoral alfa) (23-24).

En el asma bronquial los ligandos para la adhesión de neutrófilos y eosinófilos involucrados incluyen a la L-selectina en los primeros y a la E-selectina (CD 62 E) en los segundos, y a lo largo del endotelio activado se encuentran moléculas como el complejo CD 11a/CD 18 ó LFA-1(subunidad común a las Beta 2 integrinas), complejo CD 11b/ (CD 18 o MAC-1), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 o CD 54) y el antígeno de activación muy tardía -4 ó VLA-4 (CD 49d) que también promueven la adhesión y la diapedésis en el tejido dañado (25).

La señal de transducción en las vías de regulación del neutrófilo, mediante los procesos de secreción y adhesión aún son desconocidos, pero existe evidencia de que los ácidos grasos y otros mediadores de derivados lipídicos (incluidos los liposacáridos bacterianos), inducen la fagocitosis; la adhesión monocítica; la agregación del neutrófilo; el incremento de las selectinas e integrinas en neutrófilos; la degranulación del neutrófilo y del monocito y la activación y fusión de proteínas como las anexinas (26).

Los pacientes con crisis de asma, han demostrado una activa migración de neutrófilos y eosinófilos dentro de la luz del bronquio. Asimismo, se observa una regulación a través de la L-selectina, como indicadora de degranulación (27).

La especificidad en los requerimientos de las selectinas en la respuesta inflamatoria del pulmón y la migración de neutrófilos es reiterada en publicaciones. Así mismo, existe evidencia de la elevación de la L-selectina durante la infección aguda por bacterias, en BAL de pacientes con asma bronquial. Las selectinas requieren de moléculas como; LFA-1, MAC-1, VLA-4, como primer contacto para llevar a cabo la adhesión (28-35).

Knol concluye que los neutrófilos utilizan L-selectina para activar células endoteliales bajo condiciones de flujo, y a través de anticuerpos monoclonales se ha podido inhibir selectivamente el ataque de neutrófilos a células endoteliales estimuladas "in vitro", sugiriendo diferentes epítomos funcionales de la L-selectina. Bloemen por su parte sugiere que es LFA-1 y no MAC-1 la que contribuye en mayor medida a la hiperreactividad en el asma no alérgica. (29,36).

La contribución de la L-selectina a la migración leucocitaria en inflamación crónica es muy importante y su bloqueo traduce inhibición de la migración al tejido inflamado; neutrófilo (50-62%), linfocito (70-75%) y monocito (72-78%) (37).

En otra línea de investigación, estudios recientes sugieren que las toxinas del *Staphylococcus aureus* (TSa) son potentes estimuladoras de macrófagos y células T (38). Los estudios realizados en *Staphylococcus aureus* (Sa) proporcionaron evidencia de un nuevo mecanismo de estimulación inmunológica, ya que es considerado como el prototipo de los superantígenos; estimulando células T a través de moléculas del MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) clase II, con interacción en células presentadoras de antígenos. La estimulación selectiva de células T por TSa, se expresan particularmente mediante el receptor de célula T (TCR) con una cadena β , con segmentos de genes variable ($V\beta$). La separación convencional de los péptidos antigénicos y los otros componentes del TCR juegan un pequeño papel en el reconocimiento de los superantígenos. Las TSa son potentes

inductores de IL-1 y gamma interferón en monocitos y macrófagos. Las TSa median la estimulación de monocitos y macrófagos como consecuencia de ligar y transducir una señal positiva a través de antígenos y moléculas MHC clase II en la superficie celular de éstos. La capacidad de las toxinas bacterianas para ligar moléculas MHC clase II ó estimular células T en particular por su TCR sugieren algunos mecanismos del Sa (39-41).

Kinch encontró una interacción de las moléculas MHC clase II en CD4+, independientemente del antígeno, con un incremento de la molécula LFA-1 mediante la estimulación con el superantígeno TSST-1 (Toxina 1 del *Staphylococcus aureus*), fusionándose con proteínas CD 4 solubles o con anticuerpos por reactividad cruzada mediante la adhesión con LFA-1 (42).

Se ha señalado que las bacterias como el Sa toma ventaja del transporte mucociliar, al provocar así anormalidades en la fagocitosis y disminución en la capacidad de responder a un estímulo activador. Estos mismos autores buscando el aumento en la expresión de moléculas MHC clase II en células CD4+, encontraron reducción en los niveles de L-selectina, en pacientes sometidos a tratamiento con vacuna polivalente (cabe señalar que estos pacientes no eran asmáticos). Se sugiere que existe una alteración en la cinética de modulación de diversas moléculas de membrana de polimorfonucleares y linfocitos. Se propone la hipótesis de que la primera respuesta posterior a la administración de vacuna polivalente, consiste en una activación de células T; se inicia así la expresión de moléculas MHC clase II, a la vez que disminuyen los niveles de L-selectina. Al mismo tiempo los polimorfonucleares, más que tener reactividad directa contra el antígeno bacteriano, modulan los receptores en la fagocitosis. Finalmente el incremento de citocinas liberadas por la activación de linfocitos, pueden inducir un sostenido estado de activación de polimorfonucleares (43).

JUSTIFICACION

Por muchos años los alergólogos han utilizado vacuna bacteriana conteniendo extracto de *Staphylococcus aureus* (Sa) como terapia alternativa en el asma bronquial no alérgica, sin embargo, a pesar de su uso frecuente y de los beneficios que se le atribuyen, no se encuentran publicaciones que reporten estos datos y menos aún los posibles mecanismos en

los que se pudieran sustentar estas observaciones, por lo cual proponemos que el paciente con asma bronquial no alérgica, cursa con una activación de los neutrófilos caracterizada por la expresión de moléculas de adhesión como L-selectina y LFA-1 y esta expresión puede ser modificada por el extracto de *Sa*, siendo este el primer paso en la mejoría del desarrollo y la perpetuación del proceso inflamatorio, mediado por el infiltrado de neutrófilos.

Las selectinas leucocitarias no constituyen un medio de adhesión, a no ser que la célula sea activada. Las señales intercelulares para la activación de moléculas aún no se conocen. Sin embargo, cuando el neutrófilo es expuesto a lisados de *Sa* es activado en forma distinta (efecto paradójico), aumentando el número de señales intercelulares, y quizá, una de estas señales celulares puede influenciar la modulación por frecuencia y/o por afinidad de la L-selectina y LFA-1; como las más importantes, participando así en una menor infiltración celular durante el proceso inflamatorio.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Comparar el número de neutrófilos que expresan en su superficie la molécula L-selectina y LFA-1, obtenidos de pacientes con asma bronquial moderada no alérgica, con y sin estímulo con extracto de *Sa*.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRA

Neutrófilos obtenidos de hombres y mujeres, entre 15 y 35 años de edad, con diagnóstico de asma bronquial moderada no alérgica de reciente diagnóstico, no fumadores, que no hubieran recibido inmunoterapia con anterioridad, sin historia previa de enfermedades autoinmunes o de diabetes mellitus, pacientes que acudieron a la consulta externa del

los que se pudieran sustentar estas observaciones, por lo cual proponemos que el paciente con asma bronquial no alérgica, cursa con una activación de los neutrófilos caracterizada por la expresión de moléculas de adhesión como L-selectina y LFA-1 y esta expresión puede ser modificada por el extracto de *Sa*, siendo este el primer paso en la mejoría del desarrollo y la perpetuación del proceso inflamatorio, mediado por el infiltrado de neutrófilos.

Las selectinas leucocitarias no constituyen un medio de adhesión, a no ser que la célula sea activada. Las señales intercelulares para la activación de moléculas aún no se conocen. Sin embargo, cuando el neutrófilo es expuesto a lisados de *Sa* es activado en forma distinta (efecto paradójico), aumentando el número de señales intercelulares, y quizá, una de estas señales celulares puede influenciar la modulación por frecuencia y/o por afinidad de la L-selectina y LFA-1; como las más importantes, participando así en una menor infiltración celular durante el proceso inflamatorio.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Comparar el número de neutrófilos que expresan en su superficie la molécula L-selectina y LFA-1, obtenidos de pacientes con asma bronquial moderada no alérgica, con y sin estímulo con extracto de *Sa*.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRA

Neutrófilos obtenidos de hombres y mujeres, entre 15 y 35 años de edad, con diagnóstico de asma bronquial moderada no alérgica de reciente diagnóstico, no fumadores, que no hubieran recibido inmunoterapia con anterioridad, sin historia previa de enfermedades autoinmunes o de diabetes mellitus, pacientes que acudieron a la consulta externa del

servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades CMN SXXI IMSS. No se incluyeron estudios con viabilidad de células aisladas (neutrófilos) menor al 95% y/o con un histograma ilegible.

LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO

El estudio se llevo a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Reumatología e Inmunología y en el Servicio de Alergia e Inmunología del Hospital de Especialidades del C.M.N. S. XXI I.M.S.S.

