

11262

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

7
20

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EXPRESION DE RECEPTORES Fc RIII, CR1 Y CR3 EN NEUTROFILOS
POLIMORFONUCLEARES DE NIÑOS CON DESNUTRICION E INFECCION BACTERIANA
AGUDA

T E S I S
Que para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

Presenta
CARMEN GORETY SORIA RODRIGUEZ

ASESOR: DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

SITIOS DE REALIZACION DE TESIS:

Laboratorio de Inmunoquímica del Hospital Infantil de México
"Federico Gómez".

Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de la Nutrición
"Salvador Subirán".

INDICE

	Pagina
I. INTRODUCCION.....	5
II. ANTECEDENTES.....	6
A. Desnutrición - Infección - Inmunidad.....	6
B. Participación de los PMNs en el sistema inmune.....	9
1. Origen y proceso de maduración.....	10
2. Localización del proceso infeccioso y evento fagocítico.....	14
. Adherencia.....	14
. Quimiotaxis.....	16
. Oponización y Fagocitosis.....	17
. Actividad microbicida.....	22
1) Degranulación.....	22
2) Estallido respiratorio.....	30
a) Incremento del consumo de oxígeno.....	31
b) Consumo de glucosa vía hexosa- monofosfato.....	31
c) Producción de metabolitos de oxígeno....	32
d) Iodinación de proteínas.....	34
3) Medición del estallido respiratorio.....	35
a) Quimioluminiscencia.....	36
b) Reducción de Nitroazúl de tetrazolio....	37
C. Receptores para opsoninas en neutrófilos	

polimorfonucleares. Estructura, función y mecanismos que modulan su expresión.....	38
1. Receptores Fc RI, RII y RIII.....	38
2. Receptores CR1 y CR3.....	48
3. Métodos de medición de la expresión de los receptores de opsoninas.....	52
D. Receptores de opsoninas y desnutrición.....	53
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	56
IV. HIPOTESIS.....	57
V. OBJETIVOS.....	57
VI. MATERIAL Y METODOS.....	58
A. Población de estudio y tamaño de muestra.....	58
B. Obtención de neutrófilos PMNs.....	61
C. Inmunofluorescencia Indirecta.....	63
D. Análisis de Receptores por Citometría de Flujo.....	64
E. Evaluación otras funciones de los fagocitos relacionadas con los receptores de opsoninas.....	65
a) Capacidad Bactericida de los PMNs.....	65
b) Mecanismos microbicidas oxidativos.....	67
. Quimioluminiscencia.....	67
. Reducción de Nitrozúl de Tetrazolio.....	68
VII. ANALISIS ESTADISTICO.....	69
VIII. RESULTADOS.....	71
IX. DISCUSION.....	79
X. REFERENCIAS.....	88

I. INTRODUCCION

Recientemente se ha empezado a entender el importante papel intermediario que tiene el sistema inmune en la interacción de desnutrición, inmunocompetencia y enfermedades infecciosas. Ahora sabemos que cualquier circunstancia que comprometa el óptimo estado nutricional, puede afectar la función inmune. Por lo tanto es de esperarse que se reduzca la capacidad del huesped para competir ante la exposición a un agente infeccioso, se incremente el riesgo de una enfermedad que incluso lo conduzca a la muerte (1).

Estudios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos han demostrado que la desnutrición afecta la mayoría de los mecanismos de defensa. Las alteraciones de los mecanismos inmunes en el huesped desnutrido comprometen desde la integridad de las barreras físicas hasta defectos más profundos de la inmunidad celular, humoral, sistema complemento y función de las células fagocíticas, lo cual nos hace considerar al paciente desnutrido como huesped inmunocomprometido (1, 2).

Las células fagocíticas junto con factores humorales, juegan un papel importante en la defensa del huesped contra infecciones bacterianas y algunas fúngicas. En estudios recientes se han evaluado la actividad funcional de estas células en algunas entidades clínicas e inmunodeficiencias incluyendo desnutrición y se han encontrado defectos específicos en la adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y capacidad microbicida de dichas células, funciones que son reguladas

por factores humorales y receptores celulares (1, 3, 6, 9, 16, 73, 82).

De interés particular ha sido el estudio de los receptores de opsoninas (Fc RIII, CR1 y CR3) y en estudios previos hemos encontrado datos que nos sugieren alteraciones en la expresión de estos receptores en los PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda (3).

El propósito de este trabajo fué determinar la expresión de receptores de opsoninas en PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda y evaluar la capacidad de la célula para modular la expresión de estos receptores ante estímulos inflamatorios.

II. ANTECEDENTES

A. Desnutrición - Infección - Inmunidad.

La desnutrición es uno de los principales problemas pediátricos en el mundo. La prevalencia mundial de desnutrición es difícil de determinar aunque es mayor en países subdesarrollados, en sitios con guerras civiles, en economías frágiles y en regiones marginadas de países industrializados. Al igual que en otros países en desarrollo, en nuestro país el problema de salud que representa la desnutrición alcanza proporciones altas. Durante el período de 1983 a 1985, en el ámbito de trabajo del Programa IMSS-COPLAMAR, se efectuó conjuntamente con la comunidad, la búsqueda de casos de desnutrición entre los menores de 5 años y se encontró que el 34.5% del grupo estudiado tenía algún grado de desnutrición. La frecuencia de este padecimiento fué mayor en entidades federativas con alto grado de

marginación, donde el porcentaje de desnutridos fué del 45.5% contrastando con un 17.7% registrado en zonas de marginación media (4). En 1990, de acuerdo a un estudio probabilístico, el 42.3% de los niños menores de 5 años presentaron algún grado de desnutrición, concluyéndose que 3,767,000 infantes eran desnutridos y de estos 65 mil tenían desnutrición de III grado (5).

Tanto en los países en desarrollo como en las grandes ciudades de países industrializados, las causas de la desnutrición son similares, cambiando en algunas ocasiones el orden de frecuencia: 1) aporte inadecuado de nutrientes por ingesta insuficiente, malos hábitos de alimentación ó restricción de la misma por costumbres culturales ó religiosas, 2) inadecuada utilización de los nutrientes, por problemas de mala absorción, enfermedades inflamatorias gastrointestinales entre otras, y 3) incremento de la demanda de nutrientes, por efecto directo como en el caso de las neoplasias y el hipertiroidismo, infecciones agudas ó crónicas y situaciones de estrés como trauma y cirugía (1, 6). La infección por sí misma es causante de un mayor gasto energético y de nutrientes lo que a su vez puede inducir desnutrición. De tal manera, la interrelación entre Nutrición, Inmunidad e Infección crea un círculo vicioso que repercute directamente sobre la morbilidad y mortalidad en estados de deficiencia nutricional (7,8).

Las anormalidades en los mecanismos de defensa del hospedero desnutrido son múltiples (Cuadro 1) y comprometen la inmunidad humoral (9), la inmunidad mediada por células (10,11), el sistema de complemento (12) y la función de las células fagocíticas (13), donde se ha observado incremento en la función de adherencia en condiciones

basales y pobre respuesta a los estímulos inflamatorios, que dan como resultado déficit en la movilización de las células fagocíticas (14,15). Asociado a este incremento en la adherencia, ocurre disminución en la quimiotaxis, y es posible que ello sea consecuencia de alteraciones en la membrana celular y se relacione con anormalidades de la morfología incluyendo receptores de membrana, que modulan estas funciones, situación que conduce a una respuesta anormal ante el estímulo quimiotáctico (14,16,17). Aunque se ha visto por microscopía electrónica que los PMNs y mononucleares de los sujetos con desnutrición no muestran anormalidades en la formación de vacuolas fagocíticas, la fusión de fagolisosomas ó la degranulación, el proceso de muerte intracelular por sus diferentes mecanismos puede estar alterado (18).

En infecciones bacterianas, los mecanismos de opsonización son de gran importancia y están determinados por la respuesta inmune del hospedero y la naturaleza bioquímica de la superficie bacteriana (19). En términos generales, la opsonización está dada por inmunoglobulinas de clase G y M y componentes resultantes de la activación del sistema de complemento como C3b y C3bi entre otros factores. Los trabajos encaminados a evaluar estos mecanismos en individuos desnutridos son escasos y principalmente dirigidos al estudio de la capacidad opsonica del suero más que al reconocimiento de partículas opsonizadas (20).

CUADRO 1

FUNCION INMUNE EN EL DESNUTRIDO

Inmunidad Humoral	Niveles de anticuerpos normales o elevados; respuesta antigénica específica variable. Secreción de IgA deficiente.
Inmunidad por Células	Disminución del número de células T, disminución de la respuesta in vitro de las células T a diferentes mitógenos y anergia cutánea.
Complemento	CH50 disminuído. Variación en los niveles de sus componentes.
Células fagocíticas: PMNs, MNs, Macrófagos	Incremento de la adherencia. Disminución de la quimiotaxis, fagocitosis y capacidad microbicida.

B. Participación de los Neutrófilos PMNs en el sistema inmune.

La importancia de las células fagocíticas como mecanismos de defensa en infecciones bacterianas se conoce desde los estudios de Elie Metchnikoff hace más de 100 años. En experimentos con invertebrados marinos, él observó que ciertas especies de hongos podían ser ingeridas y destruídas por fagocitos, mientras que las que no llegaban a destruirse, desencadenaban enfermedad diseminada y fatal. De esto dedujo que las anormalidades de las células fagocíticas

podían comprometer las defensas del hospedero. Un siglo más tarde, se pudo demostrar este hecho al reconocerse entidades que se manifestaban con infecciones bacterianas y fúngicas fulminantes en casos de deficiencias cuantitativas ó funcionales de los neutrófilos polimorfonucleares (21).

1. Origen y proceso de maduración de los Neutrófilos PMNs.

Los neutrófilos PMN se derivan de células hematopoyéticas pluripotenciales localizadas en la médula ósea. La producción y diferenciación de estas células, depende de los factores estimuladores de colonias (22), que son moléculas glicoprotéicas producidas por macrófagos y linfocitos T activados (23), además de otras moléculas como lactoferrina neutrofílica y prostaglandina E, que actúan inhibiendo la producción y secreción de factores estimuladores ó evitando en forma directa la proliferación de las células hematopoyéticas (24).

En la especie humana se conocen: 1) GM-CSF alfa ó Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos, 2) G-CSF o Factor Estimulador de Granulocitos, 3) M-CSF o Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y 4) Interleucina 3 o Multi-Factor Estimulador de Colonias (22). Estas glicoproteínas determinan la diferenciación del **mieloblasto** hacia las líneas monocítica ó granulocítica. Cuando se diferencia hacia la serie granulocítica, el desarrollo y maduración del PMNs sucede en 2 etapas (mitótica y no mitótica) con duración de 1 semana cada una de ellas (figura 1). En la primera fase, la diferenciación es de **mieloblasto --- promielocito --- mielocito**, aquí aparecen los gránulos citoplásmicos de los PMNs. En

la etapa no mitótica, la diferenciación es de **metamielocito --- neutrófilos inmaduros** o en banda --- **neutrófilos maduros** o segmentados (23). Cuando ocurre la maduración morfológica, se producen cambios antigénicos, enzimáticos y funcionales en los neutrófilos segmentados (25). Durante la fase de promielocito, aparecen los receptores Fc, que son funcionales poco después de su aparición. Los receptores para complemento (CR1 y CR3) están presentes en las fases de metamielocito y neutrófilo inmaduro. Al mismo tiempo que ocurre la diferenciación de los receptores Fc, la célula es capaz de fagocitar y durante la fase de mielocito ya posee actividad microbicida dada principalmente por mecanismos no oxidativos, para alcanzar su funcionalidad total en la fase de neutrófilo en banda (figura 2), donde ya presenta mecanismos oxidativos y desarrolla actividad quimiotáctica (26).

Los neutrófilos maduros, contienen un núcleo multilobulado altamente condensado, gran abundancia de gránulos citoplásmicos de varios tamaños que son morfológica, bioquímica y funcionalmente distintos.

Los gránulos primarios corresponden a lisosomas, también llamados azurófilos, son peroxidasa positivos y generalmente más densos y grandes que los peroxidasa negativos. Contienen hidrolasas ácidas y diferentes enzimas, así como proteínas catiónicas con potente actividad bactericida y fungicida (27).

Los gránulos secundarios o específicos son ricos en glicoproteínas y más numerosos que los azurófilos. Contienen lisozima, lactoferrina, proteínas fijadoras de vitamina B, citocromo b y receptores para quimioattractantes como N-formil péptidos, CR3, laminina y

componentes del complejo enzimático que produce peróxido de hidrogeno (13, 28, 29).

Los gránulos terciarios se distinguen por la presencia de fosfatasa ácida, colagenasas y gelatinasa; algunos componentes y funciones relacionados con los gránulos específicos pueden residir en los gránulos terciarios (13, 30, 31).

La funcionalidad de los PMNs depende en gran parte de la constitución del citoesqueleto, el cual, como en otras células posee microtúbulos, microfilamentos y en menor proporción filamentos intermedios. Hacia la periferia del citoplasma y en los pseudopodos, se encuentran filamentos de actina y proteínas fijadoras de actina, formando una malla, mientras que el cuerpo de la célula lo forman filamentos intermedios y polimeros de tubulina que en alguna extensión penetran en el citoplasma periférico. La interacción de estas moléculas además de la miosina, permiten la contractilidad de la célula y otras funciones como fagocitosis, endocitosis, pinocitosis, movilización de vacuolas, lisosomas y gránulos hacia la periferia y superficie celular (32).

En ausencia de infección, el egreso de los PMNs de la médula osea se limita a las células morfológicamente maduras que permanecen como reserva medular durante 2 días aproximadamente, hasta que factores mecánicos, de maduración celular y humorales desencadenan la liberación de los PMNs a la circulación (33).

El neutrófilo maduro tiene una vida media de 6 a 7 hr en circulación (34). El número de PMNs varía de acuerdo a la edad como lo muestran los datos recabados por P.R. Dallman. Tabla 1 (35).

TABLA 1

NUMERO DE LEUCOCITOS TOTALES Y PMNS DE ACUERDO A EDAD

EDAD	LEUCOCITOS TOTALES (10^3)		PMNs (10^3)		%
	MEDIA	LIMITES	MEDIA	LIMITES	
Al nacer	18.1	9.0 - 30.0	11.0	6.0-26.0	61
12 hr.	22.8	13.0 - 38.0	15.5	6.0-28.0	68
24 hr.	18.9	9.4 - 34.0	11.5	5.0-21.0	61
1 sem.	12.2	5.0 - 21.0	5.5	1.5-10.0	45
2 sem.	11.4	5.0 - 21.0	4.5	1.0- 9.0	40
1 mes	10.8	5.0 - 19.5	3.8	1.0- 9.0	35
6 meses	11.9	6.0 - 17.5	3.8	1.0- 8.5	32
1 año	11.4	6.0 - 17.5	3.5	1.5- 8.5	31
2 años	10.6	6.0 - 17.0	3.5	1.5- 8.5	33
4 años	9.1	5.5 - 15.5	3.8	1.5- 8.5	42
6 años	8.5	5.0 - 14.5	4.3	1.5- 8.0	51
8 años	8.3	4.5 - 13.5	4.4	1.5- 8.0	53
10 años	8.1	4.4 - 13.5	4.4	1.8- 8.0	54
16 años	7.8	4.5 - 13.0	4.4	1.8- 8.0	57

P. R. Dallman (35)

En individuos normales, el conteo de neutrófilos de sangre periférica puede subestimar el valor real de neutrófilos en circulación ya que la mitad a dos terceras partes del total pueden encontrarse como

neutrófilos marginados, secuestrados en vénulas o capilares, y ante estrés, inflamación u otros factores, pueden liberarse y activarse para el proceso fagocítico (36).

2. Localización del proceso infecciosos y evento fagocítico.

Cuando ocurre invasión tisular por diversos microorganismos, entre ellos bacterias, los PMNs localizan el proceso infeccioso mediante una serie de eventos como adherencia al endotelio vascular, marginación a lo largo del endotelio vascular, migración transendotelial y quimiotaxis. Una vez localizado el sitio de infección, desarrollan otros eventos encaminados a la destrucción de los microorganismos invasores, como el reconocimiento de microorganismos mediante proteínas de adhesión o a través de receptores, fagocitosis de microorganismos sin opsonizar y opsonizados y finalmente, muerte intracelular producida por mecanismos oxidativos y no oxidativos (13). A esta serie de funciones que desarrollan los PMNs se le ha denominado en conjunto **Fagocitosis** (33,37).

. Adherencia.

La adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular es un fenómeno complejo. Depende por un lado de los efectos de mediadores inflamatorios sobre las células endoteliales además de los productos que de ellas se derivan (38) y por otro, de la expresión de proteínas denominadas Moléculas de Adhesión, en la membrana de las células endoteliales y leucocitos, que permiten una adherencia específica entre ambos tipos celulares (39).

Las moléculas de adhesión que están implicadas en la inflamación, hasta el momento se han agrupado en cuatro clases (Figura 3). Cada una de las clases de moléculas se unen con ligandos específicos (contrarreceptores) de otros grupos. En las células endoteliales se expresan E-selectinas (antes denominada ELAM-1) y P-selectinas (PADGEM, también expresada en plaquetas). Otras moléculas que también se expresan en las células endoteliales son dos miembros de la superfamilia de las Inmunoglobulinas ICAM-1 e ICAM-2 que son los contrarreceptores de las beta-Integrinas de los leucocitos (40). El término de "integrina" se conoce desde 1980 cuando se observó que varias proteínas de superficie celular descubiertas individualmente, tenían estructuras y funciones similares, además de que unían el citoesqueleto con macromoléculas u otras células. En los leucocitos se expresan estas integrinas que son heterodímeros constituidos por 14 subunidades alfa y 8 beta (41). Integrinas con subunidades beta₂ también conocidas como CD18 se expresan solamente en los leucocitos y tres de estas formas son expresadas en los neutrófilos (CD11a, CD11b, CD11c/CD18). Otras moléculas como L-selectinas y los contrarreceptores para las E-selectinas y P-selectinas se también se expresan en los leucocitos (42, 43).

Investigaciones en pacientes con deficiencia del receptor para la fracción C3bi del complemento (CR3 ó CD11b), dieron lugar al conocimiento sobre la regulación que ejercen las beta integrinas ó complejo glicoprotéico CD11/CD18 sobre el fenómeno de adherencia de leucocitos (44). De acuerdo a la nomenclatura adoptada en el Tercer Taller Internacional sobre Diferenciación de Antígenos Leucocitarios, a las subunidades alfa (LFA-1, Mo1, y p 150.95) se les denominó

CD11a, CD11b y CD11c respectivamente; y a la subunidad beta CD18 (45). Este complejo glicoprotéico además de participar en el fenómeno de adherencia, regula la agregación de PMNs, adhesión a substratos dependientes del receptor CR3 y quimiotaxis entre otras funciones (46).

. Quimiotaxis.

Los neutrófilos migran a los sitios de infección o inflamación en respuesta a sustancias quimiotácticas que son generadas en tales sitios. Factores quimiotácticos bien definidos incluyen C5a, producto de la ruptura de C5 durante la activación de la cascada de complemento; leucotrieno B₄, producto del metabolismo vía lipooxigenasa del ácido araquidónico; el factor activador plaquetario (PAF); linfocinas y productos de la síntesis protéica de bacterias como N-formil péptidos.

Aunque los receptores para formil péptidos, C5a y leucotrieno B₄ son distintos, la respuesta de la célula a cada ligando es similar: aumento de la adhesividad, aumento de receptores quimiotácticos, liberación del contenido de gránulos específicos y la iniciación del estallido respiratorio (47).

Los neutrófilos pueden registrar los quimioattractantes en concentraciones nanomolares y migrar hacia ellos. Se estima que estas células responden a gradientes tan pequeños como una diferencia de concentración del 1% a través de su superficie. Esta gran sensibilidad para detectar mínimas diferencias de concentración está determinada por receptores de membrana específicos a los quimioattractantes, así el PMN puede ser capaz de detectar la activación de estos receptores en diferentes partes de su superficie,

integrar la información y traducirla en un movimiento direccional (47).

Los quimioattractantes han sido un modelo de estímulo para el estudio de la activación de neutrófilos y macrófagos. Cuando se ocupa el receptor para quimioattractantes, el complejo ligando - receptor formado, interactúa con las proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina, resultando la formación de proteína G activada, la cual activa la fosfolipasa C en la membrana plasmática. La activación de fosfolipasa C da como resultado hidrólisis de fosfatidil inositol (IP) y se genera 1, 4-5 trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares que junto con DAG producen translocación de la proteína-cinasa C (PKC) hacia la membrana plasmática (Fig. 4). Estos eventos conducen a la fosforilación de la membrana plasmática, funciones secretoras dependientes de Ca^{++} , remodelación de la membrana plasmática y reorganización del citoesqueleto. Los cambios anteriores, modulan la expresión de receptores proporcionando mayor número de ellos a partir de los depósitos intracelulares ó reciclando los mismos lo que confiere una mayor sensibilidad a la célula hacia el quimioattractante y además afectan la polaridad, adherencia y otras funciones celulares, que constituyen un complejo mecanismo de retroalimentación (48).

. Opsonización y Fagocitosis.

La forma más rudimentaria de reconocimiento entre fagocitos y partículas ocurre cuando estas se unen a las células sin producir

alguna respuesta activa. Esta unión puede ocurrir como resultado de la cercanía con la partícula ó por interacción de cargas.

Un reconocimiento más complejo es aquel que activa una serie de mecanismos efectores en el fagocito como aumento en la adhesividad de la membrana con la simultanea invaginación de la misma que causa la formación de vacuolas endocíticas y aquellas reacciones encaminadas a modificar y destruir partículas a través de la degranulación y activación de enzimas y otros metabolitos tóxicos.

Algunos microorganismos patógenos y células, aunque sean reconocidos por los fagocitos, requieren ser cubiertos con proteínas específicas, proceso llamado "opsonización" [del griego opsono: preparar para ingerir] (37).

Los sistemas de opsonización mejor caracterizados del suero son Inmunoglobulinas y Complemento. Para que la actividad opsónica de la IgG sea adecuada requiere que la región Fc de la molécula se encuentre intacta. Las subclases que principalmente participan son IgG1 e IgG3. Los anticuerpos se combinan por su porción variable (Fab) con el microorganismo y por su región Fc a receptores específicos en la superficie celular, formando de esta manera un puente entre la célula y el microorganismo (49).

La unión de IgG a ciertas partículas puede ser suficiente para la opsonización, pero esto no ocurre con IgA o IgM. Sin embargo, IgM participa en la opsonización cuando se une a una superficie implicada en la activación del complemento. La activación causa que un fragmento de C3 con expresión opsónica, se fije firmemente a la superficie de una partícula tanto por uniones hidrofóbicas como por enlaces covalentes (49, 50, 51). C4 y C5 pueden tener alguna

actividad opsonica, pero esta es menor con respecto a C3. La fijación de los fragmentos opsonicamente activos de C3 a las partículas con superficies polisacáridicas puede ocurrir sin inmunoglobulina, a través de la activación de la vía alterna del complemento.

