

Nº 106
E.S.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" Importancia de las exoenzimas de Pseudomonas aeruginosa en pacientes con fibrosis quística. "

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

IRMA MONTES OCAMPO



México D.F. 1992

FALLA 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.

	Página
Resumen	1
Fibrosis quística	2
Figura 1	3
Familia: <i>Pseudomonadaceae</i>	8
Género: <i>Pseudomonas</i>	9
Especie: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Mecanismos de patogenicidad.	
Polisacáridos de superficie	19
Endotoxinas	24
Exoenzimas	25
Proteasas	27
Figura 2	30
Enterotoxinas	35
Hemolisinas	35
Toxinas (A y S)	35
Papel que desempeña la respuesta inmune en infecciones producidas por <i>P. aeruginosa</i>	42

Respuesta inespecífica	42
Respuesta específica	43
Mecanismos de inmunidad humoral antibacteriana.	
Inmunidad humoral localizada en mucosas	44
Inmunidad humoral local contra <u>P. aeruginosa</u>	47
Sistema inmune humoral contra <u>P. aeruginosa</u>	48
Mecanismos de defensa local a nivel respiratorio	50
Papel que desempeñan los anticuerpos contra <u>P. aeruginosa</u> a nivel diagnóstico y pronóstico	53
Figura 3	55
Conclusiones	59
Bibliografía	60

RESUMEN.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo con un amplio potencial enzimático, productor de toxinas y exopolisacáridos de superficie. Estos componentes, están involucrados en los mecanismos de patogenicidad de la bacteria, particularmente en pacientes inmunocomprometidos, como es el enfermo con fibrosis quística.

Diferentes autores, han referido la acción de inmunoglobulinas hacia productos extracelulares de P. aeruginosa como un mecanismo importante de defensa contra éste agente colonizante. Sin embargo, debido a la actividad enzimática presentada por la bacteria, éstas inmunoglobulinas son fragmentadas y por lo tanto resultan ineficaces.

El objetivo de este trabajo, consistió en la revisión de los estudios realizados por diversos autores, para investigar si por medio de la detección de anticuerpos o sus fracciones por métodos inmunológicos, se pudiera determinar si la infección por P. aeruginosa en pacientes con fibrosis quística, es de evolución aguda o crónica. Encontrándose que, mediante la técnica de ELISA, se pueden detectar fracciones de inmunoglobulinas, las cuales, dependiendo de su concentración, permiten establecer el tiempo de evolución del proceso infeccioso.

FIBROSIS QUISTICA.

La fibrosis quística es un síndrome sistémico, hereditario, de carácter autosómico recesivo, donde existe mutación del gen localizado en el cromosoma número 7. La enfermedad, involucra las glándulas exócrinas del organismo, principalmente; el páncreas, aparato respiratorio, tubo digestivo, y glándulas salivales, así como sudoríparas.

Observándose alteraciones fisiológicas como son; un alto contenido de glucoproteínas, disminución de la concentración de sodio en las secreciones del epitelio respiratorio y defectos en la regulación de iones cloro en el mismo. Lo anterior, conduce a la formación de moco espeso y adherente, capaz de obstruir los conductillos, con lo que se produce dilatación quística y fibrosis.(1-4). (fig. 1),

La obstrucción glandular y los cambios degenerativos secundarios, producen disminución de la actividad enzimática pancreática a nivel duodenal, especialmente de la tripsina, lipasa y amilasa.(5, 6).

El déficit de la función digestiva subsiguiente, produce un cuadro de esteatorrea y desnutrición; a su vez, la baja absorción de vitamina A, da lugar a la formación de focos de metaplasia en el epitelio de los conductos.(1, 7).

En éste padecimiento no existe predominio de sexo, ya que afecta tanto a hombres

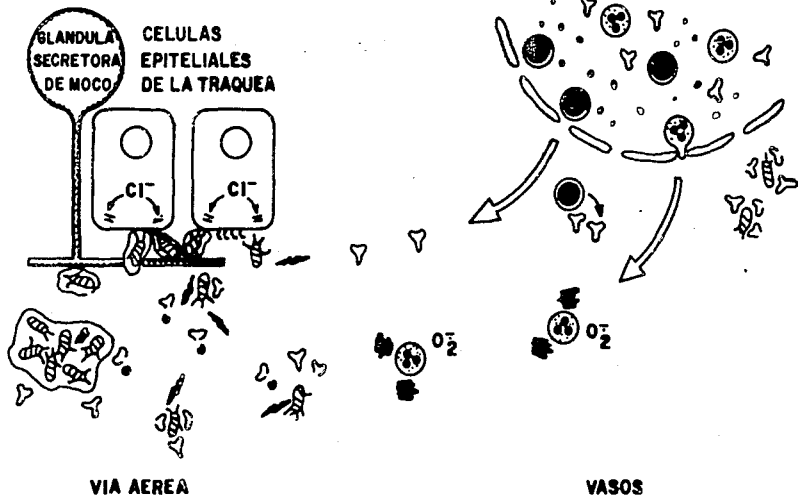


FIGURA 1 ALTERACIONES PRESENTES EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE ENFERMOS CON FIBROSIS QUISTICA.

como a mujeres. La edad para el inicio es variable, y sus manifestaciones, pueden presentarse, antes del nacimiento, durante el primer año de vida, ó en edades posteriores. (8-10).

Generalmente, la enfermedad no se manifiesta antes del nacimiento, aunque existen casos, en los que se presenta patología como; íleo meconial, vólvulos y atresia intestinal, en donde, el feto continúa su vida intrauterina sin alteraciones, con una gestación de duración normal y peso al nacimiento ligeramente bajo. (1, 11-13).

En éste padecimiento, también pueden observarse; alteraciones a nivel de senos paranasales, cuello uterino y con menor frecuencia, cirrosis hepática. Debido a que las secreciones son excesivamente viscosas, ocurren eventos obstructivos y en forma secundaria, se produce escasez de líquido; que ocasiona por consiguiente, una alteración en la concentración de electrolitos, presencia de constituyentes orgánicos anormales y alteraciones en el control autónomo del proceso secretorio. (3, 14-21). A nivel pancreático, existe obstrucción del drenaje enzimático hacia el duodeno, lo que impide la digestión y absorción adecuada de proteínas, vitaminas y lípidos, ocasionando distensión abdominal y flatulencia, que se acompañan de evacuaciones fétidas, grasosas y espumosas (1, 21-23). Las personas afectadas por la enfermedad, presentan desnutrición y retraso en el crecimiento, con ello, se produce deficiencia en la absorción de vitaminas liposolubles. (1, 24-25).

Los pulmones, son normales en el recién nacido, la lesión, se torna severa y progresiva en el período postnatal, apareciendo como defecto temprano, obstrucción parcial ó total de los bronquiolos. El primer síntoma que sugiere compromiso pulmonar es la tos, que al principio es seca, pero conforme se presentan infecciones recurrentes, se hace productiva, crónica y paroxística. (22, 26-27).

El curso de la enfermedad es variable, dependiendo del tratamiento. En algunas ocasiones, los pacientes solo presentan cuadros de tos, ó un curso asintomático, mientras otros, desarrollan enfermedad pulmonar obstructiva o crónica, Así, ésta puede aparecer, semanas meses o años después del nacimiento.(24, 26, 28-31). Pero si el padecimiento evoluciona, la tos se manifiesta como crónica y disminuye la tolerancia al ejercicio, por lo que se observa un bajo tono muscular, llegando al punto, en que es necesario utilizar accesorios musculares para facilitar la respiración cuando se produce anorexia. Los ataques de tos, favorecen la presencia de hernias abdominales e inguinales, debido a la presión intraabdominal que se ejerce.(33).

En pacientes que padecen fibrosis quística, la producción de mitógenos, se encuentra deprimida. (34).

La autoinmunidad ha sido incriminada ante la evidencia de anticuerpos antipulmonares y antipancreáticos en el moco bronquial de los pacientes afectados de fibrosis quística, los que no se presentan en las demás enfermedades pulmonares crónicas. (8, 12, 17, 18, 23, 28, 32, 35).

La mucosa pulmonar de éstos pacientes, puede ser fácilmente colonizada por microorganismos oportunistas. Staphylococcus aureus, fué el primero en detectarse como agente causal de infecciones pulmonares en personas que padecen la enfermedad, seguido por P. aeruginosa; aunque también pueden encontrarse con menor frecuencia a microorganismos tales como: Haemophilus Influenzae, Candida albicans, Aspergillus fumigatus y otros no fermentadores de glucosa. (4, 36-37).

Debido a la eficiencia de la terapia antimicrobiana para combatir a S. aureus, P. aeruginosa, emerge como la bacteria patógena más importante relacionada con la enfermedad. Este es el microorganismo más asociado a complicaciones y mortalidad, ya que posee la capacidad de desarrollarse en diferentes ambientes y la temperatura corporal le permite la formación de microcolonias, cuya característica principal en pacientes con fibrosis quística, es su consistencia altamente mucóide, lo cuál dificulta la limpieza de vías respiratorias, e incrementa la viscosidad de las secreciones bronquiales.

Bajo éstas condiciones, el microorganismo, puede elaborar una serie de productos

que presentan efecto ciliotóxico y que impide aún más la limpieza de ésta zona. También se ha demostrado la participación de toxinas y exoenzimas con actividad proteolítica, como importantes factores de daño en el paciente. (38-39).

Tomando en cuenta lo antes mencionado, y considerando a P. aeruginosa un microorganismo oportunista causante de infección crónica del paciente con fibrosis quística, juzgamos importante referirnos a ella y a los mecanismos involucrados en su patogenicidad.

FAMILIA: Pseudomonadaceae.

La familia Pseudomonadaceae se encuentra formada por bacilos gram negativos, rectos o curvos, móviles por flagelos polares, quimioorganótrofos, estrictamente aerobios; con metabolismo respiratorio, nunca fermentativo. Catalasa y oxidasa positivos en la mayoría de los casos; presentan un contenido de guanina mas citosina de 58-71% por mol.

Dentro de ésta familia, se encuentran incluidos, los géneros Pseudomonas, Xanthomonas, Fraeuteria, y Zoogloea, que pueden ser diferenciados, observando las características mencionadas en la tabla 1. (40).

El género Pseudomonas, se caracteriza por su capacidad de desarrollar en medios de cultivo simples.

Las cepas de Xanthomonas, son generalmente patógenas para las plantas, mas exigentes nutricionalmente que Pseudomonas, capaces de producir un pigmento amarillo, y generalmente oxidasa negativas. Tanto los géneros Pseudomonas como Xanthomonas, son incapaces de desarrollar en medios ácidos, en contraste con el género Fraeuteria, que puede desarrollar hasta pH de 3.6. Las cepas del género Zoogloea, producen una pseudocápsula dendrítica.

