

11271  
10  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA

"EVALUACION DEL METABOLISMO OXIDATIVO, ACTIVIDAD MICROBICIDA  
Y ESTIMULACION CON M-CSF E IFN- $\gamma$  DE MACROFAGOS DE NIÑOS CON  
DESNUTRICION E INFECCION BACTERIANA AGUDA ".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
I N M U N O L O G I A

P R E S E N T A

LUZ MARIA, ROCHA RAMIREZ

Director de tesis: Dr. Jose Ignacio Santos Preciado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE GENERAL

	PAGINAS
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCION.....	3
III. ANTECEDENTES.....	4
A). EPIDEMIOLOGIA DE LA DESNUTRICION.....	4
B). RESPUESTA INMUNE EN DESNUTRICION.....	5
C). FAGOCITOS EN DESNUTRICION .....	8
D). PARTICIPACION DEL MACROFAGO EN LA RESPUESTA INMUNE	10
1. RECONOCIMIENTO Y FAGOCITOSIS.....	10
2. MECANISMOS MICROBICIDAS.....	13
3. CITOCINAS EN DESNUTRICION .....	18
4. FUNCION DEL MACROFAGO EN DESNUTRICION.....	20
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
V. HIPOTESIS.....	22
VI. OBJETIVOS.....	22
VII. MATERIAL Y METODOS.....	23
a). POBLACION DE ESTUDIO.....	23
a.1). CRITERIOS DE INCLUSION .....	24
a.2). CRITERIOS DE EXCLUSION .....	24
b). OBTENCION DE MONOCITOS.....	25
c). DIFERENCIACION A MACROFAGOS.....	25
d). QUIMIOLUMINISCENCIA .....	26
d.1). EVALUACION CON DIFERENTES ESTIMULOS .....	26
e). DETERMINACIONES DE CONCENTRACIONES OPTIMAS DE CITOCINAS.....	27

f). ACTIVIDAD BACTERICIDA EVALUADA POR REDUCCION DE MTT..	28
VIII.ANALISIS ESTADISTICO .....	30
IX.RESULTADOS .....	31
IX.DISCUSION .....	36
X.CONCLUSIONES .....	44
XI.BIBLIOGRAFIA .....	46
XII.CUADROS, TABLAS Y FIGURAS .....	60

## I. RESUMEN

Las células mononucleares fagocíticas juegan un papel primordial en la defensa del hospedero contra infecciones intracelulares. En la desnutrición la función de estas células incluyendo la síntesis de citocinas se encuentra alterada. En este trabajo se evaluó el efecto in vitro de Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF) e Interferón gamma (IFN- ) sobre el metabolismo oxidativo y la capacidad bactericida de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de 3 grupos de niños; eutróficos no infectados, eutróficos y desnutridos infectados. Los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de cada uno se preincubaron con RPMI-1640, M-CSF ó IFN- por 48 horas y se evaluó el metabolismo oxidativo por un ensayo de quimioluminiscencia en respuesta a la estimulación con el péptido quimiotáctico (FMLP).

La capacidad bactericida se evaluó en células infectadas con *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 WT por el método de reducción del colorante (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ó MTT.

El metabolismo oxidativo basal y con el estímulo FMLP fue menor en los macrófagos de desnutridos infectados ( $P < 0.001$ ). La estimulación in vitro con M-CSF e IFN- incrementó, el metabolismo oxidativo tanto en los macrófagos de eutróficos como en desnutridos, sin embargo resulta significativamente menor en los macrófagos de desnutridos infectados ( $P < 0.001$ ).

No se observaron diferencias en la capacidad bactericida basal entre macrófagos de desnutridos y eutróficos con infección, sin embargo hubo un incremento significativo con respecto a la capacidad microbicida de los eutróficos no infectados ( $P < 0.001$ ). La estimulación con M-CSF produce un efecto inhibitorio en la capacidad bactericida de los macrófagos de eutróficos con infección no así en los desnutridos. En cambio, IFN- incrementa la capacidad bactericida en los macrófagos de eutróficos y desnutridos con infección, sin embargo es significativamente menor el incremento en el macrófago del desnutrido ( $P < 0.001$ ).

Estos resultados demuestran una disminución en el metabolismo oxidativo que no se traduce en alteración sobre la actividad bactericida basal, sin embargo si hay diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en la respuesta de macrófagos de desnutridos infectados a la estimulación con M-CSF e IFN- ya que responden parcialmente a estas citocinas probadas; es decir el macrófago del desnutrido con infección no parece responder de igual forma que el macrófago del eutrófico infectado a la estimulación con estas citocinas. Por lo que podemos sugerir que macrófagos de desnutridos tienen un defecto intrínseco que limita la respuesta del macrófago a la estimulación de M-CSF e IFN- , sobre todo en condiciones de stress como sería la infección sistémica.

## II. INTRODUCCION:

El hospedero inmunocompetente posee mecanismos de respuesta inmunológica tanto específicos como inespecíficos, a través de los cuales se coordinan una diversidad de funciones efectoras contra los microorganismos agresores (1,2,). Sin embargo en el hospedero desnutrido la inmunocompetencia presenta un desequilibrio en los distintos mecanismos de defensa, que propicia que la balanza se incline a favor del microorganismo causante de la infección. Esto hace que la desnutrición sobre todo severa, induzca mayor susceptibilidad y gravedad a las infecciones (3,4).