La contribución relativa del anticuerpo y C3 en la opsonización es variable. La opsonización óptima de patógenos encapsulados como neumococo, requiere de anticuerpos anticapsulares tipo específico, los cuales fijan C3 por la activación del complemento. Por otro lado, la opsonización de estafilococo puede producirse en suero hiperinmune con altas concentraciones de IgG unicamente. En el suero normal, la opsonización de estafilococo puede ocurrir tanto por anticuerpos como por la activación del complemento. Estos ejemplos de interacción de microorganismos con opsoninas sericas, reflejan la variedad de reacciones posibles dependiendo del microorganismo, condiciones del huesped, y probablemente de las condiciones de cultivo del microorganismo el cual puede tener influencia en la naturaleza de la superficie del organismo (37).

IgG y C3 opsonicamente activos también participan en el reconocimiento de las células animales por los fagocitos. Estas opsoninas estan implicadas en reacciones inmunológicas de tipo isoimmune, autoimmune y asociadas a drogas en eritrocitos, leucocitos y plaquetas. IgM activa la opsonización a través de C3 en transfusiones implicando isohemaglutininas y reacciones autoinmunes contra eritrocitos. IgG, con o sin la participación de C3, opsoniza eritrocitos en reacciones isoimmune implicando Rh y otros antígenos (37, 49).

Otras proteínas séricas pueden tener papel opsónico como la proteína C reactiva (51), tufsina y la fibronectina (52). Una glicoproteína, alfa-globulina, incrementa la adsorción de emulsiones de lípidos cubiertos con gelatina en células hepáticas en presencia de heparina. Esta proteína y algunos de sus fragmentos proteolíticos, se ha propuesto que participan en la depuración de proteínas desnaturalizadas. Azúcares fosforilados, particularmente manosa, pueden determinar el reconocimiento de algunas glicoproteínas circulantes para su depuración, además de que inhibe la fagocitosis de paredes de levaduras como zimozan por los macrofagos (37).

Participación de los iones de Ca⁺⁺ en la fagocitosis.

Cuando ligandos específicos se unen a receptores en los fagocitos, se generan señales que activan a las células y uno de los cambios que se producen son flujos de iones y reacciones metabólicas que funcionan como segundos mensajeros. La estimulación de fagocitos con péptidos quimiotácticos, partículas opsonizadas y otras sustancias, causan una rápida despolarización de la membrana celular y un flujo transmembrana de iones monovalentes en forma transitoria (53).

También el calcio participa como potencial mensajero en las reacciones de fagocitosis. La estimulación de fagocitos, produce influjo y/o eflujo de calcio, dependiendo del estímulo empleado. Factores peptídicos quimiotácticos y partículas opsonizadas, pueden causar entrada de calcio a la célula y un incremento del calcio libre citosólico, seguido de eflujo del mismo (54). Por otro lado, esteroides de forbol, únicamente producen salida de calcio y disminución del calcio libre citosólico posiblemente por estimulación directa de la bomba de calcio (54).

El papel del calcio como un segundo mensajero, deriva del hecho de que se une a un número de moléculas implicadas en la respuesta fagocítica. Estas moléculas incluyen: a) gelsolina, que fragmenta los filamentos de actina en presencia de concentraciones de calcio inferiores a micromoles; b) calmodulina, que activa una fosforilasa y una cinasa para la cadena ligera de la miosina, produciendo glucogenolisis y ensamblaje y activación de las moléculas de miosina (37, 55); c) fosfolipasa A2, que inicia la cascada del metabolismo del ácido araquidónico y d) proteína C cinasa, una enzima dependiente del calcio que fosforila algunas proteínas en las células, incluyendo los fagocitos y relacionada con el receptor para ésteres de forbol (37,56). Además, la actividad de esta enzima y su activación por el calcio está influenciada por la presencia de fosfolípidos (37).

Otra reacción metabólica presente durante la activación fagocítica es el reciclaje de fosfolípidos que se incrementa con la estimulación de los fagocitos, cuyos fosfolípidos son ricos en araquidonato, que sirve de substrato para la generación de eicosanoides bioactivos (37).

Es necesaria una optima fluidez de membrana para que pueda ocurrir la fagocitosis así como la interacción de proteínas contráctiles. El reconocimiento de la partícula origina un eflujo de calcio en el sitio de contacto de la partícula con la célula, produciendo que el calcio libre citosólico en esa región sea menor que en las zonas adyacentes. Esto causa que la gelsolina sea menos activa que en otros sitios, resultando el ensamblaje de actina y mayor gelación en dicha zona. La miosina contrae el gel, el cual forma el pseudopodo que rodea la partícula. La banda formada por las proteínas asociadas

a la actina y la miosina de la cara citoplásmica, remueven el soporte de la membrana y promueven la formación de la vesícula. Las vesículas formadas se asocian o recubren de una lámina bidimensional de una proteína llamada caltrina, que confluyen en una estructura icosaedrica que rodea a la vesícula. Este tipo de vesículas cubiertas son frecuentes en la fagocitosis de partículas unidas a receptores (57,58). Durante la fagocitosis, cantidades substanciales de membrana son internalizadas pero estas sufren reciclaje y regresan a la superficie de la célula y algunos componentes de las vesículas formadas pueden ser incluidos ó excluidos selectivamente de las vacuolas. Los receptores que participan en la fagocitosis son incluidos mientras que los sistemas de transporte y aminoácidos generalmente se excluyen (59).

. Actividad Microbicida

Cuando las partículas unidas a la superficie de los fagocitos son ingeridas y se ha formado el fagosoma, ocurren algunos mecanismos para la destrucción de partículas o microorganismos: 1) fusión del fagosoma a los gránulos citoplásmicos y la subsecuente descarga del contenido de los gránulos al fagosoma, proceso denominado **degranulación** y 2) la generación de productos derivados de la reducción del oxígeno que son altamente tóxicos, proceso llamado **estallido respiratorio**. La muerte y digestión de partículas o microorganismos depende de estos mecanismos.

1) **Degranulación**. Todas las células fagocíticas implicadas en la muerte de microorganismos contienen enzimas hidrolíticas y otras proteínas microbicidas empacadas en vesículas limitadas por membrana

denominadas lisosomas. Como ya se ha mencionado, durante el proceso de maduración del PMN aparecen los gránulos primarios o azurófilos en el estadio promielocítico y los gránulos secundarios o específicos en el mielocítico. El contenido de estos gránulos se ha estudiado extensamente mediante técnicas histoquímicas y bioquímicas y se muestra en el cuadro 2.

CUADRO 2
CONTENIDO DE LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES

CONTENIDO	GRÁNULOS	
	AZUROFILOS	ESPECIFICOS
Enzimas Microbicidas	Mieloperoxidasa Lisozima	Lisozima
Serina- Proteasas neutras	Elastasa Catepsina G Proteinasa 3	
Metaloproteínas		Colagenasa
Hidrolasas ácidas	N-acetil-B-glucosaminidasa Catepsina B Catepsina D Beta-glucoronidasa Beta-glicerofosfatasa alfa-manosidasa	
Otros	Proteínas catiónicas bacterianas (defensinas)	Lactoferrina Proteína de unión B12 Citocromo b Histaminasa Receptores f-MLP CR3

Adaptado de Fallon y Gallin (60).

Se ha definido la secuencia por la cual ocurre la degranulación y se ha demostrado que durante la fagocitosis de partículas, la fusión de los gránulos específicos con la membrana plasmática, y la consecuente descarga de su contenido al líquido extracelular (exocitosis), precede a la fusión de la membrana con los gránulos primarios, situación que permite proponer que los gránulos específicos estén adaptados unicamente para funciones secretoras, pues posterior a la acción de determinados estímulos, los gránulos específicos pueden fusionarse con la membrana en ausencia de fusión con los lisosomas primarios (61). Además, los gránulos secundarios a través de su fusión con la membrana plasmática, contribuyen al recambio tanto de receptores como de la misma membrana, interviniendo de esta forma en la regulación de los fenómenos de agregación, migración y estallido respiratorio (52,61). Los gránulos primarios, a través de su fusión con los fagosomas (fusión fagolisosómica), intervienen principalmente en los mecanismos microbicidas intracelulares de los PMNs (52,60). Los mecanismos microbicidas de los PMNs pueden ser divididos de acuerdo a su dependencia del oxígeno en oxidativos y no oxidativos.

Cuadro 3.

CUADRO 3

MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

1. INDEPENDIENTES DE OXIGENO

- A. Acidez
- B. Defensinas
- C. Lisozima
- D. Lactoferrina
- E. Catepsina G
- F. Elastasa
- G. Proteína inductora de la permeabilidad

2. DEPENDIENTES DE OXIGENO

- A. Mediado por mieloperoxidasa
- B. Independiente de mieloperoxidasa
 - a) Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)
 - b) Anión superóxido
 - c) Radical hidroxilo
 - d) Singletes de oxígeno

Adaptado de Klebanoff (62).

La existencia de mecanismos no oxidativos se apoya en el hecho de que tanto los granulocitos de individuos normales (colocados en condiciones anaeróbicas), como los de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC), son capaces de matar a una variedad de microorganismos. Aun cuando algunas células humanas son incapaces de desencadenar el estallido respiratorio y esto disminuye su efectividad para matar muchas especies de microorganismos catalasa positivos, especies de estafilococo, enterobacterias, *Cándida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias anaerobias o *Cándida parapsilosis*, la destrucción de estos patógenos ocurre por otros mecanismos y bajo condiciones de anaerobiosis (61).

Estas observaciones indican que los mecanismos microbicidas no dependen unicamente del oxígeno para su efectividad sino de otros factores como acidez, lisozima, proteínas catiónicas, lactoferrina, proteasas y factores séricos que se describirán brevemente.

Acidez. Durante la fagocitosis, la concentración del ión hidrógeno en el fagosoma incrementa. Se estima que el pH de las vacuolas fagocíticas varía de 3.0 a 6.0 dependiendo de la especie estudiada. El incremento observado en la concentración del ión hidrógeno puede ser el resultado de la producción durante la glicólisis, de lactato necesario para la fagocitosis, del depósito de sustancias ácidas en el fagosoma de los gránulos lisosomales o de otros mecanismos. La acidificación de la vacuola fagocítica facilita las reacciones microbicidas por dos mecanismos, en el primero, algunas bacterias son destruidas por ácidos orgánicos en el medio ácido, o por ácidos lipofílicos y en el segundo y probablemente el más importante, la acidificación puede optimizar la función de otros sistemas enzimáticos antimicrobianos por ejemplo el de Haluros-H₂O₂-MPO o lisozima encontrada en el fagosoma (37, 61).

Lisozima. La lisozima es una de un grupo de enzimas que hidrolizan las paredes celulares bacterianas. Específicamente ataca el enlace B-1-4-glicosídico que une el ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina en la estructura del peptidoglicano. Por su especificidad por el peptidoglicano la lisozima es activa unicamente contra bacterias. Los estudios de interacción entre microorganismos y lisozima, han facilitado el entendimiento de la estructura de las

paredes celulares de las bacterias y la manera en que los fagocitos y factores humorales actúan conjuntamente para destruir los microorganismos. El sistema anticuerpo-complemento, una combinación de H_2O_2 y ascorbato, así como el pH alto o bajo, facilitan la acción de la lisozima en bacterias resistentes. Quizá el papel más importante de la lisozima en la función de los neutrófilos puede ser el de digerir las bacterias fagocitadas una vez que son destruidas, más que actuar como agente bactericida primario (61, 63).

Proteínas catiónicas. Se demostró que las proteínas cationicas con actividad antifungica en los granulocitos humanos y monocitos, residían en los gránulos azurófilos primarios. Estas proteínas son más activas a un pH neutro y rápidamente impiden la habilidad del microorganismo para replicarse sin destruir su integridad estructural. Las proteínas cationicas de bajo peso molecular, son más potentes contra estafilococos que contra bacilos gram negativos; esta actividad puede correlacionarse con una pronta inhibición de la respiración bacteriana, inhibición de la síntesis protéica, DNA y RNA y con la entrada de un marcador catiónico Rb86, el cual se excluye normalmente de la bacteria. El efecto de las proteínas catiónicas y el del sistema H_2O_2 -MPO, puede ser aditivo en la muerte de bacterias susceptibles (61). La proteína catiónica de alto peso molecular aislada por Weiss, rápidamente inhibe la replicación de algunas especies gram negativas pero es inactiva contra cocos gram positivos y hongos. Además incrementa la permeabilidad de la membrana externa a moléculas que normalmente son excluidas como la actinomicina D y altera la síntesis de macromoléculas en organismos susceptibles. La

proteína catiónica de alto peso molecular de granulocitos humanos, puede disparar la actividad de fosfolipasas endogenas de bacterias susceptibles. El mecanismo preciso por el cual estas proteínas ejercen su efecto no está completamente definido y requiere de otros estudios; sin embargo, su acción puede ser inhibida por la heparina polianiónica o por la adición de Ca^{++} o Mg^{++} al medio. La susceptibilidad de los organismos gram negativos a las proteínas cationicas depende de la estructura de su envoltura externa, así, los organismos con envoltura rugosa, son eliminados completa y rápidamente por la acción de ambas proteínas catiónicas (de bajo y alto peso moleculares), mientras que las variantes con envoltura lisa son mas resistentes. La principal importancia de las proteínas cationicas para la función antimicrobiana de los neutrófilos y monocito-macrófagos es difícil de discernir; sin embargo, los granulocitos de humanos, con EGC y deficientes de MPO, eliminan algunos microorganismos principalmente a través de la acción de las proteínas cationicas. En las células normales, las proteínas cationicas actúan mayormente en cooperación con otros mecanismos antimicrobianos de los granulocitos (61).

Lactoferrina. Es una proteína de alto peso molecular, está presente en la leche y en una variedad de fluidos biológicos. Se ha recuperado de los gránulos específicos de neutrófilos humanos y de conejo. Tiene una fuerte afinidad por el hierro y a altas concentraciones puede inhibir el crecimiento bacteriano al competir por el hierro en el medio de crecimiento. Klempner y colaboradores han mostrado que pequeñas cantidades de pirógeno de los leucocitos,

causan liberación de cerca de un tercio del total de lactoferrina del neutrófilo en el medio extracelular. Otros autores han reportado que el 86% de la lactoferrina liberada durante la fagocitosis es secretada al medio extracelular mas que al fagosoma, observación que sugiere que la lactoferrina puede ejercer su efecto antimicrobiano principalmente a nivel extracelular. Además la molécula puede jugar un papel en la patogénesis de la hipoferrremia asociada con la infección. Se ha propuesto que la lactoferrina saturada de hierro y a bajas concentraciones (10nM) puede contribuir en la actividad antimicrobiana del PMN mediante la estimulación para la producción de radicales hidroxilo como un donador efectivo de hierro. Sin embargo esto se ha cuestionado pues en otras investigaciones se ha encontrado que la lactoferrina también puede aumentar o prevenir la formación de los radicales hidroxilo, dependiendo del nivel de saturación de hierro y de la disponibilidad de sales de hierro exógeno (61, 64). Teóricamente, la deficiencia de lactoferrina podría impedir una adecuada respuesta del huesped a la infección, no solamente porque la proteína actúa como agente antimicrobiano sino también porque puede ser un determinante de la adhesividad del neutrófilo, influenciando su función durante la fagocitosis. Además la lactoferrina parece ser un modulador de la granulopoyesis, pues la síntesis de GM-CSF aparentemente es suprimida por la lactoferrina (64, 65). Aún queda por determinar qué otros efectos sobre la función fagocítica posee la lactoferrina.

Proteasas. Los granulocitos contienen una gran variedad de proteasas que son activas a un pH neutro como la serina esterasa,

elastasa, colagenasa y catepsina G así como proteínas con actividad semejante a la quimi tripsina. Durante la fagocitosis, una porción de estas proteasas se libera al medio extracelular y de esta forma participan en la destrucción tisular durante la inflamación. Las proteasas neutras con actividad semejante a la tripsina, pueden romper componentes de complemento e iniciar sus funciones biológicas. La elastasa ha mostrado ser capaz de degradar las paredes celulares de estafilococo muerto por calor, sin embargo tiene muy poca acción antibacteriana contra organismos vivos. Catepsina G y catepsinas ácidas D y E son bactericidas contra estafilococo y pueden alterar algunas especies de *Acinetobacter* que ya han sido atacadas por lisozima. En sistemas libres de células, las proteasas neutras también pueden actuar cooperativamente con lisozima para eliminar estafilococos previamente tratados con beta lactámicos. El papel antimicrobiano de las proteasas, particularmente en la célula intacta, es complicado por el hecho de que la actividad de enzimas tales como elastasa y colagenasa es regulada por inhibidores protéicos ubicuitos. La interacción de la enzima y su inhibidor protéico, aparentemente es controlada por la respiración de la célula por lo que el estallido respiratorio en este caso podría condicionar la inhibición de proteasas a través de los inhibidores de las proteínas correspondientes (61, 64, 66).

2) Estallido respiratorio. El término de estallido respiratorio se refiere a un importante y abrupto cambio en el metabolismo del oxígeno que ocurre cuando los fagocitos son estimulados. Segundos después de la estimulación, las células fagocíticas desencadenan una serie de eventos que incluyen : a) incremento del consumo de

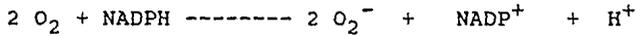
oxígeno; b) incremento del flujo de glucosa a través de la vía hexosa-monofosfato; c) incremento en la producción de metabolitos de oxígeno como anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), singletes de oxígeno (1O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); d) incremento en la fijación de haluros a proteínas ó iodinación (61).

a) Incremento del consumo de oxígeno. Los neutrófilos en reposo, consumen poco oxígeno y su energía la obtienen de la glicólisis anaeróbica. El estallido respiratorio de los neutrófilos no es necesario para la generación de energía metabólica requerida durante la fagocitosis, mas bien ocurre para una óptima actividad microbicida apoyado esto en la observación de que la actividad microbicida disminuye cuando los neutrófilos son expuestos a condiciones de hipoxia (67). Durante la ingestión de partículas, la captación de O_2 incrementa marcadamente sobre los valores basales. La captación estimulada de oxígeno no se afecta por la exposición de las células a cianuro, resultado que indica que el estallido respiratorio no se debe al metabolismo mitocondrial. El principal papel del consumo de oxígeno es proveer suficiente substrato para la formación de metabolitos de oxígeno que tienen acción microbicida. La determinación del consumo de oxígeno de los PMNs durante el proceso fagocítico constituye por tanto una forma de evaluar la capacidad microbicida oxidativa de los PMNs (61).

b) Consumo de glucosa vía hexosa-monofosfato. La estimulación de los fagocitos también se asocia a un incremento en la oxidación de la glucosa vía hexosa-monofosfato, que es hasta diez veces mayor que la producida por el ciclo de Krebs. El primer carbono de glucosa es oxidado a CO_2 con glucosa 6-fosfato por acción enzimática, el fosfato

de nicotinamida adenin dinucleótido (NADP) sirve como aceptor de electrones y dos moles de NADPH (forma reducida), se producen por cada mol de glucosa 6 fosfato oxidada. Durante la fagocitosis, una forma en la cual la oxidación del NADPH ocurre es a través del incremento de la actividad de una flavoproteína oxidasa que requiere del NADPH como sustrato. La oxidación del NADPH por esta oxidasa da lugar a la formación de superóxido (O_2^-), por la reducción de un electrón del oxígeno molecular. Un segundo mecanismo por el cual NADP puede ser generado durante el estallido respiratorio es a través del catabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), compuesto que es formado en cantidades importantes durante la ingestión de partículas o por la activación de células a través de otros estímulos (61,67).

c) Producción de metabolitos de oxígeno. Como respuesta a la estimulación de los fagocitos, se activa un sistema de transporte de electrones transmembrana en el cual un nucleótido de piridina reducido (predominantemente NADP o NADPH) reducen oxígeno y dan lugar a la formación de metabolitos de oxígeno (67). Aunque algunos sistemas enzimáticos pueden catalizar la formación de anión superóxido a partir de O_2 durante el estallido respiratorio, la NADPH-OXIDASA es la principal enzima implicada en esta reacción. Algunos autores postulan que el mecanismo de activación enzimática se lleva a cabo a través de una proteína cinasa C (PK-C), después de una serie de eventos que se desencadenan al interaccionar ligando-receptor, u ocurrir a través de araquidonato independientemente de la fosforilación (67, 68,69). Dentro de la vacuola fagocítica y utilizando NADPH como sustrato, la NADPH-OXIDASA cataliza la reacción

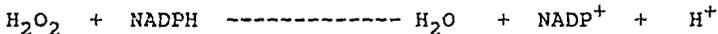


Aunque una parte del superóxido producido se libera al espacio extracelular, la mayor cantidad de O_2^- se convierte rápidamente en H_2O_2 mediante dismutación. Este fenómeno puede ocurrir en forma espontánea como consecuencia del pH ácido encontrado en el fagosoma siendo de gran importancia para la función microbicida de los PMNs, o bien el O_2^- producido puede escaparse de la vacuola fagocítica hacia el citoplasma y reducirse a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD), reacción que es tóxica a la célula (47, 61, 67).



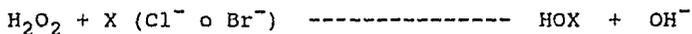
Como mecanismo de protección ante estos metabolitos, un sistema dependiente de glutatión se activa y se produce la conversión del peróxido de hidrógeno donde participan las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa (47,61).

GSH (glutatión reducido)



Glutatión peroxidasa

Al mismo tiempo que se llevan a cabo las reacciones donde participan superóxido y peróxido de hidrógeno, se producen otros compuestos oxidantes microbicidas como haluros oxidados y radicales hidroxilo. Los haluros oxidados son potentes agentes microbicidas. En los fagocitos, estos agentes se producen en reacciones catalizadas por una peroxidasa, en donde el H_2O_2 es utilizado para oxidar tanto Cl^- como Br^- al correspondiente ácido hipohaloso.

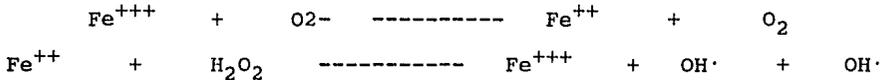


peroxidasa

En los neutrófilos y monocitos, el Cl^- es el substrato fisiológico y la reacción es catalizada por la mieloperoxidasa, una enzima con un grupo prostético semejante al hem y que se encuentra presente en altas concentraciones en los gránulos estas células. En los tejidos, HOCL reacciona con aminos del medio para formar cloraminas que también tienen propiedades microbicidas como NH_2CL (47, 61).