GRUPOS DE ESTUDIO

Neutrófilos de pacientes con asma bronquial moderada no alérgica

Grupo 1.- Sin extracto de Sa Cowan 1

Grupo 2.- Con extracto de Sa Cowan 1

AISLAMIENTO DE GRANULOCITOS NEUTRÓFILOS :

Se recolectó 20 ml de sangre periférica por paciente, se colocó en un tubo conteniendo EDTA como anticoagulante, que contenía 5 ml de gelatina (SIGMA) al 3% en solución salina con buffers de fosfatos (PBS) libre de contaminación, se mezcló suavemente, se retiró la tapa del tubo y se limpió dentro con una toalla de papel para que no se contaminara con sangre. Se dejó la mezcla a 37° C de temperatura en estufa de incubación con 5 % de CO₂ durante 40 minutos, después del paso de sedimentación, cuidadosamente se retiró el sobrenadante del plasma coloreado, un estrato de aproximadamente 0.5 cm de sangre roja con células de interfase, posteriormente se lavó con 5 ml de solución de alsevers y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a 4° C con una centrifuga Beckman TJ-6R con rotor-4.2 refrigerada y se repitió el proceso una vez más, el botón de células se resuspendió en 5 ml de PBS, usando un volumen de 2:3 con medio de separación de linfocitos Ficoll-Hypaque (SIGMA), estéril con un radio de separación media y un gradiente de separación 1077, el estrato estabilizado con una interfase aguda entre dos estratos, se centrifugó por 35 minutos a 500 xg, sin freno, cuidadosamente se retiraron plaquetas y monocitos contenidos en el estrato y a continuación

se retiró por pipeta el sobrenadante y se suspendió el botón en 2 ml de solución PBS. Se agregaron 5 ml de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.2% a 4° C para lisar células rojas remanentes y suavemente se invirtió la suspensión de células por 20 segundos, inmediatamente se le agregaron 5 ml de NaCl al 1.6% para hacer la solución isotónica. Posteriormente se agregó solución balanceada de sal a la mezcla para darle volumen a 50 ml y se centrifugaron estas células por 10 minutos a 500 xg, se decantó el sobrenadante y se lavaron las células con PBS dos veces más. Las células estaban libres de contaminación de células rojas y plaquetas después de estos tres pasos de separación por lavado. La suspensión final de células obtenidas usando este protocolo puede dar preparaciones conteniendo más del 98% de granulocitos neutrófilos. El rendimiento del método empleado, para la obtención de las células fue mayor al 80% (44-46).

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS COWAN I

El *Staphylococcus aureus* Cowan I 12598 serotipo 1 National Collection of Type Cultures (NCTC) 8530, London England. Se sembró en un medio sólido de agar sal de manitol (Bioxon) se incubó durante 24 hrs a 37° C. Se cultivó en caldo de soya tripticasa (Bioxon) en baño maría a 37° C durante 22 hrs. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución salina, se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 minutos, desechando el sobrenadante y se suspendió el botón en 8 ml de SSBH , centrifugándose nuevamente a 5,000 rpm durante 15 minutos, se lavó el botón y se suspendió en 5 ml de SSHB. Para conocer la concentración de bacterias por ml, se determinó la turbidez por nefelómetro de Mc Farland, la lectura se realizó en el espectrofotómetro, para esto se correlacionó la escala de Mc Farland de densidad bacteriana por ml con la densidad óptica del espectrofotómetro la lectura se realizó a 540 nm. Se ajustó el número de bacterias por ml (12×10^6), que equivale a la concentración de las bacterias utilizadas en la vacuna bacteriana de Sa , se aniquilaron las bacterias por calentamiento en una autoclave a 120°C durante 15 minutos, se realizó la cuenta de bacterias en la cámara de Neubauer bajo el microscopio de luz para ajustar las distintas diluciones del extracto (13, 47-48).

CITOMETRÍA DE FLUJO

Se utilizaron anticuerpos monoclonales para CD62-L marcado con isotiocianato de fluoresceína (DAKO, Glostrup, Denmark) y CD11a marcado con ficoeritrina (Becton Dickinson immunocytometry, San José, CA). Se incubaron los neutrófilos durante 20 minutos a 4° C con 100 µl del anticuerpo CD 62L y 200 µl del anticuerpo CD11a, de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Posteriormente fueron introducidos a un citómetro FACScan (Becton Dickinson), la emisión de fluorescencia del anticuerpo CD 62L fue leída a una longitud de onda de 525 nm, la emisión de fluorescencia del anticuerpo CD 11a CD fue leída a una longitud de onda de 578 nm. Además, se determinó la viabilidad de las células con la tinción de yoduro de propidio para descartar células no viables. El análisis se realizó con el programa LYSIS II (Hewlett Packard), incluyendo una lectura de 10,000 células para cada uno de los ensayos y se cuantificó el número de células que expresaban dichas moléculas (49-55).

PROCEDIMIENTO (Figura 4):

Se verificó que los pacientes remitidos al servicio de Alergia e Inmunología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI con síntomas de asma bronquial cumplieran con los criterios de selección y se les invitó a participar en el estudio y a firmar la carta de consentimiento informado, se realizó historia clínica alergológica completa, se realizaron los estudios de laboratorio y gabinete de rutina (exudado faríngeo, citología de moco nasal en serie de 3, coproparasitoscópico en serie de 3, IgE, espirometría y pruebas cutáneas por método de escarificación). Se seleccionaron 12 pacientes con asma bronquial moderada no alérgica y 12 sujetos controles sanos, de ellos se obtuvieron 20 ml de sangre por punción venosa; esta muestra fue sometida a aislamiento de neutrófilos en los siguientes 60 minutos posterior a la toma. Se ajustaron volúmenes que contenían un millón de células por ml. Los neutrófilos de cada sujeto fueron divididos en dos grupos, A y B; en el grupo A se agregó por cada millón de células 100 µl del diluyente del extracto de Sa Cowan 1 (NaCl 0.9%, fenol 4%, agua destilada y albúmina sérica humana al 3%) y en el grupo B se agregó por cada millón de células 100 µl de extracto de Sa Cowan 1, después de incubar neutrófilos a 37° C con

CITOMETRÍA DE FLUJO

Se utilizaron anticuerpos monoclonales para CD62-L marcado con isotiocianato de fluoresceína (DAKO, Glostrup, Denmark) y CD11a marcado con ficoeritrina (Becton Dickinson immunocytometry, San José, CA). Se incubaron los neutrófilos durante 20 minutos a 4° C con 100 µl del anticuerpo CD 62L y 200 µl del anticuerpo CD11a, de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Posteriormente fueron introducidos a un citómetro FACScan (Becton Dickinson), la emisión de fluorescencia del anticuerpo CD 62L fue leída a una longitud de onda de 525 nm, la emisión de fluorescencia del anticuerpo CD 11a CD fue leída a una longitud de onda de 578 nm. Además, se determinó la viabilidad de las células con la tinción de yoduro de propidio para descartar células no viables. El análisis se realizó con el programa LYSIS II (Hewlett Packard), incluyendo una lectura de 10,000 células para cada uno de los ensayos y se cuantificó el número de células que expresaban dichas moléculas (49-55).

PROCEDIMIENTO (Figura 4):

Se verificó que los pacientes remitidos al servicio de Alergia e Inmunología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI con síntomas de asma bronquial cumplieran con los criterios de selección y se les invitó a participar en el estudio y a firmar la carta de consentimiento informado, se realizó historia clínica alergológica completa, se realizaron los estudios de laboratorio y gabinete de rutina (exudado faríngeo, citología de moco nasal en serie de 3, coproparasitoscópico en serie de 3, IgE, espirometría y pruebas cutáneas por método de escarificación). Se seleccionaron 12 pacientes con asma bronquial moderada no alérgica y 12 sujetos controles sanos, de ellos se obtuvieron 20 ml de sangre por punción venosa; esta muestra fue sometida a aislamiento de neutrófilos en los siguientes 60 minutos posterior a la toma. Se ajustaron volúmenes que contenían un millón de células por ml. Los neutrófilos de cada sujeto fueron divididos en dos grupos, A y B; en el grupo A se agregó por cada millón de células 100 µl del diluyente del extracto de Sa Cowan 1 (NaCl 0.9%, fenol 4%, agua destilada y albúmina sérica humana al 3%) y en el grupo B se agregó por cada millón de células 100 µl de extracto de Sa Cowan 1, después de incubar neutrófilos a 37° C con

extracto de *Staphylococcus aureus* y con el vehículo del extracto por 30 minutos, se agregaron los anticuerpos monoclonales para CD 62L y CD 11a, y fueron incubados por 30 minutos a 4° C, para posteriormente ser analizados por citometría de flujo, con el uso de FACScan mediante el programa LYSIS II.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 7.0. Para conocer la distribución de los datos, se organizaron ocho grupos de acuerdo a la molécula expresada (CD62-L y CD11a), de acuerdo a la presencia o no del estímulo (con estímulo y sin estímulo) y de acuerdo a los sujetos de los que provino la muestra de neutrófilos (asmáticos y sanos), en cada grupo se calculó sesgo y curtosis, se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-wilk) y pruebas gráficas de normalidad, en base a esto se observó que ninguno de los grupos presentó una distribución normal, ya que no cumplían con dos o más pruebas de éstas para considerarlos como una distribución normal, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba de Wilcoxon), los datos se presentaron con las siguientes medidas de resumen, mediana como medida de tendencia central y percentiles como medidas de dispersión, para la comparación de medianas entre dos grupos dependientes y descripción de significancia estadística se utilizó la prueba de Wilcoxon. El nivel de significancia estadística fue en todos los casos de 0.05 bimarginal para una hipótesis nula (57).

