



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**“EVALUACION DE LA FUNCION DE  
ADHERENCIA DE LEUCOCITOS  
POLIMORFONUCLEARES.”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

Verónica Monroy Martínez

CUAUTITLAN IZCALLI, MEX. 1988.

**TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN**



## **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

INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	3
ADHERENCIA DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES.....	17
ALTERACIONES DE LA FUNCION DE ADHERENCIA.....	26
METODOS DE ESTUDIO DE LA FUNCION DE ADHERENCIA.....	28
PENTOXIFILINA.....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	33
OBJETIVOS DE LA TESIS.....	34
MATERIAL Y METODOS.....	35
RESULTADOS.....	43
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES.....	58
ANEXO I.....	59
ANEXO II.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	62

## RESUMEN

En el desarrollo de un proceso infeccioso, se desencadenan una serie de eventos importantes llevados a cabo por los polimorfonucleares (PMNs); un mecanismo es la adherencia, establecida como paso previo a otros procesos cruciales en la defensa del hospedero. Existe marcada susceptibilidad de pacientes desnutridos a procesos infecciosos, condicionada entre otros factores por la disfunción de células fagocíticas, habiéndose reportado que la capacidad migratoria de PMNs se encuentra dañada (4). Nos propusimos evaluar la función de adherencia en niños desnutridos utilizando como control niños eutróficos y adultos voluntarios sanos para ver si podría ser restaurada mediante el uso de pentoxifilina, fármaco que incrementa la deformabilidad de eritrocitos y restaura el movimiento de receptores de membrana (23). La metodología a seguir fué la separación de PMNs y posterior evaluación de la adherencia por la técnica de Mc Gregor (39). Encontramos que los PMNs de niños desnutridos presentan un estado de hiperadhesividad significativamente mayor al grupo de adultos y niños eutróficos; su respuesta no varía en presencia de  $C_{5}a$  como estímulo inflamatorio. La pentoxifilina disminuye potencialmente la adherencia en los tres grupos de estudio, siendo capaz de restaurar la respuesta al estímulo inflamatorio en niños desnutridos. Concluimos que los PMNs de niños desnutridos presentan una adhesividad basal elevada, lo que los hace incapaces de responder ante estímulos inflamatorios - lo que puede comprometer la respuesta al proceso infeccioso. La pentoxifilina puede ser útil como coadyuvante en el tratamiento de infecciones en este tipo de hospederos.

## INTRODUCCION

Desde 1882, año en que Ellie Metchnikoff descubrió la importancia de las células fagocíticas en la resistencia del organismo contra las enfermedades infecciosas, se dió lugar al desarrollo de grandes avances tecnológicos y principalmente en los últimos 20 años se han logrado progresos remarcables en la comprensión de la actividad celular biológica y bioquímica que interviene en la eliminación de procesos infecciosos (20).

La continua identificación de pacientes con infecciones recurrentes y otras anormalidades asociadas al sistema inmune, han llevado a la convicción de la importancia que tienen las células fagocíticas en la respuesta del hospedero ante la agresión microbiana, reconociéndose que los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) juegan un papel fundamental como primera línea de defensa en la resistencia a las infecciones, evidenciadas por el incremento de la susceptibilidad a las mismas en caso de alteraciones del número o función de estas células, presentes en forma congénita o adquirida (36).

La respuesta de los PMNs involucra una serie compleja de eventos fisiológicos y metabólicos en respuesta al estímulo inflamatorio que incluyen: la producción y liberación celular por la médula ósea, adherencia, diapedesis y finalmente la fagocitosis en el sitio de infección un defecto de alguno de los pasos precedentes a la fagocitosis, redunda en el éxito de la invasión bacteriana (27).

Nos hemos propuesto estudiar el fenómeno de adherencia que constituye un paso fundamental previo a la salida de neutrófilos del continente vascular en niños y adultos normales, dado que no se cuentan con estudios realizados en nuestra población; igualmente resulta de gran interés estu-

diar estos procesos en la población pediátrica desnutrida, - la cual es una de las principalmente afectadas por infecciones recurrentes y que constituye un problema prioritario de la salud pública en nuestro país. Asimismo, es importante -- realizar investigaciones sobre la posible resolución de los defectos de la función de neutrófilos, realizando para ello estudios experimentales con nuevos fármacos que puedan ac---tuar -en este caso- en el fenómeno de adherencia, para lo -- cual nos proponemos investigar el posible efecto de la pentoxifilina, un fármaco introducido en 1978 para el tratamiento de enfermedades vasculares oclusivas, la cual en reportes -- previos se ha demostrado que mejora la capacidad funcional - de neutrófilos de recién nacidos (5, 23).

## GENERALIDADES

Hace un siglo, Metchnikoff observó que las células fagocíticas de ciertas esponjas marinas ingerían y destruían a los hongos invasores; por el contrario si el hongo no era destruído se desencadenaba una diseminación fúngica fatal, con lo cual predijo que las anomalías de las células fagocíticas podían comprometer la defensa del hospedero.

Un siglo después, este concepto fué demostrado, constatóndose que las deficiencias cuantitativas o funcionales de los neutrófilos PMNs circulantes culminaban en el desarrollo de infecciones bacterianas y fúngicas, siendo elementos claves en la resistencia a infecciones (36).

### NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES (PMNs):

Los neutrófilos PMNs son las células más numerosas que actúan en la defensa contra las infecciones microbianas. Su número total oscila entre 5000 a 8000 células/mm<sup>3</sup> en el adulto normal, pero en niños este número varía de acuerdo al grupo etario.

Proviene de células madres pluripotenciales de la médula ósea madurando en un período de 6 a 14 días (figura 1); no se replican en la etapa final y tienen una vida media de aproximadamente 6 horas en circulación y 24 en localizaciones extravasculares; aproximadamente 100 billones de PMNs se destruyen en el organismo cada día, principalmente a nivel de intestino y otras mucosas, liberándose de la médula ósea en igual número diariamente (33, 41).

En cuanto a su desarrollo clonal, las células precursoras específicas de PMNs dependen de la presencia de moléculas glicoproteicas conocidas colectivamente como factores estimuladores de colonia (CSF), siendo regulados según los requerimientos por estos factores (10).

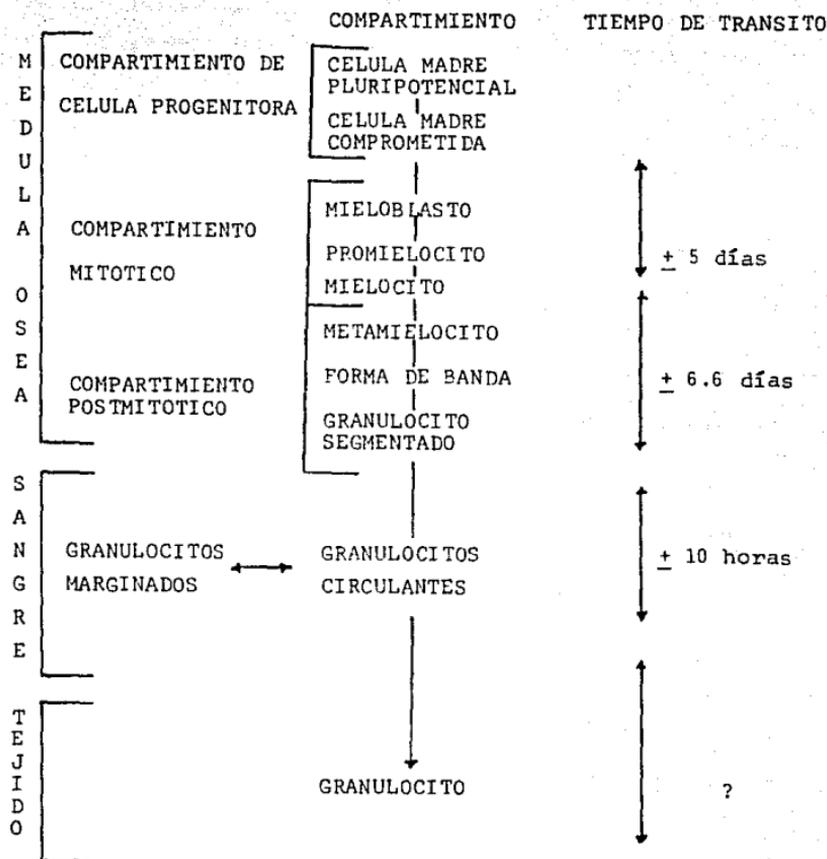


FIGURA 1. MADURACION DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEAPES.  
Adaptado del Walker y col. (41).

Los neutrófilos PMNs contienen un núcleo multilobulado, altamente condensado y metabólicamente inactivo, con gran abundancia de gránulos en su citoplasma (por lo que se conocen también como granulocitos) equipados con numerosas - enzimas antimicrobianas destinadas a la muerte y destrucción de agentes invasores (17, 43).

Estos gránulos se dividen en primarios, secundarios y terciarios, siendo biológica, morfológica y funcionalmente distintos.

#### GRANULOS PRIMARIOS:

Aparecen en la etapa promielocítica del desarrollo celular en médula ósea; bioquímica y citoquímicamente se ha demostrado que son lisosomas y adoptan un color azul con la coloración de Wright o Giemsa (por lo que se conocen como azurófilos). Contienen abundantes enzimas lisosomales hidrolíticas, gran cantidad de mieloperoxidasa (cuyo tinte verdoso es responsable en gran parte de la coloración del pus) y péptidos catiónicos de gran espectro microbicida de nominados defensinas. (31).

#### GRANULOS SECUNDARIOS:

Aparecen a medida que la célula madura, aproximadamente en la etapa de metamielocito; son más pequeños y se tiñen mal, van superando en número a los primarios a medida que progresa el proceso de maduración; contienen lactoferrina, citocromo B, proteína fijadora de vitamina B<sub>12</sub>, lisozima y colagenasas (33).

#### GRANULOS TERCARIOS:

Se distinguen por la presencia de fosfatasa ácida que desempeña una función microbicida por mecanismos desconocidos. Igualmente son abundantes en colagenasas (31,36).

## ULTRAESTRUCTURA DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES.

La funcionalidad de los PMNs dependen en gran parte de la constitución morfológica de su citoesqueleto, el cual está compuesto por microtúbulos y microfilamentos que se pueden observar mediante el uso de microscopio electrónico o de fluorescencia. (36).

Los microfilamentos ocupan la porción del citoplasma inmediatamente subyacente a la membrana plasmática, ocupando protuberancias y regiones onduladas de ésta, proyectando -- así un acceso a los gránulos citoplasmáticos de la célula. Están formados por fibras de 60 Å de diámetro aproximado, - compuestos en su mayoría por una proteína globular llamada actina. La polarización de esta proteína provoca cambios en el citoesqueleto membranal del PMN y con ello, la emisión - de pseudopodos, de gran trascendencia en el proceso de diapedesis y en procesos endocíticos, pudiendo conferir una estructura rígida a la membrana que provoca la restricción en el movimiento integral de las proteínas membranales (regulación de la fluidez de la membrana celular). (31).

Los microtúbulos están formados por fibras de 240 Å de - diámetro radial aproximado; compuestos en su mayoría por -- una proteína dimérica llamada tubulina, la cual está com--- puesta por dos subunidades no idénticas (alfa y beta), de - un peso molecular aproximado de 55000 daltons. Se originan en los centriolos, extendiéndose del centro de la célula ha - cia todas direcciones; su función aún no esta esclarecida, aunque se piensa que sirven más bien como esqueleto interno que aumenta la rigidez y mantiene la forma de la célula.(31, 41).

## EVENTO FAGOCITICO.

En respuesta a la invasión microbiana, los neutrófilos - PMNs desarrollan una serie ordenada de acontecimientos de gtinados al encuentro y destrucción del agente agresor.

La adherencia, quimiotaxis y fagocitosis con la poste---rior activación de los mecanismos antimicrobianos, son los procesos que en conjunto constituyen el evento fagocítico; de la indemnidad funcional de cada uno de estos pasos, de---penderá que el proceso infeccioso pueda ser controlado y re suelto.

### ADHERENCIA:

Al sobrevenir el proceso infeccioso se desencadenan una serie de estímulos inflamatorios, con lo cual se activan -- los PMNs adhiriéndose al endotelio.

Antiguamente esto se explicaba mediante tres mecanismos:

- a) El endotelio cambiaba tornándose pegajoso.
- b) Los leucocitos se tornaban excesivamente adherentes.
- c) Existe una sustancia extraña que actuaba como puente de unión (34).