De las células efectoras, los macrófagos desarrollan un papel muy importante ya que funcionan como orquestador de la respuesta inmune. Los macrófagos además de llevar a cabo funciones fundamentales como es la fagocitosis y la muerte de agentes patógenos mediante sus diversos mecanismos microbicidas; son los responsables de la liberación de una gran variedad de factores participantes en la respuesta inflamatoria y en la inmunidad del hospedero (5).

Debido a la dificultad técnica para obtener suficiente número de células para los ensayos in vitro, la información sobre la función de las células fagocíticas del sistema mononuclear fagocítico (monocitos y macrófagos) es limitada y controversial; existe evidencia de la disminución en la depuración bacteriana por las células de este sistema en

modelos experimentales de desnutrición proteíca-calórica (6,7,8).

De interés particular, es el estudio y análisis de las actividades funcionales del macrófago en la desnutrición humana. Así también el esclarecer las bases moleculares de dichas alteraciones, las cuales no han sido investigadas.

El propósito de este trabajo es determinar la función del macrófago en desnutrición en el hospedero humano y determinar si es posible modular esta respuesta mediante inmunomoduladores como son las citocinas, principalmente factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) e Interferón gamma (IFN- ).

### **III. ANTECEDENTES:**

#### **A). EPIDEMIOLOGIA DE LA DESNUTRICION:**

La desnutrición en conjunción con las enfermedades infecciosas, es la principal causa de morbi-mortalidad en los países en desarrollo, especialmente en la edad pediátrica(9). La desnutrición calórica-proteíca primaria se mantiene con una prevalencia del 25 al 40% a nivel Mundial y es causa de muerte en más del 50% en niños menores de 5 años (9,10).

Desde el año de 1958 el Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán" (INNSZ) ha realizado estudios sistemáticos sobre las características, distribución y magnitud de la desnutrición en México (11,12).

El panorama en México sobre el aspecto epidemiológico de la desnutrición se caracteriza por una profunda y creciente polarización, en que las zonas del sureste presentan una prevalencia más elevada en desnutrición que es del 53%, en tanto que en el medio urbano se mantiene alrededor del 17%, esta última debido a excesos o desequilibrios en la dieta consumida con consecuencias negativas para la salud. En los resultados de la Encuesta Nacional de la Alimentación (ENAL) de 1988, se estimó que de 1763 casos estudiados en la ciudad de México el 6.3% corresponde a desnutrición moderada y severa. A diferencia de otras zonas como la región del Sur de la República Mexicana en donde de 2939 casos estudiados el 20.9% corresponde a desnutrición severa y moderada (13,14).

Estos datos no han variado con los años anteriores; es decir la desnutrición sigue siendo uno de los problemas importantes de salud en el país, afectando un porcentaje importante; y asociado a otros factores, es responsable de la mayor parte de mortalidad evitable y de considerables daños a la salud de la niñez.

#### **B). RESPUESTA INMUNE EN DESNUTRICION:**

Ha sido bien establecido en la literatura que los componentes del sistema inmune tanto locales como sistémicos son influenciados por una variedad de procesos infecciosos. La alteración de los mecanismos de defensa se ven asociados

en ambos extremos de la vida a neoplasias, traumas, transfusiones, administración de drogas inmunosupresores y la desnutrición calórica-proteíca (15,16).

En el hospedero la deficiente incorporación de nutrimentos a nivel celular se traduce en una condición caracterizada por muy variadas manifestaciones clínicas de diversa severidad, que se conoce como **Desnutrición**. La variabilidad en su expresión obedece al efecto combinado de la deficiencia de proteínas en la dieta, con un aporte que puede ser insuficiente, adecuado o aún en exceso, de calorías y otros nutrimentos. La desnutrición puede clasificarse de acuerdo a sus particularidades clínicas, en *Kwashiorkor*, *Marasmo* y *Kwashiorkor-Marasmático* (17).

En las genesis de estas modalidades clínicas, la deficiencia de las proteínas de la dieta se establece con diferentes niveles de ingesta energética. En el *Marasmo* el deficiente aporte de proteínas y energía para cubrir las necesidades de un organismo en una fase expansiva de crecimiento es habitualmente la regla, el *marasmo* es caracterizado por una deficiencia total de calorías, ausencia de grasa subcutánea, atrófia de las masas musculares y la ausencia del panículo adiposo en el niño que ha dejado de crecer en peso y longitud.

En contraste, el *Kwashiorkor* se considera como resultado del consumo de una dieta deficiente en proteínas y relativa en calorías y esta caracterizado por atrófia en las masas musculares, edema, hepatomegalia y suele haber lesiones

dérmicas de morfología diversa. A diferencia, la presencia de edema en un niño que carece de pániculo adiposo y que manifiesta lesiones dérmicas inespecíficas de moderada severidad, constituyen los datos clínicos más relevantes del tipo de desnutrición conocido como *Kwashiorkor-marasmático* (17).

Se acepta que el hospedero desnutrido es más susceptible a la infección y está demostrado que la desnutrición afecta a la mayoría de los mecanismos de defensa, lo que hace considerar al desnutrido como un hospedero inmunocomprometido.

Los defectos en la inmunidad celular, así como la notable disminución en las propiedades microbicidas de los fagocitos son detectados consistentemente en los niños desnutridos durante el curso de una infección aguda (18).

En términos generales podría decirse que el hospedero desnutrido tiene limitaciones importantes en las reservas energéticas y de otros nutrientes para mantener el estado de alerta y poner en marcha de forma eficiente y coordinada, los cambios bioquímicos y hormonales implicados en la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección.

En el **Cuadro 1** se presentan de manera resumida algunas de las principales alteraciones observadas tanto en los componentes de la respuesta celular como humoral del hospedero desnutrido.