RESULTADOS

Estandarización de la concentración por número de bacterias contenidas en las diluciones del extracto de Sa y el tiempo de estímulo.

Se probaron cuatro concentraciones de bacterias contenidas en las diluciones del extracto de Sa cepa Cowan I, estas concentraciones fueron (número de bacterias por ml); 96×10^5 , 38×10^5 , 1.8×10^5 y 0.8×10^5 , para conocer la concentración óptima de estímulo para la expresión de las moléculas de adhesión CD 62L y CD 11a en neutrófilos de en 5

extracto de *Staphylococcus aureus* y con el vehículo del extracto por 30 minutos, se agregaron los anticuerpos monoclonales para CD 62L y CD 11a, y fueron incubados por 30 minutos a 4° C, para posteriormente ser analizados por citometría de flujo, con el uso de FACScan mediante el programa LYSIS II.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 7.0. Para conocer la distribución de los datos, se organizaron ocho grupos de acuerdo a la molécula expresada (CD62-L y CD11a), de acuerdo a la presencia o no del estímulo (con estímulo y sin estímulo) y de acuerdo a los sujetos de los que provino la muestra de neutrófilos (asmáticos y sanos), en cada grupo se calculó sesgo y curtosis, se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-wilk) y pruebas gráficas de normalidad, en base a esto se observó que ninguno de los grupos presentó una distribución normal, ya que no cumplían con dos o más pruebas de éstas para considerarlos como una distribución normal, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba de Wilcoxon), los datos se presentaron con las siguientes medidas de resumen, mediana como medida de tendencia central y percentiles como medidas de dispersión, para la comparación de medianas entre dos grupos dependientes y descripción de significancia estadística se utilizó la prueba de Wilcoxon. El nivel de significancia estadística fue en todos los casos de 0.05 bimarginal para una hipótesis nula (57).

RESULTADOS

Estandarización de la concentración por número de bacterias contenidas en las diluciones del extracto de Sa y el tiempo de estímulo.

Se probaron cuatro concentraciones de bacterias contenidas en las diluciones del extracto de Sa cepa Cowan I, estas concentraciones fueron (número de bacterias por ml); 96×10^5 , 38×10^5 , 1.8×10^5 y 0.8×10^5 , para conocer la concentración óptima de estímulo para la expresión de las moléculas de adhesión CD 62L y CD 11a en neutrófilos de en 5

extracto de *Staphylococcus aureus* y con el vehículo del extracto por 30 minutos, se agregaron los anticuerpos monoclonales para CD 62L y CD 11a, y fueron incubados por 30 minutos a 4° C, para posteriormente ser analizados por citometría de flujo, con el uso de FACScan mediante el programa LYSIS II.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 7.0. Para conocer la distribución de los datos, se organizaron ocho grupos de acuerdo a la molécula expresada (CD62-L y CD11a), de acuerdo a la presencia o no del estímulo (con estímulo y sin estímulo) y de acuerdo a los sujetos de los que provino la muestra de neutrófilos (asmáticos y sanos), en cada grupo se calculó sesgo y curtosis, se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-wilk) y pruebas gráficas de normalidad, en base a esto se observó que ninguno de los grupos presentó una distribución normal, ya que no cumplían con dos o más pruebas de éstas para considerarlos como una distribución normal, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba de Wilcoxon), los datos se presentaron con las siguientes medidas de resumen, mediana como medida de tendencia central y percentiles como medidas de dispersión, para la comparación de medianas entre dos grupos dependientes y descripción de significancia estadística se utilizó la prueba de Wilcoxon. El nivel de significancia estadística fue en todos los casos de 0.05 bimarginal para una hipótesis nula (57).

RESULTADOS

Estandarización de la concentración por número de bacterias contenidas en las diluciones del extracto de Sa y el tiempo de estímulo.

Se probaron cuatro concentraciones de bacterias contenidas en las diluciones del extracto de Sa cepa Cowan I, estas concentraciones fueron (número de bacterias por ml); 96×10^5 , 38×10^5 , 1.8×10^5 y 0.8×10^5 , para conocer la concentración óptima de estímulo para la expresión de las moléculas de adhesión CD 62L y CD 11a en neutrófilos de en 5

sujetos voluntarios sanos y por duplicado. La concentración de 96×10^5 , fue la que produjo mayor variación en la expresión de CD11a y CD 62L (Gráfica 1).

Se probó el tiempo de incubación de los neutrófilos durante 15, 30, 45 y 60 minutos, para conocer el tiempo óptimo de estímulo para la expresión de las moléculas de adhesión CD 62L y CD 11a sin modificar la viabilidad de las células en 5 sujetos voluntarios sanos. El tiempo óptimo para la incubación fueron 30 minutos (Gráfica 2).

Medición de la viabilidad de las células

Los recuentos diferenciales realizados después del proceso de aislamiento, demostró que más del 95% eran neutrófilos. La viabilidad medida mediante la exclusión de azul tripano fue mayor al 95% y posterior a la tinción con yoduro de propidio del 99%. El rendimiento del método empleado, para la obtención de las células fue mayor al 80%.

Medición de la expresión de moléculas de adhesión

Se estudió la expresión de las moléculas CD 62L y CD 11a en neutrófilos de 12 pacientes con asma moderada no alérgica. Seis de los pacientes fueron del sexo masculino y seis restantes fueron del sexo femenino, con promedio de edad de 25.0 ± 9.6 años. Para conocer si el fenómeno se relacionaba con la enfermedad se decidió analizar bajo las mismas condiciones neutrófilos de 12 sujetos sanos, cinco sujetos fueron del sexo masculino y siete fueron del sexo femenino, con un promedio de edad de 24.2 ± 4.9 años (Tabla 1).

La mediana de la expresión de la molécula CD 62L aumentó con el estímulo del extracto bacteriano, en pacientes asmáticos de 2444 (CI 1966, CS 3627, RC1661) a 6285.5 (CI 5243, CS 7203, RC 1960) (Gráfica 3) y la mediana de la expresión de la molécula CD 11a disminuyó con el estímulo del extracto bacteriano, en pacientes asmáticos 9910.5 (CI 9765, CS 9961, RC 196) a 7670 (CI 7125, CS 8291, RC 1166) (Gráfica 4). La mediana de la expresión de la molécula CD 62L aumentó con el estímulo del extracto bacteriano, en sujetos sanos de 593 (CI 361, CS 929, RC 568) a 1113 (CI 910, CS 1240, RC 330) (Gráfica 5) y la mediana de la expresión de la molécula CD 11a disminuyó con el estímulo del extracto

bacteriano, en sujetos sanos de 9850 (CI 9741, CS 9898, RC 157) a 9808.5 (CI 9693, CS 9890, RC 197) (Gráfica 6) [CI.- Cuartil Inferior, CS.- Cuartil Superior, RC.- Rango Cuartilar].

Se compararon medianas de grupos dependientes con la prueba de Wicoxon. Se determinó que existió una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la molécula CD 62L en pacientes asmáticos con y sin estímulo con valor de $p < 0.0001$, así mismo en los sujetos sanos con valor de $p = 0.02$. Existió una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD 11a en pacientes asmáticos con y sin estímulo con valor de $p < 0.0001$, no así en los sujetos sanos, con un valor de $p = 0.4$.

DISCUSIÓN

Nosotros encontramos que los neutrófilos de los pacientes con asma bronquial moderada no alérgica expresan más L-selectina y discretamente más LFA-1 que los sujetos sanos, lo que sugiere un estado más activo de neutrófilos en los pacientes con asma bronquial. La expresión basal o aumentada de las moléculas de adhesión en leucocitos y en el endotelio inflamado, son el soporte de la acumulación focal y detención de leucocitos en los sitios de inflamación. En leucocitos activados, algunas moléculas de adhesión incrementan la participación de sus ligandos y/o su expresión, mientras que otras se despojan de éstas, presumiblemente para acomodarse, fijarse y migrar respectivamente.

En la literatura se ha informado que los extractos bacterianos de *Staphylococcus aureus* (Sa) tienen un efecto inmunomodulador y regulador de la migración de las células inflamatorias, uno de estos estudios demostró in vitro que la toxina de Sa estimulaba la mortalidad y adherencia de los granulocitos (58-59)

En nuestro estudio, posterior a la administración de extracto de Sa aumentó la expresión de L-selectina en neutrófilos, sugiriendo una mayor activación teórica de estas células, estos hallazgos se habían propuesto en un estudio previo (40). Sin embargo, este ensayo se había realizado con liposacáridos bacterianos y no con la bacteria completa como lo fue en el nuestro. En otro estudio, Fattorossi (43) encuentra una reducción en la expresión de L- selectina en linfocitos T CD4+ y en Polimorfonucleares, posterior a la administración de

bacteriano, en sujetos sanos de 9850 (CI 9741, CS 9898, RC 157) a 9808.5 (CI 9693, CS 9890, RC 197) (Gráfica 6) [CI.- Cuartil Inferior, CS.- Cuartil Superior, RC.- Rango Cuartilar].