Actualmente estos mecanismos han sido modificados ampliándose estos criterios, sobre todo a partir de los descubri---mientos de Springer (20).

La adherencia depende de la expresión de proteínas de ad hesión, proteínas del complemento, endotoxinas, así como -- agentes farmacológicos, como explicaremos posteriormente al referirnos a este tema (41).

### QUIMIOTAXIS:

Los PMNs, son capaces de migrar en forma dirigida median---te el proceso de quimiotaxis en respuesta a agentes quími---cos con actividad quimioatrayente, llamados quimiotaxinas, dirigiéndose así con rapidez variable hacia el foco inflama---torio. ( 35).

Existen diferentes sustancias con actividad quimioatrayente sobre los PMNs, entre los que se encuentran los siguientes:

- Fragmentos del desdoblamiento del componente  $C_5$  ( $C_5$  activado), formado durante la fragmentación de proteínas -- del complemento como consecuencia de la activación por alguna de sus dos vías: la clásica o la alterna (17).
- Fragmentos de  $C_3$  que se descubren después del desdoblamiento por proteasas tisulares ( $C_3$  activado) o por activación de la cascada del complemento.
- Factores bacterianos solubles (formil-péptidos), productos del metabolismo bacteriano, que pueden aislarse de -- filtrados de diversos microorganismos (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus pyogenes).
- Prostaglandinas.
- HETE (hidroperoxieicotetraenoico, leucotrieno  $B_4$ ). (17, 45).

La modulación de los receptores de factores quimiotácticos a nivel de la membrana contribuye a dirigir la migración de los PMNs por la diferente densidad de estos receptores como resultado de la translocación de los mismos durante la polarización, corrigiendo así el PMN su dirección constantemente, haciéndola sumamente específica (36).

#### OPSONIZACION:

La opsonización puede ocurrir por anticuerpos IgG específicos (opsonina termoestable), unidos al agente extraño por su porción variable o Fab'; al poseer los fagocitos - receptores para la porción constante de la inmunoglobulina, el fragmento Fc, se forma una especie de puente (la - Ig acerca la partícula al fagocito); en forma semejante - puede actuar el componente  $C_{3b}$  generado durante la activación del complemento (opsonina termolábil), el cual puede

depositarse sobre el germen a ser ingerido y actuar como medio de unión al fagocito que posee receptores específicos para  $C_3b$  denominados CRI. (33).

La opsonización favorece la fagocitosis incrementando la efectividad del proceso por reconocimiento de los agentes extraños con el posterior englobamiento por las células fagocíticas. (figura 2). (17, 33).

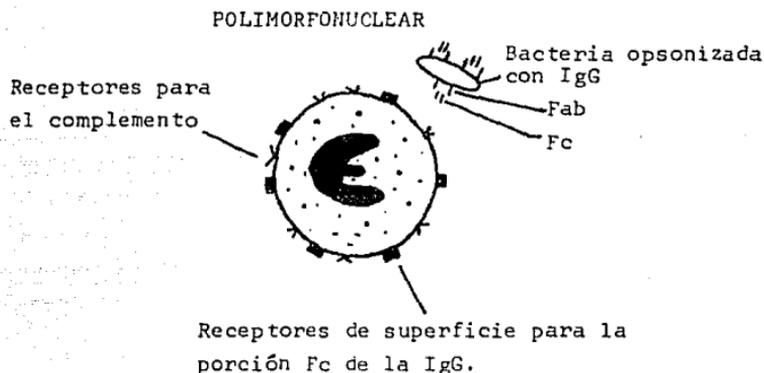


FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESO DE OPSONIZACION. Adaptado de Fudenberg y col. (17).

### FAGOCITOSIS:

La fagocitosis con la consecuente activación de los sistemas antimicrobianos de PMNs son dos de los beneficios principales del proceso inflamatorio. (41).

En este proceso, las células tienen por finalidad eliminar el agente extraño y remover los tejidos dañados o envejecidos, para lo cual ingieren y degradan las células.

Posterior al reconocimiento de los agentes extraños, -

se produce la ingestión, proceso que requiere de la producción de energía por el PMN y que ocurre con rapidez variable después del contacto del microorganismo recubierto por complemento y anticuerpos con la superficie del PMN. (26).

Como consecuencia de la ingestión, la partícula queda incluida en una vesícula membranosa llamada fagosoma y se generan una serie de mecanismos enzimáticos oxidativos en la célula, que en conjunto han sido denominados estallido respiratorio. Durante este proceso se producen metabolitos --- reactivos que aunados a enzimas hidrolíticas, proteolíticas y péptidos catiónicos conforman los elementos microbicidas de los PMNs (figura 3).

Posterior a la ingestión se produce la fusión de membrana del fagosoma con los gránulos citoplasmáticos adyacentes, que descargan su contenido en la vacuola fagocítica, para causar la muerte y digestión del microorganismo. En esta -- etapa actúan los mecanismos antimicrobianos de las células. Dichos mecanismos se dividen en: dependientes de oxígeno e independientes de oxígeno (cuadro 1). (26).

CUADRO 1. SISTEMAS ANTIMICROBIANOS DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

---

I. DEPENDIENTES DE OXIGENO	II. INDEPENDIENTES DE OXIGENO
A. Mediado por mieloperoxidasa.	A. pH ácido
B. Independientes de mieloperoxidasa.	B. Lisozima
1. Peróxido de hidrógeno	C. Lactoferrina
2. Anión superóxido	D. Proteínas catiónicas granulares.
3. Radicales hidroxilo	
4. Singlete de oxígeno	

---

Adaptado de Klebanoff, (26).

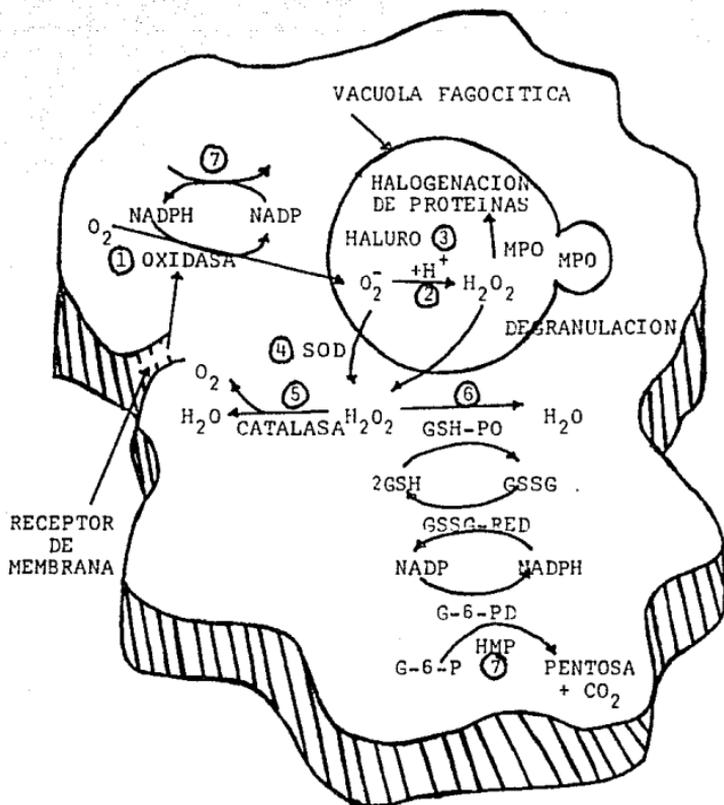


FIGURA 3. MECANISMOS MICROBICIDAS DEL METABOLISMO OXIDATIVO QUE OCURREN DURANTE LA FAGOCITOSIS (17).

- 1) Como consecuencia del contacto de una partícula con la membrana del PMN, se activa un sistema de flavoenzimas asociada a la membrana, al que se le conoce comúnmente como "NADPH oxidasa". El NADPH oxidasa cataliza la reducción de un electrón de  $O_2$  a superóxido ( $O_2^-$ ), usando NADPH como donador del electrón:
- 2) Dos moléculas de superóxido se combinan en presencia de la enzima SOD para formar peróxido de hidrógeno.
- 3) La MPO es depositada por degranulación en las vacuolas fagocíticas donde en presencia de  $H_2O_2$  y haluros cataliza las reacciones de halogenación de proteínas.
- 4) El superóxido que escapa de la vacuola fagocítica es reducido a  $H_2O$ , mediante la SOD o dismutación espontánea.
- 5-7) El  $H_2O_2$  citoplasmático es detoxificado por los sistemas catalasa y glutatión-peroxidasa-glutatión-reductasa.

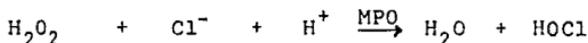
## I. SISTEMAS ANTIMICROBIANOS DEPENDIENTES DE OXIGENO.

Los mecanismos antimicrobianos dependientes de oxígeno - se dividen en dos, aquellos que están mediados por mieloperoxidasa y los que no lo están.

### A. Mediado por mieloperoxidasa (MPO):

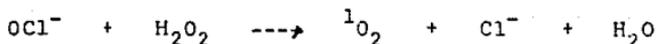
La mieloperoxidasa es una enzima que tiene un grupo hemo con peso molecular aproximado de 150000 daltons, localizada en gránulos azurófilos; juega un papel importante en la destrucción de microorganismos y su acción es óptima a pH ácido; utiliza peróxido de hidrógeno como sustrato y cataliza la oxidación de un gran número de sustancias por medio de una reacción peroxidativa. En este contexto puede oxidar --iones haluro con la consiguiente formación de hipo-haluros, los cuales se comportan como poderosos oxidantes (33).

Esto se lleva a cabo mediante la siguiente reacción:



La mieloperoxidasa junto con el peróxido de hidrógeno, -factores haluro oxidables y un pH ácido, integran un sistema antimicrobiano potente en el fagolisosoma con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales y antimicoplasmáticas. (17,26).

El hipohaluro ( $\text{OCl}^-$ ) producido por la reacción de la MPO puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir el singlete de oxígeno ( $\text{O}_2^1$ ) mediante la siguiente reacción:



El singlete de oxígeno puede reaccionar con componentes moleculares de la membrana que contienen dobles ligaduras - en su estructura, pudiendo ser letal para el microorganismo con el que tenga contacto, al producir cambios irreversibles en los mismos.

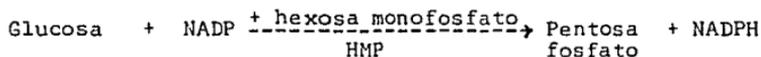
Se han propuesto varios mecanismos explicativos de la acción microbicida del sistema  $MPO-H_2O_2$ - Haluro:

1) La halogenación de sitios blanco como residuos de tirosina, aminas y grupos sulfhidrilo, de los microorganismos con la consiguiente pérdida de su función o estructura.

2) La descarboxilación oxidativa de aminoácidos con la generación de aldehídos tóxicos y la producción del singlete de oxígeno. Los aminoácidos o proteínas pueden ser clorinados, formándose potentes cloraminas o cloramidas tóxicas, ocasionando la descarboxilación y desaminación de aminoácidos formando como producto  $CO_2$ , amonio y un aldehído (18).

#### B. Independientes de mieloperoxidasa:

La fagocitosis de los PMNs se asocia a un incremento súbito en el consumo de oxígeno provocando con esto un aumento en el metabolismo de la glucosa, produciéndose NADPH mediante la siguiente reacción: (35).

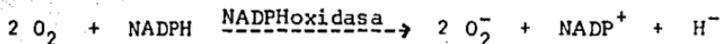


Secundariamente, se producen metabolitos oxidativos tóxicos durante el estallido respiratorio a cuyos componentes nos referiremos brevemente a continuación:

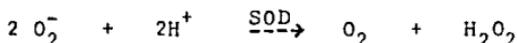
#### I. GENERACION DE ANION SUPEROXIDO Y PEROXIDO DE HIDROGENO:

Al producirse el contacto de la partícula a ser ingerida

con la membrana del PMN, se activa la enzima NADPHoxidasas, la cual cataliza la oxidación del oxígeno molecular a anión superóxido ( $O_2^-$ ).

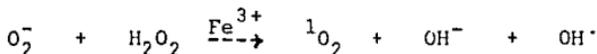


El anión superóxido es altamente reactivo y puede actuar como oxidante o reductor; cuando actúa como oxidante es reducido a peróxido de hidrógeno. De gran importancia para la función microbicida del PMN es la interacción de dos moléculas de anión superóxido en una reacción de dismutación espontánea con la formación de peróxido de hidrógeno, sobre todo a un pH bajo como el que se encuentra en el fagolisosoma; esta reacción también puede ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa. La reacción es la siguiente:



### 3. GENERACION DE RADICALES HIDROXILO:

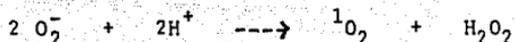
El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno en solución acuosa pueden reaccionar entre sí, en presencia de metales catalíticos tales como el hierro, formando radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) el cual puede ser producido también directamente por la reducción de peróxido.