El género Fraeuteria, es capaz de producir H₂S, y un pigmento de color amarillo-café.

Algunas características generales de la familia Pseudomonadaceae se describen en la tabla 2.

GENERO Pseudomonas.

Los miembros de éste género, se presentan como bacilos gram negativos, rectos o curvos, pero nunca helicoidales, miden de 0.5 a 1 micra de diámetro, y de 1.5 a 5 micras de largo. Algunas especies, acumulan beta-hidroxibutirato como fuente de carbono de reserva, lo cuál se observa en el microscopio, como inclusiones sudanofílicas.

Móviles por un solo flagelo, raramente inmóviles. En algunas especies, se observa un flagelo lateral, de corta longitud de onda. Comúnmente, las células del género Pseudomonas, presentan exclusivamente flagelos polares, aunque en algunos casos, la inserción flagelar es subpolar, bajo ciertas condiciones de cultivo, lográndose aislar especies inmóviles, presentes en la naturaleza. (Redfearn et al . , 1966). (40-41).

El número de flagelos polares, presentados por la bacteria, es de importancia taxonómica.

El género Fraeuteria, es capaz de producir H₂S, y un pigmento de color amarillo-café.

Algunas características generales de la familia Pseudomonadaceae se describen en la tabla 2.

GENERO Pseudomonas.

Los miembros de éste género, se presentan como bacilos gram negativos, rectos o curvos, pero nunca helicoidales, miden de 0.5 a 1 micra de diámetro, y de 1.5 a 5 micras de largo. Algunas especies, acumulan beta-hidroxibutirato como fuente de carbono de reserva, lo cuál se observa en el microscopio, como inclusiones sudanofílicas.

Móviles por un solo flagelo, raramente inmóviles. En algunas especies, se observa un flagelo lateral, de corta longitud de onda. Comúnmente, las células del género Pseudomonas, presentan exclusivamente flagelos polares, aunque en algunos casos, la inserción flagelar es subpolar, bajo ciertas condiciones de cultivo, lográndose aislar especies inmóviles, presentes en la naturaleza. (Redfearn et al ., 1966). (40-41).

El número de flagelos polares, presentados por la bacteria, es de importancia taxonómica.

Presenta un metabolismo estrictamente aerobio, utilizando al oxígeno como último aceptor de electrones. La mayoría de las especies, no requiere de factores orgánicos para su desarrollo. (42).

Generalmente, oxidasa y catalasa positivos, quimioorganótrofos, aunque algunas especies son facultativas y por lo tanto capaces de utilizar hidrógeno, ó monóxido de carbono como fuente de energía. (40-42).

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Algunas especies, son patógenas para los humanos, animales ó plantas. La capa externa de su membrana, presenta en su interior, unidades esféricas, que confieren estabilidad osmótica y que se han caracterizado como proteínas.

En la membrana externa de P. aeruginosa, se observan, una gran cantidad de poros, lo que favorece la penetración de péptidos de cadenas largas, así como de compuestos hidrofóbicos.

En algunas especies de Pseudomonas, se observan estructuras microtubulares, conocidas como rapidosomas, cuya función, no ha sido bien establecida en la actualidad, aunque se piensa que están relacionados, con el origen y reordenamiento de membranas y mesosomas, así como posible sitio de almacenamiento de bacteriocinas. (4).

Se ha detectado la presencia de un pili o fimbria en algunas especies de Pseudomonas. (Fuerst y Hayward, 1969). Su inserción, puede ser polar (P. aeruginosa, P. acidovorans, P. testosteroni, P. maltophilia, P. alcaligenes, P. solanacearum) ó peritrica (P. cepacia, P. fragi) aunque existen especies como (P. fluorescens, P. aureofaciens, P. chlororaphis, P. putida, P. oleovorans y P. andropogonis), que no presentan fimbrias. Dicho pili es retráctil, actúa como receptor para varios fagos, y en el caso de P. aeruginosa, contribuye en la patogenia sobre superficies celulares, ya que afecta la fagocitosis. (Buchanan y Pearce).

Los miembros de éste género, presentan un antígeno "O", que es termoestable y en el caso de P. aeruginosa, se encuentra representado por su lipopolisacárido de superficie. La respuesta inmune dirigida contra éste, presenta anticuerpos de la clase IgM en manifestaciones tempranas de la enfermedad. (Hoiby 1979).

Se ha aislado un antígeno termolábil, a partir de P. aeruginosa, formado por proteínas, compuestas por subunidades de P.M. de 62 000, presentes en la fracción citoplásmica de las células.

Tanto el flagelo, como la fimbria de la bacteria, actúan como antígenos termolábiles. Las exoenzimas, como; proteasas, fosfatasa y fosfolipasas, también pueden

actuar como antígenos, y la seudocápsula, es capaz de restringir la producción de aglutininas.

El género Pseudomonas, es capaz de producir pigmentos en la mayoría de sus especies, aunque existen excepciones, como el caso de P. stutzeri. Los pigmentos más comunes del género, son solubles y fluorescentes, son conocidos como; pioverdina y plocianina (de color azul); éste último, es bien conocido estructuralmente, y ambos se producen en grandes cantidades en medios de cultivo que contengan bajas concentraciones de hierro. (Stanier et al., 1966).

Estudios realizados por Meyer y col., han demostrado, que la función de la pioverdina, es la de transportar hierro.

Otro compuesto fluorescente, que se ha aislado a partir del género Pseudomonas en la especie P. ovalis, es la pteridina; así mismo, P. fluorescens, produce dos antibióticos fluorescentes; fluopsina C y fluopsina F.

Algunos pigmentos no fluorescentes, como; clororafina y pigmentos no carotenoides, se producen por diversas especies del género Pseudomonas. (43).

Frecuentemente, pueden aislarse cepas de Pseudomonas, a partir de muestras clínicas, y son capaces de causar infecciones nosocomiales, particularmente, en

pacientes que se encuentran inmunosuprimidos, como es el caso de aquellos que sufren; neoplasias, quemaduras, fibrosis quística, etc.

Generalmente, el género Pseudomonas es multirresistente a agentes antibacterianos, lo que favorece el progreso de infecciones causadas por éstos microorganismos.

En la tabla 3 se enumeran características de algunos miembros del género Pseudomonas. (40).

Tabla 1. " CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA Pseudomonadaceae. "

<u>Pseudomonas:</u>	Generalmente, oxidasa positivo, móvil, capaz de desarrollar en medios de cultivo simples.
<u>Xanthomonas:</u>	Produce un pigmento amarillo, insoluble en agua (xantomonadinas), oxidasa negativo o dudoso, su desarrollo en agar nutritivo, se puede inhibir en presencia de 0.1 % de cloruro de trifeniltetrazolo.
<u>Zoogloea:</u>	Presenta células extremadamente móviles en cultivos jóvenes, produce unaseudocápsula dendrítica.
<u>Fraeuteria:</u>	Produce H ₂ S y un pigmento de color amarillo-café.

Tabla 2. " FAMILIA Pseudomonadaceae. "

Características	Fam. Pseudomonadaceae.
Morfología:	
Bacilos	+
Cocos	-
Movilidad	+
Presencia de flagelo:	
Polar	+
Catalasa	+
Oxidasa	V
Producción de pigmento:	
Fluorescente, hidrosoluble	V
Mol% G+C de DNA	58-71

V = variable.

Tabla 3. " COMPARACION ENTRE *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, "

Características	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
Número de flagelos	1	Menos de 1
Producción de pliclanina	+	-
Producción de ploverdina	+	+ ó V
Oxidasa	+	+
Licuefacción de gelatina	+	+
Lecitinas	-	+
Des. a 4 grados Cent.	-	+
Des. a 41 grados Cent.	+	-
Desnitrificación	+	-
Mol. % G + C de DNA	67.2	60.5

V = variable.

ESPECIE: Pseudomonas aeruginosa.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo gram negativo, saprofítico, que mide de 1 a 3 micras de longitud y de 0.5 a 1 micras de diámetro. Estas dimensiones pueden variar considerablemente, dependiendo de la cantidad de material extracelular que se encuentre asociado con la membrana externa de la pared celular, conocido con el nombre de " glicocálix " que incluye tanto seudocápsula como a la cápsula que protegen a la bacteria. (41-42).

El microorganismo es móvil en diferentes grados, y el número y posición de sus flagelos, varía entre cepa y cepa.

P. aeruginosa es una bacteria aerobia, capaz de sintetizar diversos pigmentos, entre los que se encuentran; pioclanina, ploverdina, piorrubina y piomelanina. Es un microorganismo que requiere de oxígeno para sintetizar sus toxinas, que lo capacita para atacar a pacientes inmunocomprometidos , sometidos a tratamientos prolongados, personas que sufren quemaduras graves, fibrosis quística, cáncer y leucemia aguda. Con menor frecuencia se ha podido identificar en; infecciones óseas y articulares, endocarditis, meningitis, y otitis externa maligna.

Existen dos variedades morfológicas, que son; rugosa, y mucolde. Durante el curso de las infecciones causadas por la bacteria en estudio, la variedad mucolde es la que se manifiesta con mayor frecuencia, cuando la muestra que se analiza,

proviene de expectoración. Esta misma, puede llegar a producir septicemia y en algunas ocasiones la muerte.

Dentro de las distintas cepas que se han identificado hasta el momento, se observa, que cada una de ellas, posee la capacidad de exponer diferentes propiedades de invasividad, como son; producción de toxinas, marcadores antigénicos, pigmentos, resistencia a antibióticos, etc. (42-43).

P. aeruginosa fue aislada por primera vez por Gessard en el año de 1860. (43).

El pigmento verde-azulado producido por la bacteria, se extrajo primeramente por Fordos en 1882. (43-44).

La patogenicidad del microorganismo sobre animales de laboratorio, fue estudiada por Charrin en 1890, quien demostró la enorme toxicidad de la bacteria. La importancia de las toxinas solubles en la patogénesis de *P. aeruginosa*, fue analizada por Bouchard en 1889, quien además demostró la eficacia al aplicar sueros antitóxicos en el tratamiento de infecciones producidas en animales de laboratorio.

Wasserman, logró diferenciar la existencia de una toxina termolábil y una termoestable, distinguiendo entre efecto bactericida y actividad antitóxica del suero producido en conejos, también, demostró con cultivos vivos, que la toxina

termolábil, produce una Inmunidad más efectiva contra infecciones provocadas por la bacteria en estudio, que la toxina termorresistente de la misma. (44).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

POLISACARIDOS DE SUPERFICIE

La seudocápsula de *P. aeruginosa*, incluye un complejo macromolecular que cubre la superficie de la bacteria y le confiere viscosidad en medios líquidos. Dentro de éste concepto no se incluye a la cápsula, que es una pequeña cobertura que se encuentra sobre la superficie celular y que está perfectamente definida, pudiendo estar ausente en algunas ocasiones. La seudocápsula por el contrario, no forma distintas capas sobre la superficie celular y se dispersa rápidamente de la bacteria en medio líquido. Contiene una gran cantidad de polisacáridos (específicamente mananas). Se produce en presencia de compuestos de bajo peso molecular como fuente de carbono, pero no así con carbohidratos. La producción de polisacáridos tiene lugar durante las primeras 24 hrs de incubación.