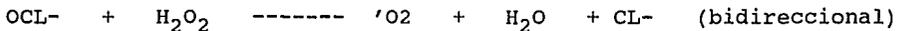


Además de la oxidación de haluros, los radicales formados tienen extraordinaria fuerza oxidante y son los responsables del daño tisular en los sistemas biológicos. El principal radical es $\text{OH}\cdot$ y se produce en la reacción "catalizada por metales" y descrita por Haber-Weiss en donde el Fe^{+++} es reducido a Fe^{++} por el O_2^- y después reoxidado a Fe^{+++} por el H_2O_2 con la consecuente producción de $\text{OH}\cdot$.

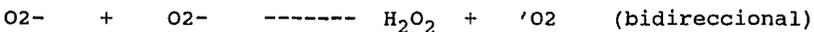


La vía por la cual se obtiene hierro para esta reacción es a través de su liberación de la ferritina que ocurre cuando se expone a O_2^- (47).

Durante esta misma reacción, un compuesto muy inestable y de alta energía, el singlete de oxígeno, también es producido a partir de la interacción de el ión hipohalito con el H_2O_2



Y de la rápida dismutación espontanea del superóxido (61).



d) Iodinación. El proceso de iodinación de proteínas es mediado por el sistema de MPO. Klebanoff y cols. demostraron que MPO puede

utilizar H_2O_2 y un cofactor haluro para destruir una variedad de microorganismos. La halogenación de constituyentes de la pared bacteriana, principalmente tirosina e histidina, por I^- o Cl^- , producen reemplazo de H^+ en sitios cruciales que desencadenan la muerte bacteriana. Esta capacidad del PMN para halogenar proteínas se ha utilizado para evaluar de manera indirecta la capacidad microbiciada de los fagocitos mediante la iodación de proteínas. Estos mismos autores notaron que en presencia de iodo exógeno, los PMNs que se encontraban fagocitando podían iodinar mucha mas cantidad de proteínas que las células en reposo (62). Root y Stossel observaron que el proceso se lleva a cabo casi exclusivamente en las vacuolas fagocíticas, dependiendo de factores como el tipo de partículas ingeridas así como la cantidad de H_2O_2 generada. De esta forma, un incremento de la iodación de proteínas durante la fagocitosis será indicativo de un incremento en la formación de H_2O_2 como de una adecuada función del sistema MPO (61).

3. Métodos de medición del estallido respiratorio.

Algunos de los pasos del metabolismo oxidativo de los PMNs pueden ser evaluados por diferentes métodos. La determinación de anión superóxido se realiza mediante la reducción de ferrocitocromo C a la forma ferrosa. El peróxido de hidrógeno puede detectarse por su reacción con peroxidasa o por la oxidación de donadores de hidrógeno, en este último caso puede utilizarse la oxidación de rojo de fenol para medir el H_2O_2 (70).

Métodos ampliamente utilizados y que evalúan en conjunto el estallido respiratorio son quimioluminiscencia y reducción del colorante nitroazúl de tetrazolio.

a) Quimioluminiscencia. Los neutrófilos estimulados por la fagocitosis o en contacto con diversos agentes que perturban la membrana celular emiten en forma abrupta energía luminosa (quimioluminiscencia). Se considera que el fenómeno luminiscente es secundario a la generación de las diversas especies oxidativas electronicamente excitadas (O_2^- , H_2O_2 , 1O_2), aunque no hay unanimidad en cuanto a la especie que principalmente produce el fenómeno. Se ha postulado que durante las reacciones donde el singlete de oxígeno y sus productos de oxidación pasan al estado de reposo, se libera energía en forma de fotones y se capta una característica fluorescencia o quimioluminiscencia que puede ser medible. Bajo condiciones de anaerobiosis, en pacientes con EGC o en deficiencias o alteraciones de la enzima MPO, no ocurre el fenómeno luminiscente. Estos hallazgos indican que la quimioluminiscencia es dependiente de la disponibilidad de O_2 , la actividad de la oxidasa inicial para la formación de O_2^- , presencia de O_2^- y H_2O_2 y la actividad de la MPO (61).

La respuesta quimioluminiscente en los granulocitos puede ser magnificada con substratos secundarios como luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) y lucigenina (10,10'-dimetil-9,9'-dinitrato de biacridina). Ambos se utilizan para medir diferentes eventos metabólicos dentro del PMN. La respuesta amplificada por luminol refleja principalmente la actividad de la MPO. Cuando dicho substrato es oxidado, se origina el anión aminoftalato que es inestable, el cual al pasar al estado de reposo emite luz como mecanismo de pérdida de energía, magnificando de esta forma la

luminiscencia. La quimioluminiscencia amplificada por lucigenina mide la oxigenación asociada a la oxidasa (61, 116).

El análisis de quimioluminiscencia originalmente se desarrolló para examinar el estallido respiratorio celular, la producción de radicales oxidantes y la generación de otros agentes cuya función es eliminar los patógenos microbianos. Numerosos estudios han utilizado la quimioluminiscencia para evaluar los primeros cambios que ocurren en los granulocitos durante los procesos infecciosos y otros procesos patológicos. Algunos estudios han sugerido que los receptores de la superficie celular y los productos del metabolismo oxidativo de los granulocitos pueden reflejar el estado funcional de la célula. Diferentes estímulos pueden seleccionarse para discriminar los eventos relacionados con receptores de los que no requieren de estos para desencadenar el metabolismo oxidativo de la célula. Ig y complemento opsonizan partículas y mediante receptores Fc y CR desencadenan la respuesta fagocítica y actividad metabólica celular. En contraste estímulos solubles como PMA (forbol-miristato-acetato) no requieren de receptores para que ocurra degranulación y estallido respiratorio. De esta forma de acuerdo a los estímulos utilizados, indirectamente puede inferirse las condiciones de expresión de receptores. Las aplicaciones clínicas del análisis de quimioluminiscencia de los fagocitos son diversas y es una metodología sensible en la medición de la capacidad fagocítica y de la integridad del metabolismo oxidativo celular (71).

b) Reducción del colorante nitroazúl de tetrazolio (NBT). El colorante NBT en su forma oxidada es amarillo y funciona como aceptor de electrones de diversos donadores. Al reducirse el NBT, se forma

un precipitado azul denominado formazán el cual es insoluble. Normalmente un pequeño porcentaje de granulocitos obtenidos de sangre periférica pueden reducir en forma espontanea el colorante, pero ante condiciones ó estímulos que desencadenen el estallido respiratorio, más del 80% de los PMNs pueden reducir el NBT. En la célula intacta, la reducción del colorante se lleva a cabo en su superficie y en los fagosomas y puede ser inhibida por la SOD lo cual es un indicativo de la producción de superóxido y por lo tanto dependiente de todos los factores que regulen la formación de este compuesto. La reducción de NBT es un método para evaluar la actividad oxidativa de las células fagocíticas (61).

C. Receptores para opsoninas en neutrófilos PMNs. Estructura y mecanismos que modulan su expresión y funciones.

IgG es de gran importancia en el sistema inmune humoral y está presente en altas concentraciones en el plasma humano. Por otro lado la activación del sistema del complemento con la consecuente proteólisis de sus fracciones origina componentes como C3 y C3bi. IgG, C3b y C3bi son las principales opsoninas para las cuales las células fagocíticas poseen receptores en su membrana. Del adecuado número y función de estos receptores, depende el reconocimiento de las partículas y microorganismos opsonizados y que se desencadenen los procesos de unión, fagocitosis y muerte intracelular por los PMNs (72).

1. Estructura de los receptores Fc-gamma.

Los neutrófilos humanos pueden expresar tres clases de receptores Fc: Fc RI, Fc RII y Fc RIII (Cuadro 4). Los tres son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulinas (73). Fc RI es una proteína de 72 Kd, su DNAC codifica para una región extracelular de aproximadamente 290 aminoácidos, en la cual tres dominios semejantes a inmunoglobulina pueden distinguirse así como una región transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio citoplásmico con carga y altamente glicosilado (73,74).

Fc RII precipita como una banda de 40 Kd, después de remover de su estructura los carbohidratos, se observa como una banda de 36 Kd. Su DNAC codifica para una región extracelular de cerca de 180 aminoácidos, contiene dos dominios semejantes a inmunoglobulina: uno de 24 a 26 aminoácidos (aa) transmembranal y un dominio citoplásmico de longitud variable (76, 52 y 44 aminoácidos). Se han identificado tres genes para este receptor (IIa, IIa' y IIb). IIa y IIb se distinguen porque generan diferentes señales peptídicas y tienen un dominio citoplásmico diferente (76 aa para IIa y 40 a 50 aa para IIb). La forma IIa' contiene una señal peptídica similar a la forma IIb y el dominio citoplásmico de la forma IIa. Este polimorfismo de Fc RII se refleja en los diferentes anticuerpos monoclonales que pueden unirse al mismo. Los neutrófilos expresan predominantemente la forma IIa. Los genes para el receptor Fc RII están localizados en la parte distal del brazo largo del cromosoma 1 y en estrecha asociación con los genes del receptor Fc RIII (74).

Fc RIII es una proteína de 50 a 80 Kd. Dos genes diferentes codifican para Fc RIII (III-1 y III-2). Ambos se localizan en el cromosoma 1 y en estrecha unión. Son altamente homologos pero se

distinguen en la substitución de una base en el codón de terminación. El RNAm III-1 codifica para una proteína de 210 aa con dos dominios extracelulares semejantes a inmunoglobulina, seguido por 21 aa carboxiterminal hidrofóbicos y 4 hidrofílicos. El RNAm III-2 codifica una proteína casi idéntica pero con 25 aa carboxiterminal hidrofílicos (75). La proteína III-1 se rompe durante el proceso postraducciona l en los neutrófilos y se une a un anclaje de fosfatidil inositol (74,76), mientras que la proteína III-2 parece ser un receptor transmembrana. En los neutrófilos solamente se ha demostrado el RNAm para la proteína III-1 mientras que en células NK solo se ha encontrado el RNAm para III-2 (74,77). Los macrófagos presumiblemente expresan la forma transmembranal de Fc RIII porque en cultivos de monocitos de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna que muestran deficiencia en el receptor Fc RIII se ha encontrado expresión del receptor Fc RIII, además de que la forma transmembranal es resistente a la acción de fosfolipasa C específica al glicosil, fosfatidil inositol (74,76,77).

CUADRO 4

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES Fc R

TIPO (CD)	DISTRIBUCION	P.M.	AFINIDAD	ESPECIFICIDAD PARA EL ISOTIPO DE IgG
Fc RI (CD64)	Monocitos, Macrófagos, PMNs (inducido por IFN-gamma y G-CSF).	70 kDa	Alta	1 = 3 > 4 >>> 2
Fc RII (CD32)	Monocitos, Macrófagos, PMNs, Basófilos, Eosinófilos, Cel. de Langerhans, Cel. B, plaquetas, Cel. endotelial.	40 kDa	Baja	3 > 1 = 2 >>> 4
Fc RIII (CD16) IIIA	Macrófagos, Cel. NK, Subpoblaciones de linfocitos T, Monocitos. Inducidos en monocitos por TGF.	50-90kDa	Media	1 = 3 >>> 2, 4
IIIB	Neutrófilos, Inducidos en eosinófilos por IFN-gamma.		Baja	

Adaptada de Wallace. J. Leuk. Biol. 1994;55:816.

No se ha descrito polimorfismo para el receptor Fc RI. Sin embargo para Fc RII se han encontrado dos formas alelicas, identificadas por algunos autores como "respondedores y no respondedores" en base a estudios funcionales por su capacidad de unir IgG1 de ratón, analisis bioquímico del patrón isoelectrico y la reacción con anticuerpos monoclonales. No está claro qué aminoácido da este polimorfismo, pero se ha encontrado que los individuos con Fc RII tipificados como

"respondedores" presentan His-133 y los "no respondedores" Arg-133, aunque en otros estudios es diferente el aminoácido implicado, Gl-27 y Cys-27 respectivamente (74).

Dos formas de Fc RIII se han encontrado en los neutrófilos con base en análisis bioquímico, reactividad con anticuerpos monoclonales y antisueros humanos. El polimorfismo corresponde al sistema de antígenos NA1/NA2, donde son pocas las diferencias en aminoácidos entre las dos formas, que influyen principalmente en la capacidad de glicosilación de estas. La significancia clínica de este polimorfismo está relacionada con diversos estados patológicos como neutropenias alo o autoinmunes y reacciones postransfusionales (74,78).

En la unión del receptor Fc RI con la IgG humana monomérica la afinidad es alta ($K_a = 5 \times 10^8 \text{ mol/L}^{-1}$) y la especificidad con las subclases (IgG1 = IgG3 > IgG4 >> IgG2). La glicosilación de IgG es importante para la unión de Fc RI pues la IgG deglicosilada no se une al receptor (72,74).

Fc RII es un receptor de baja afinidad que no se une a Ig monomérica. Ya que la expresión de Fc RII en los neutrófilos es relativamente baja (10,000 a 40,000 por célula), la K_a de complejos dimericos de IgG1 se midió en células K562 y fué de 10^8 mol/L^{-1} . La especificidad por las subclases dimericas de IgG es IgG3 > IgG1 = IgG2 >> IgG4 (72,74).

Fc RIII también es un receptor de baja afinidad, aunque se expresa en mayor cantidad en las células (100,000 a 300,000 por célula). La K_a para la IgG1 dimerica es de $11 \times 10^7 \text{ mol/L}^{-1}$ y para los dimeros de IgG3 de $47 \times 10^7 \text{ mol/L}^{-1}$. Debido a que los complejos dimericos de Ig

consisten en IgG2 o IgG4 no unidos en una extensión medible en los neutrófilos, no se disponen de datos de la K_a de estas dos inmunoglobulinas. Hay datos que sugieren que Fc RIII tiene dos sitios de unión para la IgG localizados en distinto dominio (72,74).

Otro aspecto importante de este receptor es que puede ser liberado de la superficie de la célula por la acción de proteasas que rompen su unión fosfolipídica cuando el neutrófilo se ha activado. Aparentemente esto también ocurre en condiciones fisiológicas pues se ha medido una cantidad substancial del receptor en plasma en promedio de 5 nmol/L con un rango de 2 a 10 nmol/L en donadores sanos (74).

Mecanismos de modulación.

Los neutrófilos no expresan Fc RI, pero expresan de 10,000 a 40,000 sitios de Fc RII y entre 100,000 a 300,000 de Fc RIII (74). Esta expresión está modulada por cambios en los mediadores de la inflamación. Tanto in vivo como in vitro, Fc RI es inducido en los neutrófilos humanos por citocinas como Interferón gamma (IFN-gamma) hasta 15,000 a 20,000 sitios por célula, pero IFN alfa y beta no tienen este efecto. Como mecanismo de regulación para prevenir la sobreinducción de este receptos se sugiere que los glucocorticoides a concentraciones habituales en respuesta al estrés, inhiben la expresión inducida del receptor Fc RI por el IFN-gamma (74,79).

Otras citocinas como los factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF y G-CSF) no inducen la expresión de Fc RI (74,80).

Al parecer, la expresión de Fc RII no se ve influenciada por ninguna de las citocinas antes mencionadas ni por glucocorticoides, sin

embargo parece ser que ante el estímulo con IFN-gamma, se puede producir un incremento de la citotoxicidad mediada por los receptores Fc RII sin que se incremente la expresión del mismo (81).

La expresión de Fc RIII depende de la sobreexpresión (upregulation) y liberación de este receptor. El efecto de citocinas como IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF y glucocorticoides no se ha establecido del todo. Se sabe que dexametasona sola puede incrementar la expresión de Fc RIII en cultivos de PMNs (79). Además IL-1 beta y TNF-alfa tienen la capacidad de inducir o incrementar en los PMNs, la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, la cual es mediada por receptores Fc (82). Sin embargo no se han observado cambios en el número absoluto de estos receptores que indiquen que tal incremento de la fagocitosis se deba a un aumento de la expresión de receptores Fc (82).

Se ha comprobado que GM-CSF aumenta el metabolismo oxidativo de neutrofilos, incrementa la quimiotaxis y fagocitosis y puede estimular la expresión y modular la afinidad de receptores para N-formil péptidos (f-MLP) (83). Si esta citocina incrementa los receptores para f-MLP, pudiera ejercer algún efecto adicional sobre los receptores Fc RIII a través del mecanismo de transmodulación que se ha postulado entre estos dos tipos de receptores (84).

Funciones de los receptores Fc-gamma.

Dada la complejidad del sistema de receptores Fc gamma, con múltiples receptores en la misma célula, es difícil delimitar el papel de cada uno de ellos. Sin embargo, se conocen algunos aspectos y funciones en los cuales participan predominantemente. Los neutrófilos pueden lisar células como eritrocitos de pollo, si estos han sido

sensibilizados con fragmentos de Fab de anticuerpos contra dos sitios específicos, una porción Fab contra alguno de los receptores Fc RI, II o III y la otra porción Fab contra los eritrocitos de pollo (74). El papel central del receptor Fc RI se ha demostrado en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), función que puede ser modulada por mediadores de la inflamación como interferón gamma y posiblemente otras hormonas y citocinas (72,74) además de la fagocitosis (81). Fc RII es el responsable de la unión de agregados de IgG2b de origen murino dado su polimorfismo (72). En monocitos humanos, Fc RII también puede interaccionar con alta o baja afinidad con la IgG1 murina si los monocitos se han tratado con enzimas proteolíticas como pronasa o tripsina. El mecanismo por el cual modifican su afinidad no es claro, pero es posible que el incremento de la afinidad inducido por proteasas ocurra también in vivo, sobre todo en sitios inflamatorios. De esta forma el Fc RII puede funcionar como un receptor en "espera" de la IgG: por un lado con afinidad modificable por la IgG monomérica y con baja afinidad por complejos de IgG en condiciones normales; pero con afinidad y actividad funcional que puede ser incrementada por enzimas proteolíticas liberadas localmente durante una respuesta inmune (81). Fc RII puede mediar ADCC aunque en menor proporción que Fc RI e igualmente ser modulada esta función (sin modificación del número de receptores) por IF-gamma. Además tiene gran participación en la fagocitosis, desencadenamiento del estallido respiratorio con la generación de superóxido y en la liberación de enzimas lisosomales de los neutrófilos, esta última función puede ser dependiente de una interacción entre los diferentes receptores (73,81). Se sabe que Fc

RIII participa en la depuración de complejos inmunes. En estudios en sistema monocito-macrófago de chimpancés, en donde se efectuó un bloqueo con anti-Fc RIII MAb 3G8 o su fragmento Fab, se produjo una importante disminución en la depuración de eritrocitos autólogos cubiertos con anticuerpos específicos al grupo menor sanguíneo (73), lo cual sugirió que incluso este tipo de grandes complejos inmunes pueden ser depurados mediante la acción de receptores Fc RIII. De principal importancia es la participación de este receptor en la fagocitosis de bacterias o partículas opsonizadas, además de que participa en fenómenos de quimiotaxis y adherencia como lo muestra el estudio de Masuda y cols. donde encuentran que los neutrófilos de neonatos muestran dos subpoblaciones heterogeneas de PMNs cuyas funciones de quimiotaxis y adherencia se asociaron con la alta o baja capacidad de estas células para formar rosetas con eritrocitos opsonizados (85). Además parece ser que la participación del receptor Fc RIII de los neutrófilos puede ser modulada por una citocina de bajo peso molecular (<10,000) que inicialmente se analizó en la estimulación del receptor para C3b. Esta citocina que se libera de células T en respuesta a monocitos incubados con complejos inmunes, rápidamente estimula la fagocitosis pero no la unión de eritrocitos sensibilizados con IgG en los PMNs. Un anticuerpo monoclonal contra Fc RIII de neutrófilos se ha descrito que inhibe solamente la función fagocítica estimulada por la citocina antes mencionada. Fearon encontró que el 50% de los Fc RIII en los polimorfonucleares se reagrupan (forman co-capping) con el receptor para C3b, lo cual implica que el receptor Fc gamma existe en diferentes estados dependiendo de su asociación con el citoesqueleto

de la célula (72, 85,86). Una función mediada por los receptores Fc-gamma y única para los receptores Fc RIII del neutrófilo es la inducción de fagocitosis independiente de opsonización de bacterias que poseen sustancias semejantes a lectinas en su superficie. Salmon y cols. han mostrado que la modulación de Fc RIII inhibe la fagocitosis de eritrocitos opsonizados por concanavalina A o *Escherichia coli* no opsonizada (74,87). Esta forma de fagocitosis dependiente de los receptores Fc RIII es inhibida específicamente por alfa-metil manosido. La presencia de oligosacáridos tipo manosa en el receptor Fc RIII, se piensa que son importantes para esta función (75,88).

Fracciones opsónicas de Complemento.

La activación de la cascada de complemento da como resultado proteólisis de este sistema de proteínas con la liberación de algunos potenciales ligandos para receptores en los leucocitos entre los que se incluyen: C3a, C5a, C1q, C3b/C4b, C3bi, C3bg y C3dg (72). Algunos de estos ligandos pueden ser solubles y causan movimiento quimiotáctico de los leucocitos a los sitios de la activación del complemento y otros se unen a la superficie de partículas actuando como opsoninas. Esencialmente toda la actividad opsónica de complemento reside en el fragmento C3 que es la proteína de este sistema que se encuentra en mayor cantidad en suero (1.3 mg/ml) y que se deposita en las partículas "blanco" tanto por la activación de la vía clásica como por la vía alterna que es independiente de anticuerpos (72). Después de la activación, un enlace tioester interno sufre rearrreglo y se genera un grupo sulfhidrilo libre en C3 y un enlace ester entre C3 y un grupo hidroxilo en la partícula

"blanco" (72,89). La molécula resultante, unida en forma covalente, es denominada C3b la cual puede ser reconocida por el receptor CR1. Después de que C3b es depositado en la superficie de partículas que activaron la vía clásica, su vida media es muy corta. La cadena alfa de la fracción C3b es fraccionada en minutos por la acción combinada de proteínas de unión, factor H, y la enzima denominada factor I (inactivador de C3b) para producir C3bi. La forma C3bi es inestable en suero por algunas horas y puede ser reconocida por el receptor CR3. Sin embargo, si la fracción C3bi se une a la superficie de una partícula activadora de la vía alterna, la fracción de C3b resiste a la acción del factor I y puede permanecer mas tiempo en circulación (72). De esta forma la función efectora de C3 dependerá de la naturaleza de la partícula a la cual se une. Si las partículas cubiertas con C3b, C3bi ó ambos no son removidos por los fagocitos, el C3 es convertido a C3dg por la acción del factor I. Aunque los fagocitos expresan el receptor para C3dg denominado CR4, no se ha mostrado que participen en la fagocitosis o depuración de partículas (72). C3dg también es reconocido por un receptor en los linfocitos B denominado CR2. Este receptor sirve como sitio de unión del virus Epstein-Barr al linfocito B y puede funcionar junto con los receptores para opsoninas para el control de la proliferación de las células B (72). La proteína C4 del complemento es estructuralmente homologa a C3 y se une a la superficie de partículas de manera similar y por enlaces covalentes. C4b puede ser reconocido por CR1 pero no se degrada a los fragmentos biológicamente activos (72).