### C). FAGOCITOS EN DESNUTRICION:

En el inicio de un proceso infeccioso, después de que las barreras naturales han sido rebasadas, la primera línea de defensa celular en el organismo son las células fagocíticas. La fagocitosis es uno de los eventos más importantes de estas células contra microorganismos, principalmente bacterias y hongos (19). Dentro de la categoría de fagocitos hay dos principales tipos de células involucradas: el leucocito polimorfonuclear ó neutrófilo (PMN) y el fagocito mononuclear (monocitos y macrófagos). Estas células mediante un conjunto de mecanismos que incluyen vías oxidativas como no oxidativas van a ejercer su acción como células efectoras de la respuesta (20).

La célula PMN es uno de los fagocitos estudiados de manera más amplia en desnutrición. Se ha demostrado en estudios in vitro y en modelos experimentales de desnutrición que estas células efectoras de la respuesta inflamatoria están comprometidos en la eficiencia de sus diferentes funciones (21,22,23).

La función quimiotáctica de PMN de niños desnutridos está disminuida, al compararse con sujetos sanos de la misma edad (24). También se encuentra disminuida su actividad bactericida, en donde además se ha observado un papel importante de la deficiencia de minerales como el hierro con respecto a controles depletados de hierro (25).

Otros estudios han demostrado también que la capacidad bactericida de PMN de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda está disminuida, cuando son retados in vitro con *Staphylococcus aureus* (26).

Parte de estos estudios han sido encaminados a esclarecer el mecanismo responsable de esta disfunción del PMN y han mostrado evidencias de que existe una disminución significativa de la capacidad opsonica en los PMN de niños desnutridos, lo cual involucra la expresión de receptores para opsoninas como son fracciones del sistema del complemento (C3 y C3bi) e inmunoglobulinas principalmente IgG (27).

El metabolismo oxidativo de los PMN de niños desnutridos también ha sido foco de estudio y algunos reportes mencionan que al parecer no hay diferencias con respecto a PMNs de controles eutróficos infectados, cuando se evalúan pruebas de reducción del colorante nitroazul de tretrazolio (NBT), ensayos de quimioluminiscencia (QL), determinaciones específicas de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (28).

En el **Cuadro 2** se presentan las principales características de las actividades funcionales de fagocitos polimorfonucleares que han sido investigadas en niños desnutridos.

La alteración en la respuesta del PMN parece estar más asociada al reconocimiento de la partícula, lo que implica

no solo expresión del receptor sino también la interacción ligando-receptor sobre la membrana de la célula. Ciertas hipótesis no comprobadas aún sugieren un papel muy importante de receptores de tipo solubles principalmente para fracciones del complemento e inmunoglobulinas (28,29).

#### **D). PARTICIPACION DEL MACROFAGO EN LA RESPUESTA INMUNE:**

Otro de los fagocitos importantes es el macrófago. Esta célula juega un papel importante en la defensa inmune a través de la presentación del antígeno, durante la fase inicial de la inmunidad específica dada por los linfocitos T. Además sirve de soporte como célula accesoria a la acción del linfocito por mediadores solubles (30,31).

El macrófago tiene funciones dentro de la economía del organismo, las cuales involucran principalmente una fagocitosis rápida mediada por receptores Fc y por fragmentos principales del complemento (C3) entre otras funciones (32,33).

##### **1. RECONOCIMIENTO Y FAGOCITOSIS:**

Los fagocitos mononucleares y neutrófilos son células de defensa contra microorganismos invasores. El neutrófilo es un fagocito más eficiente, excepto cuando la partícula es muy grande o hay un bombardeo de partículas; en estas circunstancias los fagocitos mononucleares son más efectivos que los neutrófilos. Los macrófagos representan además la principal defensa en contra de un gran variedad de

microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, virus hongos y protozoarios (34,35).

La acción del macrófago incluye las diferentes fases de la fagocitosis: como es el reconocimiento de la partícula (en presencia ó ausencia de opsoninas), la adsorción, la *internalización* con la formación de la vacuola fagocítica, la *fusión* con los lisosomas y la *muerte intracelular* del microorganismo ingerido (36).

La primera fase incluye la migración del macrófago, hacia la partícula microbiana a través de la generación de gradientes dado por moléculas quimiotácticas. Una vez reconocido el microorganismo el englobamiento se inicia cuando el macrófago avanza sobre sus regiones de pseudópodos en donde los tubulos de actina juegan un papel muy importante (37). Este reconocimiento se puede ver facilitado por la presencia de opsoninas que se unen a sitios específicos de las células. Las opsoninas son de varios tipos, pero las más estudiadas son las inmunoglobulinas IgG y componentes del complemento. Estas opsoninas se unen a sus receptores específicos, los cuales incluyen varios receptores para la fracción Fc de varias subclases de IgG y algunas variantes para el receptor de fragmento C3 del complemento (38).

Además muchos microorganismos son capaces de activar la cascada de complemento y generar fragmentos que activen la unión y la opsonización del microorganismo. Asimismo el macrófago es importante fuente de componentes del

complemento; que pueden opsonizar al microorganismo para su consecuente destrucción en ausencia de otras fuentes (39,40).

La absorción de la partícula fagocítica puede ocurrir sin opsonización ya que el microorganismo posee determinantes antigénicos de superficie que pueden ser reconocidos directamente por el macrófago, un ejemplo es la interacción del receptor fucosa-manosa del macrófago con residuos de carbohidratos del organismo. Después de la unión con el ligando apropiado, se inicia el proceso de *internalización* y la *fagocitosis*; lo cual no necesariamente implica destrucción microbiana. El fagolisosoma se forma cuando el fagosoma se fusiona con el compartimento lisosomal el cual contiene granúlos lisosomales (41).