En 1966 se pensó que la seudocápsula de *P. aeruginosa*, estaba compuesta por ácidos urónicos. Un año mas tarde se afirmó que su composición era: glucosa, fructuosa, ribosa, ramnosa, junto con algunas hexosaminas. Actualmente se sabe que es un complejo que predominantemente se constituye de polisacáridos, en menor grado, lo forman ácidos nucleicos y solo se detecta una pequeña cantidad

de proteínas. La hidrólisis de la fracción de polisacáridos, proporciona principalmente; glucosa, pequeñas cantidades de manosa y aproximadamente 5 % de ácido urónico.

El material que contiene ácidos nucleicos constituye aproximadamente un 20% del peso molecular total de éste compuesto, mientras que los componentes menores (proteínas, ramnosa y glucosamina) son aproximadamente un 5% del peso molecular total, sin embargo es desconocida la participación de los primeros como formadores de ésta estructura. (45, 46).

La función de la pseudocapsula en la patogénesis de la bacteria en estudio, es importante, ya que exhibe una toxicidad considerable sobre los ratones. (47).

En 1971 se demostró un efecto antifagocitario sobre los polimorfonucleares del conejo, donde la inmunización de animales con dicha sustancia, provee de un tipo específico de inmunidad contra la infección de organismos vivos. Existe diferenciación antigénica entre la pseudocapsula y los lipopolisacáridos de la pared celular, que pueden demostrarse por inmunodifusión o inhibición de la hemaglutinación indirecta.

La pseudocapsula de P. aeruginosa equivale funcionalmente a la capsula de neumococos y Klebsiella, en cuanto a que éstas protegen al organismo contra la fagocitosis y confiere cierta toxicidad.

El papel de laseudocápsula en cuanto a la virulencia de la bacteria, aún no está bien determinado, ya que la alta producción de la misma, no parece ser suficiente para conferir gran virulencia.

Un gran número de cepas aisladas del tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística, pertenecen a la variedad mucoide. Estas producen gran cantidad deseudocápsula, pero al ser inoculadas por vía intraperitoneal en ratones, producen menos polisacáridos de superficie que otras cepas de P. aeruginosa y en algunas está ausente, se determinó éste fenómeno como una consecuencia del reacomodo genético que tiene lugar en la bacteria, variación de fase demostrada en éstos microorganismos, como sucede en Escherichia coli (fimbria tipo 1), Salmonella (Ag H), etc.. El polisacárido presente en laseudocápsula, es más tóxico que el lipopolisacárido que se encuentra en la membrana externa de la pared celular de la bacteria, siendo éstos dos antigénicamente distintos. Dicho polisacárido, produce algunas de las manifestaciones tóxicas observadas en bacteriemias provocadas por P. aeruginosa; leucopenia e incluso la muerte. (48-49).

Laseudocápsula de la bacteria puede diseminarse rápidamente a la circulación periférica si es inoculada en ratones. (46).

P. aeruginosa, surge como la bacteria más importante, capaz de infectar los pulmones de pacientes que padecen fibrosis quística. (36, 50-53).

La variedad morfológica que se detecta en individuos que padecen ésta enfermedad en forma crónica, es la mucoide, caracterizada por la presencia de polisacárido en grandes cantidades, el cual se encuentra rodeando a la célula y se ha denominado " exopolisacárido mucoide ", compuesto por; ácido D-manurónico y ácido L-glucónico, cuya mezcla es comunmente referida como alginato. (38, 47, 54-55).

La variedad morfológica que coloniza a los enfermos con fibrosis quística, es la " no mucoide "; pero al ser sometida a diversos procesos ejercidos por el medio que le rodea, éste microorganismo, se transforma a su fenotipo mucoide, siendo finalmente, el que predomina durante la infección pulmonar crónica. (47-48). Costerton y col., proponen, que la variedad mucoide de P. aeruginosa, se desarrolla en el pulmón de éste tipo de pacientes, formando microcolonias, las cuales, juegan un importante papel en la patogénesis de la infección, y son el resultado de fenómenos de regulación genética, propiciados por las condiciones ambientales y propias del paciente con fibrosis quística como se discutirá mas adelante.

La formación de microcolonias, se ve ampliamente favorecida, gracias a la producción local de proteasas elaboradas por la bacteria en estudio, ya que éstas promueven, que en el epitelio respiratorio, se produzca liberación de mucinas, las cuales se caracterizan por estar sulfonadas en personas que padecen la enfermedad y al combinarse con el exopolisacárido mucoide, en presencia de

iones calcio, forman un gel altamente viscoso. Al incrementarse la producción de éste último y por lo tanto la formación de microcolonias, la erradicación ciliar de la bacteria, resulta muy pobre. (56).

P. aeruginosa, es un microorganismo capaz de evadir la respuesta inmunológica, ya que la opsonización de la variedad mucoide es muy limitada " in vivo ", por ello, su erradicación pulmonar no se lleva a cabo. (57).

La IgG de clase 2, es incapáz de unirse con los receptores de los macrófagos alveolares, por lo que éstos, no pueden fagocitar a las bacterias opsonizadas. Lo anterior ocurre, debido a que P. aeruginosa, es capaz de inducir la producción de anticuerpos que bloquean la actividad bactericida del suero de pacientes con fibrosis quística. (4).

Varios pacientes que padecen fibrosis quística, son portadores, tanto de la variedad " no mucoide ", como de la mucoide, al mismo tiempo. (58).

Algunos estudios, han demostrado, que la variedad " no mucoide ", puede convertirse más fácilmente al fenotipo mucoide, cuando se administran tratamientos con carbenicilina, en presencia de algunos fagos y piocinas. (59-60).

Para que ocurra la producción de exopolisacárido, es necesario, que se activen los genes responsables del inicio de su síntesis, cuya expresión, está bajo el control de

genes reguladores, denominados; alg R y alg T. (60-62). No se sabe si el gen alg T actúa directamente sobre el gen alg R, ó sobre el grupo de genes que sintetizan alginato.

Las cepas que pertenecen a la variedad mucoide, son poliaaglutinables, mientras que las "no mucoides", son monoaglutinables. (61). La característica de ser poliaaglutinable probablemente, se debe a la ausencia, ó a la presencia de un número reducido de cadenas laterales en el polisacárido. (58, 61-62).

Algunos pacientes con fibrosis quística, sobreviven, logrando llegar a la edad adulta, sin estar crónicamente colonizados, o infectados con la variedad mucoide de P. aeruginosa. Se ha reportado, que éstos pacientes, presentan anticuerpos opsonofágicos dirigidos, específicamente contra el exopolisacárido mucoide. Lo anterior ocurre en pocas ocasiones, ya que la mayoría de las personas que padecen la enfermedad, no logra la producción de éstos anticuerpos.

ENDOTOXINAS

Numerosos estudios, indican que la endotoxina es responsable de la patogénesis de P. aeruginosa. La fracción lipídica A, se obtiene por medio de hidrólisis ácida suave de los lipopolisacáridos, que contienen glucosamina fosforilada y los ácidos 3- hidroxidecanoico y 3-hidroxiduodecanoico. Cuando se

extrae con una mezcla de agua-fenol, se demuestra su toxicidad, obteniéndose un producto cuya dosis letal media es de 840 microgramos. Cuando la endotoxina se inocula por vía intraperitoneal y a una dosis letal media de 450 microgramos, por vía intravenosa. Las extracciones también pueden llevarse a cabo con; ácido tricloroacético, éter, etílico y EDTA-lisozima más agua caliente, cuyo producto es mucho menos tóxico, ya que se necesitan más de 4 mg. para provocar la muerte de ratones por vía intraperitoneal. Los lipopolisacáridos de P. aeruginosa no cumplen la misma función que las endotoxinas entéricas en reacciones para evaluar la sensibilidad a epinefrina. (44).

EXOENZIMAS.

Después de numerosos estudios realizados sobre la producción de endotoxinas de P. aeruginosa, se ha podido demostrar que la acción de éstas, no es suficiente para explicar la patogénesis del microorganismo; ya que lo anterior se logra, gracias a la síntesis y excreción de productos extracelulares.

Las enzimas que produce P. aeruginosa, incluyen: colagenasa, elastasa, lecitinasa, proteasas, esterasa, lipasa, nucleasas (DNAasa y RNAasa) y dos hemolisinas. En particular, tanto la colagenasa como otras proteasas contribuyen directamente con la necrosis de tejido celular.

Una de las características, mejor conocidas de la bacteria, es su actividad proteolítica; la licuefacción de gelatina, es comúnmente empleada para demostrar dicha propiedad, aunque también puede lograrse buscando el aclaramiento de leche desnatada, digestión de caseína y hemoglobina, licuefacción de suero coagulado, disolución de fibrina, elastina y colágeno.

Para evaluar el papel de los diversos productos de P. aeruginosa en la patogénesis, Liu estudió la asociación entre lesiones cutáneas hemorrágicas y necróticas con las proteasas de P. aeruginosa; Este tipo de lesiones cutáneas se asocian con la acción de proteasas de la bacteria que actúan sobre la leche desnatada y caseína, pero que no producen licuefacción de gelatina. La gelatinasa se encuentra usualmente en mucho mayor concentración que la caseinasa en el sobrenadante de cultivos de P. aeruginosa, pero solo la primera posee la capacidad de producir eritema e induración de la piel. (44).

Un aspecto de las proteasas excretadas por la bacteria, que atrajo la atención de algunos Investigadores, fue la manera de hidrolizar al colágeno nativo. Han surgido controversias con respecto a ésta actividad, debido a que existen diferentes definiciones de colagenasa utilizadas por distintos investigadores; por un lado, se encuentran los que se apegan a la definición antigua de colagenasa, reportando resultados negativos, ya que no fueron capaces de demostrar la liberación de prolina e hidroxiprolina del colágeno.

Aquellos que no comparten ésta idea, reportan resultados positivos, debido a que fueron capaces de demostrar la liberación de ciertos péptidos del colágeno. (63).

Estudios realizados por Morihara y colaboradores, demostraron que la gelatinasa o colagenasa, es una proteína de peso molecular igual a 77 000, cuyo pH óptimo para su actividad es de 7.0 a 8.5 y su temperatura óptima de 45 grados centígrados. (64).