Se compararon medianas de grupos dependientes con la prueba de Wicoxon. Se determinó que existió una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la molécula CD 62L en pacientes asmáticos con y sin estímulo con valor de $p < 0.0001$, así mismo en los sujetos sanos con valor de $p = 0.02$. Existió una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD 11a en pacientes asmáticos con y sin estímulo con valor de $p < 0.0001$, no así en los sujetos sanos, con un valor de $p = 0.4$.

DISCUSIÓN

Nosotros encontramos que los neutrófilos de los pacientes con asma bronquial moderada no alérgica expresan más L-selectina y discretamente más LFA-1 que los sujetos sanos, lo que sugiere un estado más activo de neutrófilos en los pacientes con asma bronquial. La expresión basal o aumentada de las moléculas de adhesión en leucocitos y en el endotelio inflamado, son el soporte de la acumulación focal y detención de leucocitos en los sitios de inflamación. En leucocitos activados, algunas moléculas de adhesión incrementan la participación de sus ligandos y/o su expresión, mientras que otras se despojan de éstas, presumiblemente para acomodarse, fijarse y migrar respectivamente.

En la literatura se ha informado que los extractos bacterianos de *Staphylococcus aureus* (Sa) tienen un efecto inmunomodulador y regulador de la migración de las células inflamatorias, uno de estos estudios demostró in vitro que la toxina de Sa estimulaba la mortalidad y adherencia de los granulocitos (58-59)

En nuestro estudio, posterior a la administración de extracto de Sa aumentó la expresión de L-selectina en neutrófilos, sugiriendo una mayor activación teórica de estas células, estos hallazgos se habían propuesto en un estudio previo (40). Sin embargo, este ensayo se había realizado con liposacáridos bacterianos y no con la bacteria completa como lo fue en el nuestro. En otro estudio, Fattorossi (43) encuentra una reducción en la expresión de L- selectina en linfocitos T CD4+ y en Polimorfonucleares, posterior a la administración de

extractos bacterianos en sujetos sanos. Esto tiene mayor coherencia, si pensamos en la aplicación clínica que se le ha dado al extracto de Sa, ya que el paciente asmático no alérgico, que es tratado con dicho extracto tiende hacia la mejoría (observación empírica). Esto nos sugiere, por un lado que el incremento que nosotros observamos en nuestro modelo, es por la acción exclusiva del estímulo en neutrófilos, sin la participación de otras células (linfocitos y células presentadoras de antígenos), los neutrófilos deben migrar en íntimo contacto o adhesión con substratos celulares y no celulares. Los neutrófilos actúan contra las células endoteliales y de esta manera migran de la circulación a sitios de inflamación activa o en proceso. Estas células interactúan con las células presentadoras de antígenos, los macrófagos alveolares y las células dendríticas epiteliales, ocurriendo así una respuesta inmune específica por un antígeno normal (60). En el estudio de Fattorossi se analizó la participación e interacción de otras células efectoras que pueden influir en la expresión de L-selectina en neutrófilos. Esta interacción muy probablemente se pueda atribuir a células T CD 4+. Sin embargo, esta exploración no fue orientada hacia las moléculas de adhesión, sino hacia las moléculas MHC Clase II.

Las glicoproteínas adhesivas de la superficie celular, son las principales reguladoras de casi todos los aspectos de la respuesta inmune inflamatoria. En el asma bronquial la regulación de las moléculas de adhesión en el endotelio son principalmente por linfocitos Th2 y por la liberación de derivados linfocitarios, como citocinas, tal es el caso de la IL-4, que ha sido implicada en participación del proceso, por la característico infiltrado linfocitario encontrado en este padecimiento. Más allá de proveer simplemente al leucocito de una tracción y un amarre, las glicoproteínas adhesivas de la superficie celular consuman el ataque entre célula y célula y entre célula y matriz, desempeñándose activamente en el papel de dirección y manejo de la respuesta inflamatoria.

Kanegane y cols (61) encontraron que las células T CD 4+ se dividían en dos grupos; con expresión de L-selectina y sin expresión de L-selectina, estas células fueron evaluadas por la producción de citoquinas que participan en la regulación de inmunoglobulinas. Los hallazgos observados por este grupo de investigadores encontró que las células T CD 4+ humanas positivas para L-selectina produce una gran cantidad de interleucina 4 y 5 (IL-4 e IL-5), mientras que las células T CD 4+ humanas negativas para L-selectina produce una

gran cantidad de interferon γ . Este perfil de expresión de citocinas coincide con el perfil que distingue a los sub-tipos de células T en Th1 y Th2.

Bloemen (33) sugiere que el desarrollo de la hiperreactividad en el asma bronquial no alérgica se debe en gran parte a la participación de la molécula LFA-1 y no a MAC-1 como se había apoyado en otros reportes, también reportó una disminución significativa en el porcentaje de células T CD 4+, asimismo una inhibición completa del influjo de neutrófilos, posterior al tratamiento con anticuerpos monoclonales específicos contra LFA-1, lo que sugiere que el evento está mediado por LFA-1 y no por MAC-1. Estos datos coinciden con los reportados por Scheynius y cols. (62). En nuestro estudio, la disminución de esta molécula podría relacionarse con una disminución del influjo de neutrófilos al sitio de inflamación, la reducción de LFA-1 secundaria a la administración de extracto de *Sa*, si correlaciona con la mejoría clínica observada en los pacientes que se han sometido a terapia con el extracto. Sin embargo, es importante conocer cual es el comportamiento de LFA-1 en células endoteliales, para conocer la relevancia del fenómeno.

Algunos estudios han señalado que la reactividad cruzada de LFA-1 en la superficie celular por anticuerpos pueden inducir ha señales intra-celulares, sugiriendo que la unión con el ligando puede afectar señales intra-celulares como apoptosis, citotoxicidad, proliferación, producción de citocinas y presentación de antígenos (63-64). Por lo que la reducción de LFA-1 secundaria a la estimulación con *Sa*, puede significar una modificación en la producción de citocinas y de esta forma afectar la proliferación celular produciendo una regulación en la expresión de esta molécula y su participación en el fenómeno inflamatorio, sin embargo, aun conociendo esta base teórica, no aporta suficiente información para conocer las vías que toma el *Sa* para modificar la expresión de estas moléculas. Además, puede sugerir una menor migración de la célula a los sitios de inflamación, ya que algunos reportes sugieren que la integración de esta molécula al citoesqueleto soporta el mecanismo de locomoción de la célula.

Finalmente, la adhesión en sí misma, bajo condiciones apropiadas de coestimulación/cooperación, causan la señalización, la impresión de la señal o la activación

de leucocitos. Esto obviamente sugiere que las moléculas de adhesión juegan un papel crítico en la respuesta inflamatoria del asma bronquial (65-67).

En comparación con el asma alérgica, no se ha puesto mucha atención en el asma no alérgica, sin embargo se sabe que la interacción inicial de los neutrófilos con el endotelio y con los propios neutrófilos es regulada por las selectinas, seguida por una apretada interacción regulada por las $\beta 2$ integrinas (36,68).

Por lo anterior, nosotros creemos que probablemente los hallazgos reportados se deban a que el extracto de *Staphylococcus aureus* puede encontrarse con el linfocito T CD 4+ antes de estimular al neutrófilo y de esta forma enviar una señal distinta (probablemente por ILs para reducir la expresión de L- selectina).

En conclusión, consideramos que el extracto de *staphylococcus aureus* puede inducir a un incremento en el número de neutrófilos que expresan L-selectina y reducir el número de neutrófilos que expresan LFA-1 y esta modificación en el número de neutrófilos que expresan estas moléculas, puede depender del estado basal de la célula, lo que sugiere que este extracto puede tener un efecto modulador de la respuesta inmune y muy probablemente participa en eventos clave de la respuesta inflamatoria y de la migración celular, por lo que es indispensable continuar estudiando dichos efectos antes de proponerlo como un modelo terapéutico en el asma bronquial.

REFERENCIAS

- 01.- Sheffer LA, Bousquet J, Busse WW. International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. *Eur Resp J* 1992; 5: 601-641
- 02.- Kaliner M, Lemaske R. Rhinitis and asthma. *JAMA* 1992; 268: 2807-2829
- 03.- Irvin GC, Wenzel S. Asthma: Structure and Function. *Chest* 1995;107:85s-86s
- 04.- Lai CK, Douglas C, Ho SS, Chan J, Lau J, Wong G, Leung R. Asthma epidemiology in the far east. *Clin Exp Allergy* 1996;26:5-12
- 05.- Martínez-Cairo CS, Salas RM, Segura MH. Los aspectos epidemiológicos del asma bronquial en la República Mexicana. *Gac Méd Méx* 1995;131:277-282
- 06.- Boner AL, Martinati LC. Diagnosis of asthma in children and adolescents. *Eur Respir Rev* 1997;7:3-7
- 07.- Busse WW, Bulla AH. Pathogenesis and sequelae of respiratory infections. *Rev Inf Dis* 1993; 13: (suppl 6) 447-485
- 08.- Bone RC. Goals of asthma management. A step-care approach. *Chest* 1996;109:1056-65
- 09.- Gosset P, Tillie Leblond I, Janin A, Marquette CH, Copin MC, Wallert B, Tonnel AB. Expression of E selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronquial biopsies from allergic and non allergic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106 : 69-77.
- 10.- Martínez-Cairo CS, Espinoza AJ, López RM. Quimiotaxis defectuosa de las células PMN de pacientes con asma bronquial. *Arch Invest Med* 1981;12:505-515
- 11.- BarnesPJ, Liew FW. Why does asthma become persistent. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;109:1056-65
- 12.- Shelhamer JH, Levine SJ, Wu T, Jacoby DB, Kaliner MA, Renard SI. NIH conference. Airway inflammation. *Ann Int Med* 1995;123:288-304
- 13.- Cisneros GN, Martinez-Cairo CS, Santos PJI. Efecto in vitro del extracto bacteriano de *S. aureus* en la quimioquinesis y quimiotaxis de células polimorfonucleares. *Rev Alergia Mex* 1995;42:9-13
- 14.- Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Newman W, Sterbinsky SA, Derse AC, Klunk D, Schleimer RP. Adhesión of human basophils, eosinophils and neutrophils to IL-1 activated human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1991;173 : 1553-1557