La *fagocitosis* mediada por receptores Fc resulta en la liberación de grandes cantidades de oxígeno y metabolitos derivados del ácido araquidónico por el macrófago. En contraste, la unión por receptores para C3 falla en la liberación de metabolitos del ácido araquidónico (42). El macrófago también tiene receptores para C5a, en donde al ocupar a este receptor se induce la secreción de interleucina 1 y se inicia el fenómeno quimiotáctico. La ingestión de la partícula por los fagocitos mononucleares puede ocurrir en un rango amplio de pH y es acompañado por el incremento de la oxidación de glucosa similar a lo que ocurre en la *fagocitosis* por neutrófilos (43,44).

Si bien muchos microorganismos son fagocitados y destruidos por macrófagos, ciertos patógenos parasitan a los macrófagos y se replican dentro de él y solo cuando el macrófago es activado puede ser capaz de eliminar o inhibir a estos patógenos intracelulares. Microorganismos como *Listeria*, *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacteria*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma* y *Legionella pneumophila* son capaces de invadir e inhabilitar a macrófagos no activados (45,46,47). Sin embargo, algunos de estos microorganismos pueden ser inactivados en fenómenos de activación del macrófago, además ciertos microorganismos por sus características per se tienen la capacidad de inhabilitar a esta célula como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual puede liberar ciertas sustancias azufradas que interfieren con la fusión de los lisosomas primarios a fagosomas y evitar la digestión (48). Otro ejemplo de evasión aunque por otro mecanismo es el que presenta *Salmonella* la cual induce la formación de fagosomas gigantes (49).

## **2. MECANISMOS MICROBICIDAS:**

La composición y vías metabólicas para la eliminación de microorganismos por los fagocitos mononucleares se ve alterada durante su diferenciación. A la par de la transición de monocito a macrófago hay un incremento en el número de mitocondrias, su actividad de enzimas mitocondriales y el rango de respiración celular, como es la producción de lactato que aumenta la maduración celular. Así

también un incremento de lisosomas y enzimas lisosomales (50).

Después de arribar al foco de infección y fagocitar al agente infeccioso, el organismo puede ser muerto por la célula fagocítica tanto por mecanismos independientes de oxígeno como por mecanismos dependientes de oxígeno (51,52). Es claro que ciertos microorganismos van a ser más susceptibles al ataque de mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno que otros (52). Los mecanismos dependientes de oxígeno incluyen la vía del estallido respiratorio ó metabolismo oxidativo, el cual es definido como una vía metabólica (vía de pentosas) inactiva en la células en reposo que es activada a cualquier perturbación de la membrana celular del fagocito. Este estallido respiratorio involucra la formación de especies de oxígeno altamente reactivas con propiedades antimicrobianas resultantes de la reducción parcial del oxígeno, que se inicia por la activación de la enzima NADPH-oxidasa y donde esta enzima actua como donador de electrones, catalizando la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido y este a su vez generando peróxido de hidrógeno (53).

La secreción de intermediarios de oxígeno es poco comprendida a nivel molecular, sin embargo la estimulación de receptores Fc, receptores para C3, receptores para manosa terminal, glicoproteínas ó exposición a fosfodiester como forbol-miristato-acetato (PMA) pueden inducir el estallido respiratorio (54). La secreción de estos metabolitos no

correlaciona con la inducción de función tumoricida de estas células, ni tampoco la fagocitosis necesariamente es acompañada de generación de estallido respiratorio (55). El peróxido de hidrógeno provee mucho de la actividad microbicida oxidativa dentro del fagosoma y el ambiente extracelular; la magnitud del estallido respiratorio disminuye marcadamente cuando los monocitos maduran a macrófagos (56). Los macrófagos residentes por ejemplo, tienen solamente un pico en el estallido respiratorio y esto puede ser incrementado cuando son activados in vivo. Un incremento sobre el estallido respiratorio puede ser obtenido cuando hay exposición in vitro a citocinas por ejemplo, Interferon gamma recombinante (IFN- ) ó factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (57,58).

Como consecuencia secundaria a la interacción ligando-receptor, tenemos la liberación de ácido araquidónico de los almacenes celulares de fosfolípidos y fosfolipasa A2 y la subsecuente conversión a lipooxigenasa y ciclooxigenasa a series de leucotrienos ó prostanglandinas respectivamente (59).

El metabolismo oxidativo del macrófago es uno de los mecanismos dependientes de oxígeno y esenciales para la eliminación de una gran variedad de patógenos incluyendo algunos intracelulares. Este mecanismo puede ser más eficiente en la presencia ó bajo la estimulación de ciertas citocinas (59,60).

Además de los mecanismos citotóxicos dependientes de oxígeno, los fagocitos están equipados con mecanismos independientes de oxígeno para la eliminación de microorganismos. Una gran variedad de proteínas asociadas a gránulos conforman estos mecanismos dentro de los cuales están la elastasa, colagenasa, lipasa, desoxirribonucleasa, polisacaridasas, sulfatasas, fosfatasas y defensinas (61,62). Este último es un grupo de proteínas catiónicas de peso molecular bajo, que han sido descritas con distintas propiedades antimicrobianas y las cuales han sido aisladas de macrófagos alveolares de conejo y de neutrófilos de sangre periférica, las proteínas catiónicas incluyen también a la peroxidasa del monocito y ciertas citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 que tienen un papel importante en el incremento de la capacidad microbicida de estas células (63,64).