Analizando un aspecto diferente, otro grupo de investigadores, encontró que las manifestaciones hemorrágicas y necróticas producidas por las proteasas de P. aeruginosa, se asocian con la hidrólisis de la elastina, donde la destrucción de éste sustrato en los vasos sanguíneos, produce hemorragias subcutáneas y también necrosis del área irrigada por dichos vasos. (44).

PROTEASAS.

Por el año de 1964, Morihara y colaboradores demostraron la existencia de tres tipos de proteasas en P. aeruginosa, que podían separarse por medio de cromatografía en DEAE celulosa, obteniéndose las fracciones I, II y III, que fueron denominadas respectivamente; proteasas neutra, semialcalina y alcalina. La fracción I, se detectó en concentraciones bajas en filtrados de cultivos de la bacteria y por lo tanto, se consideró poco significativa. En cuanto a la fracción II se le atribuyó actividad de elastasa; mientras que la fracción III, se logró cristalizar y

caracterizar como una proteína con peso molecular de 48 400, un punto isoeléctrico ligeramente por debajo de 4.08 y temperatura óptima para su actividad de 60 grados Centígrados. (65).

La fracción II ó elastasa presenta un peso molecular de 32 926 - 33 000 daltons, punto Isoeléctrico de 5.9, constante de sedimentación de 3.38 y pH óptimo para su actividad sobre varios sustratos, incluyendo elastina, caseína, hemoglobina, albúmina de huevo y leche desnatada, pero no así sobre colágeno. Dicha enzima es una metaloproteína dependiente de zinc y calcio, producida por una gran cantidad de cepas de P. aeruginosa. Lográndose en la actualidad la identificación y secuencia de los primeros veinte aminoácidos que la conforman. (66-67). Así como clonar y secuenciar al gen que codifica para ésta exoenzima.

Los estudios realizados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la elastasa de P. aeruginosa, han detectado cuatro epitopes diferentes, que varían entre sí con respecto a su especificidad y actividad. (66-68).

La elastasa, puede degradar al Interferón gamma, siendo menos activa que la proteasa alcalina en presencia de suero humano. Sin embargo. estudios efectuados sobre lo anterior, empleando linfocitos T, han demostrado que la actividad antiviral se reduce; por lo que se ha sugerido que P. aeruginosa y sus productos alteran la función inmunológica, lo cual resulta importante en personas que padecen fibrosis

quística en forma crónica, con lo que el factor limitante de desarrollo bacteriano en éstos pacientes se vería disminuido, ya que el interferón gamma ha sido implicado como la principal linfocina que actuaría como mediador en la activación de los macrófagos, fenómeno que dará como consecuencia la supresión de un número importante de defensas antimicrobianas, como lo demostraron Jensen y col. al estimular macrófagos pulmonares con interferón gamma, e inhibir el desarrollo de bacterias que actúan a nivel intracelular. (69- 71).

La elastasa provoca en el huésped, una respuesta de tipo inflamatorio, localizada, acompañada de derrames. La inactivación de ésta enzima a 100 grados centígrados, durante 5 minutos, evita que se produzca inflamación. También se ha demostrado, que la elastasa estimula la elaboración de mediadores de tipo histamina y bradiquinina, y el factor de Haggeman. Dicho factor, es el vértice, donde se encuentran relacionadas las proteasas activadas con aquellas que pueden activar la cascada del complemento por la vía alterna, quinina-quinógeno, sistemas de coagulación y fibrinolítico, trayendo como consecuencia, depresión de la opsonización, activación de las células T supresoras, descenso en el número de células T cooperadoras, aumento en la producción de células NK, reducción en la capacidad de los macrófagos para presentar al antígeno y la generación de más proteasas que provocan que se incremente la activación proteolítica en tejido

Infección por Pseudomonas proteasa +

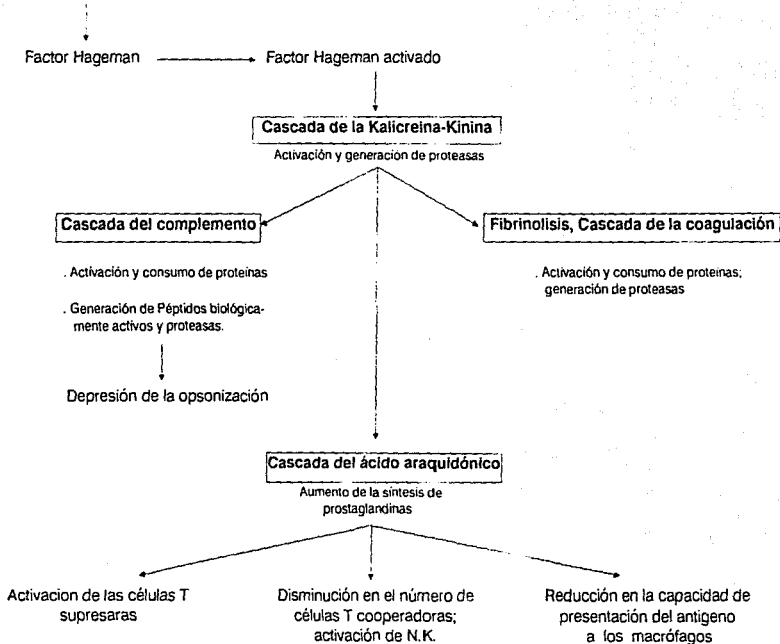


Fig. 2 Consecuencias inmunológicas de la activación de las vías dependientes del Factor Hageman

dañado por quemaduras, y con ello el paciente se encuentra más susceptible a infecciones. (70). (fig. 2).

La elastasa de P. aeruginosa, es capaz de inactivar a los inhibidores de mucosas bronquiales y a alfa 1-proteinasa, los cuáles se encargan de proteger al tracto respiratorio superior, e inferior, de la acción de la elastasa granulocítica. (72). En los pacientes con fibrosis quística, los dos tipos de elastasa, se encargan de destruir tejido conectivo, como resultado de infecciones crónicas.

Experimentos realizados por Holby y col., demuestran que el flucruro de fenilmetilsulfonilo, inhibidor de la elastasa granulocítica, es capaz de reducir en más de un 85% la actividad elastolítica de expectoraciones provenientes de pacientes con fibrosis quística; observándose también, que lo anterior no ocurre al emplear o-fenantrolina, que es un inhibidor de la elastasa producida por E. aeruginosa, lo que comprueba que la actividad elastolítica, presente en las expectoraciones anteriormente mencionadas, no derivan de la elastasa de macrófagos, ni de la producida por la bacteria. (73).

El aumento de elastasa granulocítica en las vías aéreas de los pacientes que padecen fibrosis quística, precede a la colonización por P. aeruginosa, encontrándose también relación directa entre la gran actividad elastolítica que se

presenta en sus expectoraciones con respecto a los estudios del padecimiento, en fase avanzada. (72-74).

Recientemente, se han encontrado evidencias de que la elastasa de la bacteria, provoca la destrucción del tejido conectivo del pulmón en pacientes con fibrosis quística.(73).

Se ha observado un gran aumento en el título de anticuerpos dirigidos contra P. aeruginosa, en el suero de pacientes colonizados crónicamente por la bacteria. (75).

Existe una relación inversa entre la producción de proteasas y la virulencia de la bacteria. Esta última se relaciona con la habilidad de la misma para producir una exotoxina identificada como NADasa. (toxina A)

Se sabe que las proteasas de P. aeruginosa, pueden digerir sus propias exotoxinas " in vitro " y con ello, se supone la producción de una elevada cantidad de proteasas " in vivo ", reduciéndose así el efecto letal de la infección. Con el conocimiento de lo anterior, se propuso la probabilidad de producir un antisuero, obtenido a partir de las proteasas, que pudiera neutralizar o precipitar las enzimas de la bacteria, sin embargo, dicho antisuero no proporcionó la actividad protectora contra la infección. su única aplicación encontrada, fue para tipificar a las diferentes especies

de Pseudomonas por medio de la neutralización de enzimas, o por precipitación en gel.

La elastasa producida por P. aeruginosa y P. fluorescens, son serológicamente indistinguibles.

Recientemente, Heck et. al., han demostrado que, tanto la proteasa semialcalina (elastasa), como la alcalina de P. aeruginosa, son capaces de degradar la membrana basal, que se encuentra asociada con la corteza renal. Aún cuando, anteriormente se habla mencionado la incapacidad de la fracción II, con actividad de elastasa para degradar el colágeno, éstos autores refieren la capacidad de la misma para degradar el colágeno IV, con características especiales, que le permiten la capacidad de conferir estabilidad a la membrana basal. No debiendo olvidar que la elastasa intervendría también en la degradación de la membrana basal, debido a su alto contenido de elastina, localizada en el tejido vascular.

Existen variaciones en la producción de éstas dos proteasas, lo cual depende de la cepa de P. aeruginosa en estudio. In vivo, se ha observado que la concentración de proteasas es del orden de nanogramos, habiéndose observado también una actividad sobre inmunoglobulinas de clase IgG, así como la fracción alfa 2- proteína, degradación del fibrinógeno, del complemento, de proteoglicanos, localizados a nivel pulmonar, factores de la coagulación, pérdida de quimiotaxis y fagocitosis.

Gray y Kreger, utilizando conejos, demostraron que las proteasas producen daño pulmonar extenso, provocando necrosis de las células alveolares y desarrollo de hemorragias intracelulares (76).

Las interacciones existentes entre el huésped y parásito en las superficies mucosas, donde existe la elaboración por algunas bacterias de enzimas que aparecen en las secreciones originan la producción de IgA.

La presencia de enzimas como la IgA proteasa, se estudió por primera vez en materia fecal líquida, donde se encontraron fragmentos de Fc de IgA intactos, notando, que debido a la acción de dichas enzimas, el fragmento se rompía a su vez, en fragmentos mas pequeños.

IgA-1 es sumamente sensible a la acción de las enzimas ya mencionadas, la cual se fragmenta específicamente en las uniones Pro-Tri ó Pro-Ser de la cadena pesada, mientras IgA-2 es resistente a la acción de las mismas.

Se ha encontrado, que en las secreciones respiratorias, gastrointestinales, y mamarias, se encuentra aproximadamente un 40% de IgA-2, mientras que en el suero aparece solo un 10% de la misma.(77).

Shult3 y Miller encontraron que la elastasa es capaz de atacar a los componentes C1, C3, C5, C8 y C9.

ENTEROTOXINAS

P. aeruginosa, se conoce como agente causal de diarreas debido a la producción de una exotoxina de naturaleza proteica y termolábil que no ha sido bien caracterizada, pero que puede contribuir en la formación de edema e induración cutánea.