- 15.- Kobayashi T, Bashimoto S, Imai K. Elevation of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and sE-selectin levels in bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 1994; 96 (1): 110-5
- 16.- Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre T. Endothelial interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;13:93-100
- 17.- Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley, Fennie C, Gillet N, Watson SR, Rosen SD. An endothelial ligand for L-selectin in novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-938
- 18.- Munro JM, Pober JS, Contran RS. Recruitment of neutrophils in the local endotoxins response: Association with de novo endothelial expression of the endothelial leucocyte adhesion molecule 1. *Lab Invest* 1991;64:295-99
- 19.- Steina BU, Busse WW. Management of asthma. *Cont Int Med* 1995; 5 : 415-425
- 20.- Lub M, Van-Kooyk Y, Figdor CG. Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 1995;16:479-483
- 21.- Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Payan DG, Feehan C, Betangeri R. Neutrophil altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 1996;380:720-723
- 22.- Li X, Abdi K, Rawn J, Mackay CR, Mentzer SJ. LFA-1 and L- selectin regulation of recirculating tethering and rolling on lung microvascular endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14:398-406
- 23.- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990 ;4 :346-355
- 24.- Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Calderon M, Sapsford RJ, Davies RJ. The effect of conditioned medium from cultured human bronchial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 728-737.
- 25.- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity cell. *J Immunol* 1991; 67: 1033-1038
- 26.- Huang K, Fishwild DM, Wu HM Dedrick RL. Lipopolysaccharide-induced E-selectin expression continuous presence of LPS and is inhibited by bactericidal/permeability-increasing protein. *Inflammation* 1995; 19: 389-404
- 27.- Peer BJ, Denis JS. Expression in human neutrophils recovered from blood and BAL of asthmatics. *J Immunol* 1993; 151: 5639-5652
- 28.- Mengelers HJ, Maikos L, Brinkman L, Hoofbink B. Immunophenotyping of eosinophils and neutrophils recovered from BAL of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 345-351

- 29.- Knol EF, Takey F, Tedder TF, Klonk DA. Comparison of human eosinophil and neutrophil adhesion to endothelial cells under nonstatic conditions. Role of L-selectin. *J Immunol* 1994; 153: 2161-2167
- 30.- Chkaws Y, Yamauchi K. Expression of adhesion molecules in bronchial asthma. *J Immunol* 1993; 31 (suppl) 125-131
- 31.- Montefort S, Lai CK, Kapahi P, Leng J. Circulating adhesion molecules in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1149-1152
- 32.- Haskard D, Chan HS. Elevation of serum soluble intercellular adhesion. *Clin Exp Immunol* 1994; 84: 110-115
- 33.- Bloemen PG, Vadeb C, Tweel MC, Henricks PA. Expression and modulation of adhesion molecules of human bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 579-589
- 34.- Roche WR, Montefort S, Baker J, Holgate ST. Cell adhesion molecules and bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 586-593
- 35.- Michael S, Molligan S, Watson C. Protective effects of selectins chimers in neutrophil mediated lung injury. *J Immunol* 1993; 151: 6410-6417
- 36.- Bloemen PG, Buckley TL, Van den Tweel MC, Henricks PA, Redegeld FA, Koster AS. LFA-1, and not MAC-1, is crucial for the development of hyperactivity in murine model of non allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:521-529
- 37.- Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 1995 ;1 : 2259-2264
- 38.- Marrack P, Kappler J. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 19: 705-718
- 39.- Ryosuke Y, Shunichi S, Takuo F. Gamma interferon is produced by human natural killer cells but not T cells during staphylococcus aureus stimulation. *Infect Immunity* 1993; 61: 3117-3122
- 40.- Andrew JH, Walter N. Circulating adhesion molecule in disease. *Immunol Today* 1993; 14: 506-512
- 41.- Ishimata N, Takio K. Alternatively spliced isoform on P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *L Biol Chem* 1994; 269: 237-242
- 42.- Kinch SM, Jack LS, Doyle C. Cell adhesion mediated by CD4+ and MCH class II proteins requires active cellular processes. *J Immunol* 1993; 151: 4542-4561
- 43.- Fattorossi A, Casciaro A. Oral polyvalent vaccine (Buccalin Berna) administration activates selected T cell subsets and regulates the expression of polymorphonuclear leucocyte membrane molecules. *J Clin Lab Immunol* 1992; 38: 95-110

- 44.- Harvath. Granulocyte isolation protocol: Dextran sedimentation followed by Ficoll-Hypaque separation. *J. Immunol Methods* 1980; 37: 39-45
- 45.- Ferrante A, Thing TY. Separation of mononuclear leucocytes from human blood by the one-step Ficoll-Hypaque method is dependent on blood column height. *J Immunol Methods* 1982;48:81-3
- 46.- Miller JL, Baintosn DF, Borregard N, Springer A. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and P 150,95 adhesion proteins from intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest* 1987;80:535
- 47.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis FA, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 48.- Ferrante A, Martin JA, Bates EJ, Goh HBD, Harvey PD, Parsons D, Rathjen AD, Russ G, Dayers JM. Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor Necrosis Factor α Activated Neutrophils. *J Immunology* 1993;151:4821-28
- 49.- Tedder TF, Penta AC, Levine HB, Fredman AS. Expression of human leucocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu 8 differentiation antigens. *J Immunol* 1990;144:532-540
- 50.- Spertini O, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Tedder TF. Regulation of leucocyte migration by activation of the leucocyte adhesion molecule-1(LAM-1) selectin. *Nature* 1991;349:691-694
- 51.- Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991;66:921-933
- 52.- Lub M, Van Kooyk Y, Figdor CG. Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 1995;16:479-83
- 53.- Coon SJ, Weinstein RS. *Diagnostic Flow Cytometry*. Williams and Wilkins. London 1991
- 54.- Bochner BS, McKelvey AA, Schelimer RP, Hildreth JEK, MacGlashan DW. Flow cytometric methods for analysis of human basophils surface antigens and viability. *J Immunol Methods* 1989;125:265-69
- 55.- Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from a prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859-63
- 56.- Feinstein RA. L. On choosing a mean and other quantitative indexes to describe the location and dispersion of univariate data. *Clin Biostatistics* 1980;27:120-130
- 57.- Peace KE. The alternative Hypothesis: one-sided or two-sided. *J Clin Epidemiol* 1989;42:473-476

- 58.- Fontana VS. Gamma interferon is produced by human natural killer cells but not T cell during *Staphylococcus aureus* stimulation. *Infect Immunology* 1993;61:433-439
- 59.- Spangulo PJ, Ellner JJ. Comparative stimulation of granulocyte adherence and chemotaxis by bacterial products. *Infect Immunology* 1980;27:519-524
- 60.- Wegner CD, Gundel RH, Rely P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990; 247: 456-459.
- 61.- Kanegane HY, Kasahara Y, Niida Y, Yachie A, Suggi S, Takatsu K, Taniguchi N, Miyawaki T. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1-and Th2-like cytokine-producing memory CD4+ T cells. *Immunology* 1996;87:186-190.
- 62.- Scheynius A, Camp RL, Pure E. Reduce contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1993;150:655-663.
- 63.- Röpe PC, Gladstone P, Nielsen M, Borregard N, Ledbetter JA, Svejard A, Odum N. Apoptosis following interleukin-2 withdrawal from T cells: evidence for a regulatory role of CD18 (B-2-integrin) molecules. *Tissue Antigens* 1996;48:127-135.
- 64.- Lub M, Van Kooyk Y, Figdor CG. Ins and outs of LFA-1 *Immunology Today* 1995;16:479-483.
- 65.- Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and Mel-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; 245 :1238-1241.
- 66.- Van Seventer GA, Newman W, Shimizu Y, Nutman TB, Tanaka Y, Horgan KJ, et al. Analysis of the T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: Costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J Exp Med* 1991; 174: 901-913.
- 67.- Wegner CD, Wallace RW. Adhesion molecules that regulate inflammatory cell interactions. In Chung FK, Barnes PJ (Eds.) *Pharmacology of the respiratory tract: Clinical and experimental*. New York: Marcel Dekker, 1992 , pp.223-252.
- 68.- Walcheck B, Moore LK, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-Neutrophil Interactions under Hydrodynamic Shear Stress Involve L-selectin and PSGL-1: A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation on P-selectin in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:1081-1087

Figura 1

Clasificación de la gravedad del asma (1).