La producción de intermediarios de nitrógeno, es otro de los mecanismos independientes de oxígeno. La síntesis de óxido nítrico a partir del metabolismo de arginina es mediado por la enzima sintetasa del óxido nítrico y la cual presenta diferentes isotipos. Dos constitutivos y uno inducible; los productos de este óxido nítrico en los macrófagos incluye la formación de nitratos y nitritos y están en un rango de 100 veces más que las enzimas constitutivas (65). Los genes de todas estas enzimas han sido reportadas en el humano y las inferencias de que el óxido nítrico tiene propiedades antimicrobianas sobre modelos de infección, está basado en el uso de inhibidores

de la óxido sintetasa tal como N-nonometyl-L-arginina (NMMA); sin embargo estos componentes se tienen que tomar con cierta reserva ya que dichos componentes pueden inhibir otros procesos in vivo (66). Así también estudios in vitro han demostrado, que estos componentes son importantes en la muerte de *Listeria monocytogenes*. La producción de óxido nítrico es importante en la muerte microbicida de monocitos humanos y macrófagos no obstante a nivel molecular es poco claro. En otros estudios se ha observado que el óxido nítrico parece ser inducible con altos niveles de LPS (5ug/ml) (67).

Otro de los mecanismos microbicidas, independientes de oxígeno es la propia acidificación de la vacuola fagocítica (pH de 4.5 a 5). Esta acidificación ocurre dentro de los primeros 15 minutos y su efecto microbicida probablemente este relacionado a la acción del PH óptimo de las enzimas, más que el propio pH (68).

Existen diferencias en los mecanismos de muerte de monocitos de sangre periférica y macrófagos. Por ejemplo, a diferencia de macrófagos, monocitos humanos son más eficientes en la eliminación de *Candida albicans* (69). Sin embargo, los macrófagos pueden eliminar *Candida pseudotropicalis* ya que este organismo no requiere de actividad enzimática de peroxidasa para ser destruido (69,70). Además, los mecanismos microbicidas de macrófagos se van a ver influenciados por la secreción de diversos factores entre ellos, diferentes citocinas (71,72).

### 3. CITOCINAS EN DESNUTRICION:

Las citocinas presentan actividades pleitrópicas y son liberadas como parte de la respuesta inmune. Estas glicoproteínas presentan diferentes blancos de acción y la mayoría de las citocinas son sintetizadas en respuesta a diversos estímulos; es decir inducidas (sintetizadas de novo) no constitutivas, por lo que es factible pensar que alteración en los requerimientos nutricionales del hospedero esten implicados en su síntesis (73).

El efecto específico ó combinado de las deficiencias de minerales, proteínas, ácidos grasos y vitaminas sobre la actividad y producción de citocinas no ha sido evaluado. Asimismo existe poca información sobre el efecto de citocinas específicas sobre células efectoras en diferentes estados de desnutrición. Dentro de las citocinas de interés a investigar con respecto a los requerimientos nutricionales constitutivos de la dieta estan la IL-1 y TNF- que son los principales reguladores de la inmunidad humoral y celular (74).

La nutrición puede tener una marcada influencia sobre la cantidad de interleucina 1 y TNF liberado en la respuesta inmune como consecuencia de un reto infeccioso (74,75). Diferentes estudios han sido encaminados para determinar la producción y funcionalidad de IL-1,IL-6 y TNF- y han demostrado que la producción en macrófagos depende del

agente inductor, así como del microambiente (estímulo hormonal) (75).

Estudios clínicos han demostrado una falla en la liberación de IL-1 en monocitos de sangre periférica de pacientes con *Kwashiorkor* estimulados in vitro (76). Asimismo en macrófagos peritoneales provenientes de ratas deficientes de proteína, la producción de IL-1 esta marcadamente disminuída (77). La liberación de IL-1 por macrófagos en los pacientes con *Kwashiorkor* es corregida después de 7 días de terapia con soporte nutricional (78).

Hoffman, Goetz y colaboradores han establecido que a diferencia de los pacientes con *Kwashiorkor*, la IL-1 de leucocitos obtenidos de pacientes adultos *marasmáticos* no esta disminuida (78). Sin embargo, otros estudios por Bhaskaram, detectaron falla en la liberación de IL-1 de monocitos circulantes de niños *marasmáticos*, observandose que la extensión de esta disminución es considerablemente más baja en los niños que sufren *Kwashiorkor* (79). La disminución en la producción de IL-1, por los monocitos de los pacientes no se puede corregir adicionando aminoácidos al medio de cultivo en donde fueron estimulados, sin embargo puede ser corregido adicionando inhibidores de la liberación de prostanglandinas (79).

Utilizando un modelo experimental en conejos con dieta deficiente de proteínas Bell y Hoffman Goetz han mostrado que pueden inducir fiebre y respuesta de redistribución de hierro, sin embargo los animales fallan en la respuesta de

síntesis de proteínas de fase aguda comparada con controles bien nutridos (80). Asimismo cobayos depletados de proteína no exhiben alteraciones en la respuesta febril granulocitosis, oxidación de leucina acelerada o respuesta de fase aguda a la administración de IL-1 (81).

La disminución de liberación y respuesta de IL-1 puede ser el mecanismo por el cual la desnutrición conduce a una falla en la inmunocompetencia e incrementa la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. Estudios sobre la producción de otras citocinas, como la producción de M-CSF, TNF- e IFN- no se han investigado, sin embargo se sugiere que estas proteínas seguramente presenten alteración ya sea en su producción ó acción efectora. Nuevamente los estudios con respecto a estas citocinas en células humanas son limitados y poco específicos.