HEMOLISINAS

La hemolisina termoestable producida por P. aeruginosa consiste de dos glicolípidos, que están compuestos de ramnosa y ácido beta-hidroxi-decanoico. Dicha hemolisina, produce daño ocular y pulmonar. Su mecanismo de acción es similar al de algunos detergentes, los cuáles contienen diversos tipos de sales de sodio y ácidos grasos. (78).

TOXINAS (A y S)

El efecto letal de P. aeruginosa, es la consecuencia más seria de la infección por éste microorganismo.

La acción en conjunto de las endotoxinas y otras toxinas, confieren el efecto nocivo de P. aeruginosa. La mejor manera de demostrar su producción, se logra, aplicando inyecciones subcutáneas de cultivo líquido en conejos. La muerte del animal, por lo general, se presenta después de 24 horas de aplicado el inóculo.

Se ha establecido, que para lograr una buena producción de toxinas, se debe tener un medio estrictamente aerobio en el que se adiciona glicerol como fuente de carbono; por el contrario, la presencia de ácidos nucléicos en el medio, resulta inhibitoria al proceso y esto se incrementa sometándolo a temperaturas elevadas, por lo que se puede concluir, que dicho efecto es mayor cuando los ácidos nucléicos se encuentran como cadenas sencillas que como cadenas dobles; esto resulta interesante, ya que se favorece el desarrollo del microorganismo, pero se inhibe la producción de las toxinas.

Un medio de caldo soya-tripticasa, que contenga glicerol y glutamato monosódico, permite que se libere una alta concentración de exotoxina A a partir de la cepa PA-103. Dicha exotoxina puede ser concentrada por precipitación con acetato de zinc y sulfato de amonio y posteriormente purificada en DEAE y sephadex por cromatografía.

P. aeruginosa, produce las exotoxinas A y S, además de un factor de permeabilidad vascular. (79).

La exotoxina A, está constituida por un gran número de aminoácidos, los cuales en conjunto poseen un punto Isoeléctrico de 5.1 y de estos, los que predominan son; arginina-lisina, siendo el aminoácido N-terminal la arginina.

Está constituida por una cadena polipeptídica sencilla, con un peso molecular que oscila entre 66 000 y 71 500 daltons.

Partiendo de una cepa mutante de P. aeruginosa, donde el aminoácido CIS, en posición 287 (CIS-287) y CIS 265 que forman un puente disulfuro, son intercambiadas por SER en el dominio dos de su exotoxina A, se reduce el efecto tóxico que produce sobre las células L de ratón, con respecto al de la cepa silvestre. La toxicidad de la exotoxina A sobre éstas células, se debe, como se mencionó anteriormente, a que se produce una aceleración en la ribosilación de ADP del factor de elongación 2, dentro del citosol. Esto ocurre por diversos mecanismos, comenzando con los enlaces de receptores sobre la superficie de la célula.

La toxina es endocitada y posteriormente, es posible que pase al aparato de Golgi; proceso que requiere de un pequeño descenso en el pH Intravesicular. Al ocurrir lo anterior, la exotoxina A sufre un cambio conformacional y las regiones hidrofóbicas

que normalmente se encuentran ocultas, quedan expuestas, lo que resulta crucial en el proceso de inserción translocación.

Por medio de difracción de rayos X, se han detectado tres dominios en la estructura de la exotoxina A.

DOMINIO I. Ha sido identificado como el receptor-enlace.

DOMINIO II. Involucrado con la inserción y translocación en la membrana.

DOMINIO III. Como el responsable de la actividad enzimática.

El puente disulfuro formado por CIS-265, CIS-287, conecta a dos de las seis series de alfa-hélice que se encuentran comprendidas en el dominio II de la exotoxina A.

Se ha hipotetizado, que los puentes disulfuro producen una coacción conformacional sobre la molécula, y cuando los anteriores son removidos, se promueve un cambio estructural que se favorece a bajo pH.

La substitución de CIS-265 y CIS-287 en el dominio II de la exotoxina A por SER, produce la eliminación del puente disulfuro que se tiene entre las hélices A y B del mismo, por lo cual, la proteína, exotoxina A obtenida de la cepa mutante, resulta aproximadamente 80 veces menos tóxica sobre las células L de ratón.

La función del dominio III de la exotoxina A, no se ve alterada con la mutación. Se piensa que la función del dominio I se altera considerablemente con el fenómeno anteriormente mencionado.

Los antecedentes presentados son consistentes y con ello sabemos que al remover los puentes disulfuro en la exotoxina A, se alteran las propiedades funcionales del dominio II, causando por lo tanto, alteraciones en la permeabilidad de la membrana y produciéndose con ello, la desestabilización de la proteína ya mencionada. (80).

La exotoxina, induce el engrosamiento mitocondrial con cambios en la permeabilidad de su membrana. Se ha visto que dicha toxina inhibe la síntesis de proteínas en los reticulocitos celulares. Para que lo anterior se lleve a cabo, se requiere de la presencia de NAD. La toxina cataliza la transferencia de ADP ribosilado del NAD, el cual forma un enlace covalente con el factor 2 de elongación y con ello se inhibe la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. (45)

La actividad como ADNasa de la exotoxina A de P. aeruginosa, es igual a la efectuada por el fragmento A de la toxina diftérica, comprobándose que las dos toxinas son serológicamente distintas y que ambas exhiben diferentes especificidades celulares. Una diferencia entre la toxina diftérica y la exotoxina A de P. aeruginosa es el hecho de que la última, usualmente produce una proenzima que

funciona como NADasa únicamente después de que ocurre un rompimiento de sus dos fragmentos (A y B respectivamente).

La exotoxina A funciona como un buen antígeno y provoca que se active la respuesta inmune cuando se ha sufrido una infección por P. aeruginosa, en donde se presenta una ausencia total de anticuerpos dirigidos contra los componentes celulares del organismo.

La exotoxina A es una de las toxinas extracelulares con gran efecto tóxico sobre las células de mamíferos. Dicha exotoxina puede ser fácilmente convertida a toxoide con la adición de formalina al 0.4 %, bajo una temperatura de 4 grados centígrados, provocando la pérdida de su toxicidad después de 24 horas y conservando su antigenicidad durante 3 a 4 días. La pérdida de la misma es variable dependiendo de la temperatura. (8).

La exotoxina A puede obtenerse experimentalmente y concentrarse por medio de liofilización, ya que no pierde su toxicidad tras sesiones de enfriamiento y calentamiento, a diferencia del resto de las toxinas extracelulares producidas por P. aeruginosa. (34).

La toxicidad detectada en animales al aplicar la toxina por vía subcutánea, aparece gradualmente; por ejemplo, en conejos las lesiones necróticas, aproximadamente después de 48 a 72 horas y la muerte se produce 48 horas más tarde del inicio de la

lesión. Con lo anterior, se concluye que la toxina ejerce su efecto por inhibición de la actividad del metabolismo esencial de las células.

Al administrar exotoxina A en perros, se produce un rápido ascenso en la presión portal, que es moderado durante 2 a 3 minutos y a esto le sigue un descenso en la presión sanguínea periférica; en ocasiones, los perros mueren a causa de choque e incluso se han detectado casos de acidosis, niveles elevados de catecolamina circulante, e incremento en la diferencia arteriovenosa de saturación de oxígeno, leucopenia y colapso circulatorio. La necrosis del hígado, es el hallazgo histopatológico más prominente y se ha reportado en estudios postmortem en animales, cuya causa de muerte se atribuye a la inoculación de exotoxina A purificada. En otros animales, se detectó hemorragia pulmonar e incluso necrosis de túbulo renales. La ausencia de necrosis en otros tejidos es notoria y eso indica que existen diferencias en el grado de penetración por las moléculas de toxina.

Demostraciones realizadas en ratones, indican que, al inocular la exotoxina A clase I, el hígado y los riñones sufren un mayor daño que el corazón, pulmones, páncreas y cerebro. Después de 4 horas de aplicada la exotoxina, la síntesis de proteínas en el hígado es inhibida aproximadamente en un 50%.

El estudio de la exotoxina A resulta difícil, como consecuencia de la actividad proteolítica de las enzimas de la propia bacteria, ya que " in vitro " se ha observado la destrucción de ésta toxina. (34).

Los anticuerpos dirigidos contra la exotoxina A, poseen la capacidad de neutralizar a la toxina extracelular. (8).

PAPEL QUE DESEMPEÑA LA RESPUESTA INMUNE EN INFECCIONES PRODUCIDAS POR P.aeruginosa.

P. aeruginosa es un microorganismo oportunista, que no es capaz de producir infecciones en individuos sanos.

Los mecanismos de defensa que protegen al organismo son; de tipo inespecífico y específico.

1. RESPUESTA INESPECIFICA.

Los mecanismos locales inespecíficos, incluyen; barrera física (del epitelio de las superficies celulares, que continuamente es renovado) y la secreción mucosa que cubre las células por su parte interna. El tracto respiratorio, está provisto por células ciliadas que cumplen con múltiples funciones, como la de remover partículas

Inhaladas; la lisozima, lactoferrina, interferón, sistema del complemento, y en algunas ocasiones la flora bacteriana normal que compete con la bacteria infectante.

Tanto el pH de algunas secreciones, como el flujo gástrico, son condiciones desfavorables para que pueda ejercer su efecto letal P. aeruginosa.

Los ácidos grasos de cadenas largas, fungen como antibacterianos naturales; la piel está provista de un pH desfavorable para que ocurra infección por la bacteria en estudio. Finalmente los macrófagos y leucocitos neutrófilos en las mucosas, desempeñan funciones fagocitarias sobre los microorganismos invasores no capsulados.

El principal mecanismo de defensa inespecífico, incluye la activación de la cascada del complemento por la vía alterna o de la properdina y por la vía clásica, así como la fagocitosis realizada por neutrófilos y macrófagos. Esos mecanismos inespecíficos, juegan un importante papel en la lucha entre bacterias no patógenas y las variantes no capsuladas de las patógenas. (44).

2. RESPUESTA ESPECIFICA

Los mecanismos inespecíficos, son reforzados por la inmunidad humoral (anticuerpos producidos por las células B) y celular (células T y linfocinas). La unión entre los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, es necesaria para

establecer un combate contra las bacterias capsuladas, pirogénicas y las de localización intracelular. (44).

MECANISMOS DE INMUNIDAD HUMORAL ANTIBACTERIANA

INMUNIDAD HUMORAL LOCALIZADA EN MUCOSAS.

La manifestación de la respuesta inmune humoral " in situ ", es la secreción de inmunoglobulinas. Dentro de éstas, la clase que se secreta en mayor proporción, es la IgA secretora, la cual es producida localmente; otra clase de inmunoglobulinas que pueden estar presentes en secreciones son: IgG, IgM, IgD, e IgE. Además, durante la inflamación, hay una liberación considerable de IgG que va del suero hacia las secreciones mucosas.