### 4. FORMACION DEL SINGLETE DE OXIGENO:

Una rápida y no catalítica dismutación de anión superóxido, conduce a la formación del singlete de oxígeno ( ${}^1O_2$ ) y -

peróxido de hidrógeno por la siguiente reacción:



Todas estas especies representan estados excitados de -- energía altamente reactivos y sumamente tóxicos para los organismos. (17, 26).

## II. MECANISMOS INDEPENDIENTES DE OXIGENO:

### A. pH ACIDO:

Duante la formación de la vacuola fagocítica, el pH desciende, principalmente debido a la producción de lactato durante la glucólisis, e influye sobre los microorganismos, afectándolos directamente, ya sea por ácidos orgánicos o lipofílicos; por otra parte, la acidez proporciona un medio óptimo para el funcionamiento enzimático de MPO, además de que facilita la digestión de organismos intracelularmente por aumentar la actividad de hidrolasas ácidas lisosomales. (17).

### B. LISOZIMA:

La acción de la lisozima es hidrolizar la pared celular de los microorganismos; es una proteína catiónica de bajo peso molecular (aproximadamente 14500 daltons), termoestable y ataca específicamente enlaces beta-1,4, que unen al ácido N-acetil-murámico con el N-acetil-glucosamina del péptido--glicano, constituyente fundamental de la pared bacteriana. (26).

### C. LACTOFERRINA:

Es una proteína proveniente de gránulos específicos de -

alta afinidad por el hierro; puede inhibir el desarrollo de los microorganismos al competir con ellos por el hierro del medio; por otra parte, facilita la producción de radicales hidroxilo (26).

#### D. PROTEINAS CATIONICAS GRANULARES O DEFENSINAS:

Estas proteínas son ricas en arginina, de un peso molecular generalmente bajo; son más activas a pH neutro; afectan la capacidad de los microorganismos para desarrollarse sin destruir su integridad estructural. Actúan en cooperación - con otros mecanismos antimicrobianos dañando la membrana micro**bi**ana (26).

## ADHERENCIA DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES.

Diversos factores están involucrados en la función de adherencia, los cuales pueden actuar de manera directa o indirecta sobre los neutrófilos PMNs. Estos factores los podemos clasificar de la manera siguiente:

- 1) Factores intrínsecos del PMN.
- 2) Factores que afectan la membrana del endotelio.
- 3) Factores encontrados en el plasma.
- 4) Factores farmacológicos que pueden afectar alguno de los mencionados anteriormente (34).

### 1) FACTORES INTRINSECOS DEL POLIMORFONUCLEAR:

En 1979 Springer (20), descubrió una serie de anticuerpos monoclonales, específicos para antígenos leucocitarios murinos capaces de afectar la respuesta de los leucocitos - en el proceso inflamatorio; esto marcó la pauta para una serie de observaciones vitales que permitieron la comprensión de las bases moleculares de la adherencia de leucocitos murinos, que más tarde se descubrirían para humanos.

Las proteínas involucradas en la interacción adhesiva de neutrófilos PMNs con el endotelio vascular, son un complejo glicoproteico que consiste de tres subunidades designadas - como LFA-1, Mac-1 (conocido también como Mol) y p.150.95, - respectivamente (a partir del segundo congreso de trabajos internacionales sobre diferenciación de antígenos leucocitarios humanos celebrado en Nueva York en 1985, se designa al conjunto anterior como CDw18). (20, 28, 32).

Estos antígenos glicoproteicos están formados por dos cadenas: la cadena beta, que es idéntica en los tres y la cadena alfa, que es la porción variable; las subunidades Mol y LFA-1 (antígeno asociado a la función linfocítica), contienen una cadena alfa de 150 a 177 KDa y una cadena beta -

de 95 KDa, unidas por un enlace no covalente (28).

La cadena alfa del antígeno Mol (llamada alfa 1), es reconocida por los anticuerpos monoclonales OKM-1, Mac-1 y --Mol, que pueden ligar con neutrófilos y monocitos; mientras que la cadena alfa del antígeno LFA-1 (llamada alfa 2), es reconocida por los anticuerpos monoclonales TS1-ss, L-1 y -TA-1, que ligan con linfocitos T, B, células NK y aparentemente con neutrófilos y monocitos (20).

El antígeno p.150.95, es una glicoproteína encontrada en neutrófilos y monocitos, contiene una cadena alfa (llamada alfa 3); evidencias sugieren que pueda ser el receptor C3d de las células fagocíticas. (figura 4). (20).

Los neutrófilos PMNs de pacientes que carecen del antígeno Mol (llamado también CR3) son incapaces de unir partículas opsonizadas con  $C_{3b}$ , el cual es un fragmento opsónico derivado del complemento que se fija a la superficie del microorganismo durante la activación del complemento (28); este receptor CR3 promueve reacciones de adherencia respondiendo a cambios en el microambiente celular, alterando su distribución en la célula; aunque pueden encontrarse en sitios que no son accesibles a ligandos extracelulares, se puede producir una rápida translocación de estos receptores a la membrana plasmática por la estimulación con factores quimiotácticos. (36) La deficiencia del antígeno Mol se asocia no sólo a defectos en la adherencia, sino también a defectos en la agregación, quimiotaxis, fagocitosis y estallido respiratorio. Se han identificado que pacientes con deficiencia de la glicoproteína Mol presentan alteración parcial o completa para sintetizar la subunidad beta normal; son frecuentemente productos de parejas consanguíneas, lo que indica un probable patrón autosómico recesivo de herencia. (20, 36).

Se han descrito igualmente, pacientes con deficiencia de los antígenos glicoproteicos LFA-1 y p.150.95. (36).

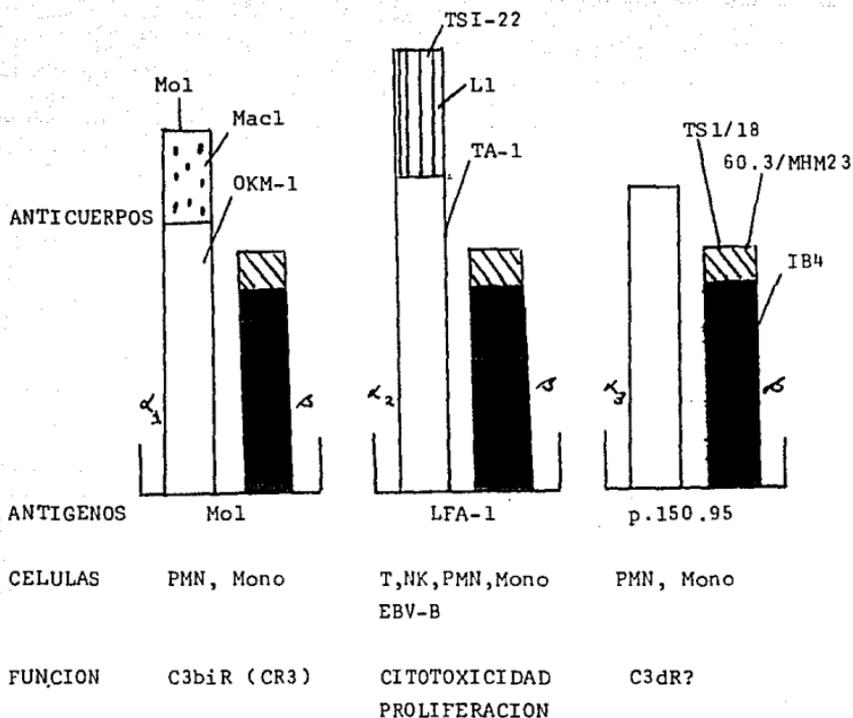


FIGURA 4. ANTIGENOS LEUCOCITARIOS QUE INTERVIENEN EN LA ADHERENCIA DE PMNs. Adaptado de J.I.Gallin (20).

PMN: Polimorfonuclear

Mono: monocitos

EBV-B: linfocitos B transformados por virus Epstein-Barr

LFA-1: antígeno asociado a la función linfocítica.

Existen otros factores intrínsecos del PMN que intervienen en la función de adherencia los cuales están relacionados con los antígenos membranales. La adherencia de alguna forma está mediada por cargas electrostáticas en las membranas (normalmente negativas); por tanto, una disminución de la carga superficial negativa de los PMNs puede intervenir en la agregación y adherencia celular. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento de PMNs con neuraminidasa incrementa la adherencia debido a la neutralización de cargas electrostáticas de la membrana cortando el enlace entre el grupo terminal del ácido n-acetilmurámico y los componentes internos de la superficie membranal facilitando con ---ello el contacto celular (19).

Algunas observaciones indican que la exocitosis del contenido de los gránulos específicos de PMNs es asociada con el decremento de la carga superficial y la translocación de receptores a nivel de membrana con el consecuente aumento de la capacidad adhesiva; la liberación del contenido de --los gránulos específicos, incluyendo lactoferrina y proteínas catiónicas modulan por otra parte la carga superficial y las propiedades biofísicas de los PMNs, iniciando con ---ello funciones de ensamblaje de microtúbulos y microfilamentos que ocasionan un aumento en la adhesividad celular; Anderson (3) evidenció que la movilización y expresión de antígenos de adhesión son regulados por estímulos quimiotácticos o secretorios del contenido granular de neutrófilos (3, 19). Lo anterior se apoya en recientes estudios con células leucémicas y células inmaduras, en las que se ha evidenciado rigidez de la membrana y reducción de la adherencia que es intrínseca a la célula y mejora con la maduración, al --mismo tiempo que se incrementa el contenido de gránulos secundarios. (29).

Los niveles de nucleótidos cíclicos también influyen en la función de adherencia de PMNs; Bryant y Sutcliffe (29) -

observaron que el aumento en los niveles de AMPc (3'-5'-adenosinmonofosfato cíclico intracelular) podía inducir la inhibición de la permeabilidad de membrana, lo que implica -- cambios en las fuerzas electrostáticas de membrana, provocando con ello un incremento en la repulsión con las células endoteliales. Inversamente, los niveles de GMPc (guanosinmonofosfato cíclico), tienen un efecto contrario al AMPc en la adhesión de PMNs, aunque aún no está bien estudiado.

Los diferentes factores del PMN que intervienen en la adherencia, se resumen en el cuadro siguiente: (cuadro 2).

#### CUADRO 2. FACTORES INTRINSECOS DEL PMN Y ADHERENCIA.

---

ANTIGENOS LEUCOCITARIOS	Mol, LFA-1, p.150.95
EXOCITOSIS DE GRANULOS SECUNDARIOS	
CARGA SUPERFICIAL DE LA MEMBRANA	
NIVELES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	AMPc y GMPc

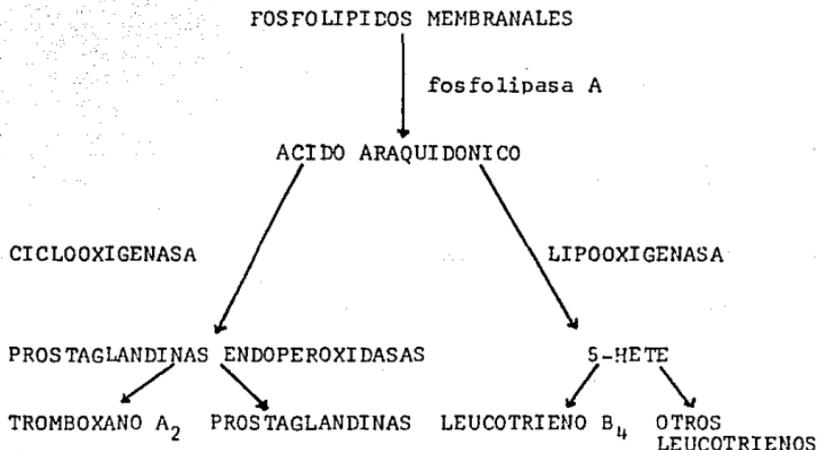
---

#### 2) FACTORES QUE AFECTAN LA MEMBRANA DEL ENDOTELIO.

El endotelio bajo ciertas circunstancias puede jugar un papel activo en la producción del infiltrado leucocitario a un tejido, al tener un papel modulador de la respuesta de PMNs a mediadores inflamatorios, lo cual es el resultado de la liberación de productos solubles de células endoteliales que modifican dicha respuesta (29).