#### **4. FUNCION DEL MACROFAGO EN LA DESNUTRICION:**

El macrófago ha sido estudiado en la desnutrición pero de manera más limitada a lo descrito en el PMN. De los años 70s a los 80s, surgen la mayoría de los reportes relacionados con esta célula efectora, sin embargo la información disponible esta basada principalmente en modelos de experimentación animal, haciendo deprivación nutricional con dietas bajas de proteínas (82). En algunos de estos estudios se ha demostrado que los macrófagos en la desnutrición presentan una disminución general en sus distintas funciones como fagocitosis, capacidad microbicida y producción de mediadores de la respuesta inflamatoria

(83,84). También es mencionado que la producción de peróxido de hidrógeno, metabolitos de ácido araquidónico y la síntesis ó liberación de citocinas principalmente IL-1, en respuesta a estimulación in vitro con LPS estan disminuidas (84). Si bien ha sido demostrado en los modelos de desnutrición animal que la funcionalidad del macrófago está deficiente, sigue siendo importante aclarar más específicamente las características de la inmunodeficiencia del hospedero desnutrido pero con modelos experimentales humanos.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Las alteraciones múltiples y variables del sistema inmune observadas en los pacientes desnutridos sugieren que el defecto fundamental podría estar a nivel de la regulación de la respuesta inflamatoria desencadenada a un estímulo infeccioso.

Las citocinas son mediadores esenciales de la comunicación entre las células inmunes. Alteraciones en la síntesis ó en la respuesta a estas proteínas regulatorias podrían condicionar defectos significativos en la función de los macrófagos que participan en los mecanismos de defensa del hospedero. Ninguno de estos aspectos ha sido estudiado en su totalidad en pacientes desnutridos. El conocimiento de la efectividad de la respuesta celular asociada al macrófago y su respuesta a citocinas

proinflamatorias, contribuiría a la caracterización más específica de la inmunodeficiencia del desnutrido.

#### **V. HIPOTESIS:**

El estallido respiratorio y la capacidad bactericida de los macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica de pacientes desnutridos esta disminuida. Esta disminución puede ser corregida in vitro con citocinas proinflamatorias como M-CSF e IFN- .

#### **VI. OBJETIVOS:**

1. Evaluar la producción de intermediarios de oxígeno y la actividad bactericida en macrófagos derivados de monocitos aislados de pacientes eutróficos infectados y desnutridos infectados.

2. Determinar el efecto de dos citocinas proinflamatorias, M-CSF e IFN- , sobre la producción de intermediarios de oxígeno y la función bactericida en los macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica de niños desnutridos e eutróficos con infección. Comparar estas respuestas con macrófagos de niños eutróficos sanos.

## **VII. MATERIAL Y METODOS:**

### **a). POBLACION DE ESTUDIO:**

Los sujetos incluidos en esta población fueron un total de 45 niños internados en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" cuyos padres dieron consentimiento informado por escrito, los cuales fueron subdivididos en 3 grupos de 15 pacientes por grupo: el grupo I (control) representado por niños eutróficos, clínicamente sanos sometidos a cirugía electiva. El grupo II integrado por pacientes eutróficos infectados, con diagnóstico de infección aguda bacteriana corroborada por datos clínicos y de laboratorio y el grupo III, conformado por desnutridos de tercer grado ( deficit de peso para talla mayor del 40% de acuerdo a las Tablas de NCHS y los criterios de Waterlow) (85).

Los pacientes del grupo II y III se estudiaron en las primeras 72 horas a su internamiento y los del grupo I, se hizo su captación a través de la Consulta Externa y la Toma de Productos del Laboratorio Central de esta Institución de los niños con solicitud de estudios para cirugía electiva. Para la captación de estos pacientes se siguieron los siguientes criterios de selección.

#### **a.1). CRITERIOS DE INCLUSION:**

Fueron elegibles para el estudio niños de 2 a 48 meses de edad de ambos sexos, eutróficos y desnutridos infectados.

Con diagnóstico de infección bacteriana aguda, sin tratamiento antibiótico previo ó menor de 48 horas de tratamiento previo al ingreso. La autorización informada del padre o tutor fué solicitada por escrito.

El criterio de desnutrición se tomo con base a la comparación de valores reales con valores ideales en talla y peso de acuerdo a la edad siguiendo los criterios de Waterlow y las tablas de NCHS (85). El diagnóstico de infección bacteriana aguda se estableció en base a datos clínicos y de laboratorio como biometría, velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, tinciones de Gram, antígenos bacterianos de líquidos corporales, así como cultivos y estudios radiológicos de acuerdo al padecimiento específico de cada paciente.

**a.2). CRITERIOS DE NO INCLUSION:**

Cursar con infecciones no bacterianas ó infecciones crónicas. Tener más de 72 horas de internamiento y tratamiento antibiótico mayor de 48 horas previo al ingreso ó el uso de drogas inmunosupresoras (esteroides ó tratamiento oncológico). Cursar con SIDA, cancer u otras inmunodeficiencias y la no autorización del padre o tutor para ingreso al estudio.

**b). OBTENCION DE MONOCITOS:**

Las células mononucleares fueron aislados de sangre venosa periférica obtenidas en gradiente de Ficoll e Hypaque, utilizando el método de Boyum modificado (86).