<i>Gravedad del asma</i>	<i>Características Clínicas antes del tratamiento</i>	<i>Función Pulmonar</i>	<i>Tratamiento usado regularmente para mantener el control</i>
LEVE	+ Episodios intermitentes y cortos + Síntomas <de 1-2 veces por semana + Síntomas de asma nocturna <a 2 veces al mes + Asintomático entre exacerbaciones	+ PEF > 80% del valor previsto del paciente + Variabilidad del PEF < 20% + PEF normal después del uso del broncodilatador	+ Uso intermitente de agonistas beta 2, de acción corta (lo toma sólo cuando lo necesita)
MODERADA	+ Exacerbaciones > 1-2 veces por semana + Síntomas de asma nocturna > 2 veces al mes + Los síntomas requieren beta 2 agonistas casi diariamente.	+ PEF 60-80% del valor previsto del paciente + Variabilidad del PEF 20-30% + PEF normal después del uso del broncodilatador	+ Inhalación diaria de agentes antiinflamatorios + Posiblemente uso diario de broncodilatadores de larga acción, especialmente para síntomas de asma nocturna
GRAVE	+ Exacerbaciones frecuentes + Síntomas continuos + Síntomas de asma nocturna frecuentes + Actividades físicas limitadas por el asma + Hospitalización por asma en el año previo + Exacerbación previa con amenaza a la vida	+ PEF < 60% del previsto del paciente + Variabilidad > 30% + PEF por debajo de lo normal a pesar de una terapia óptima	+ Inhalación diaria de agentes antiinflamatorios a altas dosis + Uso diario de broncodilatadores de larga acción, especialmente para síntomas de asma nocturna + Uso frecuente de corticoesteroides sistémicos

FIGURA 2.

MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN LA VÍA AÉREA.

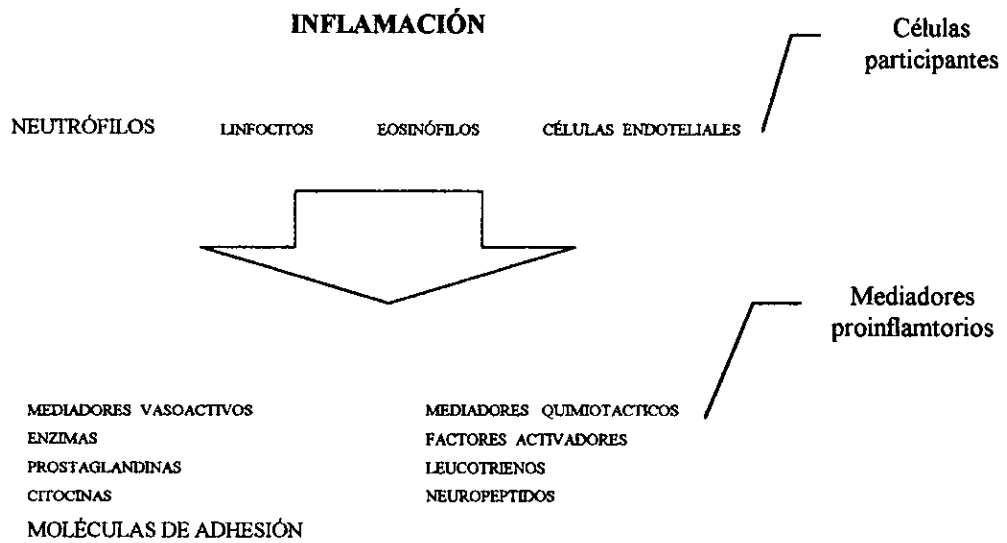
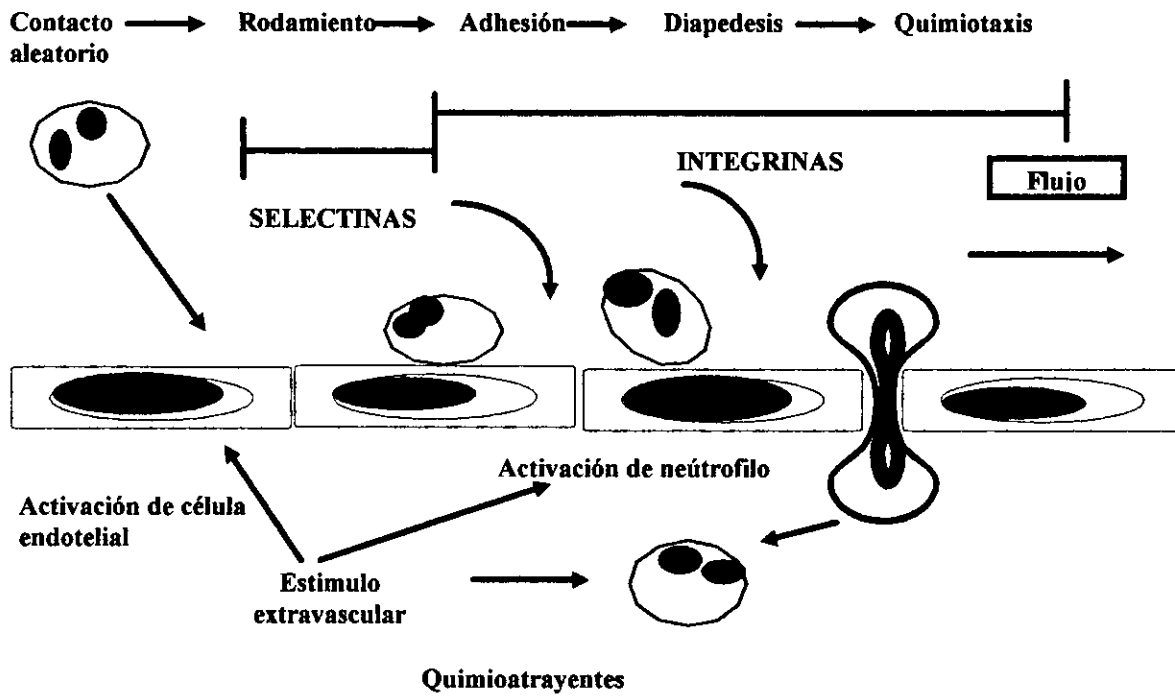


Figura 3.

a)



b)