Entre los productos que tienen efecto sobre la adherencia de PMNs se encuentran metabolitos derivados de la activación del ácido araquidónico producidos en membrana lipídica. (cuadro 3).

CUADRO 3. PRODUCTOS DERIVADOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN MEMBRANA DE POLIMORFONUCLEARES.



Adaptado de I. L. Weissman y col. (42).

Se ha enfatizado la participación de las prostaglandinas; la prostaglandina  $I_2$  (PG- $I_2$ ), un derivado del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa, puede inhibir la adherencia de PMNs en concentraciones nanomolares; es probable que esto ocurra a través del incremento del nivel de AMPc intracelular, inhibiendo además la producción de leucotrieno  $B_4$  que es un agonista de la adherencia, así mismo se sabe que la PGE $_2$  y la PGF $_2$  son capaces también de inhibir la adherencia. (46).

Varios metabolitos del ácido araquidónico pueden incrementar la adherencia; entre éstos encontramos al leucotrieno  $B_4$

(ácido 5-S-12-R-Dihidroxi-6,4,cis-8-trans-icosatetranoico) - generado endogenamente en los PMNs por vía de la lipooxigenasa, el cual incrementa la adherencia cuando se aplica a células endoteliales, siendo su efecto rápido (no requiere de más de 1 minuto de preincubación para obtener un efecto máximo), dosis dependiente y decae linealmente después de 30 minutos de removido. El mecanismo por el cual es posible que actúe, sería a través del ocupamiento de receptores propios de la superficie del endotelio provocando cambios en la interacción del endotelio con los PMNs. (24,37).

Bevilacqua y colaboradores (37), demostraron que el pretratamiento de células endoteliales con interleucina 1 (0.5 a 2 U/ml) induce la síntesis de factores de superficie en los mismos que incrementan la adherencia de leucocitos; ésta no es una propiedad general de las interleucinas, ya que se ha demostrado que la IL-2 y el interferon no estimulan la adherencia (37).

Igualmente los lipopolisacáridos y el factor de necrosis tumoral o caquectina (1 a 3 ng/ml, rTNF-alfa), son sustancias que inducen la síntesis de factores de superficie de células endoteliales que promueven la adherencia de neutrófilos por algún mecanismo que involucra el complejo CDw18. (32, 37).

En este mecanismo de modulación de adherencia por células endoteliales intervienen en grado significativo la síntesis de nuevo RNA y proteínas; así se ha demostrado que puede bloquearse con la adición de cicloheximida o actinomicina D (inhibidores de la síntesis proteica y síntesis de RNA, respectivamente). (37).

### 3) FACTORES ENCONTRADOS EN EL PLASMA.

Existen diversos factores plasmáticos que pueden intervenir modificando la función de adherencia de PMNs.

Factores plasmáticos tales como los referidos al sistema del complemento, pueden incrementar significativamente la adherencia. Los fragmentos  $C_3a$  y  $C_5a$  des, arg (producidos durante la activación del complemento) inducen un aumento de 3 a 7 veces la adherencia de neutrófilos PMNs al endotelio, debido en gran parte a que causan un pequeño pero significativo decremento de la carga superficial celular aumentando de esta manera la adherencia a las células endoteliales (36).

La interacción de factores quimiotácticos con PMNs puede afectar el metabolismo de fosfolípidos de la célula con la consiguiente modulación de la fluidez de la membrana; se modifican así las características propias de receptores ocupados y con ello su actividad (38).

Bockensted y col. (b) han descrito un factor plasmático que incrementa la adherencia de PMNs al cual denominaron factor de adherencia de neutrófilos (NAF). Este factor es termostable, no dializable en el plasma y no se encuentra normalmente en suero; requiere de un cofactor termolábil (complemento), para ejercer su efecto plenamente. Se ha determinado su punto isoeléctrico y se encontró la actividad de dos diferentes proteínas ácidas, con punto isoeléctrico de 3.6 a 3.8 y de 3.3 a 3.4, que fueron designadas como factor adherente de neutrófilos NAF I y NAF II respectivamente. El NAF incrementa la expresión de receptores  $C_3b$  de neutrófilos, aunque no afecta significativamente la fagocitosis (6, 27).

#### 4) FACTORES FARMACOLOGICOS.

Se ha demostrado que diversos agentes farmacológicos pueden interferir con la adherencia de neutrófilos "in vitro" pudiendo potencialmente comprometer las reacciones inflamatorias "in vivo" y en consecuencia las defensas del hospedero.

Entre éstos encontramos los fármacos de acción antiinflamatoria como los salicilatos, corticosteroides y los alcoholes. (29, 30).

Los corticosteroides pueden disminuir la capacidad de adherencia de los PMNs, aunque no se ha establecido con claridad el mecanismo de acción; se propone que puedan actuar a través de la incorporación de moléculas de esterol en la membrana plasmática de las células fagocíticas, lo que produce cambios en la carga superficial, inhibiendo de esta forma la adherencia a células endoteliales. (11, 30).

Los agentes antiinflamatorios no esteroidales como el ácido acetilsalicílico, indometacina, fenilbutazona, ibuprofen y fenoprofen, afectan igualmente la adherencia. Es probable que actúen a través de la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa en la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas. (41).

Las emulsiones de grasas, además de ejercer efectos nutricionales, pueden afectar la capacidad de adherencia de PMNs. Siegel (38) explica ésto mediante la repulsión entre moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, esencial para la estructura básica de las membranas celulares; la presencia de triglicéridos incrementaría la concentración de moléculas hidrofóbicas en la membrana celular, alterando el balance hidrofóbico-hidrofílico de la membrana, modificando la distribución de receptores de membrana (mayor exposición) y aumentando de esta forma la adherencia del PMN al endotelio. (38).

Dentro de este marco de agentes farmacológicos que pueden actuar sobre la adherencia celular, existen algunos que se ha demostrado, afectan la adherencia de líneas celulares no leucocitarias, como eritrocitos. Sin embargo, es probable que afecten igualmente a PMNs. Uno de estos fármacos es la pentoxifilina, a la cual nos referiremos posteriormente. (5).

## ALTERACIONES DE LA FUNCION DE ADHERENCIA DE PMNs.

Se han reportado diferentes alteraciones en la función de adherencia de PMNs, las cuales pueden presentarse en forma congénita o adquirida.

Diversas investigaciones han reportado defectos de la adherencia de PMNs de neonatos, la cual no es debida precisamente a algún daño, sino más bien a la falta de maduración de leucocitos PMNs a edad temprana, principalmente en lo que respecta a la maduración de gránulos secundarios y el ensamblaje de microtúbulos (2, 3); el PMN del neonato presenta un citoesqueleto rígido, el cual no permite que la distribución de sitios de adhesión se realice de manera normal, lo que ocasiona una deficiencia en la movilización y/o expresión de las proteínas de adhesión del complejo CDw18; estas anomalías son de importancia clinicopatológica debido a que se les atribuye como uno de los contribuyentes del aumento de la susceptibilidad de neonatos a las infecciones.(3).

Se han descrito casos de pacientes con deficiencia de las glicoproteínas de adhesión de PMNs; estos pacientes presentan deficiencia en la separación de cordón umbilical, infecciones bacterianas y fúngicas severas y recurrentes, disminución en la formación de pus, enfermedad periodontal severa y leucocitosis persistente (16). La severidad de la enfermedad depende del grado de deficiencia de las glicoproteínas, ya que si la deficiencia está en la subunidad alfa se puede presentar falta de una glicoproteína; cuando la deficiencia se encuentra en la incapacidad de sintetizar la subunidad beta normal, se puede presentar deficiencia de una o más glicoproteínas del complejo CDw18 (43). Esta enfermedad parece tener un patrón autosómico recesivo de herencia.

La terapia con corticosteroides es otro factor que puede

alterar la función de adherencia. Por más de 30 años los corticosteroides han sido utilizados comunmente como terapia para muchos procesos inflamatorios y desórdenes autoinmunes, -tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, hepatitis activa crónica, colitis ulcerativa, púrpura trombo citopénica y síndromes nefróticos leves; la administración de éstos pueden tener efectos diversos, ya que además de disminuir la adherencia de PMNs, afectan otro tipo de células, como linfocitos T y B, incrementando así la susceptibilidad a enfermedades infecciosas que son atribuidas al uso diario de este tipo de fármacos, pudiendo tener resultados catastróficos. (11).

Por otra parte en pacientes con daño hepático también se han encontrado alteraciones de la adherencia, presentando -- además daño en la locomoción de PMNs. Esta alteración puede ser incrementándose o disminuyendo. La disminución de la adherencia es explicada por Altin y col.(1), los cuales sugieren que al alteración es debida a la baja capacidad de respuesta del PMN a mediadores séricos (complemento), ya que estos pacientes presentan concentraciones de complemento sérico bajas, probablemente como resultado de la reducción en la síntesis del mismo por el hígado y al incremento en su consumo.

En cuanto al incremento de la adherencia se dice que se produce cuando el daño hepático es leve y la liberación de mediadores séricos se encuentra elevada, lo que implica el incremento de la adherencia de PMNs debido a la liberación -- que existe de factores que la estimulan.

Se ha reportado que las complicaciones en poblaciones pediátricas con un estado de malnutrición proteica-calórica, -- resultan del deficit de la respuesta inmune inespecífica, ya que presentan alteraciones de la función inflamatoria que resultan del deficit en la movilización de células fagocíticas pudiendo ser afines a fallas en las propiedades adhesivas -- del PMN. (4).

Por lo anteriormente expuesto es de interés para nosotros estudiar el fenómeno de adherencia en nuestra población pediátrica.

#### MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ADHERENCIA DE PMNs.

Existen diferentes métodos con los cuales es posible medir la función de adherencia de PMNs in vitro. Existen métodos muy sofisticados que resultan altamente costosos debido al material que se utiliza para llevarlos a cabo; entre los métodos existentes enumeramos los siguientes:

##### A) Método de Diener (15):

Este método utiliza cultivos de células endoteliales a las cuales se les agregan los PMNs previamente marcados con  $^{51}\text{Cr}$ , posteriormente se realizan varios lavados para eliminar las células no adheridas. Los PMNs que se adhirieron se lisan mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1M y se mide en un contador de centelleo las cuentas por minuto liberadas por los PMNs que se adhirieron mediante la siguiente fórmula: (11,28)

$$\% \text{ ADHERENCIA} = \frac{\text{cpm de PMNs lisados}}{\text{cpm totales agregadas}}$$

El número mínimo utilizado es de  $5 \times 10^6$  PMNs.

##### B) Método de Cramer (13):

Este método utiliza cultivos de células endoteliales a los cuales se les adicionan los PMNs, posteriormente se realizan varios lavados para desechar las células no adheridas; las células que se adhieren se fijan con glutaraldehído al 2% o formalina al 10%, para después teñirlos con Giemsa y contarlos al microscopio invertido para obtener el porcentaje de adherencia mediante recuento diferencial.

C) Método de Mc Gregor (30,39):

Es un método muy simple y rápido, utiliza fibras de nylon empacadas en pipetas pasteur; este método permite medir los PMNs adheridos a la fibra mediante la diferencia de células que entran y las que salen en el efluente; el número mínimo de PMNs utilizados para cada ensayo es de  $1 \times 10^6$  PMNs y no -- hay necesidad de teñirlos, por lo que se pueden contar directamente al microscopio óptico.

El método de Mc Gregor da resultados comparables con los dos métodos anteriores; para los fines de nuestro estudio resulta ser el método de elección.

## PENTOXIFILINA

La pentoxifilina, es una metilxantina (3,7,dimetil-1-oxo-hexil-xantina). Fué introducida en 1978 para el tratamiento de enfermedades vasculares periféricas debido a que tiene la propiedad de incrementar la deformabilidad de eritrocitos facilitando su paso a través de capilares. (5,9,25).

Actualmente se ha dirigido la atención a la investigación de los efectos de pentoxifilina sobre los PMNs. Sheetz, Wang y Kreutzer (25), fueron los primeros en estudiar los efectos inmunomoduladores de pentoxifilina, encontrando que incrementaba la motilidad de leucocitos PMNs in vitro y la acumulación de éstos "in vivo" en conejos. Posteriormente Mandell y Sullivan (22), reportaron que la pentoxifilina modula la exposición de receptores de superficie específicos cambiando - el potencial de membrana, los niveles de calcio libres, la aparición de microtúbulos y microfilamentos celulares.

Se ha demostrado que este fármaco incrementa la quimiotaxis de leucocitos PMNs así como la acumulación de éstos en - el foco inflamatorio, lo que sugiere que pueda ser utilizado para incrementar las defensas del hospedero infectado.(5).