Los monocitos se separaron del resto de mononucleares por su propiedad de adherencia a vidrio sobre cubreobjetos de 0.9 cm previamente tratados para cultivo de tejidos. La capa de monocitos se incubó por 2 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% adicionando RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) más 5% de Pool de Suero Humano (PSH). Después de esta incubación se realizaron pruebas de viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano (87). Se realizaron cuantificaciones del número de células adheridas a estos cubreobjetos por el método de Nakagura (88). Solamente se emplearon los cubreobjetos que tuvieran el 90% de viabilidad celular.

**c). DIFERENCIACION A MACROFAGOS:**

Los monocitos obtenidos después de dos horas de adherencia se mantuvieron en cultivo por 72 horas, alimentandolos con medio RPMI-1640, suplementado de 10% de SFB y adicionado de 5% de PSH. Se realizaron cambios de medio cada dos días. La pureza de la población de macrófagos se determinó por tinción de esterasa no específica y observación de morfología por tinción de Giemsa (89,90).

Es importante mencionar que la diferenciación para algunos ensayos (Capacidad bactericida) se hizo sobre placas de poliestireno de 96 pozos, tratados para cultivo de tejidos, con las mismas condiciones señaladas para el cultivo sobre el cubreobjetos.

**d). QUIMIOLUMINISCENCIA:**

La evaluación del metabolismo oxidativo ó producción de intermediarios de oxígeno se realizó por un ensayo de quimioluminiscencia de acuerdo al método de Müeller (91). Esta evaluación se hizo en células no estimuladas y en células incubadas con varios estímulos. Las lecturas de quimioluminiscencia son efectuadas en un luminometro LKB 1251, el cual contiene un fotomultiplicador que convierte los fotones liberados en unidades de corriente eléctrica, de tal forma que la quimioluminiscencia es expresada en milivoltios (MV) por número de células. Las determinaciones se efectuaron en muestras por duplicado ajustando la lectura a 100,000 células por mililitro.

**d.1) EVALUACION CON DIFERENTES ESTIMULOS:**

La quimioluminiscencia es inducida con varios estímulos y el grado de producción va ha variar dependiendo del estímulo que se emplee. La quimioluminiscencia en el macrófago a diferencia del leucocito polimorfonuclear presenta algunas modificaciones por lo que es necesario

ajustar ciertas variables, entre ellas el estímulo. Para determinar las condiciones óptimas de ensayo, así como el estímulo más apropiado para la valoración de quimioluminiscencia en los diferentes grupos de estudio se probaron dos estímulos solubles derivados de ester de forbol como el miristato acetato ó PMA y el péptido quimiotáctico FMLP, en concentraciones de 100 ng/ml y  $10^{-6}$  M respectivamente (127,128). Asimismo se utilizó un estímulo particulado, zymosán opsonizado con 10% de suero AB.

**e). DETERMINACIONES DE CONCENTRACIONES OPTIMAS DE CITOCINAS:**

Para determinar el efecto de las citocinas sobre quimioluminiscencia del macrófago se preincubaron los macrófagos con cada uno de los factores a diferentes concentraciones, tomando en consideración algunos datos reportados en la literatura (94). En el caso de M-CSF se emplearon concentraciones de 100 hasta 1000 Unidades por ml y para el IFN- de 200 hasta 1000 U/ml.

La incubación se hizo por períodos de 48 horas y previo a la realización del ensayo, 18 horas antes, se removio el medio con citocina y se reemplazo unicamente con el medio de cultivo para cada ensayo. Se realizaron cuatro experimentos por duplicado.

Una vez determinadas las concentraciones se realizaron los ensayos de quimioluminiscencia con el estímulo previamente seleccionado.

**f). ACTIVIDAD BACTERICIDA EVALUADA POR REDUCCION DE MTT:**

Además de evaluar la producción de intermediarios de oxígeno se evaluó la actividad microbicida del macrófago. En la literatura hay diferentes métodos de valoración para medir la actividad bactericida en el macrófago, sin embargo no todas son ajustables a los ensayos de estudio. En este trabajo se utilizó el ensayo de reducción de MTT (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (95). Este ensayo requiere de un número menor de células y esta basado en la propiedad de que deshidrogenasas producidas por el microorganismo de estudio, durante la fase logarítmica de crecimiento son capaces de reducir este colorante, la reducción de tal colorante es medida en un espectrofotometro a una longitud de onda de 650 nanometros y representa en forma indirecta el número de bacterias presentes. No obstante, este método se comparó con el estandar de oro, que es la determinación de unidades formadoras de colonias por plaqueo en agar antes de efectuarlo en los grupos de estudio. El microorganismo de estudio para el ensayo de la actividad bactericida se seleccionó después de ensayar los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 2952, *Klebsiella pneumoniae* K8 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 WT. Los tiempos probados fueron de 30 y 90 minutos de interacción in vitro con los macrófagos y el microorganismo en una relación de 1:20 (célula:bacteria). En el ensayo,

unidades formadoras de colonias (UFC). El conteo se realizó por duplicado en varias diluciones en un promedio de 4 experimentos. Los controles respectivos incluyeron un blanco, bacteria sola y macrófagos solos.

Por último ya establecidas las condiciones de ensayo, tanto para la quimioluminiscencia, como la actividad bactericida se procedió a la realización de los ensayos en los diferentes grupos de estudio.

#### **VIII. ANALISIS ESTADISTICO:**

Los resultados se expresan de acuerdo a la función estudiada considerando la hipótesis nula:

Los macrófagos de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda responden adecuadamente a la estimulación con M-CSF e IFN- en condiciones de reposo y ante estímulos proinflamatorios al compararse con los niños eutróficos.