La IgA secretora, está especialmente adaptada en las superficies de las células secretoras; el componente secretor de esta molécula, es relativamente resistente a la digestión enzimática, efectuada por enzimas proteolíticas presentes en las superficies de las mucosas. Algunas enzimas bacterianas, son capaces de fragmentarla. Su función antiviral está bien establecida, pero no sucede así, con su actividad antibacteriana. El posible mecanismo se explica, afirmando que existe aglutinación de las células bacterianas, e inhibición de su crecimiento (efecto bacteriostático) en las células mucosas, lográndose el transporte mucociliar y la remoción de la bacteria. (44).

Se sabe que la adherencia de algunas bacterias, se adjudica a la posesión de una fimbria, por lo que, al tener anticuerpos dirigidos contra la misma, es posible proteger al huésped. Otra posible acción de la IgA secretora es la neutralización de las toxinas bacterianas, aunque no se ha detectado que pueda fijar al complemento por la vía clásica.

Posiblemente algunos complejos antigénicos de la IgA secretora logran activarlo por la vía alterna. Dicha inmunoglobulina, puede interactuar con la lisozima y el complemento para producir bacteriolisis, sin embargo, en secreciones del tracto respiratorio existen bajas concentraciones de componentes del complemento.

Los polimorfonucleares y macrófagos no presentan receptores para IgA, e IgA secretora, por lo que, no promueve la fagocitosis de P. aeruginosa por los macrófagos alveolares en el mismo grado que la IgG. Otra función de la IgA secretora, es la de regular el acceso de antígenos microbianos.

La IgG no es una inmunoglobulina predominante en secreciones, pero en los pequeños conductos, su concentración es semejante a la de IgA secretora.

La IgG es biológicamente muy activa y su poder antibacteriano es bien conocido; los polimorfonucleares y macrófagos poseen receptores para ésta inmunoglobulina, que sin la participación del complemento puede aglutinar y opsonizar bacterias;

además es capaz de inactivar toxinas y su complejo antigénico puede activar al complemento por la vía clásica, promoviendo así la lisis de las bacterias gram negativas susceptibles.

La IgM se encuentra en bajas concentraciones en fluidos mucoides y su papel no ha sido bien establecido; los neutrófilos y macrófagos poseen receptores para el complemento, pero no para la IgM. Gracias a la activación del complemento, ésta inmunoglobulina puede promover la opsonización provocando lisis bacteriana. En resumen, la IgM, puede aglutinar bacterias en pacientes con una deficiencia selectiva de IgA.

La IgE es la principal clase de inmunoglobulina homocitotrópica en humanos y desempeña un importante papel en reacciones de hipersensibilidad de tipo I, pero su intervención en la defensa del huésped no está clara: se cree que posiblemente la IgE es mediadora de reacciones para incrementar la concentración de otras inmunoglobulinas.

La función de la IgD no es conocida. A partir del momento en que la barrera epitelial es traspasada y la infección local logra establecerse, P. aeruginosa puede provocar daño tisular severo, incluyendo la destrucción de vasos sanguíneos, con la consiguiente necrosis de tejido.

En el suero humano, procedente de personas sanas, puede detectarse un título bajo de inmunoglobulinas, específicamente IgM, que están dirigidas en contra de proteasa y elastasa de P. aeruginosa. (76).

Guttman y Wattson , reportaron que algunos pacientes con infecciones crónicas por la bacteria en estudio, poseen anticuerpos de clase IgG con actividad bactericida. (76).

INMUNIDAD HUMORAL LOCAL CONTRA P. aeruginosa.

La IgA secretora anti-P. aeruginosa puede obtenerse a partir de expectoraciones de pacientes con infección pulmonar previa. Los anticuerpos dirigidos contra los lipopolisacáridos de la bacteria se detectan por medio de la hemaglutinación indirecta. A través de inmunofluorescencia, se ha observado que, tanto la IgA como la IgM, contribuyen con la opsonización bacteriana.

El efecto de la IgA secretora, proporciona un modesto aumento en la actividad de los macrófagos sobre P. aeruginosa, en cambio el producido por la IgG es eficiente y superior con respecto al anterior, favoreciendo con ello la fagocitosis de la bacteria por los macrófagos alveolares, por lo cual, en infecciones del tracto respiratorio humano, la IgG es una clase importante de anticuerpos que se producen contra P. aeruginosa.

Para que los neutrófilos puedan llevar a cabo su función fagocitaria, primero la bacteria debe ser opsonizada y para ello se requiere de los anticuerpos antibacterianos.

La porción Fab de los anticuerpos, se encuentra dirigida contra el antígeno "O", presente en el lipopolisacárido de la membrana externa. (82).

Durante los procesos infecciosos existen deficiencias de algunos componentes del complemento. P. aeruginosa provoca deficiencia en los componentes C3 y C5 que funcionan como quimiotaxinas. La activación del complemento, produce efectos biológicos, que incluyen quimiotaxis y opsonización bacteriana.

Algunas cepas de P. aeruginosa pueden ser opsonizadas por el complemento, cuando existe una ausencia relativa de anticuerpos; por lo que podemos decir que la fagocitosis de la bacteria por los macrófagos alveolares está mediada por la acción del sistema del complemento.(82).

SISTEMA INMUNE HUMORAL CONTRA P. aeruginosa.

El suero normal de pacientes, o el que contiene aglutininas contra P. aeruginosa protege a ratones contra la infección por el mencionado microorganismo.

La capacidad de opsonización de la IgG y la IgM se demostró empleando macrófagos y polimorfonucleares en ratones. La IgG es capaz de promover el efecto bactericida de los macrófagos de ratones sobre la bacteria en estudio, en presencia de factores termolábiles del suero humano. En contraste con la IgM, el efecto de la IgG fue mejor con suero fresco de ratones, ya que contiene factores termolábiles, que probablemente son factores del complemento. Existe una relación directa entre la concentración de opsoninas y la de anticuerpos protectores en preparaciones de IgG.

Inoculando ratones con sueros obtenidos de personas sanas y voluntarios vacunados con sueros polivalentes de lipopolisacáridos de P. aeruginosa, además de los obtenidos de pacientes con infecciones por dicha bacteria, se observó que la actividad protectora es específica para cada tipo de suero, estableciéndose una relación entre el título obtenido por hemaglutinación indirecta y la presencia de precipitinas y opsoninas dirigidas contra los lipopolisacáridos de P. aeruginosa.

La sensibilidad a la actividad bactericida del suero de personas sanas se puede caracterizar empleando páneces de cepas vivas de P. aeruginosa.

Existe un pequeño incremento de fagocitosis y muerte de la bacteria como se ha observado en neutrófilos polimorfonucleares humanos, como una consecuencia de la vacunación con antígenos de superficie de la bacteria. Otro hecho que se ha observado, es que la vía alterna del complemento, es menos eficiente que la vía clásica, para promover la fagocitosis de bacterias como P. aeruginosa.

La incidencia de la aparición de P. aeruginosa tanto en el medio ambiente, así como microorganismo saprófito en el intestino humano, demuestra que nuestros mecanismos de defensa se encuentran continuamente sometidos a prueba, y éstas infecciones se incrementan en huéspedes inmunocomprometidos. (33).

Cuando P. aeruginosa está presente en el pulmón, debe resistir la acción de una sustancia mucociliar, su descamación y la fuerza de fluido en el tracto urinario; en el ojo, la misma debe soportar la presencia de lisozima y otra gran variedad de factores involucrados con los mecanismos de defensa. (33,32).

MECANISMOS DE DEFENSA LOCAL A NIVEL RESPIRATORIO.

La función mas importante que se desempeña en el tracto respiratorio, es la de purificar el aire inspirado, removiendo gases nocivos, microbios, y otros contaminantes poco comunes.

En personas sanas, el tejido pulmonar se encuentra libre de la presencia de organismos infecciosos.

Para excluir partículas del tracto respiratorio, intervienen diversos mecanismos de defensa, que incluyen, la secreción de moco, tos, broncoconstricción y la producción local de proteínas como la IgA secretora.

Los bronquiolos funcionan como unidades intercambiadoras de aire. Revistiendo la superficie alveolar, se encuentra una proteína con alto contenido de hierro, conocida como transferrina, inmunoglobulinas de la clase IgG y properdina B, la cual activa el sistema del complemento por la vía alterna. Finalmente el tracto respiratorio, cuenta con la presencia de macrófagos alveolares, que son las principales células fagocíticas localizadas en la superficie alveolar.

Existen mecanismos de defensa pulmonar adicionales, como la producción de inflamación del parénquima pulmonar.

Tanto las células inflamatorias, como los granulocitos polimorfonucleares, se movilizan desde la médula ósea u otros espacios vasculares, al tejido pulmonar, para auxiliar a los macrófagos alveolares en su tarea de erradicar por medio de fagocitosis a organismos infecciosos; simultáneamente ocurren alteraciones en la permeabilidad de la barrera hemato-aérea, produciéndose inflamación y permitiendo la entrada a los alveolos, de proteínas intravasculares y fluidos que

contienen factores del complemento, anticuerpos, y algunos otros componentes Inmunológicos.

Todo lo anterior no sucede en pacientes que se encuentran Inmunocomprometidos.

La predisposición a infecciones ocurre, debido a que algunos componentes celulares del tracto respiratorio, son vulnerables al efecto directo de drogas empleadas en quimioterapia y a agentes antiinflamatorios. (83, 81).

Durante procesos infecciosos, los monocitos penetran a los pulmones, a nivel de sistema linforreticular, mientras esto sucede, los macrófagos alveolares se replican " in situ ", en los intersticios, mas rápidamente, por lo que el flujo celular de los mismos a la sangre periférica se incrementa.(84).

PAPEL QUE DESEMPEÑAN LOS ANTICUERPOS CONTRA P. aeruginosa A NIVEL DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO.

Se ha postulado, que en enfermos con fibrosis quística existe alteración en los anticuerpos de la clase IgG, lo que contribuye a que existan infecciones crónicas por P. aeruginosa (85).

El estudio de un perfil enzimático inhibitorio, sugiere que existe actividad de serina-proteínasa, que se atribuye a la elastasa producida por la bacteria en estudio.

La concentración de alfa-1-antitripsina no se encuentra alterada en éste tipo de pacientes.

Las opsoninas de clase IgG, presentan un fragmento que posee un coeficiente de sedimentación de 5S y presenta determinantes antigénicas similares a la porción Fab de la IgG. La presencia del mismo, está inversamente relacionada con la actividad fagocítica. El fragmento, se produce debido a la acción proteolítica de la elastasa de P. aeruginosa.