El mecanismo por el cual es posible que actúe la pentoxifilina, es porque siendo un inhibidor de fosfodiesterasas -- (enzimas que catalizan la hidrólisis de AMPc a 5'AMP), incrementa la concentración de AMPc, el cual se sugiere que induce la interiorización de partículas, extrañas sirviendo como una señal para que los leucocitos PMN puedan fagocitar, dando la energía suficiente y reemplazando la carga superficial de membrana, lo que puede apoyarse en estudios anteriores -- de Bryant y Sutcliffe (8), los cuales proponen que el AMPc pueda cambiar las fuerzas electrostáticas de membrana provocando con ello un cambio en las características de la membrana del PMN. (23).

A raíz de los descubrimientos anteriores, se produjeron - diferentes estudios aplicados específicamente a neonatos; --

Hill y col. (23) reportaron que los leucocitos PMNs de neonatos tienen citoesqueleto rígido, lo que puede disminuir el movimiento de los receptores de membrana a la superficie celular, dando por resultado un decremento de la motilidad del PMN del neonato comparado con el del adulto (5). La pentoxifilina es capaz de incrementar la motilidad debido a que eleva la flexibilidad del citoesqueleto pudiendo ser utilizada para incrementar la respuesta de PMNs de infantes recién nacidos infectados y con ello su defensa, evitando riesgos comparados con tratamientos tales como la aplicación de transfusiones o la administración de anticuerpos específicos en neonatos. (22, 23, 25).

No se ha evaluado el efecto de este fármaco sobre la función de adherencia de PMNs, por lo que nos propusimos llevar a cabo dicha tarea en el presente trabajo, debido a los antecedentes ya existentes.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Nos hemos referido a los antecedentes del papel principal de la adherencia de PMNs dentro del marco de la respuesta in flamatória y de la importancia del estudio de esta función - de los neutrófilos PMNs.

De ahí la necesidad de disponer de una metodología que -- permita evaluar esta función y que sea fácilmente disponible en los laboratorios de apoyo al diagnóstico y sobre todo en las instituciones hospitalarias.

En este contexto es igualmente necesario determinar los - valores de adherencia de PMNs de adultos sanos, niños normales y niños desnutridos, estableciendo parámetros de anormalidad. El estudio de esta última población (niños desnutri-- dos) encuentra su justificación debido a que constituye el - grupo de mayor morbimortalidad infecciosa, disponiéndose de escasa información con respecto al comportamiento de la función de adherencia de PMNs provenientes de la población pe-- diátrica mexicana.

Por otra parte, consideramos de importancia la evaluación de la adherencia de PMNs provenientes de las mismas poblaciones en respuesta al tratamiento "in vitro" de estas células con pentoxifilina para establecer el posible efecto de éste fármaco sobre la función de adherencia ya que se ha demostrado que la misma altera la distribución de receptores a nivel de la membrana celular, la cual, como ya hemos mencionado anteriormente desempeña un papel fundamental en la función de adherencia.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

- 1) La capacidad de adherencia de leucocitos polimorfonucleares de niños desnutridos difiere significativamente de la de niños eutróficos y adultos normales.
  
- 2) La pentoxifilina disminuye la función de adherencia de -- neutrófilos polimorfonucleares.
  
- 3) La pentoxifilina no influye sobre la capacidad de respuesta a estímulo inflamatorio medida por función de adherencia de neutrófilos polimorfonucleares.

## OBJETIVOS

- a) Estandarizar una metodología para el estudio de la función de adherencia de leucocitos polimorfonucleares.
- b) Determinar la capacidad de adherencia basal de leucocitos polimorfonucleares de adultos, niños eutróficos sanos y niños con desnutrición grave (deficiencia de peso mayor del 25%) y con exposición a un estímulo inflamatorio.
- c) Evaluar el efecto de la pentoxifilina sobre la capacidad de adherencia basal y en respuesta a un estímulo inflamatorio de los leucocitos polimorfonucleares.

## MATERIAL Y METODOS.

### a) MUESTRAS UTILIZADAS:

Para alcanzar los objetivos que nos propusimos, se procedió a obtener sangre venosa, que para los fines del presente trabajo las denominamos muestra, de tres diferentes grupos - de población que se expresan a continuación:

I) Muestras provenientes de 20 adultos voluntarios sanos, de ambos sexos, de un promedio de edad de 25 a 35 años que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Infantil de México -- "Federico Gómez".

II) Muestras de 10 niños eutróficos sanos que acudieron al hospital sin cursar enfermedades infecciosas, previo consentimiento por escrito de los padres, de un promedio de edad - de 5 años.

III) Muestras de 20 niños desnutridos de II y III grado, según las tablas del Doctor Federico Gómez (deficiencia de peso mayor del 25%), con un promedio de edad de 5 años. (ver - anexo II).

### b) SEPARACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES:

La separación de PMNs se llevó a cabo utilizando la metodología de Boyum (7) con algunas modificaciones.

Se colectó sangre venosa en tubos de polipropileno de 15 ml, utilizando Heparina como anticoagulante a una concentración de 10 U/ml de sangre. Se diluyó la sangre en S.S.I. en una relación 1:1 (v/v); luego de mezclarlo se adicionó solución de Ficoll-Hypaque en la parte inferior del tubo (en relación 1:6), lo cual permite la formación de un gradiente -- que separa eritrocitos y leucocitos PMNs de las células mono nucleares al centrifugar la muestra a 1500 rpm durante 25min en una centrifuga refrigerada a 4°C; luego de la centrifugación se desechó la capa de células mononucleares con el so--

brenadante. El paquete obtenido (conteniendo eritrocitos y - PMNs) se incubó con solución de Dextrán al 6% (en relación - 1:3) durante 20 min a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%; en es te paso se produce la sedimentación de los eritrocitos, en - tanto que los PMNs quedan en suspensión. Se separó el sobre- nadante que contenía los PMNs y se centrifugó a 1500 rpm du- rante 10 min, para lisar posteriormente los eritrocitos con- taminantes mediante la adición al botón de 1ml de solución - de cloruro de amonio al 0.85% dejando la suspensión en repo- so a temperatura ambiente (22°C) durante 10 min; al cabo de este tiempo se adicionó S.S.I. para restaurar la osmolaridad y se centrifugó nuevamente a 1500 rpm durante 10 min.

Finalmente el paquete obtenido conteniendo los PMNs se re suspendió en 1 ml de solución salina balanceada de hanks --- (SSBH) y se procedió a realizar el recuento celular, así co- mo controles de viabilidad y pureza.

#### c) DETERMINACION DEL NUMERO DE POLIMORFONUCLEARES:

Se determinó el número de leucocitos PMNs/ml en la suspen- sión obtenida utilizando solución de Turk como diluyente y - agente que lisa los eritrocitos contaminantes, preparando -- una dilución 1:10, de la cual se tomó una alicuota que se co locó en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) para reali-- zar el recuento con el lente objetivo de 40x de un microsco- pio Olympus.

El número final de PMNs se calculó según la siguiente fór mula:

$$\text{PMNs/ml} = \text{No. promedio de células por cuadrante} \times 10 \times 10^4$$

d) DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE PUREZA:

El porcentaje de pureza de leucocitos PMNs, se llevó a cabo durante la estandarización del procedimiento de obtención de PMNs, mediante la preparación de un frotis de la suspensión obtenida en un portaobjetos limpio y desengrasado, tiñéndolo posteriormente durante 2 min con colorante de Wright; se lavó con agua destilada, se secó y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión.

El porcentaje de pureza de PMNs se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%PMNs = 1 - \left[ \frac{100 - \text{No. PMNs}}{100} \right] \times 100$$

e) DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD:

La metodología de exclusión de azul tripano se basa en la capacidad que tienen las células vivas de impedir la penetración del colorante a través de membrana celular, por lo que las células muertas se tiñen por no tener esta capacidad.

Se preparó una dilución 1:10 con azul tripano de la suspensión contando las células viables en el hematocitómetro después de colocar una alicuota en éste.

El porcentaje de viabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%VIABILIDAD = \frac{\text{PMNs viables}}{\text{PMNs totales}} \times 100$$

f) ESTANDARIZACION DE UNA METODOLOGIA DE ESTUDIO DE LA ADHESION DE PMN:

Los leucocitos PMNs tienen la capacidad de adherirse mediante cargas electrostáticas que existen en la superficie de

la membrana a diferentes superficies inertes; entre éstas se encuentran el vidrio y la fibra de nylon; la técnica de evaluación de la capacidad de adherencia de Mc Gregor (39), se fundamenta en esta capacidad de los PMNs de adherirse a materiales inertes, existiendo una relación directa entre el valor obtenido de células adheridas y la adherencia de PMNs a las células del endotelio (superficies vitales). (37,39). Nosotros seguimos la metodología de Mc Gregor para estudiar la adherencia de PMNs, utilizando durante los ensayos de estandarización dos procedimientos diferentes que se detallan a continuación:

Se empacaron uniformemente pipetas pasteur con 40mg de fibra de vidrio (laboratorios J.T.Baker) en un espacio de 15mm se humedecieron con SSBH y se incubaron durante 10min a 37°C antes de ser utilizadas. Las columnas fueron ancladas en un caballete, tras lo cual se les agregó 1 ml de la suspensión de PMNs ajustada a  $2 \times 10^6$  PMNs/ml, determinando el número de PMNs que pasaron a través de la columna después de dejar fluir libremente la suspensión durante 10 min.

El porcentaje de adherencia se calculó de la manera siguiente:

$$\% \text{ADHERENCIA} = \frac{\text{PMNs/ml mta. original} - \text{PMNs/ml en el efluente}}{\text{PMNs/ml muestra original}} \times 100$$

Cada ensayo se realizó por duplicado, sacando un promedio de cada muestra estudiada.

Debido al costo y riesgo presentados al manejar la fibra de vidrio, posteriormente ensayamos el estudio de adherencia de PMNs utilizando fibras de nylon por la facilidad de su manejo; además utilizamos jeringas de polipropileno que son reutilizables, en lugar de pipetas pasteur, con lo que se abarataron costos notablemente, procediendo simultáneamente a determinar si existían diferencias entre ambas metodologías. Para

estos fines se empacaron uniformemente jeringas de polipropileno de 1 ml (tipo tuberculina), con 40 mg de fibra de nylon (tipo 200, 3 denier, 3.81 cm, laboratorios Fenwal); se humedecieron con SSBH y se incubaron a 37°C durante 10 min antes de su utilización. Se determinó el porcentaje de adherencia de igual manera que con la fibra de vidrio.

g) TRATAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES CON PENTOXIFILINA.

Se preparó una solución de pentoxifilina (Trental R, lote 2719, laboratorios Hoechst-Roussel Pharmaceuticals Inc.) con SSBH a una concentración de 100 ug/ml 1 hr antes de su utilización. Se eligió esta concentración del fármaco debido a que en diferentes reportes se menciona como la dosis efectiva sobre las funciones de PMNs.

A la suspensión de PMNs ajustada a  $5 \times 10^6$  células/ml se le adicionó 1 ml de la solución de pentoxifilina (relación PMNs-fármaco de  $5 \times 10^6/100$  ug), incubando la suspensión durante 60 min a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, tras lo cual se lavaron las células, adicionándoles 3 ml de SSBH centrifugando a 1500 rpm durante 10 min, resuspendiendo posteriormente el paquete en SSBH para estudiar la capacidad de adherencia de PMNs.

Para los ensayos posteriores con factor quimiotáctico como estímulo inflamatorio, las muestras se incubaron 30 min, dejando los otros parámetros constantes.

h) EXPOSICION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES CON FACTOR QUIMOTACTICO COMO ESTIMULO INFLAMATORIO.

Se ha demostrado que el factor C<sub>5</sub> activado (C<sub>5</sub><sup>a</sup>) tiene actividad quimioatrayente sobre los leucocitos PMNs, siendo un factor producido durante la activación de la cascada del complemento ya sea por vía clásica o alterna (12).

"In vitro" este factor puede ser producido incubando suero normal con diversas estructuras bacterianas (como endotoxinas, lipopolisacáridos) o fúngicas, como el zimosan (fragmento de la pared celular de la levadura Sacharomices cereviceae), durante lo cual se activa la vía alterna del complemento produciendo con ello la generación del fragmento C<sub>5</sub>a. (12, 17).