2. Estructura de los receptores CR.

CR1 es una proteína glicosilada con un peso molecular entre 160 y 250 kD. En humanos se han descrito cuatro formas alélicas para CR1 con pesos moleculares de 160, 190, 220 y 250 kD. Estos alelos se expresan en forma codominante por lo que los individuos pueden ser tanto homocigotos y expresar CR1 de un solo peso molecular o heterocigotos y expresar CR1 con dos diferentes pesos moleculares. CR1 tienen un solo dominio en membrana de 25 aa, un dominio citoplásmico C-terminal de 43 aa y un gran dominio extracelular con 30 segmentos cortos repetidos y ordenados en tandem, los cuales poseen de 60 a 70 aa cada uno, observándose variaciones en la longitud y secuencia de los 30 segmentos cortos, pero 29 de los 60 a 70 aa que los forman se mantienen altamente conservados y la localización de cisteínas no varía. Un patrón de repetición adicional también se ha observado en el dominio extracelular de CR1. Hasta 4 secuencias repetidas en tandem de 450 aa pueden encontrarse y compuestas de 7 segmentos cortos repetidos, estos fragmentos de repetición "largos" son similares en secuencia uno a otro y pueden ser la base de las diferentes formas alélicas de CR1 (72,90).

CR3 se compone de dos polipéptidos, una cadena alfa de 185 kD y una beta de 95 kD unidas por enlaces no covalentes como dímeros alfa1-beta1. Ambas cadenas están expuestas en la superficie celular. Mediante anticuerpos dirigidos contra la cadena beta, se han inmunoprecipitado tres diferentes dímeros alfa 1 - beta 1 en macrófagos. El primero es CR3 y el segundo es una molécula denominada LFA-1 y el tercero se denomina p150.95, que pertenecen al grupo de las integrinas. Las cadenas beta de LFA-1 y p150.95 son idénticas a la cadena de CR3 pero la cadena alfa es estructural y

antigénicamente diferente. Por lo anterior ni LFA-1 ni la proteína p150.95 reconocen C3bi porque ambas expresan la cadena beta que es diferente a la que se une a C3bi (72,91).

La afinidad de CR1 por la fracción C3b es de aproximadamente 5×10^7 M^{-1} , mientras que la afinidad de CR3 por C3bi es mas baja y además requiere de relativamente altas concentraciones de cationes divalentes (aproximadamente 0.5mM de Ca^{++} y Mg^{++}) para interactuar en forma efectiva con su ligando. Además esta unión con el ligando es dependiente de temperatura (72).

Mecanismos que modulan su expresión.

Los neutrófilos no estimulados expresan alrededor de 5000 sitios del receptor CR1 por célula que pueden incrementarse dependiendo del estímulo utilizado. Fearon y Collin han demostrado que los PMNs en sangre con anticoagulante expresan relativamente pocos receptores CR1, pero este número incrementa rápidamente después de la activación con C5a o f-MLP. Con PMNs aislados, la expresión del receptor CR1 incrementa rápidamente solo con la incubación a 37°C aún en ausencia de un estímulo específico y alcanza un máximo de 40,000 receptores por célula, lo cual debe tomarse en consideración cuando se quiere concluir acerca de los efectos de activadores en la expresión de los receptores CR1 (92). Sin embargo Berger y cols. encontraron que aún en PMNs aislados, el incremento en el número de receptores CR1 y CR3 que observaron con el cambio de temperatura y procedimiento de separación de células no representa la expresión total del receptor ya que pudieron observar un incremento adicional inducido por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina o sobrenadante de células Raji,

con lo cual concluyen que en este fenómeno está implicada la translocación de los receptores de los depósitos intracelulares y que PMNs aislados pueden utilizarse para estudiar este fenómeno (93). Por otro lado, una de las principales citocinas que se liberan durante la inflamación IF-gamma modula la capacidad de unión de los receptores CR1 y CR3 en células que han sido tratadas con esta citocina sin asociarse con cambios en el número de receptores ni inactivación proteolítica de los mismos. Este efecto de depresión en la capacidad de fijación de partículas se debe a cambios reversibles de la conformación de los receptores existentes (72). Además GM-CSF otro factor liberado durante la inflamación, se ha mostrado que induce hasta 5 a 12 veces la expresión de CR1 y CR3 al parecer tanto por incremento de la traducción protéica como por movilización de los depósitos intracelulares similar al efecto producido por f-MLP (94).

Función de los receptores CR.

La principal función biológica del receptor CR1 es mediar la fagocitosis de partículas opsonizadas por la fracción C3b así como de complejos solubles y previene la generación de C3bi (72,86). El receptor CR3, el cual pertenece al grupo de integrinas, participa en la fisiopatogénesis de la inflamación crónica o persistente y por lo tanto en las funciones de adherencia de célula/célula y célula/substrato, así como la fagocitosis de partículas opsonizadas con C3bi (72,91). Se había postulado inicialmente que este receptor no desencadenaba la producción de metabolitos oxidativos como peróxido de hidrógeno o superóxido (95) como ocurre con la activación de los receptores Fc-gamma (96) en donde además se liberan metabolitos del ácido araquidónico (97). Sin embargo Shappell y

cols. han encontrado que CR3 puede mediar la producción de H_2O_2 dependiente de la adhesión tanto en neutrófilos humanos como caninos que fueron expuestos a factores quimiotácticos (98).

3. Metodos de medición de la expresión de receptores de opsoninas.

Se han empleado diferentes métodos para la detección de receptores de opsoninas en células fagocíticas. Desde métodos sencillos aunque menos sensibles como el ensayo de formación de rosetas utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con IgG y fracciones de complemento (99), hasta otros más sensibles y automatizados como el uso de anticuerpos monoclonales específicos al receptor, marcados con tinciones fluorescentes (inmunofluorescencia directa o indirecta) y análisis por citometría de flujo.

La inmunofluorescencia es esencialmente una técnica histoquímica ó citoquímica para la identificación y localización de antígenos, en este caso, del receptor en la superficie celular. Un anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, resultando un trazador sensible sin que se altere su reactividad inmune. El antisuero conjugado es añadido a las células o a los tejidos y se fija a los antígenos formando por lo tanto un complejo inmune estable. Este complejo fluorescente puede ser medido por diferentes métodos como microscopía de luz, fluorometría y citometría de flujo entre otros.

En el análisis por citometría de flujo es posible la medición simultanea de características físicas múltiples de una sola partícula, generalmente células. El citómetro de flujo utiliza una combinación de flúidos, optica y componentes electrónicos para

iluminar las células en forma individual y coleccionar los datos generados para el análisis subsecuente. Las partícula o células en una suspensión acuosa, se hacen pasar a velocidad alta a través de una región donde la luz proveniente de un laser ilumina uniformemente la célula por un corto tiempo, la luz incidente del laser se dispersa en la célula y cualquier molécula fluorescente en la partícula o célula se excitará y emitirá fluorescencia. Tanto la luz dispersa como la fluorescencia emitida se colecta por lentes, una combinación de rayos y filtros conducen la luz a detectores apropiados que producen señales electrónicas proporcionales a la cantidad de luz que reciben. Por tanto, las características o parámetros medidos en cada evento se basan en la dispersión de la luz y las propiedades fluorescentes. Los datos son colectados y almacenados en una computadora y pueden ser analizádos en forma diferida. La información obtenida en caso de células, es acerca de subpoblaciones dentro de la muestra, tamaño relativo, granularidad relativa, complejidad interna y la intensidad de fluorescencia relativa, esta última se expresa en escala lineal o logarítmica y puede efectuarse análisis estadístico de los resultados comparando dos parámetros (dot plot) u obtenerse datos de un sólo parámetro en el diferente número de eventos analizados y mostrarse a través de histogramas de frecuencia (100,101).

D. Receptores para opsoninas y desnutrición.

La información que se tiene con respecto a la expresión de receptores para opsoninas en estados de desnutrición es escasa y controvertida.

En un estudio efectuado por Douglas y Schopfer en desnutrición protéica calórica en niños, se encontró que la fagocitosis de partículas de poliestireno y eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpos fué adecuada (102). Keusch y Douglas en un modelo experimental de desnutrición en ratas evaluaron la función de receptores de superficie para IgG en macrófagos peritoneales y no encontraron alteración (103). Sin embargo, estos estudios se enfocaron al análisis de receptores para IgG, específicamente en el modelo experimental en ratas, donde las células utilizadas fueron macrófagos y se sabe que en el humano, los PMNs pueden ser más eficientes que los macrófagos en la ingestión y muerte intracelular de algunos tipos de bacterias (104), que además de inmunoglobulinas requieren de otras opsoninas como fracciones de complemento, en este sentido, la función de receptores para las fracciones de complemento no fué investigada.

Condiciones de inmunidad similares a las del desnutrido se manifiestan en el sujeto recién nacido. Se ha evaluado la expresión de receptores Fc RIII en recién nacidos pretérmino de muy bajo peso, mediante anticuerpos monoclonales marcados y se observó que hay una disminución en la expresión de los receptores en aquellos pacientes que además de esta condición cursaron con bacteremia o septicemia (105). Bruce y cols. investigaron la expresión de los receptores CR1 y CR3 en neutrófilos de neonatos y su respuesta ante estímulos inflamatorios. Encontraron que la expresión de ambos receptores es similar cuando las células no han sido activadas, posterior al estímulo con formil-péptidos y partículas opsonizadas observaron un

incremento de la expresión de CR1 y disminución en la expresión de CR3. Concluyen que ya que el receptor CR3 es necesario en los fenómenos de adherencia y migración dirigida, un defecto en la expresión de este receptor puede ser causa de la alteración encontrada en dichas funciones en los PMNs de neonatos (106). Smith y cols. además han evaluado la expresión de los receptores de complemento CR1 y CR3 así como la de los receptores Fc RIII en neutrófilos de neonatos y fetos con enfermedad por Rh. Ellos encontraron datos similares a los de Bruce, ninguna diferencia en la expresión de los receptores de complemento cuando la célula no estaba estimulada y disminución en la expresión de CR3 en los PMNs de fetos, pretérminos y recién nacidos de término cuando las células se estimularon con f-MLP. Igualmente la expresión de Fc RIII se vió disminuída en los neutrófilos de recién nacidos pretérmino y de término. Concluyen que se encuentra una correlación de menor expresión de receptores con la edad gestacional, sin embargo hacen notar que no es el único factor determinante de la menor expresión de los receptores (107).

En un estudio preliminar realizado en el Lab. de Inmunoquímica del Hospital Infantil de México, utilizando el método de neutrófilos formadores de rosetas, evaluamos la expresión de los receptores de opsoninas en PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana y encontramos alteración en la expresión de estos receptores (Tabla 2).

Tabla 2. Neutrófilos Formadores de Rosetas* en Eutróficos y Desnutridos con y sin Infección bacteriana aguda.

Eutróficos		Desnutridos	
Sin Infección (n = 12)	Infectados (n = 10)	Sin Infección (n = 6)	Infectados (n = 12)
70.2 ± 5	54.4 ± 6 [^]	67.0 ± 3	42.8 ± 5 ^{^^}

*Resultados expresados en % de Neutrófilos Formadores de Rosetas y representan el promedio ± E.E.M.

[^] p < 0.05

^{^^} p < 0.01

Sin embargo este método es menos sensible y evalúa en forma general la expresión de los receptores de complemento e inmunoglobulina sin establecer la diferenciación entre los dos tipos (3).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En sujetos con desnutrición protéico calórica se ha demostrado una mayor susceptibilidad a las infecciones, sobre todo de tipo bacteriano, como consecuencia de las alteraciones que presentan en los mecanismos de defensa. La eliminación de microorganismos causantes de infecciones, requiere de una adecuada función de las células fagocíticas, en cada uno de los eventos que desarrollan durante el proceso de fagocitosis. El hecho de que estas células muestren una disminución en su capacidad de reconocer partículas opsonizadas, pudiera estar condicionada por una inadecuada expresión de receptores para opsoninas ó de alteración en los mecanismos intracelulares que se desencadenan por la interacción de estos receptores con sus respectivos ligandos. De ahí la necesidad de

conocer si la expresión de los receptores Fc RIII, CR1 y CR3 se encuentra alterada en los neutrófilos PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda, además de determinar si los PMNs de estos pacientes son capaces de incrementar la expresión de los receptores de opsoninas en respuesta a estímulos inflamatorios.

IV. HIPOTESIS

Ha.

Los neutrófilos de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda, son deficientes en su capacidad para expresar los receptores de superficie CR1, CR3 y Fc RIII en condiciones de reposo y ante estímulos inflamatorios al ser comparados con los de niños eutróficos.

V. OBJETIVOS

1. Determinar la expresión de receptores CR1, CR3 y Fc RIII en PMNs de niños eutróficos y desnutridos con ó sin infección bacteriana aguda.
2. Evaluar la capacidad de expresión de los PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda ante un estímulo inflamatorio.

VI. MATERIAL Y METODOS

A. Población de estudio y tamaño de muestra.

Se realizaron ensayos preliminares utilizando PMNs de 10 adultos voluntarios "sanos" y de 10 niños menores de 48 meses, eutróficos y sin padecimientos infecciosos bacterianos ó virales. El propósito de estos ensayos fué la estandarización de los métodos de inmunofluorescencia indirecta y medición de la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo, además de obtener valores de referencia de la expresión de los receptores Fc RIII, CR1 y CR3 en niños y adultos.

Se calculó el tamaño de muestra mediante la fórmula para comparación de promedios unidireccional (108), considerando un alfa = 0.05, beta = 0.10 y diferencia de 20 con lo que se obtuvo un tamaño de muestra de 10 elementos por grupo.

Los sujetos incluidos en el estudio fueron niños de 2 a 48 meses de edad, independientemente del sexo, eutróficos y desnutridos, que se internaron en los servicios de Urgencias, Cirugía, Nutrición y Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del Hospital Infantil de México, con diagnóstico de infección bacteriana aguda.

Los pacientes seleccionados se captaron dentro de las primeras 72 hr de internamiento.

El proyecto se sometió al Comité de Investigación y Etica de la Institución y se registró como HIM/91/006, siendo aprobado con fecha 03/04/1991. Se solicitó la autorización por escrito de los padres ó tutores de los niños para incluirlos en el estudio.

a) Criterios diagnosticos:

Desnutrición.- Se consideró desnutrición en base al exámen clínico (109) y evaluación antropométrica efectuadas por dos observadores. Los índices obtenidos incluyeron peso/edad, talla/edad y peso/talla (110). Para la medición del peso se utilizaron báscula pesa bebé de resorte, precisión 5 gr y báscula de pie Detekto, precisión 250 gr. Para la talla se utilizaron como instrumentos de medición infantómetro y estadiómetro. Se tomaron valores de referencia para realizar las comparaciones entre el peso y talla reales y el peso y talla ideales para la edad (1,111) y los valores para las comparaciones entre peso/talla reales y peso/talla ideales fueron tomados de las tablas del National Center for Health Statistics (NCHS) (1). Una vez obtenidos los índices se utilizaron las clasificaciones de Gómez (112) y Waterlow para considerar el grado de desnutrición, seleccionandose unicamente los pacientes con desnutrición grave. Ya que las clasificaciones anteriores no incluyen al paciente con Kwashiorkor se utilizó el puntaje de McLaren (113) para su diagnóstico.

Infección bacteriana aguda.- Se estableció el diagnóstico en base a datos clínicos y de laboratorio y gabinete. Estos incluyeron fiebre mayor de 38°C ó hipotermia, síntomas y/o signos de inflamación para los casos de artritis, celulitis, otomastoiditis, abscesos en piel, otitis media supurada. En infecciones como meningitis, osteomielitis aguda, fiebre tifoidea, neumonías y/o derrames pleurales, se consideraron síntomas y signos específicos a cada padecimiento. Se determinaron biometría hemática completa, proteína C reactiva, Velocidad de sedimentación globular, cultivos, tinciones de Gram y

antígenos bacterianos en líquidos corporales. Los indicadores indirectos de infección fueron: leucocitosis ó leucopenia determinada de acuerdo a valores de referencia para la edad, incremento en el porcentaje de neutrófilos y formas jóvenes así como una relación bandas/neutrófilos menor a 0.5; velocidad de eritrosedimentación incrementada; proteína C reactiva positiva; aislamiento bacteriano, tinción de Gram y determinación de antígenos bacterianos por coaglutinación cuando fué posible obtener muestras de secreciones, exudados ó líquidos corporales. Para el caso particular de neumonías no complicadas con derrame pleural donde no hubo acceso a la toma de cultivos, se consideró como bacteriana cuando los datos clínicos y laboratoriales anteriores, junto con los hallazgos radiológicos sugirieron esta etiología.

b) Criterios de Inclusión:

- Niños de 2 a 48 meses de edad sin importar sexo.
- Eutróficos y desnutridos.
- Con diagnóstico de infección bacteriana aguda.
- Período de internamiento NO mayor a 72 hr.
- Sin tratamiento antibiótico establecido.
- Con autorización por escrito del padre ó tutor.

c) Criterios de No Inclusión:

- Mayores de 48 meses de edad.
- Con infecciones NO bacterianas.
- Con infecciones crónicas.
- Con más de 72 hr de internamiento.

- Tratamiento antibiótico establecido.
- Negación para ingresar al estudio.
- Con diagnóstico de neutropenia ú otro padecimiento que cursara con alteraciones en la función de PMNs.

d) Criterios de Exclusión:

- Pacientes a los que se les diagnosticó otro padecimiento de base que se manifestó con alteración de la función de PMNs como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y Enfermedad Granulomatosa Crónica.

B. Obtención de neutrófilos PMNs.

Los neutrófilos PMNs fueron separados de sangre venosa periférica de los niños eutróficos y desnutridos así como de adultos. Se extrajeron 4 ml de sangre en jeringas desechables y estériles, utilizándose como anticoagulante 10 U de heparina (Heparth-1000, 20th Century Chemical de México, S.A. de C.V.) por cada mililitro de sangre.

a) Procedimiento:

La separación se realizó siguiendo la metodología de Boyum modificada, que permite la separación de PMNs de mononucleares mediante un gradiente de densidad y centrifugación; y de los eritrocitos mediante lisis hipotónica (114). Brevemente, la sangre heparinizada se colocó en tubos de poliestireno (Polystyrene tubes, 25305, Corning Glass Works, N.Y.) y se diluyó volúmen a volúmen con solución salina al 0.85%, pH 7.2. En la base del tubo, en una proporción 1:6 se colocó ficoll-hypaque de una densidad de 1.077 y la

sangre heparinizada, quedando ésta superpuesta a la capa de ficoll. Después de centrifugar a 1500 rpm durante 25 minutos, se eliminó el sobrenadante, incluyendo la interfase de mononucleares formada. Se resuspendió el sedimento en 4 ml de solución de cloruro de amonio al 0.85% pH 7.2 durante 10 min, para eliminar eritrocitos. Luego de lavar con solución salina al 0.85%, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y se resuspendió el botón de PMNs en 1 ml de solución salina balanceada de fosfatos (PBS) pH 7.2. Todo el procedimiento de separación se realizó a 4°C.

b) Recuento de PMNs:

Se preparó una suspensión de células y colorante de Turk en proporción 1:1 volúmen a volúmen y se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer, utilizando microscopía de luz. Se obtuvo el número de células por cuadrante y se realizó el cálculo del total de células / ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células} = \text{No. de células/cuadrante} \times \text{Dilución} \times 10^4$$

c) Viabilidad y Pureza:

Se preparó una suspensión de células y colorante de azul tripano volúmen a volúmen. La viabilidad de los PMNs se corroboró por la exclusión del colorante supravital por las células vivas, ya que solamente se tiñen las células muertas. De esta forma se obtuvo el porcentaje de viabilidad, y se requirió de más del 95% para los ensayos subsecuentes. Además se tiñeron frotis con colorante de Wright, los cuales se analizaron para controlar la pureza de la población celular, igualmente se requirió de una pureza mayor del

95%. En etapa posterior de los ensayos, la pureza de la población celular también fué controlada durante el análisis por citometría de flujo donde se eligió la población de acuerdo a tamaño y granularidad de las células y se estableció una ventana (gate) para elegir únicamente dicha población.

C. Inmunofluorescencia Indirecta.

En suspensiones celulares de adultos se realizaron los ensayos para la obtención de la concentración óptima del anticuerpo monoclonal para cada receptor eligiéndose la concentración de 3.75 mcg de proteína/ml (Gráfica 1). En cada grupo de estudio, por duplicado, suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200mcl de HBSS, se incubaron a 4°C, durante 30 min a una concentración final de 3.75 mcg/ml con los anticuerpos monoclonales murinos IgG1 Anti-CR1 (CD35), IgG2a Anti-CR3 (Leu-15;CD11b) e IgM Anti-Leu-11b (CD16) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA). Después de efectuar 3 lavados con PBS y centrifugar a 1200 rpm durante 10 min, se resuspendieron las células en 200 mcl de HBSS y se incubaron a 4°C con una concentración final de 4 mcl/ 10^6 PMNs del segundo anticuerpo (Goat anti-mouse IgG) conjugado con fluoresceína (Becton Dickinson, Mountain View CA) durante 30 min. Después de efectuar 3 lavados con PBS y centrifugar a 1200 rpm durante 10 min, se resuspendieron las células en 500 mcl de formaldehído al 3% en PBS adicionado con 0.01% de azida de sodio, o paraformaldehído al 1% para su análisis por citometría de flujo, manteniéndose durante todo el procedimiento a 4°C.

Anticuerpos monoclonales isotipo específico se utilizaron para el control de la unión inespecífica. Proteína purificada de mieloma de ratón IgG1 (K) MPOC 21 y Proteína purificada de mieloma de ratón IgM (L1) MPOC 104E (Azko-Organón Teknika).

Ensayos con estímulos inflamatorios. Se utilizaron f-MLP y GM-CSF como estímulos para evaluar la respuesta celular. El f-MLP (Sigma Chemical Co. St Louis MO) fué preparado en una solución concentrada de 1×10^{-3} M en DMSO que se mantuvo a -30°C . Para los ensayos de estimulación se diluyó en PBS adicionado con Ca^{++} y Mg^{++} y se utilizó a una concentración final de 10^{-7} M. El GM-CSF fué donado por el Dr. Larry Guilbert de la Universidad de Alberta, Canadá y se mantuvo a -70°C . Para los ensayos de estimulación se utilizó una concentración final de 100 U/ml. Suspensiones de 2.5×10^5 PMN/200 μl de HBSS se incubaron con f-MLP ó GM-CSF a las concentraciones señaladas, durante 1 h a 37°C en el caso de f-MLP y durante 2 hr cuando se estimularon con GM-CSF. Después de efectuar 3 lavados con PBS y centrifugar a 1200 rpm durante 10 min, las células se enfriaron rápidamente a 4°C y se procedió al marcaje mediante inmunofluorescencia indirecta para el posterior análisis por citometría de flujo.