Al estar fragmentadas las opsoninas de clase IgG, se presenta inhibición de la fagocitosis, ya que a pesar de que la fracción Fc se une a los receptores presentes en la superficie de los macrófagos alveolares; al estar ausente la porción Fab no hay reconocimiento del antígeno, ni opsonización y por consiguiente, no ocurre la

fagocitosis; favoreciendo que las infecciones por P. aeruginosa se conviertan en crónicas. (85-86).

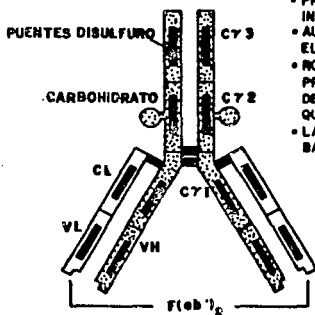
Bigger y Col., afirman que el suero que proviene de enfermos con fibrosis quística, posee un factor fagocítico deficiente, que probablemente, es la IgA. Mientras que Thomassen y Col., han caracterizado a dicho factor, como una proteína termoestable.

Bell y Spock, sugirieron que los dímeros de la IgA secretora que se encuentran en las secreciones respiratorias de personas con fibrosis quística, son capaces de bloquear la actividad bactericida de la IgG. (86-87).

Se han logrado aislar anticuerpos de clase IgG, dirigidos contra el lipopolisacárido de superficie de P. aeruginosa, a partir de suero de enfermos con fibrosis quística. Dichos anticuerpos, presentan deterioro en la porción Fc y por lo tanto, en el ataque contra el antígeno.

El rompimiento que sufre la IgG por la elastasa, es a nivel del dominio C gamma 2; dejando separadas a Fc y Fab (figura 3).

Para que la fagocitosis de Pseudomonas sea óptima se requiere la presencia de opsoninas termoestables; por lo que se espera que los niveles de la IgG sean mayores con respecto a las inmunoglobulinas de clase M y A. (88).



- IgG HIPOGLICOSILADA
- DISMINUCION DE LA ESTABILIDAD DE LOS PUENTES DISULFURO EN LA REGION Fc
- PROCESO BACTERICIDA INTRACELULAR INEFICAZ
- AUMENTA LA AFINIDAD POR LA ELASTASA DE *Pseudomonas aeruginosa*
- ROMPIMIENTO DE LA INMUNOGLOBULINA PRESENTE EN LOS FLUIDOS PULMONARES DE LOS ENFERMOS CON FIBROSIS QUISTICA
- LA FRACCION F(ab)₂ CUBRE A LA BACTERIA

FIGURA 3 ALTERACIONES INMUNOQUIMICAS PRESENTES EN LA IgG DE PERSONAS CON FIBROSIS QUISTICA.

Zebra y Col., cuantificaron seis proteínas presentes en lavados pulmonares de personas con fibrosis quística; entre ellas, se reportaron; IgG, IgA, lactoferrina y lisozima, cuyo niveles se encuentran elevados.

Se ha observado, que las concentraciones de albúmina y transferrina, se encuentran disminuidas en los fluidos que provienen de personas que padecen la enfermedad, así como la actividad elastolítica se encuentra notablemente elevada.

Actualmente, se piensa que la albúmina puede ser destruida debido al proceso inflamatorio crónico, presente en los pulmones de personas enfermas con fibrosis quística (en forma crónica).

Al existir daño pulmonar en las fibras elásticas por la acción de la elastasa, puede producirse enfisema o atelectasia.

Se sabe, que los macrófagos alveolares, contienen una gran variedad de hidrolasas, tales como; colagenasa, elastasa y fosfolipasa.

Observaciones similares a lo anterior, se han hecho en muestras que provienen de expectoraciones de enfermos con fibrosis quística, encontrándose anticuerpos de clase IgA secretora fragmentados; debido a la acción de la IgA proteasa producida por *P. aeruginosa*. (89).

La contribución del factor del complemento C5, para que la fagocitosis se lleve a cabo, también se ve afectada; puesto que la elastasa de la bacteria, posee la capacidad de hidrolizarlo.

Otros autores han encontrado que en forma secundaria, se produce una glucosidasa, que es capaz de alterar al carbohidrato presente en el dominio C gamma 2.

Como consecuencia, de la ineficiencia de anticuerpos dirigidos contra P. aeruginosa, se ha detectado la presencia de complejos inmunes circulantes, formados por IgG, generalmente de clase 2 y la bacteria; lo que favorece que se presenten reacciones de hipersensibilidad, y que el pronóstico de éstos pacientes sea aún más pobre. (89-90).

Analizando lo anterior, podemos concluir que en los pacientes con fibrosis quística, la inmunoglobulina que se detecta en mayor concentración, es la IgG pero ésta no posee la capacidad de opsonizar a P. aeruginosa, debido a que se encuentra fragmentada y por lo tanto, la fagocitosis bacteriana no se lleva a cabo, permitiendo que la infección se vuelva crónica. Con esto es posible suponer que pueden extraerse anticuerpos de clase IgG dirigidos contra la bacteria en estudio y dependiendo de la concentración de éstos, poder predecir si la enfermedad cursa en forma crónica o aguda.

La detección de éstos anticuerpos puede llevarse a cabo, extrayéndolos del suero de personas con fibrosis quística y realizando pruebas de ELISA, para identificar las fracciones correspondientes a fragmentos de IgG. (90-93) .

CONCLUSIONES:

1. La fibrosis quística, es una entidad patológica, de carácter autosómico recesivo.
2. Caracterizada por la producción de secreciones espesas.
3. Compromete inmunológicamente a las personas que la padecen; lo cuál condiciona que sean susceptibles a microorganismos oportunistas.
4. Se encuentra en primer lugar a Pseudomonas aeruginosa.
5. Produce una gran cantidad de enzimas y toxinas, como són; la exotoxina A, la elastasa, colagenasa y dos hemolisinas.
6. Por lo tanto, resulta muy difícil de erradicar del organismo.
7. Algunos de éstos productos, son capaces de actuar sobre factores inmunológicos; ya sea inhibiéndolos ó bloqueando su producción.
8. Lo que favorece la cronicidad de la infección y en muchas ocasiones, la muerte del paciente.
9. Analizando lo anterior, se puede inferir, que la detección de fracciones de anticuerpos dirigidos específicamente contra la bacteria y/ó sus productos, permitiría establecer el tiempo de evolución del proceso infeccioso.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mattsheus M. D. and Drotar D. 1984. Cystic fibrosis a challenging longterm chronic disease. *Pediatr. Clin. North. Am.* 31:133-152.
- 2.- Di Sant' Agnese P.A. and Davis P.B. 1986. Research in cystic fibrosis. (first of the three parts), *N. Engl. J. Med.* 295:481-485.
- 3.- Davis P.B. and Di Sant' Agnese P.A. 1984. Diagnosis and treatment of Cystic fibrosis. An update. *Chest.* 85:802- 809.
- 4.- Peter H. Gilligan. 1991. Microbiology of airway diseases in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:35-51.
- 5.- Bechara J.K. 1986. Enfermedades de las vías respiratorias. *Neumol. Pediatr.* 2da. ed. Méndez Cervantes. México. pp.212-220.
- 6.- Frydman M.I: 1979. Epidemiology of cystic fibrosis. *Rev. J. Chron. Dis.* 32:211-219.
- 7.- Nelson W.E., Behman R.E. and Vaughan V.C. 1983. Diseases of the respiratory system In: *textbook of pediatrics*. 12th ed. W.B. Saunders company. Philadelphia. pp.1086-1099.
- 8.- Rodríguez S.R. Zapata C.R. y Bones D. 1982. Sesión clinicopatológica. Enteritis necrosante y mucoviscidosis. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 39:221-231.

- 9.- Aristozabal D.G. Leal F.J. Ruiz V.E. y Franco R.G. 1988. Actualización sobre mucoviscidiosis Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 35:65-77.
- 10.- López C.E., Saenz R. and López C.G. 1980. Cystic fibrosis in Mexican children: report of 32 cases in 32600 consecutive pediatric autopsies. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 18:167-181.
- 11.- Armendares S., Cortés R. y De la Rosa L. 1984. El componente genético en la mortalidad infantil. Rev. Invest. Clin. 26:3-18.
- 12.- Silverman A. 1983. Exocrine pancreatic insuficieny. In: Karen Berger. Ped. Clin. Gastroenterol. C.V. company Mosby 3a Ed. London. pp.814-835.
- 13.- Symon D.N.K., Russell G., Couzin D.A. and Stewar L. 1984. Cystic fibrosis and chromosomal abnormalities J. Clin. Microbiol. 12:1070-1075.
- 14.- Honeyman M.S. and Siker E. 1985. Cystic fibrosis of the pancreas: An estimate of the incidence of cystic fibrosis. Am. J. Hum. Genet. 17:461-465.
- 15.- Harris R.L. and Riley H.D. 1978. Cystic fibrosis in the Am. Indian. Clin. Pediatr. 41:733-738.
- 16.- Gerdes J.S. and Murphy S. 1985. Cystic fibrosis in the children. Clin. Pediatr. 24:104-106.

- 17.- Colon A.R. 1985. Pediatric pathophysiology. Exocrine pancreatic insufficiency in cystic fibrosis. 1a Ed. Little Brown. Philadelphia pp.244-247.
- 18.- Cosío I.V. 1980. Respiratorio: Fibrosis quística. 9a Ed. Méndez Oteo, Méx pp.455-459.
- 19.- Kendig E.L. 1980. Transtornos pulmonares de la fibrosis quística Ed. Salvat. Méx. pp.546-570.
- 20.- Boucher R.C. Quinton P., Beall R.J. and Mangos J.A. 1984. Cystic fibrosis linked to chloride ions inability to cross certain cells. J.A.M.A. 252:2519-2557.
- 21.- Lowe C.V., May C.D. and Reed S.C. 1979. Fibrosis of the pancreas in infants and children. Am. J. Dis. Child. 78:349-374.
- 22.- Oppenheimer E.H. and Esterly J.R. 1985. Pathology of cystic fibrosis. Review of the literature and comparison with 146 autopsies cases. Prospect. Pediatr Path. 2:241-278.
- 23.- Sturgger F.M. 1984. Structural and developmental abnormalities of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 3:555-556.
- 24.- Wood R.G., Boat T.F. and Doershuk C.G. 1976. Cystic Fibrosis. Am. Rev. Respir. Dis. 113:833-878.