Nosotros utilizamos para nuestros estudios C<sub>5</sub>a preparando un lote como sigue:

a) PREPARACION DE ZIMOSAN:

Se pesaron en balanza analítica 300 mg de zimosan (levaduras de Sacharomices cereviceae, Sigma Chemical Co., USA, lote 93F-0144) suspendiéndolo en S.S.I. estéril, se agitó vigorosamente en un vortex y se hirvió durante 30 min para su disolución completa; posteriormente se realizaron 2 lavados con S.S.I. para finalmente resuspenderlo a una concentración de 10 mg/ml en SSBH, la cual fué alicuotada en viales de polipropileno estériles de 1 ml, conservándolos en un refrigerador a -10°C hasta su uso.

b) OBTENCION DE SUERO:

Se obtuvo sangre venosa de conejos albinos de 6 meses de edad promedio, a partir de la cual se obtuvo el suero. La sangre se dejó coagular durante 15 min a 37°C, se centrifugó posteriormente a 1500 rpm durante 10 min, separando el coágulo, aspirando el suero con una pipeta pasteur para alicuotarlo en viales de polipropileno estériles en volúmenes de 200 ul por vial, los cuales fueron guardados en un refrigerador Revco a -40°C para evitar la descomposición de proteínas (complemento) hasta su utilización.

c) PROCEDIMIENTO:

El suero de conejo se activó con zimosan a una concentra-

ción de 10 mg/ml, inmediatamente antes de la preparación, se procedió a descongelar el zimosan y centrifugar a 3000 rpm; luego de desechar el sobrenadante, se adicionó al botón, suero de conejo al 20% en SSBH; incubándolo durante 30 min a  $-37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%; luego la suspensión de zimosan se centrifugó a 3000 rpm para posteriormente separar el sobrenadante (suero activado). La actividad quimioatrayente de este suero se demostró por ensayo de quimiotaxis. (12).

Finalmente el suero ya activado se alicuotó en viales de polipropileno (1 ml en cada vial) sellándolos con parafilm y guardándolos en un refrigerador Revco a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## II) ESTUDIO DE LA ADHERENCIA DE POLIMORFONUCLEARES EXPUESTOS A SUERO ACTIVADO.

Para evaluar la respuesta de adherencia de PMNs al suero activado se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de suero activado (descongelado 10 min antes de utilizarlo) por cada  $5 \times 10^6$  PMNs (sin tratamiento y tratados previamente con pentoxifilina); se procedió a incubarlas durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%; luego se lavaron las células adicionándoles 3 ml de SSBH y se centrifugó a 1500 rpm durante otros 10 min. El paquete fué resuspendido en SSBH a una concentración de  $2 \times 10^6$  PMNs/ml, procediendo luego a determinar el porcentaje de adherencia.

### i) ANALISIS ESTADISTICO:

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la utilización de la "t" de Student, estadígrafo paramétrico, ya que los resultados se expresaron en escala dimensional y las --- muestras tuvieron distribución normal (14).

Para demostrar la diferencia entre muestras de diferentes poblaciones, se utilizó una "t" de Student para muestras no

correlacionadas:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{x_1^2 - x_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

DONDE:  $x^2 = x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}$

Para demostrar la diferencia entre muestras pertenecientes a una misma población, se utilizó una "t" de Student para muestras correlacionadas.

$$t = \frac{\bar{D}}{S_{\bar{D}}} \quad \text{donde:} \quad \bar{D} = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$$

$$S_{\bar{D}} = \frac{S_D}{\sqrt{N-1}} \quad d^2 = D^2 - \frac{(\sum D)^2}{N}$$

## RESULTADOS.

### A) CARACTERISTICAS DE LA POBLACION CELULAR:

Durante la fase de estandarización del proceso de separación celular se demostró que más del 95% de las células obtenidas fueron PMNs (grado de pureza). La medición de viabilidad de las células obtenidas por exclusión de azul tripano - demostró que más del 95% de ellas excluían el colorante, lo que implicaba un alto grado de viabilidad con el uso de esta metodología. El rendimiento del método en cuanto al porcentaje de PMNs obtenidos a partir del número inicial presente en la sangre fué mayor del 75%.

### B) ENSAYOS DE ESTANDARIZACION DE LA ADHERENCIA DE POLIMORFONUCLEARES:

En los ensayos de estandarización utilizando los dos tipos de fibra, encontramos que no existía una diferencia significativa (tabla I) por lo cual se optó por continuar trabajando con fibras de nylon que presentaba más facilidades en su manejo.

### c) CAPACIDAD DE ADHERENCIA BASAL DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES:

Al medir la capacidad de adherencia basal de neutrófilos PMNs de las poblaciones: adultos sanos, niños eutróficos sanos y niños desnutridos, se demostró una diferencia significativa entre los 3 grupos (tabla II); sin embargo claramente se puede observar que la diferencia es aún mayor entre los 2 grupos de niños estudiados (figura 5).

Tabla I. ESTANDARIZACION DE LA ADHERENCIA EN ADULTOS VOLUNTARIOS SANOS CON LOS DOS TIPOS DE FIBRA.

MUESTRA	PORCENTAJE DE ADHERENCIA CON FIBRA DE NYLON	PORCENTAJE DE ADHERENCIA CON FIBRA DE VIDRIO
1	73.3	73.3
2	75.0	78.3
3	73.3	76.6
4	76.9	79.4
5	76.6	73.3
6	81.1	78.8
7	69.6	69.6
8	91.7	91.7
9	72.5	67.5
10	86.0	60.0
11	85.0	60.0
$\bar{X} \pm SD$	78.3 $\pm$ 6.8	73.5 $\pm$ 9.2*

\*  $p > 0.05$ .

Los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando 40mg de fibra.

Tabla II. CAPACIDAD DE ADHERENCIA BASAL DE LEUCOCITOS POLI-MORFONUCLEARES.

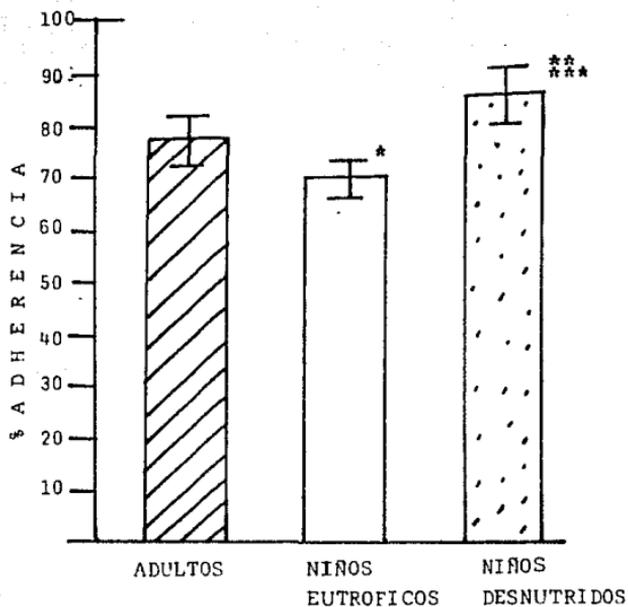
MUESTRA	PORCENTAJE DE ADHERENCIA		
	ADULTOS (n=20)	NIÑOS EUTROFICOS (n=10)	NIÑOS DESNUTRIDOS (n=20)
1	73.3	62.9	84.9
2	75.0	73.3	90.6
3	76.6	70.0	79.3
4	76.9	63.6	91.3
5	81.1	71.4	85.5
6	73.3	66.6	76.9
7	79.8	71.1	84.9
8	70.0	75.9	76.6
9	86.1	70.0	89.4
10	82.6	71.4	88.7
11	86.3	---	91.2
12	76.1	---	91.2
13	77.7	---	92.1
14	75.0	---	91.7
15	71.4	---	88.5
16	73.6	---	75.0
17	78.5	---	83.3
18	77.7	---	93.4
19	82.3	---	83.3
20	80.0	---	86.0
$\bar{X}$ ±SD	77.6±4.5	70.3±3.4*	86.2±5.6** ***

\* Diferencia entre el grupo de adultos voluntarios sanos y niños eutróficos sanos  $p < 0.001$ .

\*\* Diferencia entre el grupo de adultos voluntarios sanos y niños desnutridos.  $p < 0.01$ .

\*\*\* Diferencia entre el grupo de niños eutróficos sanos y niños desnutridos.  $p < 0.001$ .

Los ensayos se realizaron por duplicado utilizando 40mg de fibra de nylon.



\*  $p < 0.001$   
 \*\*  $p < 0.01$   
 \*\*\*  $p < 0.001$

FIGURA 5. CAPACIDAD DE ADHERENCIA BASAL DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

D) RESPUESTA DE POLIMORFONUCLEARES AL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA:

Al realizar los ensayos de adherencia de PMNs en respuesta al tratamiento con pentoxifilina "in vitro" (100 ug/ml) se demostró que esta droga efectivamente disminuía la adherencia en los 3 grupos de estudio significativamente. (figura 6, tabla III).

E) RESPUESTA DE POLIMORFONUCLEARES AL TRATAMIENTO CON  $C_{5a}$  COMO ESTIMULO INFLAMATORIO:

En lo que respecta a la respuesta de PMNs al tratamiento con  $C_{5a}$ , se demostró que existía una respuesta significativa en adultos sanos y niños eutróficos sanos; sin embargo en niños desnutridos variaba notablemente (tabla IV), evidenciando que no había una respuesta ante dicho estímulo, lo que se puede ver más claramente en la figura 7.

F) RESTAURACION DE LA RESPUESTA ADHERENTE DE POLIMORFONUCLEARES DE NIÑOS DESNUTRIDOS:

Comprobamos que el tratamiento con pentoxifilina es capaz de restaurar la respuesta de PMNs de niños desnutridos al tratamiento con  $C_{5a}$  como estímulo inflamatorio (tabla V. Figura 8).

TABLA III. RESPUESTA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES  
AL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA (Px).

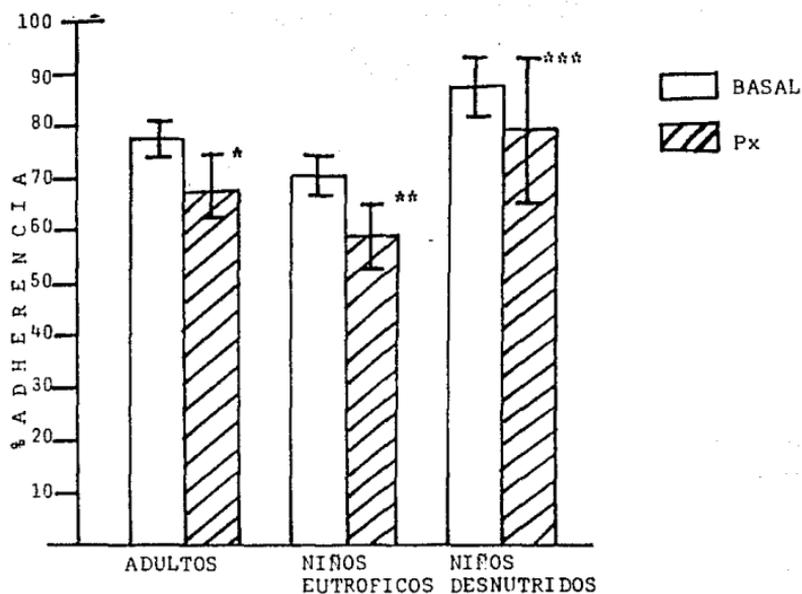
PORCENTAJE DE ADHERENCIA					
ADULTOS		NIÑOS EUTROFICOS		NIÑOS DESNUTRIDOS	
BASAL	Px	BASAL	Px	BASAL	Px
86.3	76.0	69.2	56.4	91.2	88.0
76.1	71.4	73.3	60.0	91.2	92.4
77.7	60.0	70.0	62.5	92.1	99.3
75.0	62.5	63.6	52.1	91.7	87.5
71.4	66.6	71.4	62.5	88.5	82.1
73.6	66.6	66.6	50.0	75.0	69.4
78.5	61.5	71.4	50.0	83.3	50.0
77.7	66.6	75.9	71.8	93.4	73.1
82.3	70.0	70.0	61.5	83.3	71.1
80.0	76.5	71.4	63.6	86.0	79.2
77.9	67.8*	70.3	59.0**	87.6	79.2***
<u>+4.3</u>	<u>+5.7</u>	<u>+3.4</u>	<u>+6.9</u>	<u>+5.7</u>	<u>+14</u>

$\bar{X} \pm SD$       n=10

\* Significancia en la respuesta de adultos voluntarios sanos  
 $p < 0.001$ .

\*\* Significancia de la respuesta de niños eutróficos sanos  
 $p < 0.001$ .