D. Analisis de Receptores por Citometría de Flujo.

Las suspensiones celulares en formaldehído fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson Immunosystems, Mountain View CA) provisto con rayo laser de ión de argón y operando en una longitud de onda de 488 nm. Fué calibrado con microesferas fluorescentes de 7.8 μm de diámetro (Becton Dickinson Immunosystem, Mountain View CA), y después de cada calibración se mantuvieron los

parámetros: SSC 333, FSC 116, FL1 520, FL2 527 y AMP 2. De acuerdo a tamaño y granularidad se seleccionó la población de granulocitos (dot plot) y establecida la ventana (gate) se procedió al análisis. Se obtuvieron mediciones de 5000 eventos que se procesaron en la computadora y se expresaron en escala logarítmica obteniéndose el promedio de intensidad de fluorescencia. Adicionalmente se obtuvieron histogramas de las muestras analizadas.

E. Evaluación de otras funciones de los fagocitos relacionadas con los receptores de opsoninas.

1. Capacidad Bactericida de los PMNs. Se utilizó el método de Edwards y cols. modificado (115) y validado en la Institución (52). Brevemente, es un micrométodo que consiste en incubar, en microplacas de titulación, PMNs y bacterias previamente opsonizadas, después de lo cual se produce lisis de los neutrófilos y la suspensión resultante se siembra en placas de agar soya tripticaseína (TSA) para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) al inicio y término de la incubación y obtener el índice de muerte bacteriana.

Preparación de la bacteria: Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* y se incubó en caldo soya tripticaseína durante 18 hrs a 37°C (bacteria en fase logarítmica de crecimiento). Se obtuvo la concentración bacteriana/ml mediante correlación con la Escala de Mc Farland de densidad bacteriana por ml con densidades ópticas medidas en un espectrofotómetro Beckman modelo 26, utilizando una longitud de onda de 540 nm. Las bacterias se ajustaron a una concentración de 10^8 /ml para la opsonización. 100 µl de la suspensión de bacterias

se incubaron con suero AB al 10% en HBSS 30 min antes del ensayo y se obtuvo una concentración bacteriana final de 10^6 /ml.

Procedimiento: En microplacas de titulación y por triplicado, se colocaron 80 mcl de una suspensión celular ajustada a 5×10^5 PMNs/ml de HBSS y 80 mcl de la suspensión de bacterias opsonizadas, manteniendo una relación PMN/bacteria de 10:1, así como suspensiones celulares sin la bacteria. Se incubaron durante 120 min en agitación continua a 37° C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Antes de la incubación y al término de la misma, se tomó una alícuota de cada pozo de 10 mcl de la mezcla y se diluyó en dos ocasiones en agua destilada para la lisis de los PMNs. De la última dilución se tomaron 100 mcl y fueron sembrados en placas de TSA al 4% con asa de vidrio. Las placas se incubaron durante 18 hr a 37°C después de lo cual se procedió al conteo de UFC y se obtuvo el índice de muerte bacteriana (capacidad bactericida) mediante la fórmula:

$$CB = 1 - \text{UFC muestra con bacteria} / \text{UFC muestra sin bacteria} \times 100$$

para los tiempos 0 y 120 min. Los resultados se expresaron como porcentaje muerte bacteriana.

Se realizaron algunos ensayos para evaluar la capacidad bactericida de los PMNs posterior a estímulos. Se utilizó GM-CSF a la concentración de 100 U/ml que se incubó con los PMNs durante 2 hr a 37°C, previo a la determinación de la capacidad bactericida.

2. Mecanismos microbicidas oxidativos.

. **Quimioluminiscencia.** Se midió la respuesta de quimioluminiscencia de los PMNs de acuerdo con lo descrito por Easmon (116) estableciendo algunas modificaciones, en un luminómetro LKB - Wallac 1250. Se utilizó como amplificador de la respuesta, el substrato luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona, A8511, Sigma Chemical Co. ST Louis Mo). Como partícula a fagocitar y estímulo se utilizó Zymosan (levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Chemical Co, USA) que fué preparado y opsonizado mediante el procedimiento siguiente: el Zymosan fué suspendido usando agitación en vortex a una concentración de 10 mg/ml en SS al 0.85%, y hervido durante 1 hr, después de 2 lavados con SS, fué resuspendido en HBSS a una concentración final de 10mg/ml ($20-30 \times 10^8$ levaduras /ml) y mantenido en alícuotas de 1 ml a -10°C hasta su uso. Para la opsonización, una alícuota de 1 ml se diluyó en 20 ml de SS al 0.85% y colocó a baño maría durante 30 min a 37°C . Después de enfriar a temperatura ambiente, se lavó y centrifugó en dos ocasiones a 5000 rpm durante 10 min y se resuspendió en un volúmen final de 1 ml de HBSS y suero AB al 20% que fué incubado durante 30 min a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y agitación. Después de un lavado se reconstituyó para obtener una concentración de 1.25 mg/ml para los ensayos necesarios.

Procedimiento: Se realizaron por duplicado, ensayos de las condiciones basales y posterior a estímulos inflamatorios (GM-CSF). En tubos de poliestireno, 2×10^5 PMNs, fueron incubados en 250 mcl de HBSS/Albúmina/HEPES con y sin factor estimulante de colonias de granulocitos (100 mcl de GM-CSF) durante 2 hr a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. Posterior a la incubación se procedió a la lectura del

primer ciclo de los 20 programados (basal). 100 mcl de la solución de luminol se agregaron a cada tubo, manteniendo una concentración final de 10^{-3} M y 100 mcl de Zymosan opsonizado a los que requerían de dicho estímulo. Se completó con HBSS un volumen final de 700 mcl/muestra después de lo cual se prosiguió con la lectura de los ciclos programados, ajustando el intervalo entre las muestras de acuerdo al número de las mismas. Se eligió el valor del pico máximo de quimioluminiscencia y los resultados se expresaron en mV.

. Reducción del colorante Nitroazúl de Tetrazolio (NBT).

La medición de esta función se realizó de acuerdo a lo descrito por Rook con algunas modificaciones (117). Es un micrométodo que consiste en determinar la cantidad de NBT que es reducida por los PMNs mediante la solubilización del colorante con dimetil sulfóxido (DMSO) y utilizando el lector de ELISA para elaborar una curva de titulación y obtener la cantidad de colorante reducido.

NBT grado III, cristalino (2,2'-Di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-[3,3'-dimetoxi-4,4'-difenilen] cloruro de ditetrazolium, Sigma Chemical Co, USA) se disolvió por calentamiento a 37°C en PBS libre de fenol a una concentración de 1 mg/ml y se filtró antes de su uso. Forbol-miristato-acetato (PMA, Sigma Chemical Co, USA) se utilizó como estímulo desencadenante del estallido respiratorio de los PMNs. De una solución concentrada de 50 mcg/ml en etanol, mantenida a -20°C, se tomaron alícuotas para los ensayos y llevarla a una concentración final de 125 ng/ml. KOH al 2M y DMSO se utilizaron para la solubilización del NBT. Un lector de ELISA con filtro a 570 nm se utilizó para las lecturas de DO y se elaboró la

curva de titulación con cantidades conocidas de NBT reducido que se correlacionaron con las densidades ópticas.

Procedimiento: En microplacas de titulación se colocaron 10^5 PMN/25 mcl de HBSS por pozo, posterior a lo cual se agregaron 100 mcl de la solución preparada de NBT. Se agregaron 100 mcl del estímulo soluble (PMA) y se incubaron a 37°C durante 30 min. El sobrenadante de cada pozo que contenía el colorante, se retiró y se agregó metanol, realizando el mismo procedimiento en 3 ocasiones. Como el cambio de coloración refleja el total de NBT mas que el reducido, los pozos se secaron con aire. El colorante fué solubilizado agregando 120 mcl de KOH al 2M y 140 mcl de DMSO en cada pozo, mezclandose el contenido con micropipetas para completar la solubilización. Se procedió a la lectura de las densidades ópticas en el lector de ELISA y el resultado en mcg de NBT reducido se obtuvo utilizando la curva de titulación.

VII. ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados se expresaron de acuerdo a la función estudiada considerando :

Ho. Los neutrofilos PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda expresan adecuadamente los receptores de superficie CR1, CR3 y Fc gamma RIII en condiciones de reposo y ante estímulos inflamatorios al compararse con los de niños eutróficos.

a) Receptores CR1, CR3 y Fc RIII.

Se expresaron como promedio de intensidad de fluorescencia. Las poblaciones estudiadas mostraron distribución libre por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas para su análisis (118).

Al contrastar la expresión de cada uno de los receptores en condiciones basales (4°C y sin estímulo) en los grupos de estudio, se utilizó el análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis para establecer diferencias generales y la prueba U de Mann-Whitney para las diferencias entre grupos.

En el análisis del efecto de temperatura, f-MLP y GM-CSF sobre la expresión de cada uno de los receptores en los diferentes grupos estudiados, se utilizaron el análisis de varianza de dos clasificaciones por rangos de Friedman para diferencias generales y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon para diferencias intra grupo.

b) Capacidad bactericida.

Los resultados se expresaron como porcentaje de muerte intracelular. Igualmente la distribución de los valores estudiados fue libre por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (118). Las diferencias generales entre los grupos de estudio se analizaron mediante análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis y las diferencias entre grupos mediante la prueba U de Mann-Whitney. En el análisis de las condiciones basales y postestímulo se utilizó la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon.

c) Quimioluminiscencia.

Los resultados se analizaron utilizando el promedio de los duplicados del pico máximo de quimioluminiscencia expresado en mV, y el promedio

de las muestras de los grupos estudiados. La distribución de estos datos no fue normal por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas en su análisis (118). Al contrastar las diferencias generales entre los grupos independientes se utilizó el análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis, y para las diferencias entre dos grupos la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias pre y postestímulo se trataron de establecer utilizando la prueba de pares igualados y rangos señalados de Wilcoxon.

d) Reducción de Nitroazúl de Tetrazolio.

Los resultados se expresaron en mcg de colorante reducido, a partir de la curva de titulación obtenida de la correlación entre D.O. y mcg de colorante, análisis que se realizó utilizando el Coeficiente de Correlación de Rango de Spearman (rs). Se analizaron los resultados con pruebas no paramétricas (118); análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis para diferencias generales entre los grupos y U de Mann-Whitney para las diferencias entre dos grupos. La contrastación de pre y postestímulo se estableció mediante la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon.

VIII. RESULTADOS.

A) Características clínicas de los pacientes estudiados.

Se estudiaron 12 adultos voluntarios sanos para los valores de referencia y estandarización de los métodos. De los 40 pacientes considerados para el estudio, se excluyeron un total de 5. Los diagnósticos de ingreso en 4 de ellos fueron Desnutrición de III grado y septicemia por microorganismos gram negativos, posteriormente se corroboró Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida en 1 y en los 3

restantes hasta el momento de terminado el estudio se consideraron con sospecha de HIV. Al quinto paciente excluido se le hizo diagnóstico de Enfermedad Granulomatosa Cronica. Los 35 sujetos que constituyeron el estudio quedaron distribuidos en los siguientes grupos: "Sanos" o eutróficos sin infección bacteriana aguda (n = 10), Eutróficos infectados (n = 10), Desnutridos sin infección bacteriana aguda (n = 5) y Desnutridos infectados (n = 10). Las características clínicas de estos sujetos se muestran en la tabla 3 y laboratoriales en la tabla 4.

B) Concentración óptima de anti-CR1, anti-CR3 y anti -Leu 11b.

De los ensayos realizados en PMNs de adultos con diferentes concentraciones del anticuerpo específico a cada receptor, se obtuvo la concentración óptima para lograr la saturación de los mismos . Se expresó el promedio de fluorescencia relativa \pm E.E.M. Al no encontrar diferencia estadísticamente significativa en la fluorescencia a partir de la concentración de 2.5 a 5.0 mcg/ml de anticuerpo (p >0.05), se eligió la concentración de 3.75 mcg/ml (Gráfica 1). El promedio de intensidad de fluorescencia para el receptor CR1 en los PMNs de adultos fué de 251.59 ± 12.17 , para CR3 de 1855.68 ± 13.01 y para Fc RIII de 1412.07 ± 80.34 .

C) Efecto de la temperatura en la expresión de los receptores para opsoninas en los PMNs.

Considerando los mecanismos que modulan la expresión de los receptores CR1, CR3 y Fc RIII, se estudió el efecto de la temperatura sobre la expresión de estos. Bajo iguales condiciones de separación

de PMNs obtenidos de los sujetos considerados "sanos", el cambio de temperatura de 4°C a 37°C durante 30 minutos, no produjo efecto alguno en la expresión del receptor CR1 (40.88 ± 4.29 vs 44.35 ± 5.6 $p > 0.05$) ni en la de Fc RIII (323.65 ± 59.38 vs 394.49 ± 53.38 $p > 0.05$). Contrariamente se observó un incremento significativo en la expresión de los receptores CR3 ante este cambio, 158.58 ± 15.82 vs 234.67 ± 33.97 $p < 0.05$.

D) Expresión de los receptores CR1, CR3 y Fc RIII en PMNs de niños No Infeccionados.

Al evaluar la expresión de estos receptores en los grupos de Eutróficos y Desnutridos sin infección en iguales condiciones de procesamiento de las muestras, 4°C y sin estímulos, no observamos diferencias en ninguno de los receptores al comparar ambos grupos, $p > 0.05$ (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión de receptores CR1, CR3 y Fc RIII en PMNs de niños NO Infeccionados (4°C y sin estímulos)*

	CR1	CR3	Fc RIII
Eutróficos	40.88 ± 4.29	$158.8 \pm 15.82^{\wedge}$	323.65 ± 59.38
Desnutridos	45.28 ± 10.32	$117.11 \pm 17.56^{\wedge}$	300.97 ± 26.29

*Los resultados representan promedio de intensidad de fluorescencia de $N = 10 \pm$ EEM.

$\wedge p = 0.06$

E) Expresión de receptores CR1, CR3 y Fc RIII en PMNs de niños Infectados.

Con el propósito de evaluar el efecto que produce la infección bacteriana aguda sobre la expresión de los receptores de opsoninas se analizaron en condiciones basales (4°C y sin estímulos) a los grupos de Eutróficos y Desnutridos con infección bacteriana aguda, no encontrando diferencias en la expresión de CR1 y CR3 al comparar ambos grupos: 50.13 ± 6.96 vs 38.05 ± 4.20 $p > 0.05$ y 170.15 ± 17.08 vs 145.41 ± 9.2 $p > 0.05$, respectivamente (Figura 5a). Con respecto al receptor Fc RIII si observamos diferencia en su expresión al comparar ambos grupos 398.63 ± 49.77 vs 519.83 ± 41.78 $p < 0.05$ (Gráfica 2, Figura 5b). El cambio de temperatura de 4°C a 37°C en la expresión de los receptores CR3 y Fc RIII en los PMNs de niños eutróficos y desnutridos infectados, produjo incremento en la expresión de CR3 y disminución en la de Fc RIII respectivamente (Figuras 6a y b).

F) Efecto de f-MLP y GM-CSF sobre la expresión de los receptores para opsoninas en PMNs.

Para determinar si la célula es capaz de responder ante el estrés producido por la infección "in vitro", se utilizaron como estímulos inflamatorios f-MLP y GM-CSF. Dado que el procedimiento de incubación se llevo a cabo a 37°C, se consideraron los valores obtenidos a esta temperatura como parametros de referencia para establecer las comparaciones. Al analizar los receptores CR1 encontramos que a 37°C los PMNs de niños Eutróficos Infectados muestran una mayor expresión de estos receptores al compararse con

los grupos de Eutróficos sin infección y los Desnutridos infectados 79.43 ± 11.84 vs 44.35 ± 5.6 y 47.13 ± 4.24 $p < 0.01$ respectivamente (Gráfica 3). Aunque se observó esta misma tendencia en la expresión de CR3 en el grupo de Eutróficos Infectados (315.21 ± 37.12) al compararse con los Eutróficos sin infección (234.67 ± 33.9) y Desnutridos Infectados (307.02 ± 41.88), la diferencia encontrada no fué comprobada estadísticamente ($p > 0.05$).

La expresión del receptor Fc RIII fue significativamente mayor en los PMNs de niños Eutróficos Infectados (519.70 ± 52.43) al compararse con los grupos Eutróficos sin infección (394.49 ± 53.38 $p < 0.05$), Desnutridos sin infección (235.54 ± 94.88 $p < 0.01$) y Desnutridos Infectados (356.73 ± 39.61 $p < 0.05$). Gráfica 4.

Posterior al estímulo con f-MLP, los PMNs mostraron un incremento en la expresión de CR1 en los grupos de niños Eutróficos sin infección de 44.35 ± 5.65 a 78.00 ± 5.8 $p < 0.05$, y en Eutróficos Infectados de 79.43 ± 11.84 a 144.05 ± 19.61 $p < 0.05$, no habiendo cambios comprobables estadísticamente en el grupo de Desnutridos Infectados cuyos valores variaron de 47.13 ± 4.24 a 54.9 ± 6.57 $p > 0.05$ (Gráfica 5). En la expresión del receptor CR3 solo se encontró diferencia en el grupo de Desnutridos Infectados donde el estímulo con f-MLP produjo una disminución de la expresión del receptor en estudio (Tabla 6, Figura 7a).

Tabla 6. Efecto de f-MLP sobre la expresión del receptor CR3 en PMNs de Eutróficos y Desnutridos.*

	37°C	f-MLP
Eutróficos sin Infección ^	234.67 ± 33.9	344.88 ± 79.55
Eutróficos Infectados ^^	315.21 ± 37.12	306.12 ± 50.19
Desnutridos Infectados ^^^	307.02 ± 41.88	205.55 ± 18.09

*Los resultados representan promedio de intensidad de fluorescencia ± E. E. M.

^ n = 7 p = 0.11

^^ n = 10 p = 0.43

^^^ n = 10 p = 0.05

Al analizar el efecto de f-MLP sobre el receptor Fc RIII, no se observó diferencia en su expresión, en los PMNs del grupo de niños Eutróficos sin Infección (394.49 ± 53.38 vs 420.71 ± 71.03 $p > 0.05$, datos no graficados). Aparentemente hubo una disminución posterior al estímulo en los PMNs de los niños Desnutridos Infectados de 356.73 ± 39.61 a 289.96 ± 26.44 , no comprobada estadísticamente ($p > 0.05$), y en el grupo de Eutróficos Infectados, una disminución significativa de la expresión del receptor en estudio de 519.70 ± 52.43 a 324.44 ± 48.44 $p < 0.02$ (Gráfica 7).

El efecto del GM-CSF se probó únicamente en los grupos de Eutróficos y Desnutridos Infectados y para los receptores CR3 y Fc RIII. Al respecto, el GM-CSF produjo una disminución en la expresión de CR3 (Figura 7a) en los PMNs de niños Desnutridos Infectados con respecto al ensayo a 37°C de 307.0 ± 41.88 a 55.05 ± 5.14 ($p < 0.005$), igualmente se observó esta disminución al compararlo con el efecto producido por f-MLP de 205.55 ± 18.09 vs 55.05 ± 5.14 ($p < 0.01$). En el grupo de Eutróficos Infectados también ocurrió disminución en la

expresión del receptor CR3 posterior al estímulo con GM-CSF de 315.21 ± 37.12 a 252.49 ± 33.29 ($p = 0.05$) sin observarse otra diferencia comprobable estadísticamente (Gráfica 6).

El efecto producido por el GM-CSF sobre la expresión del receptor Fc RIII (Figura 7b), fue similar al producido sobre CR3, se observó una disminución significativa en el grupo de niños Desnutridos Infeccionados respecto al ensayo a 37°C de 356.73 ± 39.61 a 209.16 ± 23.69 ($p < 0.02$) y aparentemente un incremento en el grupo de niños Eutróficos Infeccionados de 519.70 ± 52.43 a 589.73 ± 29.94 ($p > 0.05$), efecto contrario al producido por el estímulo con f-MLP (Gráfica 7).

G) Capacidad Bactericida en PMNs de Eutróficos y Desnutridos Infeccionados.

Al analizar esta función en los PMNs no estimulados, se observó diferencia en el porcentaje de muerte intracelular entre los grupos estudiados ($p = 0.049$), siendo menor en el grupo de niños Desnutridos Infeccionados (49.6 ± 5.6) cuando se comparó con los niños Eutróficos sin infección (70.2 ± 7.22 $p = 0.048$) y los Eutróficos Infeccionados (82.6 ± 6.9 $p = 0.016$). Gráfica 8.

Posterior al estímulo con GM-CSF, se observó un incremento en los valores de muerte intracelular en los PMNs de los grupos de Eutróficos sin infección de 70.2 ± 7.22 a 80.4 ± 3.02 y Desnutridos infectados de 49.6 ± 5.6 a 53.4 ± 8.2 , así como una disminución en el porcentaje de muerte intracelular en los PMNs de Eutróficos Infeccionados de 82.6 ± 6.9 a 61.71 ± 10.53 , no siendo corroborados estadísticamente tales cambios. Cabe señalar que los PMNs de los

niños con desnutrición, mostraron los porcentajes de muerte intracelular mas bajos de los grupos estudiados tanto en condiciones basales como posterior al estímulo ($p = 0.028$) Gráfica 8.

H) Quimioluminiscencia y receptores para opsoninas en PMNs de Eutróficos y Desnutridos Infectados.

En el análisis de la función de quimioluminiscencia, se observó una diferencia en los valores basales entre los grupos de estudio, los PMNs de los niños Eutróficos Infectados mostraron mayor quimioluminiscencia 386.14 ± 52.12 mV al compararse con los Eutróficos sin infección 203.62 ± 14.22 mV ($p = 0.01$) y los Desnutridos Infectados 255.11 ± 29.58 mV ($p = 0.03$). Al efectuar la comparación de cada uno de los grupos antes y después del estímulo con GM-CSF, no se observaron diferencias que pudieran comprobarse estadísticamente (Gráfica 9).

I) Reducción de Nitroazul de tetrazolio en PMNs de Eutróficos y Desnutridos Infectados.

En el análisis de estos resultados no se encontraron diferencias entre los grupos estudiados, ni efecto alguno del estímulo, comprobable estadísticamente (Tabla 7).

Tabla 7. Reducción del Nitrozúl de tetrazolio en PMNs y efecto de PMA.*

	37°C	PMA
Eutróficos sin Infección	1.93 ± 0.24	3.23 ± 0.56
Eutróficos Infectados	2.72 ± 0.39	3.41 ± 0.43
Desnutridos Infectados	2.53 ± 0.34	3.98 ± 0.44

Los resultados representan el promedio de N=4, expresado en mcg de colorante reducido ± E.E.M. p > 0.05.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IX. DISCUSION

La respuesta inmune en pacientes con desnutrición e infección bacteriana aguda, y en particular la función de células fagocíticas, se ve sujeta al efecto de citocinas y factores proinflamatorios activando o inhibiendo muchos de los procesos celulares (18,119). Los neutrófilos "utilizan" receptores de superficie para captar señales y responder a los cambios producidos en el microambiente por inflamación, infección u otras condiciones. De interés particular por su participación como moduladores de las funciones de adherencia, quimiotaxis y capacidad bactericida entre otras, son los receptores para las principales opsoninas: IgG (Fc RIII), C3 (CR1) y C3bi (CR3).