- 25.- Hugh J.G. 1980. Synopsis of pediatrics. 5th Ed. S.T. In C.V. Company Mosby. Missouri pp.615-622.
- 26.- Suter S., Schaad U.B., Roux L. Nydegger U.E., and Waldvogel F.A. 1984. Granulocyte neutral protease and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 149:523-530.
- 27.- Baker N.R: 1981. Role of exotoxin A and proteases of Pseudomonas aeruginosa in respiratory tract infections. Can. J. Microbiol. 28:248-255.
- 28.- Ramírez J.A., Pedroza A. y López C.E. 1982. Manifestaciones gastrointestinales en fibrosis quística del páncreas en niños. Acta Pediatr. 3:24-32.
- 29.- Gray L. and Kreger A. 1979. Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by Pseudomonas aeruginosa proteases. Inf. Immun. 23:150-159.
- 30.- Swachman H. 1988. Cystic fibrosis 3th ed. Ed. Little Brown and company. Boston. pp.271-273.
- 31.- Brock D.J., Barrion L., Bedgood D. and Hayward C. 1985. Prospective prenatal diagnosis of cystic fibrosis. Lancet. 25:1175-1178.
- 32.- Vazquez G.V. 1986. Manifestaciones pulmonares en padecimientos genéticos en edad pediátrica. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 42:1175-1178.

- 33.- Bern Stuttgart. 1990. Pseudomonas aeruginosa, the organism diseases it causes and their treatment. Hans Huber Publishers, Vienna pp.316-323.
- 34.- Pollack Mand Anderson and S.E. Jr. 1979..Toxicity of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A for human macrophages. Inf. Immun. 19:1092-1096.
- 35.- Gibson L.E. and Cooke R.E. 1989. Concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Clin. Pediatr. 23:35-45.
- 36.- Bauernteind A., R.M. Bertele and R. Hung. 1987. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis infection. J. Clin. Microbiol. 15:270-277.
- 37.- Knowles, M.R., M.J. Stutts and A Spock. 1983. Abnormal permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. Science 221:1067-1070.
- 38.- Doring G., Goldstein W. Roll A. and Hoby N. 1985. Role of Pseudomonas aeruginosa exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. Infect Immun. 49:557-562.
- 39.- Pler G.B. Desjardins F. and Aguilar T. 1986. Polysaccharide surface antigens expressed by nonmucoid isolates of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 24:189-196.
- 40.- Arango M. and Schlegel H.G. 1977. Taxonomy of the aerobic Pseudomonas J. Gen. Microbiol. 53:349-361.

- 41.- Krieg N.R. and Hoit J.G. Ed. 1984. Bergeys Manual of sistematic bacteriology Ed. Williams and Wilkins Co. Balt. pp.140-198.
- 42.- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H. N. Ginberg H.S. and Wood B.W. 1984. Tratado de microbiología 3a ed. Salvat Ed. S.A. de Méx. pp.808-810.
- 43.- Lennete E.H. Bajlows A. 1987. Manual de microbiología clínica, 4a ed. Panamericana Buenos Alres. pp.442-469.
- 44.-R.G. Doggett. Pseudomonas aeruginosa. Academ. Press. Inc. 1979. Bast pp.132-150.
- 45.-Sadott J.C. and Artenstein M.S. 1984. The outer cell-wall membrane of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect Dis. 130:81-93.
- 46.- George Dimitracopoulus and John W. Sensakovic. 1985. Slime of Pseudomonas aeruginosa in vivo production. Inf. Immun. 10:152-156.
- 47.- Gerald B. Pierr and Hazel F. Sidberry 1978. Protective Immunization by High-Molecular weight polysaccharide from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 22:919-925.
- 48.- Pierr G.B., H.F. Sidberry. 1983. Isolation and characterization of a high molecular weight polysaccharide from the slime of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 22:908-918.

- 49.- Sesakovic J.W. and Bartell P.F. 1984. The slime of Pseudomonas aeruginosa biological characterization and possible role in experimental infection. J. Infect. Dis. 129:101-109.
- 50.- Thomassen M.J., C.A. Demko and C.F. Doershuck. 1987. Cystic fibrosis: a review of pulmonary infections and interventions. J. Infect. Dis. 3:334-351.
- 51.- Stutman, H.R. and M.J. Marks. 1987. Pulmonary infections in Children with cystic fibrosis. Semin. Respir. Infect. 2:166-176.
- 52.- Mearns M. B., G. H. Hunt and R. Rushworth. 1982. Bacterial flora and respiratory tract in patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 47:902-909.
- 53.- Huang N.N, E. L. Van Hoon and K.T. 1961. The flora of the respiratory tract of patients with cystic fibrosis of the pancreas. J. Pediatr. 59:512-521.
- 54.- Wahba A. H. and J. H. Darel. 1985. The identification of the atypical strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. 38:329-342.
- 55.- Bauernfeind A., R. M. Bertele and Harm K. 1987. Pressure of antistaphylococcal chemotherapeutics in favor of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Infect. Immun. 49:557-562.
- 56.- Baltimore R. S. and M. Mitchell. 1980. Immunologic investigations of mucoid strains of P. aeruginosa. J. Infect. Dis. 141:238-247.

- 57.- Cheng P. W. and T.F Boat. 1989. Increased sulfatation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 84:68-72.
- 58.- Pier G.B. and Desjardins D. 1986. Polysaccharide surface antigens expressed by nonmucoid isolates of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 24:189-196.
- 59.- Pier G.B. 1985. Pulmonary disease associated with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis current status of the host-bacterium interaction. J. Infect. Dis. 151:575-580.
- 60.- Ombaka E. A. R.M. Cozens and M.R.D. Brown. 1983. Influence of nutrient limitation of growth on stability and production of virulence factors of mucoid and nonmucoid strains of Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 5:5880-5888.
- 61.- Pitt, T.L. 1980. Typing Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 12:193-199.
- 62.- Pier G.B., W.J. Matthewus Jr. and D.D. Eardly. 1983. Immunochemical characterization of the mucoid exopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 147:499-503.
- 63.- Dring G., Goldstein W., Roll A. and Holby N. 1985. Role of Pseudomonas aeruginosa exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. Infect. Immun. 49:557-562.

- 64.- Morihara K. 1964. Production of elastase and proteinases by Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 88:745-757.
- 65.- Gerd Dring, Axel Dalhoff. 1984. In vivo activity of proteases of Pseudomonas aeruginosa in a rat model. J. Infect. Dis. 4:302-313.
- 66.- C.C. Hse and R. A. Finkelstein. 1990. Comparison of the Vibrio cholerae hemagglutinin protease and the Pseudomonas aeruginosa elastase. Infect. Immun. 58: 4011-4015.
- 67.- Ian Alan Holder and Alice N. Neely. 1988. Pseudomonas elastase acts as a virulence factor in burned hosts by Haggeman factor-dependent activation of the host-kinin cascade. Infect. Immun. 57:345-348.
- 68.- Jaqueline Lagacé and Manon Fréchette. 1991. Four epitopes of Pseudomonas aeruginosa elastase defined by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 59:712-715.
- 69.- R.T. Harval and B.H. Iglewsky. 1988. The antigenicity of a pulmonary pathogen defined by monoclonal T cells Plenum Publish. Corp. pp.1043-1051.
- 70.- Sorensen R. V. J. 1983. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by Pseudomonas aeruginosa phenazine pigments. Infect. Immun. 4:321-402.
- 71.- Farr A.G. and J. M. Kiely. 1989. Macrophage- T cell interactions involving Pseudomonas aeruginosa. J. Immunol 122:358-389.

- 72.- Suter S. Schaad and U. B. Roux. 1984. Granulocyte neutral proteases and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 149:523-531.
- 73.- Suter S. Schaad. 1986. Levels of free granulocyte elastase in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis: Effect of antimicrobial treatment against Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 153:902-909.
- 74.- Dring G. and N. Holby. 1983. Longitudinal study of immune response to Pseudomonas aeruginosa antigens in cystic fibrosis. Infect. Immun. 43:197-201.
- 75.- Annika Eriksson Marta and Granstr M. Vasil. 1987. Prospective study of serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa exoproteins in cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 25:186-198.
- 76.- L. Gray and Kregger T.S. 1980. Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by Pseudomonas aeruginosa proteases. Infect. Immun. 23: 150-159.
- 77.- Paul C. Mc. Nabb and Thomas T.B. 1981. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Ann. Rev. Microbiol. 35: 477-496.
- 78.- Kozo Fujita and Toyooki Akino. 1988. Characteristics of heatstable extracellular hemolysin from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 56:538-557.

- 93.- Fick, R.B. and Baltimore S. B. 1985. 1-20
- 79.- Blackwood Linda. L. and Stone Richard. 1983. Evaluation of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infections. Infect. Immun. 39:198-201.
- 80.- Azghani O. Ali. 1990. Effects of Pseudomonas aeruginosa elastase on alveolar epithelial permeability in Guinea pigs. Infect. Immun. 58:433-438.
- 81.- Pollack M. and Anderson S.E. 1978. Toxicity of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A for the human macrophages. Infect. Immun. 19:192-198.
- 82.- Young L.S. , Meyer D. R. and Armstrong D. S. 1982. Human immunity to Pseudomonas aeruginosa. Relationship between heatstable opsonins and typespecific lipopolysaccharides. J. Infect. Dis. 126:257-276.
- 83.- Sorensen R.U. and Stern R.C. 1981. Cellular immunity to bacteria: Impairment of In vitro lymphocyte responses to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. Infect. Immun. 18:735-740.
- 84.- Golde D.W. and Finley T.N. 1984. The pulmonary macrophage in cystic fibrosis. J. Med. Microbiol. 290: 875-878.
- 85.- Robert Fick and Gary S. Jr. 1984. Proteins of cystic fibrosis respiratory tract. J. Clin. Invest. 74:236-248.

- 86.- Holby N. and Olling S. 1987. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Bactericidal effect of serum from normal individuals and patients with cystic fibrosis on Pseudomonas aeruginosa strains. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 85:106-114.
- 87.- Bell D. and Spock A. 1980. Immunoglobulins of the distal airway of the lung in cystic fibrosis. Sturgess Ed. Can. Cys. Fibr. Found. Toron. Can. 3a Ed. pp. 303-323.
- 88.- Reynolds H. Y. and Newball H.H. 1985. Specificity of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa by human alveolar macrophages. J. Clin. Invest. 56:376-385.
- 89.- Fick R.B. and Squier S.U. 1984. Protein of the cystic fibrosis respiratory tract: fragmented immunoglobulin-G opsonic antibody causing defective opsonophagocytosis. J. Clin. Invest. 14:236-248.
- 90.- M.M. Brett. and Littlewood M. 1988. Prediction and diagnosis of early Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 26:156-166.
- 91.- Pederson S.S. and Espersen F. 1987. Diagnosis of chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Invest. 25:183-189.
- 92.- Krieg D.P. Bass J.A. and Mittingly S.J. 1986. Aeration select for mucoid phenotype of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 24: 986-990.

93.- Fick. R.B. and Baltimore S. R. 1985. IgG proteolytic activity of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 151: 589-598.