\*\*\* Significancia en la respuesta de niños desnutridos  $p < 0.05$ .



\*  $p < 0.001$   
 \*\*  $p < 0.001$   
 \*\*\*  $p < 0.05$

FIGURA 6. RESPUESTA DE POLIMORFONUCLEARES AL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA (100 ug/ml por  $5 \times 10^6$  PMNs).

TABLA IV. RESPUESTA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES A C<sub>5</sub>a  
COMO ESTIMULO INFLAMATORIO.

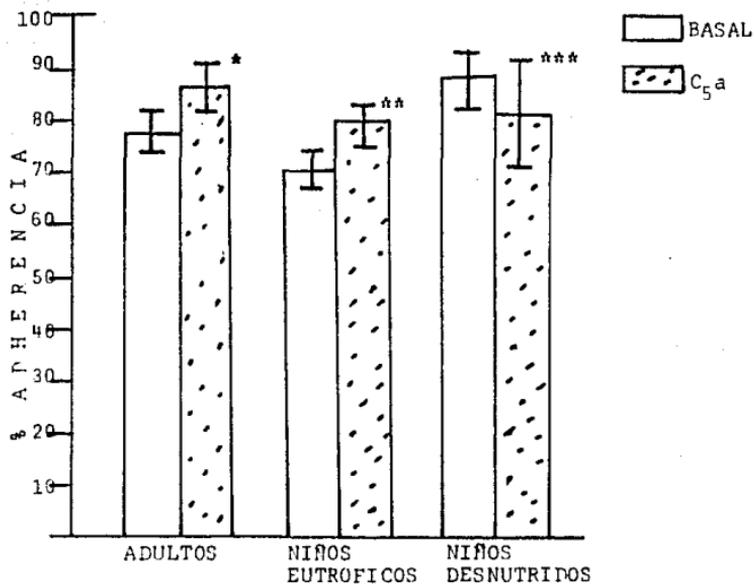
PORCENTAJE DE ADHERENCIA					
ADULTOS		NIÑOS EUTROFICOS		NIÑOS DESNUTRIDOS	
BASAL	C <sub>5</sub> a	BASAL	C <sub>5</sub> a	BASAL	C <sub>5</sub> a
86.3	92.6	62.9	77.5	91.2	78.7
76.1	81.2	73.3	82.6	91.2	69.5
77.7	85.7	70.0	75.0	92.1	95.3
75.0	83.4	63.6	73.1	91.7	88.7
71.4	85.7	71.4	83.3	88.5	90.8
73.6	83.3	66.6	75.0	75.0	82.5
78.5	87.5	71.4	81.3	83.3	62.5
77.7	90.0	75.9	82.4	93.4	87.7
82.3	94.5	70.0	78.5	83.3	79.0
80.0	81.2	71.4	82.2	86.0	72.7
<hr/>					
77.9	86.4*	70.3	79.1**	87.6	80.7***
<u>+4.3</u>	<u>+4.7</u>	<u>+3.7</u>	<u>+3.7</u>	<u>+5.7</u>	<u>+10.3</u>

$\bar{X} \pm SD$  n=10

\* Significancia en la respuesta de adultos voluntarios sanos  
 $p < 0.001$ .

\*\* Significancia en la respuesta de niños eutróficos  $p < 0.001$ .

\*\*\* Significancia en la respuesta de niños desnutridos  $p < 0.1$ .



\*  $p < 0.001$   
 \*\*  $p < 0.001$   
 \*\*\*  $p < 0.1$

FIGURA 7. RESPUESTA DE POLIMORFONUCLEARES A C<sub>5</sub>a COMO ESTIMULO INFLAMATORIO

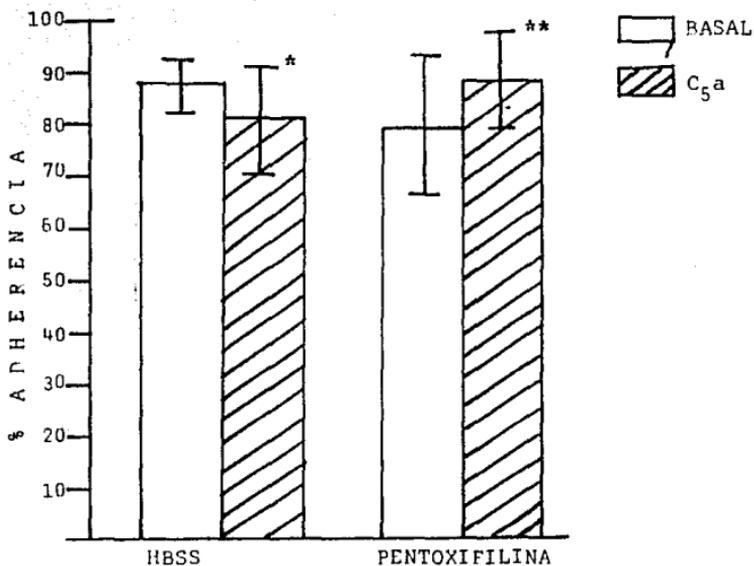
TABLA V. RESTAURACION DE LA RESPUESTA DE POLIMORFONUCLEARES DE NIÑOS DESNUTRIDOS AL ESTIMULO INFLAMATORIO DESPUES DEL - TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA (Px).

PORCENTAJE DE ADHERENCIA				
MUESTRA	BASAL	C <sub>5a</sub>	PENTOXIFILINA	Px-C <sub>5a</sub>
1	91.2	78.7	88.0	94.6
2	91.2	69.5	92.4	96.3
3	92.1	95.3	99.3	94.2
4	91.7	88.7	87.5	97.5
5	88.5	90.8	82.1	92.8
6	75.0	82.5	69.4	89.4
7	83.3	62.5	50.0	68.7
8	93.4	87.7	73.1	80.4
9	86.0	72.7	79.2	78.1
10	83.3	79.0	71.1	88.8
$\bar{X}$ $\pm$ SD	87.6 $\pm$ 5.7	80.7 $\pm$ 10.3*	79.2 $\pm$ 14	88.0 $\pm$ 9.3**

n = 10

\* Significancia entre PMNs en condiciones basales y PMNs tratados con C<sub>5a</sub>, p<0.1.

\*\* Significancia entre PMNs tratados con pentoxifilina y C<sub>5a</sub> previo tratamiento con pentoxifilina, p<0.005.



\*  $p < 0.1$   
 \*\*  $p < 0.005$

FIGURA 8. RESPUESTA A ESTIMULOS INFLAMATORIOS DE POLIMORFONUCLEARES DE NIÑOS DESNUTRIDOS. EFECTO DE PENTOXIFILINA.

## DISCUSION

Cuando se produce una invasión microbiana, se desencadena una serie de eventos que involucran diferentes procesos en los cuales los neutrófilos PMNs juegan un papel central en la resolución del problema como respuesta primaria.

Como ya lo habíamos definido anteriormente, la adherencia es una de las funciones llevadas a cabo por los PMNs de la cual van a depender procesos subsiguientes tales como -- quimiotaxis, fagocitosis y muerte intracelular.

Existen diferentes metodologías para la evaluación de la función de adherencia de leucocitos PMNs; uno de estos métodos, es el desarrollado por Mc Gregor (39), que fué el estandarizado para los fines de nuestro estudio; resulta ser una técnica de fácil adquisición, no requiere de material sofisticado ya que puede realizarse con fibra de nylon o fibra de vidrio, no encontrando entre ambas una diferencia -- significativa ( $78.3 \pm 6.8$  v.s.  $73.5 \pm 9.2$ ;  $p > 0.05$ ), lo que implica que se puedan utilizar indiferentemente cualquiera de ellos; sin embargo, la fibra de vidrio requiere de más precauciones en su manejo por los riesgos de traumatismo cor-- tante y deben utilizarse pipetas pasteur, lo que aumenta -- los costos del procedimiento; por otra parte el empaquetado final no siempre resulta ser el ideal; por todas estas razones optamos por trabajar con la fibra de nylon.

Esta técnica puede ser implementada en los laboratorios de apoyo al diagnóstico, sobre todo los enfocados a problemas de salud pediátricos, ya que las fallas en la función -- de adherencia pueden ser detectadas principalmente a edad -- temprana, las cuales son debidas a la falta de maduración -- del PMN (en el caso de neonatos) ó fallas estructurales del PMN (deficiencias del complejo glicoproteico CDw18). (32).

En lo que respecta a los valores basales reportados en literatura, utilizando el método de Mc Gregor, se reporta un valor de  $76 \pm 12$  (30) para la población de edad adulta, mientras que con los métodos utilizando cultivos celulares, este valor es de  $17 \pm 7$  (11); los valores basales de adherencia que hemos obtenido con PMNs provenientes de adultos sanos son similares a lo reportado en la literatura, lo que apoya nuestro concepto de fácil estandarización y reproducibilidad del método (tabla II); por otra parte no podemos comparar nuestros datos con los valores de adherencia obtenidos con las metodologías basadas en el uso de células endoteliales debido a las condiciones empleadas que son totalmente diferentes, incluyendo la población muestreada.

El valor de adherencia basal de PMNs para adultos sanos es comparativamente mayor al de niños eutróficos ( $77.7 \pm 4.5$  v.s.  $70.3 \pm 3.4$ ;  $p < 0.001$ ) como se puede observar claramente en la figura 5; esto puede deberse a que las condiciones metabólicas referentes a la producción y maduración celular varían notablemente si comparamos un adulto sano con una edad promedio de 25 a 35 años, con un niño sano de 5 años. La diferencia de la capacidad de adherencia en función a la edad, no es un hallazgo inesperado, ya que también se ha observado -- con otras funciones del PMN.

Al determinar la adherencia de niños desnutridos (con un déficit de peso mayor del 25%), se encontró que la adherencia basal resulta ser significativamente elevada en comparación con la de niños eutróficos sanos de la misma edad ( $86.2 \pm 5.6$  v.s.  $70.3 \pm 3.4$ ;  $p < 0.001$ ), lo que indica un estado de hiperadhesividad y por lo tanto una pobre respuesta de los PMNs, lo cual nos explica en parte la elevada susceptibilidad de esta población a sufrir diversos tipos de infecciones bacterianas y fúngicas.

En base a los resultados anteriores encontrados en estos

niños decidimos estimular los PMNs in vitro con un agente - agonista de la adherencia, para corroborar si había diferencia en la respuesta, por lo cual utilizamos suero de conejo como fuente de  $C_5a$  ( $C_5$  activado), en base a que sabemos que al desencadenarse un proceso inflamatorio, se liberan factores quimiotácticos, entre los que se encuentra  $C_5a$ , el cual aumenta la adhesividad de PMNs (16). Dicha respuesta en las poblaciones sanas, resultó ser altamente significativa; así, en adultos sanos la adherencia aumentó de  $77.9 \pm 4.3$  a  $86.4 \pm 4.7$  ( $p < 0.001$ ) y en niños eutróficos sanos de  $70.3 \pm 3.4$  a  $79.1 \pm 3.7$  ( $p < 0.001$ ), (figura 7), tal como se esperaba, ya que la incubación de PMNs con  $C_5a$ , provoca la reducción de la - carga superficial e inducción de perturbaciones en membrana plasmática que incrementa la adhesividad (12); sin embargo en los niños desnutridos, esta respuesta no se incrementa - ( $87.6 \pm 5.7$  v.s.  $80.7 \pm 10.3$ ;  $p < 0.05$ ), lo que implica que ade-- más del estado de hiperadhesividad observado en los PMNs de estos pacientes, los mismos presentan una inadecuada res--- puesta en presencia del estímulo inflamatorio ( $C_5a$ ), lo que implica un deficit en el grado de respuesta del hospedero.

Es probable que este estado de hiperadhesividad sea debido a una rigidez de membrana del PMN, que impide la translocación de receptores de membrana (glicoproteínas del complejo CDw18) que regulan la adherencia. (4).

Por otra parte, existen diferentes agentes farmacológico-- cos que pueden alterar la función de adherencia de PMNs, -- por lo cual fué de interés para nosotros estudiar el efecto de la pentoxifilina, la cual se había demostrado anterior-- mente que era capaz de afectar la adherencia de líneas celulares no leucocitarias.

Los resultados obtenidos con la incubación "in vitro" de PMNs con pentoxifilina a una concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$  por cada  $5 \times 10^6$  células, demuestran que es capaz de causar una -

disminución significativa de la adherencia en los tres grupos de estudio (figura 7); estos resultados nos sugieren -- que la pentoxifilina es un fármaco que no sólo es capaz de incrementar la deformabilidad de líneas celulares no leucocitarias (eritrocitos y plaquetas), sino también de PMNs y muy probablemente de macrófagos, debido al metabolismo similar que se lleva a cabo en los dos tipos de células, ya que inhibe fosfodiesterasas, inhibiendo el paso de 5-AMPc a 5'-AMP, afectando con ello el movimiento de receptores a nivel de membrana (5).