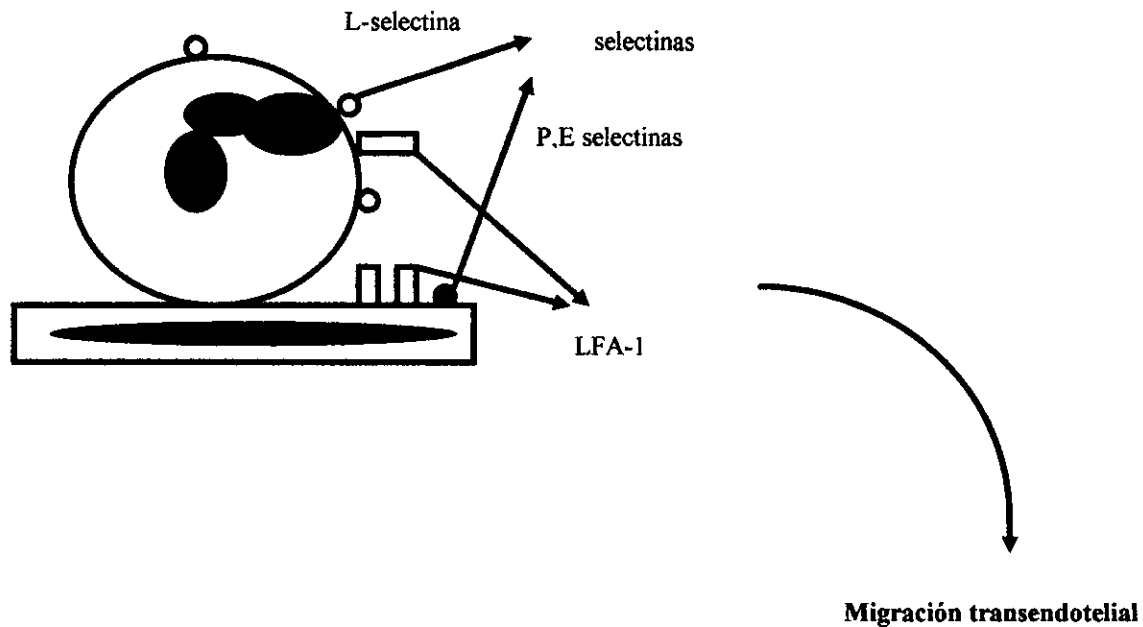
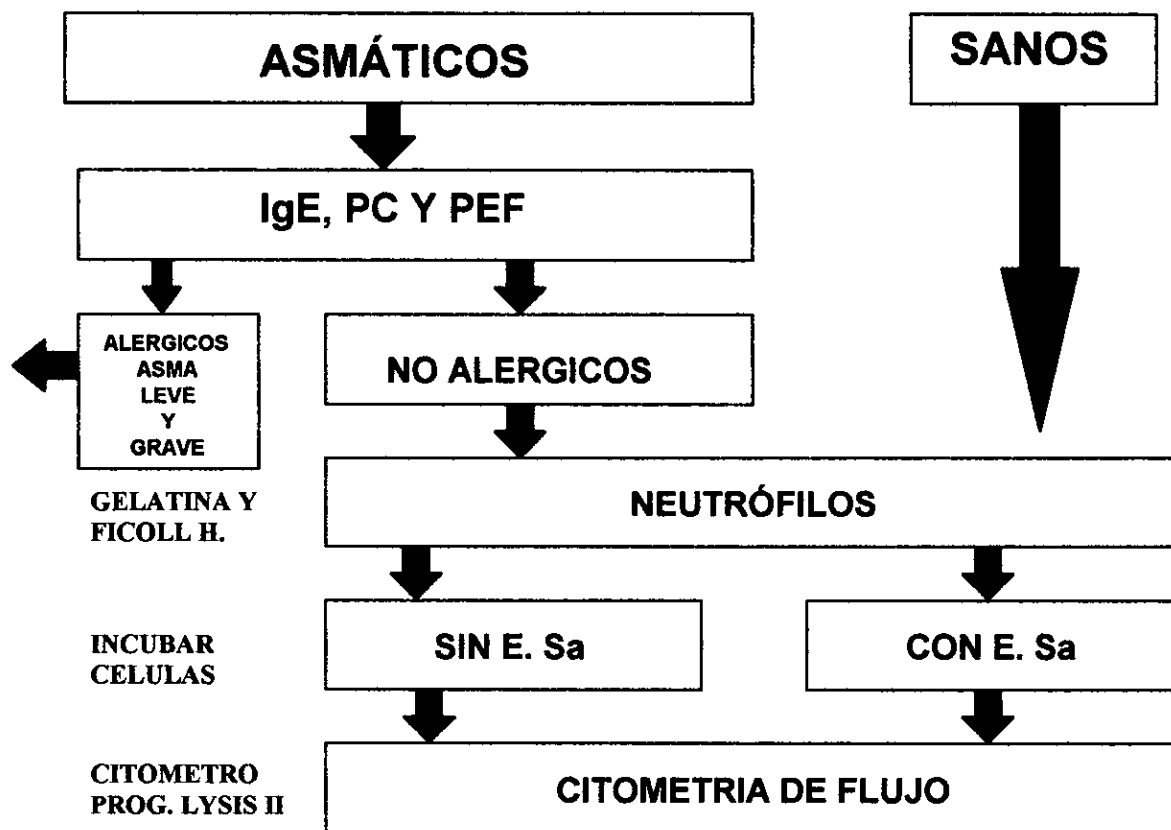
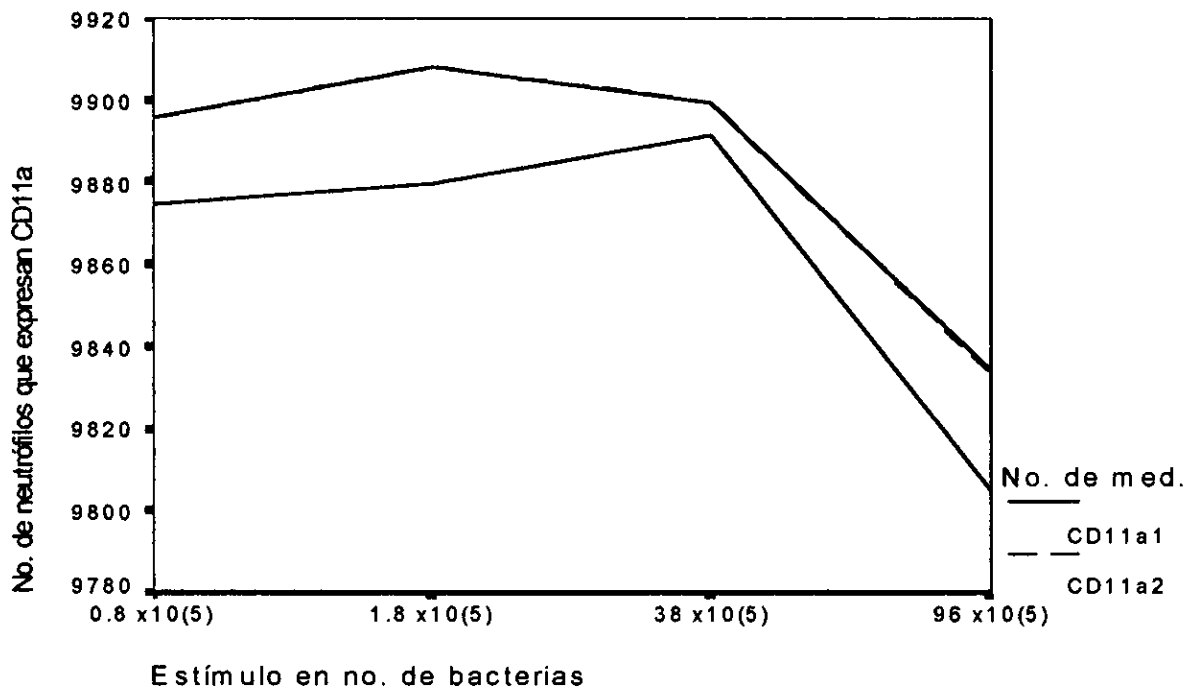
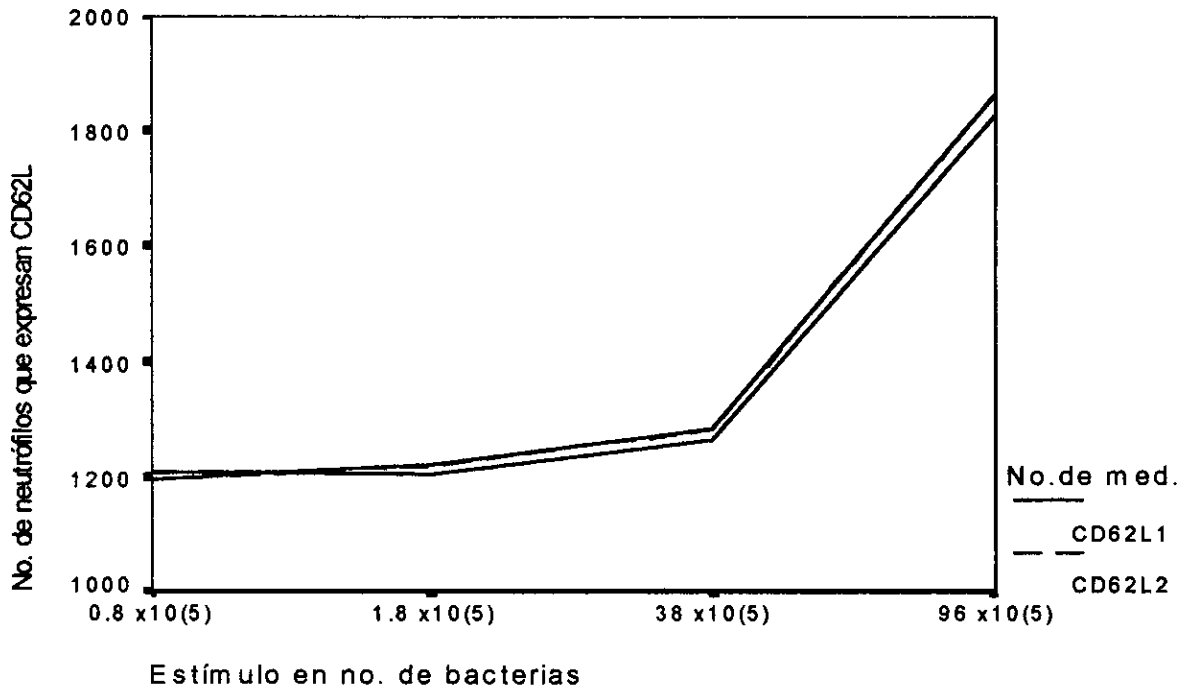


FIGURA 4.