En este estudio hemos demostrado que los PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda no expresan en forma adecuada los receptores de opsoninas y la capacidad de estas células para incrementar la expresión de los receptores ante estímulos

específicos es deficiente. Los hallazgos que apoyan este hecho fueron: 1) la mayor expresión de Fc RIII observada en los PMNs de niños desnutridos infectados al compararse con los PMNs de niños desnutridos sin infección en condiciones basales (Gráfica 2), 2) Una menor expresión del receptor CR1 en los PMNs del mismo grupo cuando las condiciones de temperatura se modificaron (Gráfica 3), 3) una significativa disminución en la expresión del receptor CR3 en los PMNs de estos pacientes cuando fueron estimulados con f-MLP, observandose el mayor efecto de "subexpresión" (downregulation) al ser estimulados con GM-CSF (Gráfica 6) y 4) disminución significativa en la expresión de Fc RIII cuando los PMNs de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda se estimularon con GM-CSF (Gráfica 7).

En trabajos realizados en pacientes adultos con infección bacteriana aguda, Sims y cols. (120) encontraron un incremento de la fagocitosis en PMNs medida por la ingestión de partículas opsonizadas con inmunoglobulina y las fracciones de complemento C3b. Cuando sólo se opsonizó con la fracción C3b, la fagocitosis no ocurrió y se observó muy poca ingestión de eritrocitos cubiertos por C3bi en los PMNs de los pacientes de estudio. Los receptores de superficie Fc RIII, CR1 y CR3 no presentaron alteración en su expresión con respecto a los PMNs de los controles y concluyen que el incremento de la función fagocítica no parece estar determinado por diferencias en el número de los receptores opsónicos (120). Estudios sobre la expresión de receptores CR1, CR3 y Fc RIII en PMNs de recién nacidos realizados por Smith y cols. (107) y bajo condiciones de estimulación con quimioattractantes, han mostrado una menor expresión de CR3 y CR1 así como de Fc RIII siendo más acentuada en PMNs de recién nacidos

pretérmino. Dado que las condiciones de inmunidad y las funciones de las células fagocíticas son muy similares entre los neonatos y el paciente desnutrido, los mecanismos que explican las anomalías encontradas en los PMNs de recién nacidos pudieran ser aplicables al paciente con desnutrición. Hemos realizado estudios donde demostramos que la adherencia de los PMNs en pacientes pediátricos desnutridos infectados se encuentra incrementada, función que tiene estrecha relación con la expresión de receptores CR3 y moléculas de adhesión (15). Así mismo en estudios previos donde evaluamos la capacidad del PMN de reconocer partículas opsonizadas, lo cual, de manera indirecta nos traduce la capacidad de la célula para expresar los receptores opsónicos, hemos encontrado que el niño con desnutrición y mas aún con desnutrición e infección bacteriana aguda, expresa receptores de opsoninas en menor proporción (3).

La mayor expresión del receptor Fc RIII encontrada en los PMNs de niños con desnutrición e infección (células en estado de "reposo", procesadas a 4 C), sugiere que los PMNs de estos sujetos (los cuales han estado sometidos a diferentes estímulos inflamatorios in vivo), han sido previamente activados. Estos datos concuerdan con los resultados encontrados por Guyre y cols. (121) quienes encontraron que pacientes con infección estreptocócica, presentan incremento en el número de receptores Fc RI al parecer por un posible efecto activador in vivo de citocinas como Interferón gamma que se liberan durante procesos infecciosos.

Cuando las células se estimularon con f-MLP, se encontró el incremento esperado en la expresión del receptor CR1 en los PMNs de

niños eutróficos infectados y no infectados; sin embargo, la respuesta fué nula en los PMNs de niños con desnutrición e infección. El efecto del f-MLP sobre la expresión del receptor CR3 fué de una disminución, unicamente observada en los PMNs de niños con desnutrición e infección, hecho que pudiera ser consecuencia de una incapacidad del neutrófilo para sobreexpresar los receptores presentes en los depósitos intracelulares, o probablemente por alteración en algún paso de su síntesis. Considerando la relación de este receptor con la función de adherencia, podemos suponer que la falta de respuesta ante estímulos específicos de los PMNs de niños desnutridos infectados para incrementar el porcentaje de adherencia (15), pudieran estar determinados por una inadecuada expresión de los receptores CR3. Igualmente, los valores más bajos en el porcentaje de muerte bacteriana observados en los PMNs de niños con desnutrición e infección del presente estudio, es probable que estén asociados a la insuficiente expresión de dichos receptores.

Un efecto similar de disminución en la expresión de receptores se observó al analizar el efecto de f-MLP sobre la expresión del receptor Fc RIII en los PMNs de niños eutróficos infectados y la misma tendencia en los PMNs de desnutridos infectados sin ser esta significativa, lo que sugiere que la condición de infección parece ser determinante en esta diferencia. El receptor Fc RIII, se une a membrana a través de glicosil-fosfatidil-inositol, además de que funciona en conjunto con el receptor para formil-péptidos y el sistema de proteínas G como una sola unidad en la transmisión de señales generadas por ligandos que se unen a este receptor (84). En base a lo anterior, la regulación de la expresión del receptor Fc

RIII se ve determinada por la internalización del mismo así como por factores que promueven su liberación de la membrana plasmática como fosfolipasa ya que su anclaje es sensible a esta enzima. Por otro lado, es posible que el receptor Fc RIII se vea afectado por hormonas o citocinas que previamente hayan favorecido su liberación al espacio extracelular y de esta forma el receptor se detecta en menor proporción en la superficie de la célula, sobre todo, si al igual que para otro tipo de receptores, existe la posibilidad de que Fc RIII no sea totalmente expresado por alteraciones en su síntesis y reciclaje. El mayor cambio observado en la expresión de los receptores CR3 y Fc RIII fué el producido por el estímulo con GM-CSF que resultó en una disminución significativa y mucho más marcada en los PMNs de niños desnutridos infectados y en una tendencia al incremento del receptor Fc RIII en los PMNs del niño eutrófico.

Las alteraciones de la función de los PMNs bajo condiciones de desnutrición e infección aún no se han esclarecido. Es conocido que los niños desnutridos cursan con una mayor frecuencia de infecciones bacterianas predominantemente por organismos gram negativos, cuyos componentes de membrana externa son capaces de activar diversos sistemas celulares y producir liberación de factores humorales, específicamente citocinas. De gran importancia es el estado o funcionalidad de la célula fagocítica para reconocer partículas opsonizadas a través de sus receptores de membrana CR1, CR3 y Fc RIII, cuya expresión encontramos alterada. La mayor expresión del receptor Fc RIII que se observó en condiciones basales o de reposo, sugiere la activación in vivo del PMN por diversas citocinas u hormonas incrementadas en estados de desnutrición y con efectos

conocidos sobre la modulación de este receptor y funciones relacionadas (79,82,119).

El efecto de f-MLp y GM-CSF en la expresión de receptores de opsoninas es promover la síntesis de los receptores CR1 y CR3 bajo condiciones normales. Sin embargo en los PMNs del paciente desnutrido, los estímulos mencionados tuvieron un efecto de disminución en la expresión de estos receptores.

Existen pocos estudios sobre la expresión de receptores de opsoninas en PMNs de pacientes desnutridos infectados y la información que más se asemeja por las condiciones de inmunidad de estos pacientes, proviene de estudios en PMNs de recién nacidos. Algunos trabajos han reportado que los PMNs del recién nacido tienen una incapacidad relativa en la expresión de receptores (107), sin embargo también se ha reportado (106) que solo se ve afectada la expresión de CR3, postulandose una alteración a nivel celular, atribuible a una mayor rigidez y falta de fluidez en la membrana de los PMNs en este tipo de pacientes.

En estudios preliminares, hemos analizado el efecto de Pentoxifilina, un modulador de membrana, sobre la expresión de los receptores de opsoninas en PMNs de niños desnutridos con infección bacteriana (datos no publicados) y este defecto en la expresión llega a corregirse cuando los PMNs son tratados previo al estímulo (f-MLP) con el fármaco modulador de membrana, por lo que suponemos, que al igual que en los PMNs del recién nacido, el defecto en los PMNs del paciente desnutrido sea secundario a alteraciones de la membrana celular o del citoesqueleto. En un estudio acerca del efecto de fosfatidil colina y ácido linoléico en la respuesta fagocítica de

los PMNs y en la generación de araquidonato en adultos normales, se observó que estos suplementos pueden modificar la composición del principal ácido graso en los PMNs e incrementar la fagocitosis y muerte de microorganismos en un sistema ex vivo por efecto de fosfatidil colina (119). Se sugiere en este estudio que el mecanismo de acción de fosfatidil colina pudiera estar relacionado con cambios en la composición de lípidos de membrana del PMN que promueven la liberación de eicosanoides vasoactivos y biorreguladores de las respuestas inmunes. Considerando lo anterior, podemos suponer que alteraciones en la composición de lípidos en membrana por condiciones de la propia desnutrición así como el efecto de sustancias reguladoras presentes en estados de inflamación, pueden determinar en parte la inadecuada movilización y expresión de algunas proteínas en membrana, en este caso de receptores, sin embargo son necesarios estudios a este respecto.

Con los hallazgos de este y otros estudios, especulamos que en el desnutrido infectado en el cual ocurren frecuentes infecciones, se mantiene un estado de activación inmunológica prácticamente "constante" por la influencia de citocinas pro-inflamatorias como TNF-alfa, IF-gamma, IL-1 entre otras, que a su vez activan o inhiben diversas funciones fagocíticas propiciando la "permanente" interacción ligando-receptor con la consiguiente secuencia de eventos que ocurren para la eliminación de microorganismos. Sin embargo, la falta de respuesta a estímulos inflamatorios (f-MLP) y citocinas (GM-CSF) para incrementar la expresión de los receptores CR1 y CR3 en los PMNs del sujeto desnutrido infectado, aunado a la corrección parcial de este defecto cuando se utilizó un fármaco modulador de membrana,

sugiere fuertemente una profunda alteración en la capacidad de sobreexpresión o translocación de estos receptores. Con respecto al receptor Fc RIII, su menor expresión encontrada en los PMNs de niños desnutridos infectados posterior a los estímulos utilizados, no se puede explicar únicamente por una alteración a nivel de membrana ya que su modulación depende de la internalización y liberación de la membrana celular (74). Se requeriría cuantificar la concentración del receptor libre en plasma y sobrenadante de células activadas para inferir otros mecanismos que expliquen la imposibilidad del PMN para sobreexpresar este receptor.

Es probable que in vivo exista liberación del receptor Fc RIII y tanto la disminución en la producción, transporte y el incremento en su liberación puedan combinarse para reducir su expresión en los PMNs de los sujetos desnutridos.

Las consecuencias de la menor expresión de los receptores CR1, CR3 y Fc RIII en los PMNs de niños desnutridos infectados aún se desconocen, sin embargo los receptores de superficie celular son esenciales para que el PMN responda a los mediadores de inflamación y reconozca, fagocite y destruya bacterias patógenas. La deficiente capacidad bactericida que observamos en los PMNs de niños con desnutrición e infección, además de la nula respuesta ante los estímulos f-MLP y GM-CSF para mejorar el estallido respiratorio y la propia capacidad bactericida en los PMNs de estos pacientes, pueden ser el resultado de la insuficiente expresión de los receptores de opsoninas.

El desconocimiento de los mecanismos responsables de las anomalías en las funciones de las células fagocíticas de los

niños con desnutrición e infección es limitante para el manejo adecuado de estos defectos. Además, la eficacia de tratamientos como inmunoglobulina intravenosa en la prevención y manejo de las infecciones bacterianas (123,124), cuya potencial efectividad reside en su capacidad de opsonizar bacterias y servir como ligando al receptor Fc en el PMN, se vería afectada, dado que la expresión de este receptor se encuentra disminuída. Por otro lado la menor expresión del receptor y el posible incremento de receptor libre circulante, estimularían otros sistemas celulares causando un efecto contraproducente y condicionaría la formación de complejos inmunes.

La identificación de los defectos específicos en las defensas del huésped con desnutrición, conducirán al mejor entendimiento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas que muestran estos sujetos, así como a encontrar nuevas formas terapéuticas para la corrección de estos defectos, aplicable no solo al desnutrido sino a otro tipo de pacientes con alteraciones similares.

Definitivamente desde el punto de vista nutricional, la corrección de la pérdida de nutrientes secundario al deficiente aporte o mayor consumo dado por la condición subyacente, mejorará la respuesta inmune del huésped a la infección.

X. REFERENCIAS

1. Santos J.I. Nutrition infection and immunocompetence. *Infect. Dis. Clin. of Noth Am.* 1994;8(1):243-267.
2. Sorensen R.U. Leiva L. E. and Kuvidila S. Malnutrition and immune response. En *Textbook of Pediatric Nutrition*. Suskin R.M. & Lewinter L.S. eds. 2da. Ed. New York, Raven Press, 1993:141.
3. Soria R., Arbo S., Santos J.I., Basurto C., Capacidad de reconocimiento opsónico de los neutrófilos polimorfonucleares de niños con desnutrición. *Bol. Med. Hosp. Infant. de Mex.*, 1990;76:607-611.
4. Flores A.A., Gómez C.C., Suárez C.J. Desnutrición en áreas rurales marginadas de la República Mexicana: epidemiología y programa de control. *Salud Pública Mex.*, 1987; 29: 293-298.
5. Sepúlveda J.A., Lezana M., Tapia R.C., Valdespino J., Madrigal H y Kumate J. Estado nutricional de preescolares y mujeres en México: Resultados de una encuesta probabilística nacional. *Gac. Med. Mex.* 1990;126:207-224.
6. Alpuche C., Santos J.I. Nutrición - Inmunidad - Infección. En *Manual de Infectología*. Kumate J., Gutierrez G., Munoz O., Santos J.I. 1990 : 40-48.
7. Chandra R.K. y Newberne P.M. *Nutrition, Immunity and Infection. Mechanisms of Interaction*. New York. Plenum, 1977:1-9.
8. Santos J.I. Nutritional implications and physiologic response to pediatric diarrhea. *Pediat. Infecto. Dis.*, 1986; 5:S 152-154.
9. Stiehm R. Humoral immunity in malnutrition. *Fed. Proc.*, 1980; 39:3093-3097.

10. Chandra R.K. Cell-mediated immunity in nutritional imbalance. Fed. Proc., 1980; 19: 3088-3092.
11. Powel G.M. Response to live attenuated measles vaccine in children with severe kwashiorkor. Ann. Trop. Paediatr., 1982; 2: 143-145.
12. Sirisinha S., Suskind R., Edelman R., Charupatana C., Olson R.E. Complemento and C3-proactivator levels in children with protein-calorie malnutrition and effect of dietary treatment. Lancet, 1973; II: 1016-1021.
13. Malech H.L., Gallin J.I. Current Concepts: Immunology. Neutrophils in human diseases. The New Engl. J. of Med., 1987; 317:687-694.
14. Anderson D.C., Krishna G.S., Hughes B.J., Mace M.L. Impaired polymorphonuclear leukocyte motility in malnourished infants: relationship to functional abnormalities of cell adherence. J. Lab. Clin. Med., 1983; 101: 881-895.
15. Monroy V. Evaluación de la función de adherencia de leucocitos polimorfonucleares. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores., Cuautitlán, Izcalli, México. 1988.
16. Chandra R.K., Chandra S., Ghai O.P. Chemotaxis, random mobility, and mobilization of polymorphonuclear leucocytes in malnutrition. J. Clin. Path., 1976; 29: 224-227.
17. Schoper K., Douglas S.D. Neutrophil fuction in children with kwashiorkor. J. Lab. Clin. Med., 1976; 88: 450-461.
18. Keusch G.T. Seminars in infectious disease. Voll II. Cap.9 Nutrition as a determinant of host response to infection and the

metabolic sequelae of infectious diseases. En L. Weinstein & B.N. Fields. New York. Medical Book Corp., 1979: 265-303.

19. Baehner R.L., Boxer L.A. Inborn errors of immunity. Cap. 14. Morphological and biochemical alterations of polymorphonuclear neutrophil (PMN) leukocytes from patients with inborn errors of phagocytic function: a comprehensive review. En F. Guttler, W.T. Seakins. Baltimore, USA: University Park Press., 1979: 201-246.

20. Seth V., Chandra R.K. Opsonic activity, phagocytosis and intracellular bactericidal capacity of polymorphs in undernutrition. Arch. Dis. Child., 1972; 47:282.

21. Rotrosen D., Gallin J.I. Disorders of phagocyte function. Ann Rev. Immunol., 1987; 5: 127-150.

22. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. Blood 1986; 67: 257-267.

23. Walker R.I., Willemze R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. Rev. Infect. Dis. 1981; 3: 505-598.

24. Pulus L.M., Bromeyer H.E., Kurland S.I. et al. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. J. Exp. Med., 1979; 150: 257-267.

25. Lichtman M.A., Weed R.I. Alterations of the cell periphery during granulocyte maturation: relationship to the cell function. Blood 1972; 39: 301-316.

26. Glasser L., Fiederlein R.L. Functional differentiation of normal human neutrophils. Blood, 1987; 69: 937-944.

27. Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., et al. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1427-35.
28. O'Shea J.J., Brown E.J., Seligmann B.E., Metcalf J.A., Frank M.M., Gallin J.I. Evidence of distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J. Immunol.* 1985; 134:2580-7.
29. Fletcher M.P., Gallin J.I. Human neutrophils contain an intracellular pool of putative receptors for the chemoattractant N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Bood* 1983; 62:792-9.
30. Dewald B., Bretz V., Baggiolini M. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1982; 70:518-25.
31. Petrequin P.R., Todd F.R.III, Devall L.J., Boxer L.A., Curnutte J. T. III. Association between gelatinase release and increased plasma membrane expression of the Mo1 glycoprotein. *Blood* 1987; 69:605-10.
32. Stossel T.P. *The Mechanical Responses of White Blood Cells. En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* Ed. Gallin J.I., Goldstein and Snyderman R. Raven Press. Ltd New York. 1988:325-342.
33. Malech H.L. *Phagocytic Cells: Egress from Marrow and Diapedesis. En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* Ed. Gallin J.I., Goldstein I.M, Snyderman R. Raven Press, Ltd, New York 1988; 298-308.

34. Athens J.W., Hoob O.P., Roob S.O. et al. Leukokinetics studies IV. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J. Clin. Invest.*, 1961; 40: 989-995.
35. Dallman P.R., in *Pediatrics*, 16th Ed. AM Rudolph, ed. New York: Appleton-Century-Crofts, Inc. 1977.
36. Athens J.W., Hoob O.P., Roob S.O., et al: Leukokinetics studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J. Clin. Invest.* 1961; 40: 159-164.
37. Stoosel T.P., *The Phagocyte System: Structure and Function. Functions of phagocytes. En Hematology of Infancy and Childhood.* D.G. Nathan y F.A. Oski eds. 3a. Edición. Saunders Co. Philadelphia USA. 1987:779-793.
38. Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunology Today.* 1992;13:93-99.
39. Bevilacqua M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 1993;11:767-804.
40. De Fougerolles A.R., Stacker S.A., Schwarting R. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 1991;174:253-267.
41. Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69:11-25.
42. Bevilacqua M.P., Nelson R.M. Selectins. *J. Clin. Invest.* 1993;91:379-387.
43. Sako D., Chang X-J., Barone K.M. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993;3:680-682.

44. Springer T.A., Thompson W.S., Miller L.J, et al: Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p 150.95 glycoprotein family and its molecular basis. J. Exp. Med. 1984; 160:1901.

45. Shaw S: Characterization of human leukocyte differentiation antigens. Immunol. Today. 1987; 8:1.

46. Todd III R.F., Freyer D.R. The CD11/CD18 Leukocyte Glycoprotein Deficiency. Phagocytic Defects I: Abnormalities Outside of the Respiratory Burst. Hematology/Oncology Clinics of North America. 1988;2:13-31.

47. Lehrer R.I., Ganz T., Selsted M.E., Babior B., Curnutte J.T. Neutrophils and Host Defense. UCLA Conference. Ann. of Int. Med. 1988; 109:127-42.

48. Allen R.A., Traynor A.E. Ommann G.M. and Jesaitis A.J. The Chemotactic Peptide Receptor. Phagocytic Defects I: Abnormalities Outside of the Respiratory Burst. Hematology / Oncology Clinics of North America. 1988; 2(1):33-59.

49. Root R.K., Ryan J.L.: Humoral immunity and complement. En Principles and Practice of infectious diseases. G.L. Mandell, G.R. Douglas & J.E. Bennett eds. New York: Wiley Medical, 1985:31-57.

50. Nicholson-Weller A., March J.P. et al: Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. Proc. Natl. Acas. Sci. USA. 1983; 80:5066.

51. Joiner K.A., Brown E.J., Frank M.M.: Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. Ann. Rev. Immunol. 1984; 2:461-491.

52. Arbo S.A.H., Santos J.I.: Efecto de la Clindamicina sobre la función de los Neutrófilos Polimorfonucleares. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina. U.N.A.M. 1988.
53. Seligmann, B.E., and Gallin, J.I.: Comparison of indirect probes of membrane potential utilized in studies of human neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 1983; 115:105.
54. Pozzan, T., Lew, P.D., et al: Is cytosolic ionized calcium regulatin neutrophil activation? *Science* 1983; 221:1413.
55. Adelstein, R.S.: Regulation of contractile proteins by phosphorylation. *J. Clin. Invest.* 1983; 72:1863.
56. Niedel, J.E., Kuhn, L.J., et al.: Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983;80:36.
57. Southwick, F. S. and Stossel, T.P.: Contractile proteins in leukocyte function. *Sem. Hematol.* 1983;20:305.
58. Pearse, B.M.F. and Bretscher, M.S.: Membrane recycling by coated vesicles. *Ann.Rev. Biochem.* 1981;50:85.
59. Steinman, R.M., Mellman, I.S.: Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell.Biol.* 1983;96:1.
60. Fallon J., Gallin J.I.: Neutrophil granules in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1986;77:653-662.
61. Root R.K., Cohen M.S.: The microbial mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev.of Inf. Dis.* 1981;3:565-597.
62. Klebanoff S.J.: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Sem. Hematol.* 1975,12:117-142.
63. Elsbach P.: Degradation of microorganisms by phagocytic cells. *Rev.Infect. Dis.* 1980;2:106-128.