Finalmente, nuestros resultados sugieren que la pentoxifilina pueda restaurar la respuesta de PMNs de niños desnutridos ante estímulos inflamatorios en el aspecto de la adherencia, ya que obtuvimos posterior al tratamiento de los PMNs con pentoxifilina un incremento en esta función en respuesta al suero activado por zimosan, esto nos lleva a pensar que la pentoxifilina pueda ser útil como coadyuvante en el tratamiento de infecciones en este tipo de hospederos.

No obstante, las pruebas realizadas en nuestro estudio, se realizaron "in vitro", por lo que sería de gran interés llevarlas a cabo en un modelo animal y posteriormente aplicarlas a humano.

## CONCLUSIONES

- 1) Los PMNs de niños con desnutrición grave presentan mayor adherencia "in vitro" que PMNs de niños sanos y adultos sanos.
- 2) Los PMNs de niños desnutridos no incrementan su función de adherencia en respuesta a estímulos inflamatorios.
- 3) La pentoxifilina disminuye el nivel de adherencia basal de PMNs en los tres grupos de estudio.
- 4) La pentoxifilina restaura la capacidad medida por ensayos de adherencia de respuesta a estímulos inflamatorios de PMNs de niños desnutridos.

ANEXO I

SOLUCIONES:

Solución de Ficoll-Hypaque:

Ficoll.....3.84g  
Hypaque al 50%.....12 ml  
Agua destilada c.b.p.....60 ml

Solución salina isotónica (S.S.I.):

NaCl.....0.85g  
Agua destilada c.b.p.....100ml

Solución de Dextrán al 6%:

Dextrán.....6g  
S.S.I. c.b.p.....100ml

Solución de Turk:

Acido acético.....12ml  
Solución al 1% de azul de metilo.....7.5ml  
Agua destilada c.b.p.....100ml

Solución de azul tripano:

Azul tripano.....0.1g  
S.S.I. c.b.p.....25ml

Solución de cloruro de amonio al 0.85%:

NH<sub>4</sub>Cl.....0.85g  
S.S.I. estéril c.b.p.....10ml

Solución Salina Balanceada de Hanks:

Glucosa.....	1.0g	CaCl <sub>2</sub> .....	0.14g
NaCl.....	8.0g	MgCl <sub>2</sub> .....	0.14g
KCl.....	0.4g	NaHCO <sub>3</sub> .....	0.35g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.1g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.06g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.06g	Agua destilada c.b.p.	1 lt.

NOTA: Las soluciones fueron ajustadas a un pH de 7.2 antes de su utilización, exceptuando la solución de Turk y la solución de azul tripano.

ANEXO II

## PACIENTES DESNUTRIDOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO.

---

NOMBRE	EDAD	PESO(Kg)	GRADO DE DESNUTRICION
BAUTISTA BEATRIZ	4a	11.9	II
BRITO AGUILAR ADRIAN	4/12	4.3	II
CASTRO ISLAS ANA LILIA	6a, 7/12	15.0	III
CRUZ MOSCOSA DULCE	7/12	5.0	II
GALICIA RAMIREZ ALEJANDRO	9a	24.4	I
GOMEZ SANCHEZ ERICK	5a	14.0	II
HERNANDEZ LECHUGA JORGE	2a	8.2	II
LEAL CUEVAS DIEGO	4a	12.0	II
LEON GARCIA DANIEL	1a, 2/12	6.0	III
LOPEZ ESPINOSA ANGEL	14a, 1/12	40.0	I
MARTINEZ PEREZ LILIA	1a, 9/12	5.3	III
ORTIZ LOPEZ OFELIA	13a	23.5	III
PEREZ MARIANO NORMA	2a, 11/12	10.5	II
RIVERA CRUZ ROCIO	7a	21.0	III
RIVERA GARCIA NATABEL	9/12	5.3	II
RUIZ SALAZAR CAROLINA	4a	13.5	I
SALAZAR NAVA JOSE	4a	11.3	II
SANCHEZ REYES AGUSTIN	2a, 3/12	11.0	I
SERNA ESCALANTE RAFAEL	9a	15.0	III
SIERRA GARDUÑO YABELY	1a, 6/12	7.5	II

---

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Altin M., Rajkovic R.D., Hughes & William R. Neutrophil - adherence in chronic liver disease and fulminant hepatic failure. Gut, 1983; 24: 746-750.
- 2) Anderson D.C., Bonnie J.H. & Wayne S. Abnormal mobility - of neonatal polymorphonuclear. J. Clin. Invest. 1981; 68: -- 863-874.
- 3) Anderson D.C., Becker F., Heerdt B. Abnormal stimulated - adherence of neonatal granulocytes: Impaired induction of -- surface MAC-1 by chemotactic factors or secretagogues. Blood, 1987; 70: 740-750.
- 4) Anderson D.C., Krishna G.S., Hughes B.J., Mace L., Mintz A., Smith C.W. & Buford N. Impaired polymorphonuclear leucocyte motility in malnourished infants: relationship to functional abnormalities of cell adherence. J. Lab.Clin.Med.1983.
- 5) Bessler H.R. Gingal M.D. & Zahavi I. Effect of Pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. J. of Leuk. Biol. 1986; 40: 747-754.
- 6) Bockenstedt and Goetzl E.J. Constituents of human neutrophils that mediate enhanced adherence to surfaces. J. Clin. Invest. 1978; 65: 1372-1381.
- 7) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J. Clin. Lab. Invest. 1968; 77: 21 - (suppl. 97).
- 8) Bryant R. E., Sutcliffe M.C. The effect of 3',5'-adenosine monophosphate on granulocyte adhesion. J.Clin. Invest. 1974; 54: 1241-1244.

9) Carper and Mandell G.L. Effect on blood cells on modulation of PMN chemotaxis by Pentoxifylline. Abstracts of the - 1986, ICAAC.

10) Carpenter P. Inmunología y Serología. Cap. 8 "Reacciones antígeno anticuerpo in vitro citotoxicidad y neutralización". p.354-360. 2a.ed. Edit. La Prensa Medica Mexicana S.A.,1980.

11) Clark R., Gallin J.I. & Fauci A.S., Effects of in vivo - prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence - and chemotaxis. Blood. 1979; 53: 633-641.

12) Craddock P., Dale H., James G., Dalmasso A. and Harry J. Complement (C<sub>5a</sub>) induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement mediated leukostasis and -- leukopenia. J. of Clin. Invest. 1977; 60: 260-264.

13) Cramer E.B., Milks L.C., Frontolo M.J., Ojakian G.K., -- Wright S.D. & Showell H.J. Effect of human serum and some of its components on neutrophil adherence and migration across and epithelium. J. Cell. Biol. 1986; 102: 1868-1877.

14) Eownie N.M. Métodos estadísticos aplicados. Cap. 5. "Medidas de la variabilidad". Edit. Harla. 1970, Méx. p.68-99.

15) Diener A.M., Hans D., Harlan J.M. The role of neutrophil membrane glycoprotein 150 (GP-150) in neutrophil mediated endothelial cell injury in vitro. J. Immunol. 1985; 135: 537-543.

16) Fallon M.D. Gallin J.I. Neutrophil granules in health -- and disease. J. Aller. Clin. Immunol. 1986; 77:653-662.

17) Fudenberg. Inmunología. Cap.14."Inmunidad e infección". 5a. ed. Edit. El Manual Moderno.1982., p.201-213.

- 18) Galindo S.N. Estudio de la respuesta fagocítica de leucocitos. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. 1984.
- 19) Gallin J.I. Degranulating stimuli decrease the negative surface charge and increase the adhesiveness of human neutrophils. J. Clin. Invest. 1980; 65: 298-306.
- 20) Gallin J.I. Perspective. Leukocyte adherence-related glycoproteins LFA-1, Mol, and p.150.95: A new group of monoclonal antibodies, a new disease, and a possible opportunity to understand the molecular basis of leukocyte adherence. J. Infect. Dis. 1985; 152: 661-664.
- 21) Harlan J.M., Killen P. The role of neutrophil membrane -- glycoprotein GP-150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. Blood. 1985; 66: 167-178.
- 22) Harry R. Correction of a developmental defect in neutrophil activation and movement. Am. J. Pathol. 1987; 128:307 - 314.
- 23) Hill H. & Sacchi F. Abnormal signal transduction in the pathogenesis of the defect in neonatal PMN, chemotaxis, correction by pentoxifylline. Clin. Res.1985; 33: 123A.
- 24) Hoover R., Morris J., Austen F., Karnousdy J. and Lewis R. Leukotriene B<sub>2</sub> action on endothelium mediates augmented -- neutrophil endothelial adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 2191-2193.
- 25) Krause J.P., James K. Pentoxifylline enhancement of defective neutrophil function and host defense in neonatal mice. - Am. J. Pathol. 1987; 129: 217-222.

- 26) Klebanoff S.J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Seminars in Hematol. 1975; 12: 117-142.
- 27) Lentnek A.L., Schreiber A. & Mc Gregor R.R. The induction of augmented granulocyte adherence by inflammation. J. Clin. Invest. 1976; 57: 1098-1103.
- 28) Malech H. & Gallin J.I. Current concepts: Immunology -- neutrophils in human diseases. Med. Intel. 1987; 317: 687 - 694.
- 29) Mc Gregor R.R. The effect of anti-inflammatory agents - and inflammation on granulocyte adherence. Am. J. Med. 1976; 61: 597-607.
- 30) Mc Gregor R.R., Phillip M.D. & Lentnek A. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisolone, and aspirin, measured with an assay system. New. Engl. J.M. 1974; 291: - 642-646.
- 31) Oliver J.M. Cell biology of leukocyte abnormalities membrane and cytoskeletal function in normal and defective --- cells. Am. J. Pathol. 1978; 93: 221-230.
- 32) Pohlman T., Stannes K., Beatty P., Hans D., Harlan J. An endothelial cells surface factor(s) induced in vitro by lipo polysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor alpha. Increases neutrophil adherence by a CDw18 dependent mechanism. J. Immunol. 1986; 131: 4548-4553.
- 33) Quie P. G. Phagocytic cell dysfunction. J. Aller. and -- Clin. Immunol. 1986; 77: 387-398.

- 34) Robins S.L. Patología estructural y funcional. Cap.15. "Inflamación". 1a.ed. Edit. Interamericana, 1975, inc.
- 35) Roitt J.M. Essential Immunology. Cap.7. "Immunity to infection-mechanism". 5a.ed. Edit. Blackwell Scientific Publications. 1984., p.179-186.
- 36) Rotrosen D. & Gallin J.I. Disorders of phagocyte function. Am. Rev. Immunol. 1978; 5: 127-150.
- 37) Schleimer R.P., & Bryan K. Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor promoting phorbol diesters. J. Immunol. 1986; 136: 649-654.
- 38) Siegel I., Tian L.L., Gleicher N. Parenteral fat emulsions and immune adherence. JAMA. 1984; 251: 1574-1579.
- 39) Steven D.D. Investigation of phagocytes in disease. Practical methods in clinical immunology. Cap. 2. "Adherence". series. Vol.3, Churchill Livingstone, 1981. inc.
- 40) Venezio F.R., DiVicenzo C. Effects of the newer nonsteroidal anti-inflammatory agents. Ibuprofen, fenoprofen, and Sulindac on neutrophil adherence. J. Infect. Dis. 1985; 152: 690-695.
- 41) Walker R.I., Willemze R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. Rev. Infectious Dis. 1980; 2: 282 - 292.
- 42) Weissman S., Roger L. Glycoprotein 180 deficiency: genetics and abnormal neutrophil activation. Blood. 1985; 65: 696 -704.

- 43) Weissman I. Hood L., Wood W.C. Immunology. Cap.9. "Immune mechanisms and the complement system". 2a.ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc. USA, 1984. p.351-352.
- 44) Younons G.P., Patterson P., and Sommers H.M. The biology and clinical basis of infectious diseases. 3a.ed. Edit. W.B. Sanders Company. Toronto, Canada, 1975 inc.
- 45) Yuli I., Akimitsu T. & Snyderman R. Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982; 79: 5906-5910.
- 46) Zimmerman G.A., Grey A. and Harry R. Human endothelial -- cells modulate granulocyte adherence and chemotaxis. J. Immunol. 1985; 131: 1866-1874.