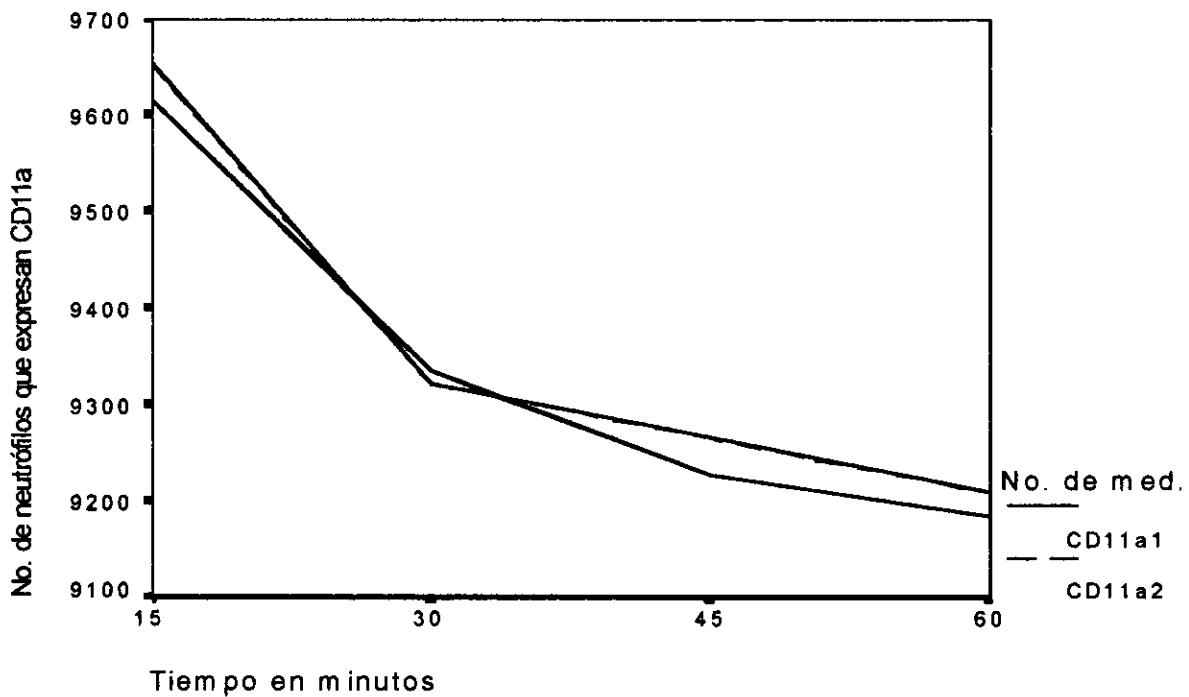
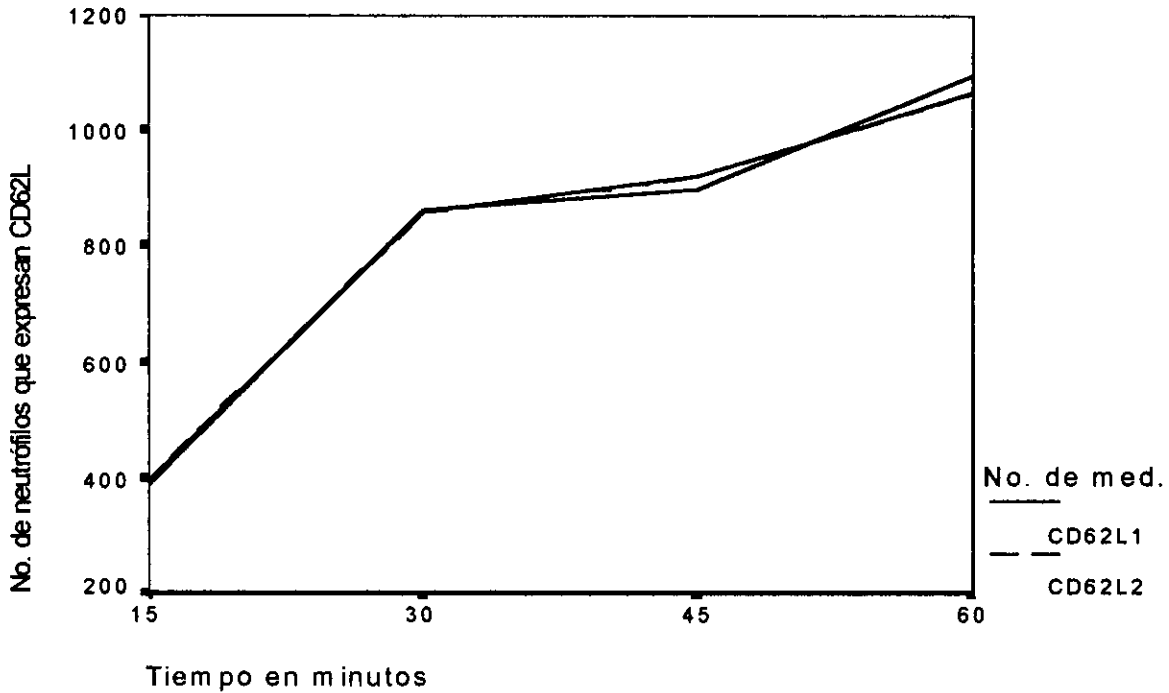
PROCEDIMIENTO



GRÁFICA 1. ESTANDARIZACIÓN POR NÚMERO DE BACTERIAS. (media de 5 ensayos independientes por duplicado)



GRÁFICA 2.- ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE ESTÍMULO (media de 5 ensayos independientes por duplicado)



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

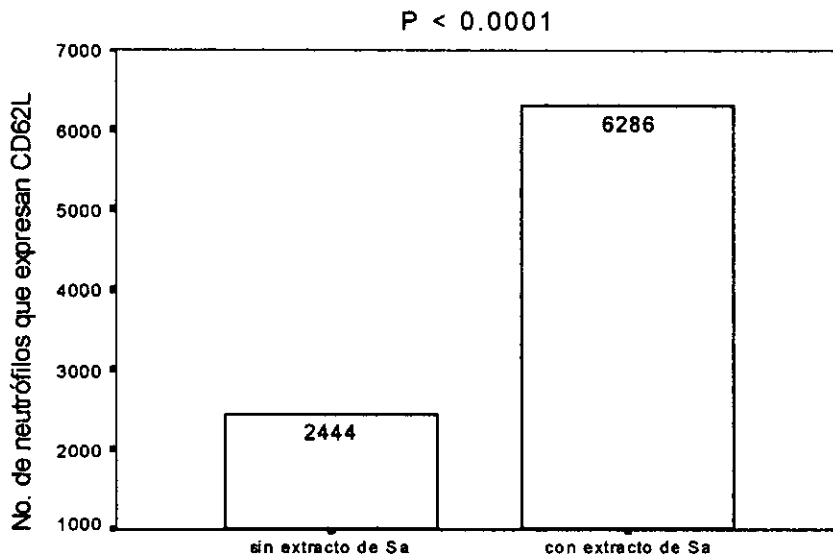
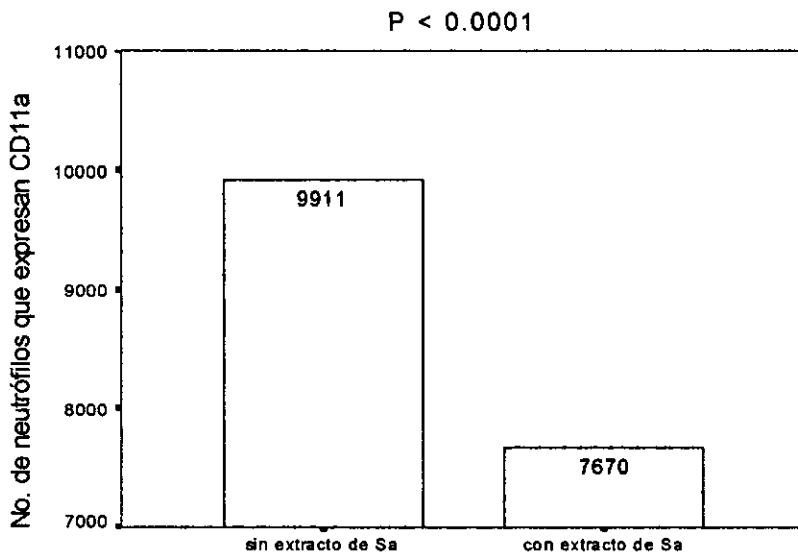
TABLA 1.

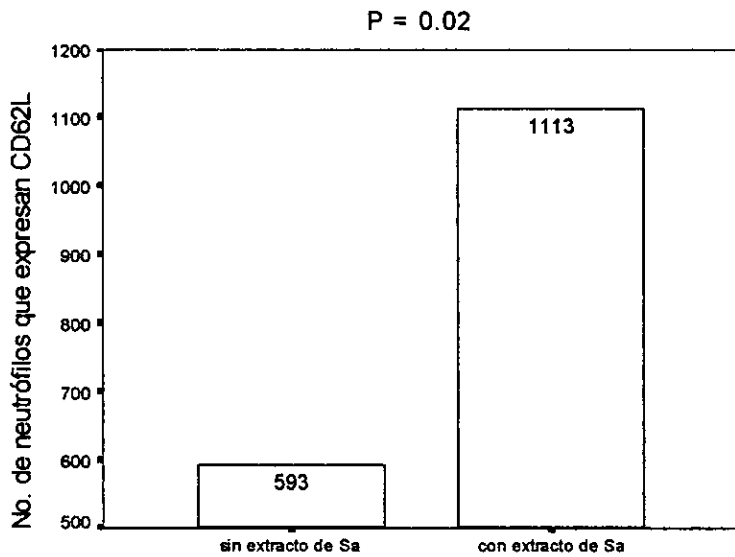
Características de edad y sexo estudiadas en pacientes con asma bronquial moderada y sujetos sanos.

CARACTERISTICA	PACIENTES ASMÁTICOS (12)	CONTROLES SANOS (12)
edad (años) *	25 +/- 9.6	24.2 +/- 4.9
sexo (m/f) **	6/6	5/7

* Media y desviación estándar

**Frecuencias absolutas

GRÁFICA 3.**EXPRESIÓN DE CD 62L EN PACIENTES ASMÁTICOS (mediana).****GRÁFICA 4.****EXPRESIÓN DE CD 11a EN PACIENTES ASMÁTICOS (mediana).**

GRÁFICA 5.**EXPRESIÓN DE CD 62L EN SUJETOS SANOS (mediana).****GRÁFICA 6.****EXPRESIÓN DE CD 11a EN SUJETOS SANOS (mediana).**