64. Elsbach P. and Weiss J. Phagocytic Cells; Oxigen-Independent Antimicrobial Systems. En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Ed. Gallin J.I., Goldstein and Snyderman R. Raven Press. Ltd. New York 1988: 445-470.
65. Bagby, G.C., Jr. Mc Call, E., Bergstrom, K.A. and Burger D. A monokine regulates colony-stimulating activity production by vascular endothelial cells. Blood 1983; 62:663-668.
66. Peppin, G.J. and Weiss, S. J. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase by triggered human neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986;83:4322.
67. Klebanoff S.J. Phagocytic Cells: Products of Oxygen Metabolism. En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Ed. Gallin J.I., Goldstein and Snyderman R. Raven Press. Ltd. New York. 1988:391-444.
68. Gabig T.G., English D: The arachidonate dependent activator of the subcellular neutrophil NADPH oxidase acts independent of phosphorylation. Clin.Res. 1986; 34:657a.
69. Sadler K.L., Badwey J.A. Second Messengers Involved in Superoxide Production by Neutrophils. Function and Metabolism. Phagocytic Defects II: Abnormalities of the Respiratory Burst. Hem/Onc. Clin. of North Am. 1988;2:185-200.
70. Metcalf J.A., Gallin J.I., Nauseef W.M. Root R.K. Functions Related to Microbicidal Activity. En Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press Ltd. New York. 1985:87-142.
71. Steele R.W. Clinical Applications of Chemiluminescence of Granulocytes. Rev. of Infect. Dis. 1991;13:918-925.

72. Unkeless J.C. Wright S.D. Phagocytic Cells: Fc and Complement Receptors. En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Ed. Gallin J.I., Goldstein I.M. and Snyderman R. Raven Press. Ltd. New York. 1988:343-362.
73. Unkeless J.C. Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G. J. Clin. Invest. 1989;83:355.
74. Huizinga T.W.J., Ross D., Von dem Borne A.G.Kr. Neutrophil Fc Receptors: A Two-Way Bridge in the Immune System. Blood 1990;75(6):1211-1214.
75. Scallon B.J., Scigliano E., Freedman V.H., Miedel M.C., Pan Y.C.E., Unkeless J.C., Kochan J.P. A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989;86:5079.
76. Selvaraj P., Rosse W. F., Silber R., Springer T.A. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Nature 1988;333:565-567.
77. Simmons D., Seed B. The Fc receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. Nature 1988;333:568-570.
78. Stroncek D.F., Skubitz K.M., Plachta L.B., Shankar R.A., Clay M.E., Fleit H.B., McCullough J. Alloimmune neonatal neutropenia due to an antibody to the neutrophil Fc receptor III with maternal deficiency of CD16 antigen. Blood 1991;77(7):1572-1580.
79. Petroni K.C., Shen L., Guyre P.M. Modulation of human polymorfonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. J. Immunol. 1988;140:3467.

80. Buckle A.M., Hogg N. The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J. Immunol.* 1989;143:2295.

81. Tax W.J.M., Van de Winkel J.G.J. Human Fc receptor II: a standby receptor activated by proteolysis?. *Immunol. Today.* 1990;11(9):308-310.

82. Moxey-Mims M.M., Simms H.H., Frank M.M., Lin E.Y., Gaither T.A. The effects of IL-1, IL-2 and Tumor Necrosis Factor on polymorphonuclear leukocyte Fc receptor-mediated phagocytosis. IL-2 down-regulates the effect of Tumor Necrosis Factor. *The J. of Immunol.* 1991;147(6):1823-1830.

83. Cairo M.S., VandeVen C., Toy C. Mauss D., Kommareddy S.S., Modanlou H. Lymphokines: enhancement by Granulocyte-Macrophage and Granulocyte Colony-Stimulating Factors of neonatal myeloid kinetics and functional activation of polymorphonuclear leukocytes. *Revs. of Infect. Dis.* 1990;12 (S4):S492-S497.

84. Kew R.R., Grimaldi C.M., Furie M.B., Fleit H.B. Human neutrophil Fc RIIIB and formyl peptide receptors are functionally linked during formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced chemotaxis. *The J. of Immunol.* 1992;149(3):989-997.

85 . Masuda K., Kinoshita Y., Kobayashi Y. Heterogeneity of Fc receptor expression in chemotaxis and adherence of neonatal neutrophils. *Pediatr. Res.* 1989;25(1):6-10.

86. Jack R.M. and Fearon D.T. Altered surface distribution of both C3b receptors and Fc receptors on neutrophils induced by anti-C3b receptor or aggregated IgG. *J. Immunol.* 1984;132:3028-3033.

87. Salmon J.E., Kapur S., Kimberly R.P. Opsonin-independent ligation of Fc receptors. The 3G8-bearing receptors on neutrophils mediate the phagocytosis of concanavalin A-treated erythrocytes and nonopsonized Escherichia coli. J. Exp. Med. 1987;166:1798.
88. Kimberly R.P., Tappe N.J., Merriam L.T. Redecha P.B., Edberg J.C., Schwartzman S., Valinsky J.E. Carbohydrates on human Fc-gamma receptors. J. Immunol. 1989;142:3923.
89. Hostetter M.K., Gordon K.L. Biochemistry of C3 and related thiolester proteins in infection and inflammation. Rev. of Infect. Dis. 1987;9(1):97-109.
90. Klickstein L.B., Wong W.W., Smith J.A., Weis H.J., Wilson J.G. and Fearon D.T. Human C3b/C4b receptor (CR1): demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristic of C3/C4 binding proteins. J. Exp. Med. 1987;165:1095-1112.
91. Sánchez-Madrid F., Nagy J.A., Robbins E., Simon P. and Springer T.A. Characterization of a human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha subunits and a common beta subunit: the lymphocyte-function associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac1), and the p150.95 molecule. J. Exp. Med. 1983;158:1785-1803.
92. Fearon D.T., Collins L.A. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. The J. of Immunol. 1983;130(1):370-375.
93. Berger M., O'Shea J., Cross A.S., Folks T.M., Chused R.M. Brown E.J. and Frank M.M. Human neutrophils increase expression of C3bi as

well as C3b receptors upon activation. J. Clin. Invest. 1984;74:1566-1571.

94. Neuman E., Huleatt J. and Jack R.M. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor increases synthesis and expression of CR1 and CR3 by human peripheral blood neutrophils.

95. Wrigth S.D., Silverstein S.C. Receptor C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phogocytes. J. Exp. Med. 1983;158:2016-2023.

96. Johnston R.B., Lehmeier Jr. J.E., Guthrie L.A. Generation of superoxide anion and chemiluminescence by human monocytes during phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G. J. Exp. Med. 1976;143:1551-1556.

97. Rouzer C.A., Scott W.A., Kempe J., John Z.A. Prostaglandin sythesis by macrophages requires a specific receptor-ligand interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980;77:4279-4282.

98. Shappell S.B., Toman C., Anderson D.C., Taylor A.A., Entman M.L. and Smith W. Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. The J. of Immunol. 1990;144(7):2702-2711.

99. Kay A.B., Glass B.J. and Salter D. McG. Leucoattactants enhance complement receptors on human phagocytic cells. Clin. Exp. Immunol. 1979;38:294-299.

100. Colvin R.B. New techniques in cell analysis by flow cytometry. Arch. Pathol. Lab. Med. 1987;111:628.

101. Haynes J.L. Principles of Flow Cytometry. Cytometry Supplement En Alan R. Liss Inc. 1988;3:7-17.

102. Douglas S.D., Shopfer K. Phagocyte function in protein calorie malnutrition. Clin. Exp. Immunol. 1974;17:121.
103. Keusch G.T., Douglas S.D., Hammer G., Ugurbil K. Macrophage function in experimental protein-calorie malnutrition. En Malnutrition and Immune Response, Ed. R.M. Suskind. New York, Raven Press. 1977:277-283.
104. Baehner R.L., Johnston R.B. Jr. Monocyte function in children with neutropenia and chronic infections. Blood 1972;40:31-41.
105. Carr R., Davies J.M. Abnormal Fc RIII expression by neutrophils from very preterm neonates. Blood 1990;76:607-611.
106. Bruce M.C., Baley J.E., Medvik K.A. and Berger M. Impaired surface membrane expression of C3bi but not C3b receptors on neonatal neutrophils. Pediatr. Res. 1987;21(3):306-311.
107. Smith J.B., Campbell D.E., Ludomirsky A., Polin R.A., Douglas S.D., Garty B.Z. and Harris M.C. Expression of the complement receptors CR1 and CR3 and the type III Fc gamma receptor on neutrophils from newborn infants and from fetuses with Rh disease. Pediatr. Res. 1990;28(2):120-126.
108. Brown G.W., Sample size. Am. J. Dis. Child. 1988;142:1213-1215.
109. Baker J.P., Detsky A.S., Wesson D:E., Wolman S.L., Stewart S., Whitewell R.N., Langer B. and Jeejeebhoy K. Nutritional assessment. A comparison of clinical judgment and objective measurements. The New Engl. J. of Med. 1982;302(16):969-972.
110. Flores H.S., Villalpando S., Fajardo G.A. Evaluación antropométrica del estado de nutrición de los niños. Procedimientos, estandarización y significado. Bol. Med. Hosp. Inf. de Mex. 1990;47(10):725-735.

111. Ramos Galván R. Somatometría pediátrica. Arch. Invest. Med. (Mex). 1975;6(1 S):83-396.
112. Gómez F. Desnutrición. Bol. Med. Hosp. Inf. de Mex. 1946;3:543-551.
113. Mc Laren D.S. and Kanawat A.A. The epidemiology of protein-calorie malnutrition in Jordan. Part I. Application of a simple scoring system. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1970;64,754.
114. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968;21(97 S):77-91.
115. Edwards M.S., Baker C.J., Kasper D.L. Opsonic specificity of human antibody to the type III polysaccharide of group B Streptococcus. J. Infect. Dis. 1979;140:1004-1008.
116. Easmon C.S., Cole P.J., Williams A.J. and Hatings M. The measurement of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent chemiluminescence. Immunol. 1980;41:67-74.
117. Rook G.A.W., Steele J., Umar S. and Dockrell H.M. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. J. of Immunol. Methods. 1985;82:161-167.
118. Siegel S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. 1985. Ed. Trillas. México.
119. Klasing K. C. Nutritional aspects of leukocytes cytokines. J. Nutr. 1988;118:1436-1446.

120. Simms H.H., Frank M.M., Quinn T.C., Holland S., Gaither T.A. Studies on phagocytosis in patients with acute bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 1989;83:252-260.
121. Guyre P.M., Campbell A.S., Kniffin W.D., Fanger M.W. Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. *J. Clin. Invest.* 1990;86:1892-1886.
122. Jannace P.W., Robert H., Lerman R.M., Santos J.I. and Vitale J.J. Effects of oral soy phosphatidylcholine on phagocytosis, arachidonate concentrations, and killing by human polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992;56:599.
123. Eibl M.M. Gamma globulin therapy. *Curr. Opinion in Pediatrics.* 1990;2:935-40.
124. Murguía S.T., Santos J.I. Sistema inmune e inmunoterapia en el recién nacido. II. Inmunoterapia. *Bol. Med. Hosp. Inf. de Mex.* 1994;51(4):298-304.

Figura 1. CINETICA DE MADURACION DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES

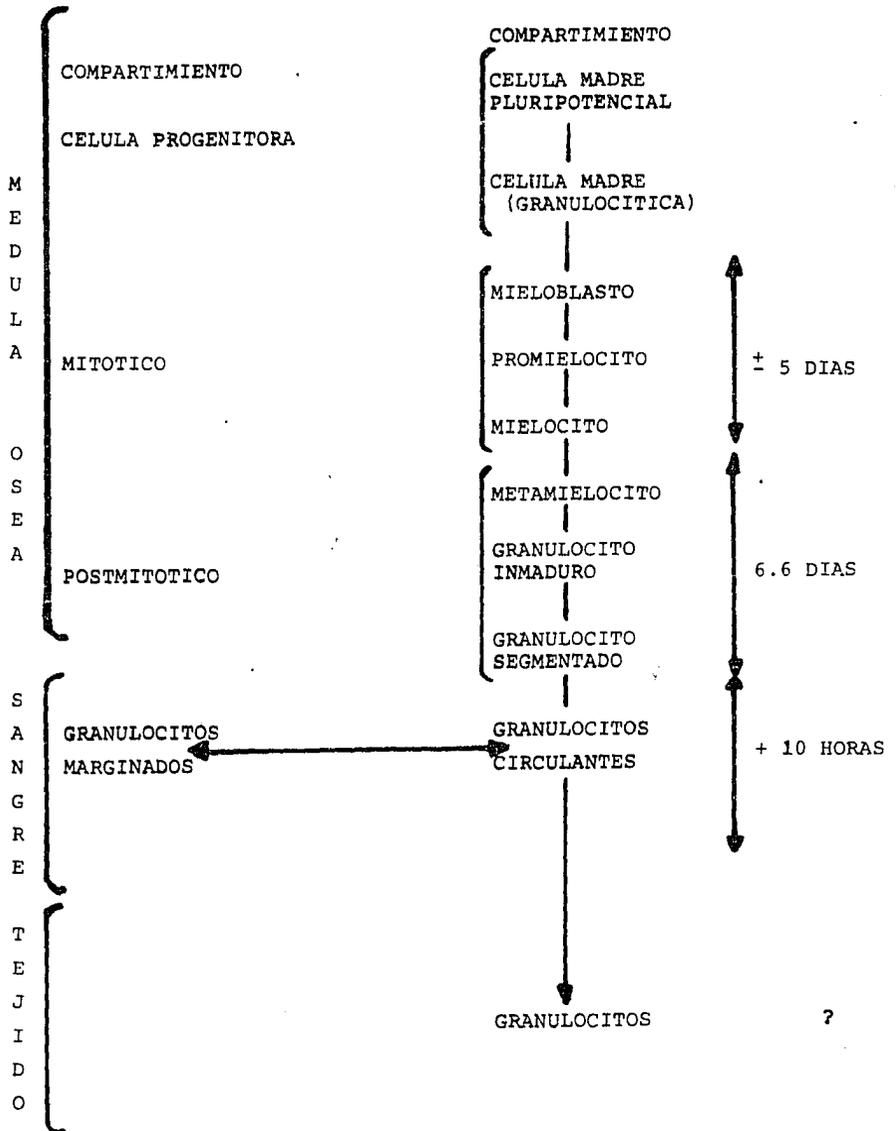
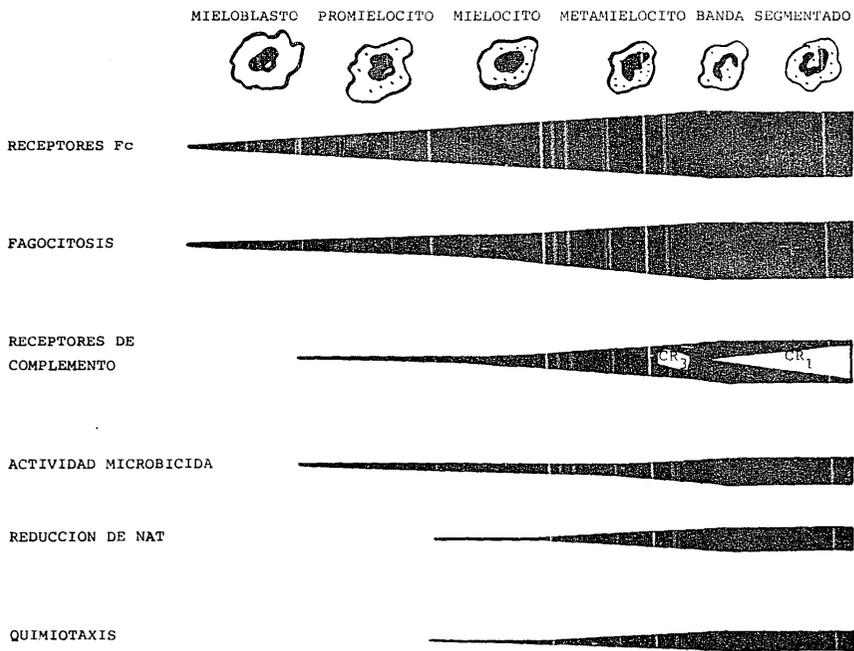


Figura 2. MADURACION FUNCIONAL DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES



Adaptado de Glasser y Fiederlein

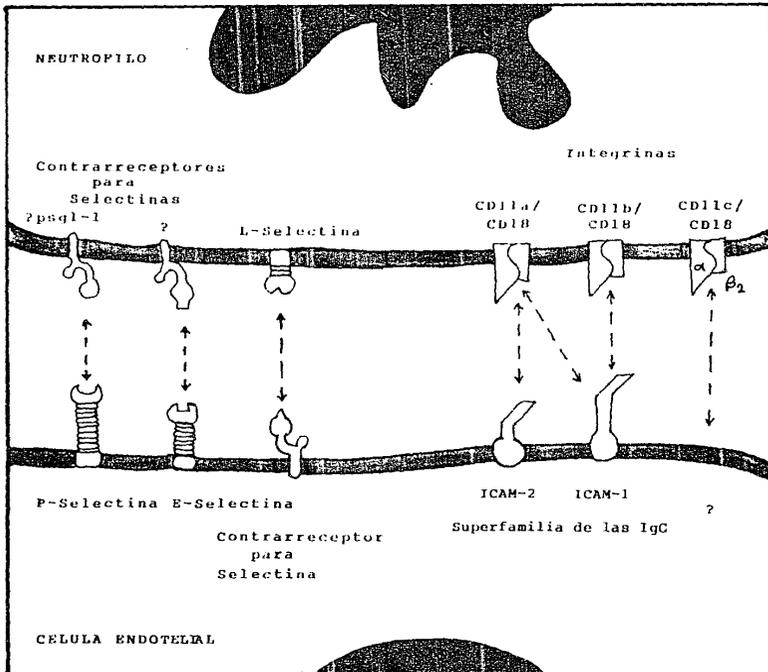


Figura 3. Moléculas de Adhesión implicadas en la respuesta inflamatoria. Las selectinas reconocen glicoproteínas expresadas en la membrana de la célula opuesta. Las integrinas reconocen hasta dos miembros de la superfamilia de las IgG.

Adaptado de Zimmerman 1992.

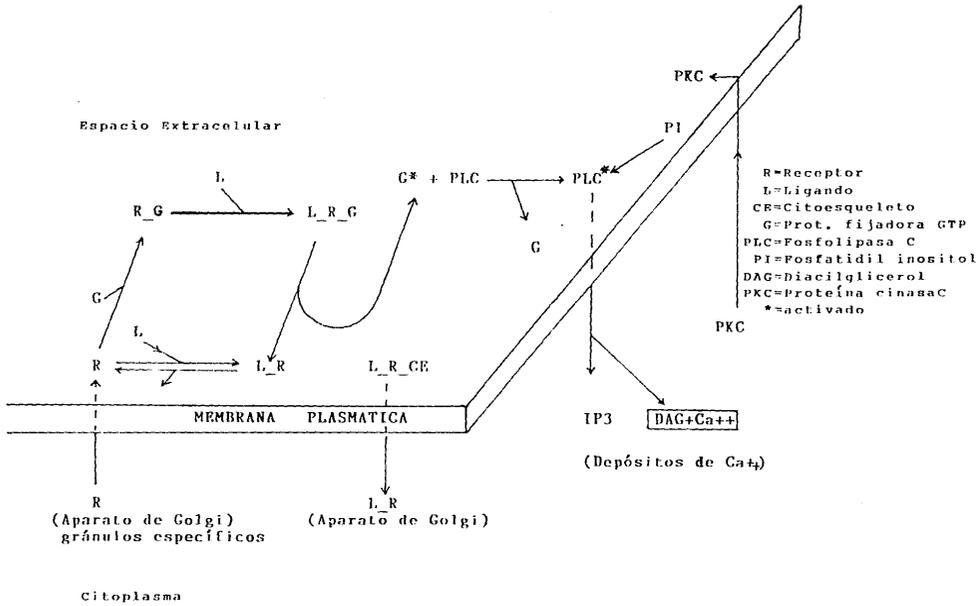


Figura 4. Modelo especulativo de la activación de neutrófilos por quimioattractantes.

TABLA 3. CARACTERISTICAS CLINICAS

	EUTROFICOS		DESNUTRIDOS	
	AUSENTE	INFECCION BACTERIANA AGUDA PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE
NUMERO DE PACIENTES	10	10	5	10
EDAD EN MESES*	15.3 ± 2.8	16.8 ± 4.2	17.2 ± 5.9	8.1 ± 1.8
DESNUTRICION				
I	---	---	1	0
II	---	---	3	3
III	---	---	1	7
DIAGNOSTICOS				
INFECCIONES BACTERIANAS Y AGUDAS				
SEPTICEMIA	---	3	---	5
MEMINGITIS/VENTRICULITIS	---	1	---	3
OTITIS MEDIA/SINUSITIS	---	3	---	1
ADENITIS CERVICAL	---	1	---	0
CELULITIS/ABSCEOS	---	3	---	0
NEUMONIA/DERRAME PLEURAL	---	3	---	2
PERITONITIS	---	1	---	1
INFECCIONES VIAS URINARIAS	---	1	---	3
OTROS				
LESION TRAUMATICA	1	---	0	---
DACRIOESTENOSIS	0	---	1	---
ESTRABISMO	4	---	0	---
LABIO/PALADAR HENDIDOS	3	---	1	---
RECUPERADO DE SEPSIS	0	---	2	---
GINECOMASTIA	1	---	0	---
MARIPOSTOPERADO	0	1	1	---
CRYPTORQUIDEA	1	---	0	---
OTITIS MEDIA AGUDA/CELULITIS (RECUPERADO)	1	---	1	---
DEFUNCIONES	---	2	---	2

*X E.F.M

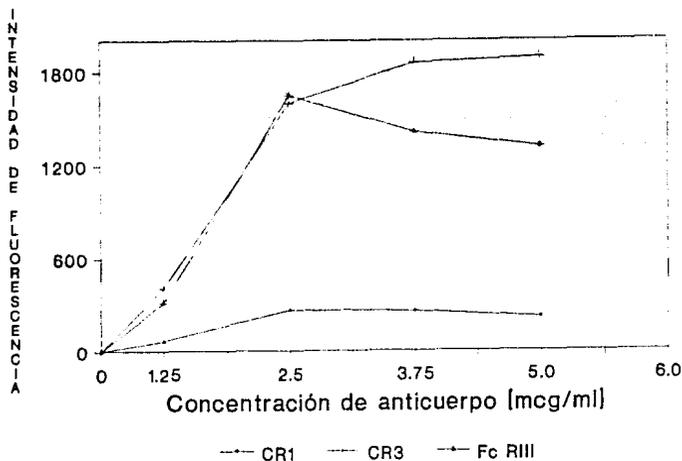
MAR = MALFORMACION ANORRECTAL

TABLA 4. CARACTERISTICAS LABORATORIALES
DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

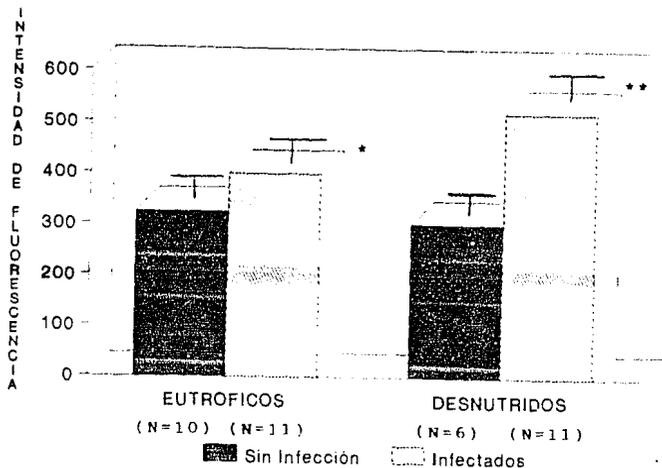
	EUTROFICOS		DESNUTRIDOS	
	AUSENTE	INFECCION BACTERIANA AGUDA PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE
AISLMIENTOS BACTERIANOS (ORIGEN)**				
<i>K pneumoniae</i>	---	0	---	4 (a, c)
<i>E coli</i>	---	1 (d)	---	3 (c)
<i>P vulgaris</i>	---	0	---	2 (c)
<i>P aeruginosa</i>	---	2 (d, h)	---	2 (b, d, f)
<i>Shigella</i>	---	0	---	1 (e)
<i>Salmonella b</i>	---	0	---	1 (e)
<i>H influenzae b</i>	---	2 (b, d)	---	0
<i>S aureus</i>	---	2 (a, b, d, g)	---	1 (b)
BIOMETRIA HEMATICA				
Hematocrito (%/dl)*	36.0 ± 0.6	36.0 ± 1.7	32.0 ± 0.4	31.0 ± 1.8
Hemoglobina (g/dl)*	11.8 ± 0.3	11.8 ± 0.5	10.9 ± 0.7	10.6 ± 0.6
Leucocitos/mm ³	9.89 ± 1.1	15.19 ± 2.6	8.52 ± 1.6	14.04 ± 2.7
Neutrofilos/mm ³	3.76 ± 0.5	8.17 ± 0.5	3.77 ± 0.6	8.28 ± 0.7
Bandas/mm ³	0	0.51 ± 0.1	0	0.71 ± 0.2
Plaquetas, mm ³	normales	normales	normales	96.2 ± 12.0

*X E E M

**ORIGEN A) SANGRE B) L.C.R C) ORINA D) ABSCESO E) MATERIA FECAL F) LIQUIDO DE BRONCOASPIRACION G) LIQUIDO DE OIDO MEDIO
H) TEJIDO PULMONAR (Autopsia)
(× 1000. mm²)

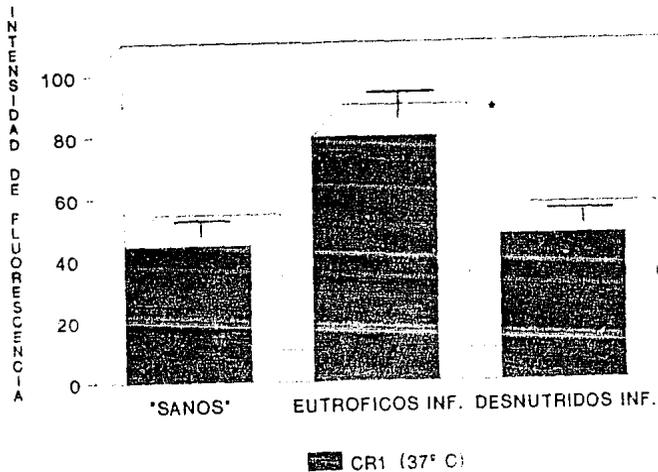


Gráfica 1. Determinación de la concentración óptima del anticuerpo monoclonal específico para obtener la saturación de los receptores CR1, CR3 y Fc RIII expresados en PMNs. Suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200ml HBSS provenientes de adultos sanos, se tiñeron mediante inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células en cada muestra por duplicado. Se muestra el $\bar{X} \pm$ E.E.M. de la intensidad de fluorescencia de 5 experimentos.

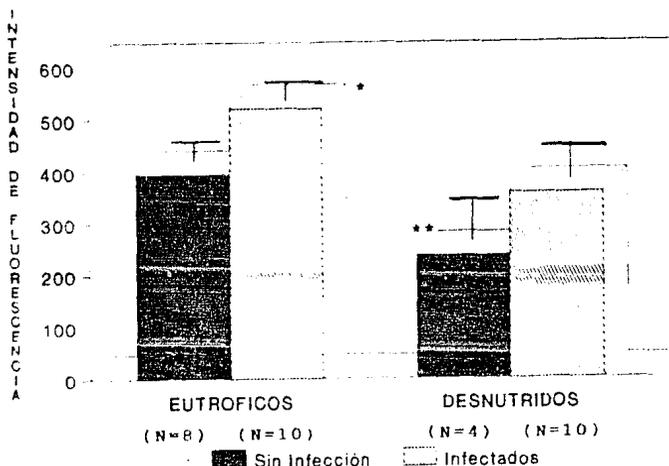


Gráfica 2. Expresión del receptor Fc RIII en PMNs no estimulados.

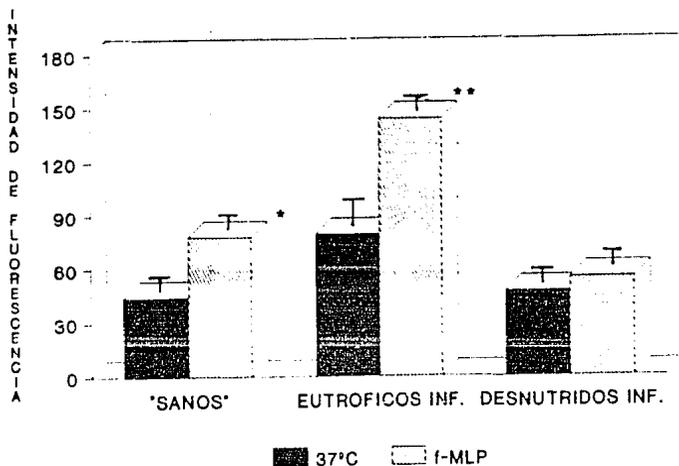
Los procedimientos de separación y tinción mediante inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo se realizaron a 4°C. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células en cada muestra por duplicado. N es el número de sujetos en cada grupo. Se muestra el $\bar{X} \pm$ E.E.M. * $p < 0.05$, Eutróficos infectados vs Desnutridos infectados. ** $p < 0.01$, Desnutridos sin infección vs Desnutridos infectados.



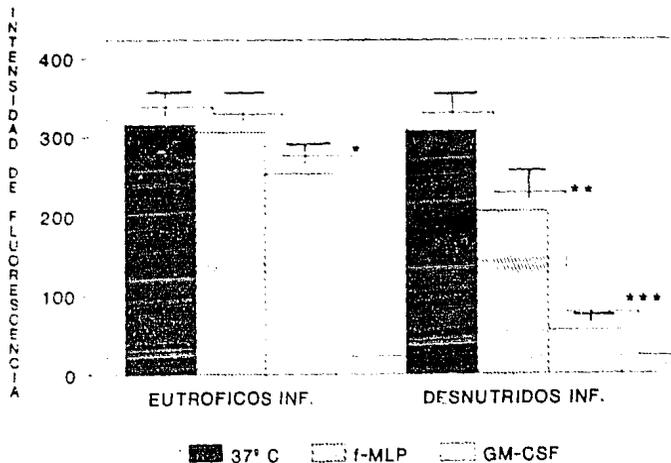
Gráfica 3. Expresión de CR1 a 37°C en PMNs. Suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200 mcl HBSS, se incubaron a 37°C durante 1 h previo al procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células en cada muestra. Se presenta el $\bar{X} \pm E.E.M.$ de 9 experimentos en cada grupo. * $p < 0.01$ Eutróficos infectados vs Eutróficos sin infección y Desnutridos infectados.



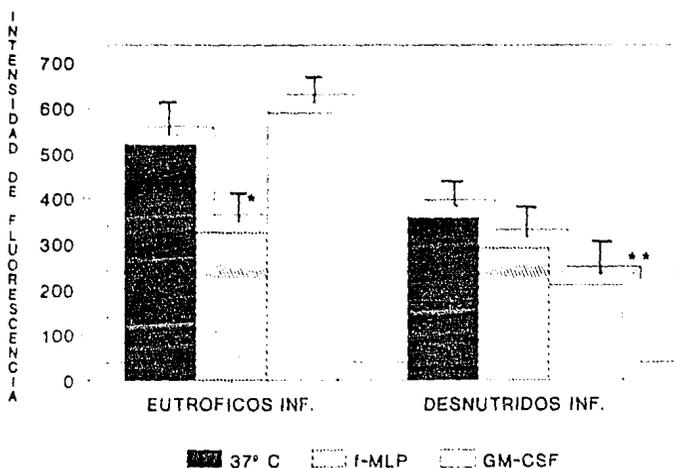
Gráfica 4. Expresión del receptor Fc RIII a 37°C en PMNs. Suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200 mcl HBSS, se incubaron a 37°C durante 1 h previo al procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células en cada muestra. N representa el número de sujetos en cada grupo. Se presenta el $\bar{X} \pm$ E.E.M. de los valores de fluorescencia. * $p < 0.05$ Eutróficos infectados vs Eutróficos sin infección y Desnutridos infectados. ** $p < 0.01$ Desnutridos sin infección vs Eutróficos infectados.



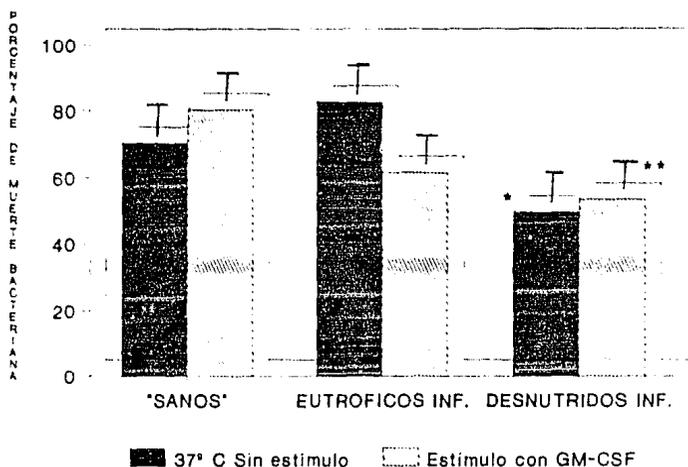
Gráfica 5. Efecto del estímulo f-MLP sobre la expresión del receptor CR1 en PMNs. Suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200 mcl HBSS, se incubaron a 37°C en presencia o ausencia de f-MLP a una concentración de 10^{-7} M, durante 1 h. Se tiñeron mediante inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células. Se muestra el $X \pm$ E.E.M. de 7 experimentos en cada uno de los grupos. * $p < 0.05$, Eutróficos sin infección pre y post-estímulo. ** $p < 0.05$, Eutróficos infectados pre y post-estímulo.



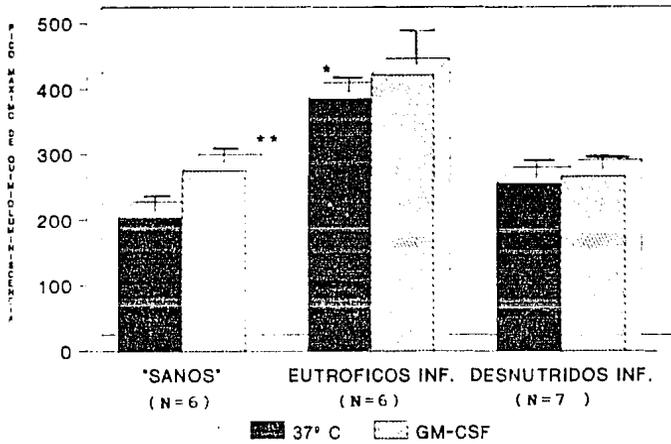
Gráfica 6. Efecto de f-MLP y GM-CSF sobre la expresión del receptor CR3 en PMNs. Suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200 mcl HBSS, se incubaron a 37°C durante 1 y 2 horas en ausencia de estímulos y con los estímulos f-MLP (10^{-7} M) y GM-CSF (100 U/ml). Se tiñeron mediante inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células. Se muestra el $X \pm$ E.E.M. de los valores obtenidos de 10 experimentos en cada grupo. * $p = 0.05$, Eutróficos infectados, ensayo a 37°C vs estímulo GM-CSF. ** $p = 0.02$, Desnutridos infectados, ensayo a 37°C vs estímulo f-MLP; *** $p < 0.005$, ensayo a 37°C vs estímulo GM-CSF.



Gráfica 7. Efecto de f-MLP y GM-CSF sobre la expresión del receptor Fc RIII en PMNs. Suspensiones de 2.5×10^5 PMNs/200 mcl HBSS, se incubaron a 37°C durante 1 y 2 horas en ausencia de estímulos y con estímulos f-MLP (10^{-7} M) y GM-CSF (100 U/ml). Se tiñeron mediante inmunofluorescencia indirecta para el análisis por citometría de flujo. Se determinó la media de fluorescencia de 5000 células en cada muestra. Se presenta el $\bar{X} \pm$ E.E.M. de los valores obtenidos de 10 experimentos en cada grupo. * $p = 0.025$, Eutróficos infectados, ensayo a 37°C vs f-MLP. ** $p = 0.025$, Desnutridos infectados, ensayo a 37°C vs GM-CSF.



Gráfica 8. Efecto de GM-CSF sobre la Capacidad Bactericida de PMNs. 5×10^5 PMNs/100 mcl HBSS, se incubaron a 37°C durante 2 h en presencia o ausencia de GM-CSF. Por triplicado, los PMNs se incubaron con *Staphylococcus aureus* opsonizado, durante 2 hr y se sembraron en el medio de cultivo en placa TSA. Se efectuó el conteo de U.F.C. de los tiempos 0 y 120 min. y se determinó el porcentaje de muerte bacteriana. Se muestra el $\bar{X} \pm$ E.E.M. de los valores obtenidos en los experimentos de 6 sujetos en cada grupo. *¹ $p = 0.048$, Desnutridos infectados vs Eutróficos sin infección; $p = 0.016$, Eutróficos infectados. ** $p = 0.028$, Desnutridos infectados (post-estímulo) vs Eutróficos sin infección y Eutróficos infectados.



(mV)

Gráfica 9. Efecto de GM-CSF sobre el Estallido respiratorio de PMNs.

2×10^5 PMN/200 mcl HBSS/albúmina/HEPES, se incubaron a 37°C durante 2 h en presencia o ausencia de GM-CSF (100 U/ml). En ensayos por duplicado, los PMNs se estimularon con Zimosan opsonizado y se determinó el pico máximo de quimioluminiscencia que se expresó en mV. Se muestra el $\bar{X} \pm$ E.E.M. de los valores obtenidos en cada grupo. * $p < 0.05$, Eutróficos infectados vs Eutróficos sin infección y Desnutridos infectados. ** $p < 0.05$ Eutróficos sin infección pre y post-estímulo con GM-CSF.

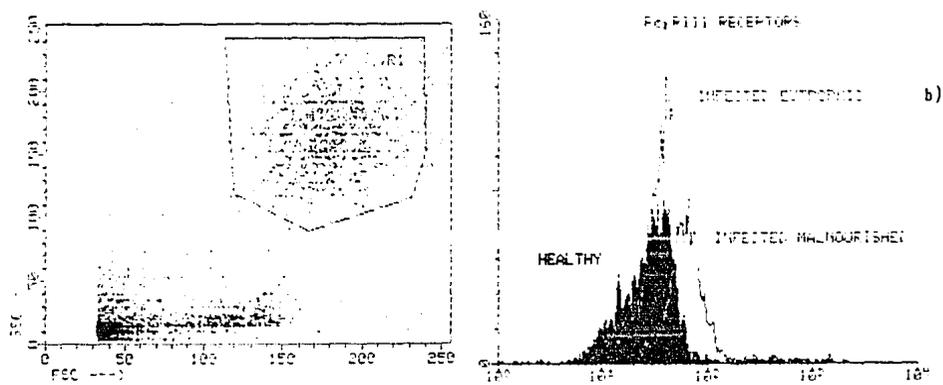
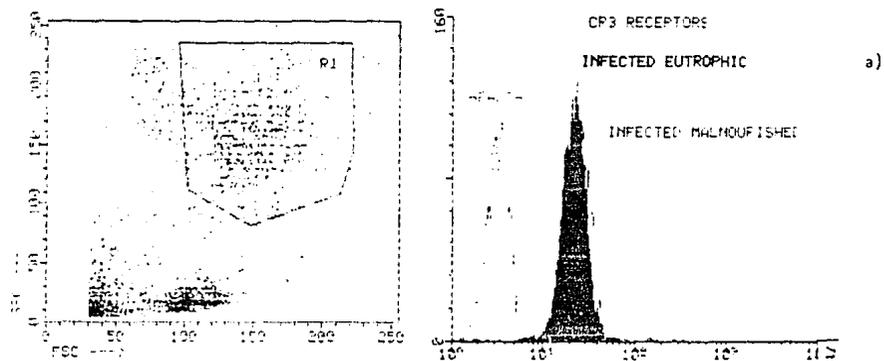


Figura 5a: Histograma representativo de la expresión de CR3 en PMNs de niños sanos, eutróficos infectados y desnutridos infectados.

Figura 5b: Histograma representativo de la expresión del receptor Fc RIII en los grupos anteriores.

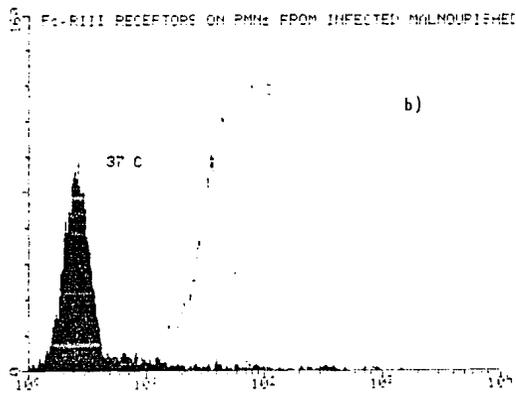
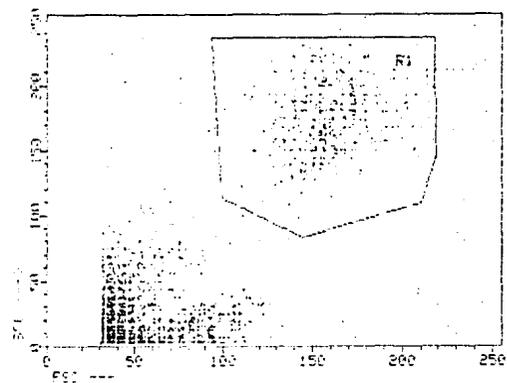
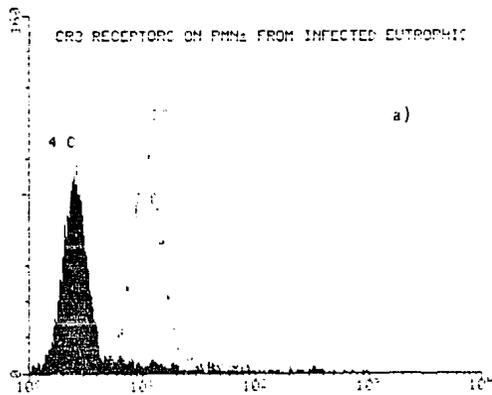
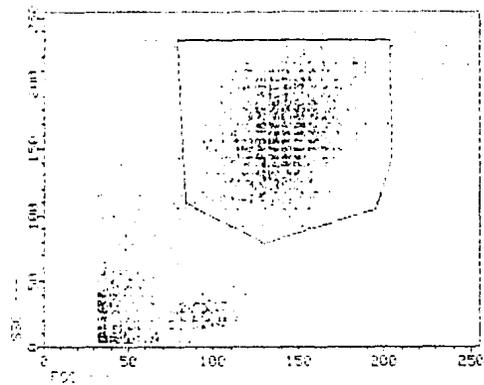
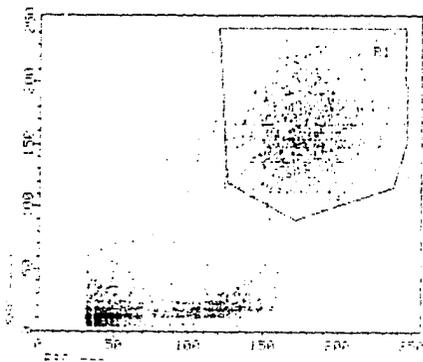
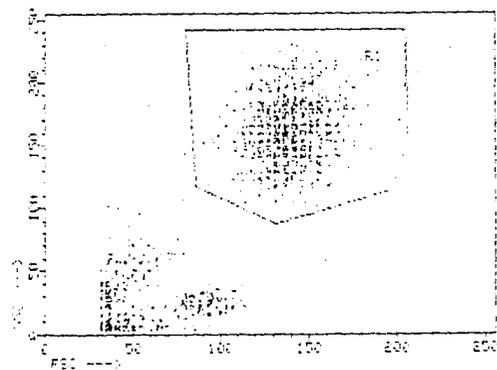
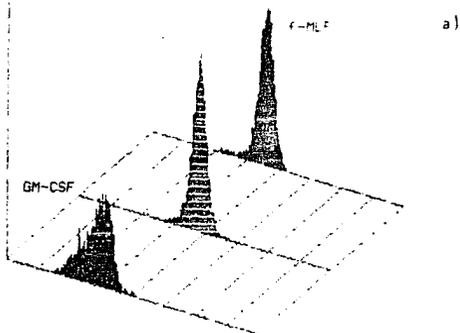


Figura 6a: Distribución de la intensidad de fluorescencia del receptor CR3 en PMNs de niños eutróficos infectados. Condición del ensayo a 37°C comparado con la condición basal.

Figurar 6b: Histograma representativo de la expresión del receptor Fc RIII en PMNs de niños desnutridos infectados en las condiciones anteriores.



CR3 RECEPTORS ON PMNs FROM INFECTED MALNOURISHED



Fc-RIII RECEPTORS ON PMNs FROM INFECTED MALNOURISHED

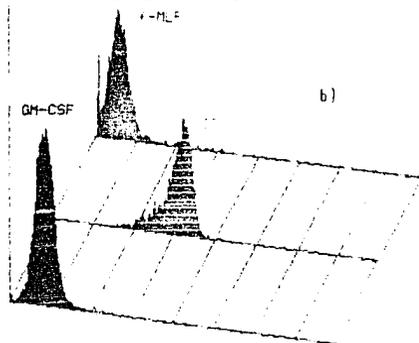


Figura 7a: Distribución de la intensidad de fluorescencia del receptor CR3 en PMNs de niños desnutridos infectados después de la incubación con f-MLP durante 1 h y GM-CSF durante 2h a 37°C.

Figura 7b: Histograma representativo de la expresión del receptor Fc RIII en PMNs de niños desnutridos infectados en las condiciones anteriores.