**a). Quimioluminiscencia:** Los resultados se expresan como promedio de pico máximo en mv observado a la adición del estímulo seleccionado a 100,000 células. Para cada uno de los tres grupos se calculó el sesgo y la curtosis de los promedios de pico máximo. Los valores obtenidos indicaron que los datos no tienen una distribución normal por esta razón se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman.

En el análisis de las determinaciones de concentraciones óptimas de citocinas se aplicó prueba no paramétrica de Wilcoxon para diferencias intra grupo.

las bacterias son ajustadas a  $1 \times 10^9$  bacterias/ml de acuerdo a la fase logarítmica de crecimiento de cada bacteria previo al ensayo. Las bacterias previamente opsonizadas con suero AB 10% son adicionadas a los macrófagos en la relación indicada y son centrifugadas a 500 rpm durante 5 minutos para una mejor interacción de las bacterias con las células. Una vez centrifugadas se mantienen en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio RPMI-1640 con 10% de suero AB (generalmente para el ensayo se utilizaron dos placas). Después de 30 minutos de incubación una de las placas es lavada con medio tibio, para la eliminación de las bacterias extracelulares, las células son lisadas con una solución de tritón al 0.1% e incubadas por un período de 5 horas con medio de cultivo para el crecimiento de cada bacteria. A este tiempo se le consideró como tiempo cero (bacterias asociadas y fagocitadas).

La otra placa se reincuba nuevamente por 90 minutos suplementando el medio con gentamicina a 8 ug/ml, para matar a las bacterias extracelulares. Después de esta incubación se lisaron las células con tritón al 0.1% y se incubó por 5 horas en medio de cultivo. Posterior a esta incubación se adicionaron a ambas placas 10 ul de una solución de MTT preparada a 5 mg/ml en solución salina fisiológica, y se incubaron por 15 minutos a 37°C. La reducción de MTT (formación de formazán) se leyó en un lector de ELISA Thermomax para lectura de placas a una longitud de onda de 650 nm. Estos resultados fueron comparados con el conteo de

**b). Capacidad bactericida:**

Los resultados se expresan como porcentaje de muerte intracelular, con base a la determinación de las diferencias de absorvancia observada entre el tiempo de 30 y 90 minutos. Los valores obtenidos de absorvancia no mostraron distribución normal. Estos datos se analizaron también aplicando prueba no paramétrica de Friedman (96).

**IX. RESULTADOS:**

**1. CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA:**

En la **Tabla 1**, de manera resumida se describen los aspectos generales de la muestra como son edad, sexo, peso y características de las infecciones incluidas de los pacientes al final del estudio.

**2. RESPUESTA QUIMIOLUMINISCENTE A DIFERENTES ESTIMULOS.**

Se analizó la producción de intermediarios de oxígeno en respuesta a varios estímulos en macrófagos de 10 niños eutróficos clínicamente sanos. Se puede observar en las **Figuras 1A, 1B y 1C** que el metabolismo oxidativo en respuesta a los tres estímulos, fué mayor con los estímulos de FMLP ( $67.4 \pm 10.1$  mv) y PMA ( $54.8 \pm 9.0$ ) respectivamente. Cabe señalar que la cinética de respuesta es completamente diferente, alcanzándose el pico más rápidamente a la estimulación con FMLP en comparación con los otros dos estímulos; está se alcanza en un minuto, después de

adicionar el estímulo. En el caso de FMLP la cinética de respuesta es dosis dependiente. La concentración de FMLP que se utilizó fue  $10^{-6}$  M.

Con respecto a Zymosan que es un estímulo particulado la respuesta fué menor ( $47.4 \pm 11$ mv), con una cinética más lenta (20 minutos para alcanzar el pico máximo). Con relación a estos resultados la respuesta al estímulo de FMLP. Se consideró la más adecuada, no solo por su magnitud sino por la similitud de este péptido a componentes de células bacterianas lo cual sería más probable a lo que pudiese suceder en infecciones bacterianas in vivo. En base al estímulo se determinó la concentración y el efecto de citocinas en el ensayo de quimioluminiscencia.

**3. DETERMINACION DEL EFECTO DE CITOCINAS SOBRE LA RESPUESTA QUIMIOLUMINISCENTE.** Después de adicionar diferentes concentraciones de las citocinas recombinantes utilizadas, se valoró su efecto sobre la quimioluminiscencia. Como se señala en la **Figura 2A**, los resultados en el caso del efecto del tratamiento con M-CSF en concentraciones de 100 y 200 U/ml sobre las células durante 48 horas no se obtienen diferencias en los picos promedio con respecto al control. Sin embargo cuando se emplearon concentraciones de 500 y 1000 U/ml se observaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).

Con relación al efecto de IFN- en la quimioluminiscencia, **Figura 2B**. La concentración óptima de

respuesta para el ensayo fué de 400 U/ml con un incremento significativo en los picos promedio de quimioluminiscencia; estas diferencias son significativas con respecto a las células no tratadas ( $P < 0.001$ ).

Las concentraciones que se emplearon con base al incremento de quimioluminiscencia observado fue para M-CSF de 500 U/ml y para IFN- de 400 U/ml, ambas por períodos de incubación de 48 horas. Una vez determinadas estas concentraciones se realizó la valoración ya directa en la población de estudio.

**4. RESPUESTA QUIMIOLUMINISCENTE A LA ESTIMULACION DE FMLP Y EL EFECTO DE M-CSF E IFN- EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.** La respuesta quimioluminiscente de macrófagos de los niños infectados fué mayor en comparación al el grupo de desnutridos infectados **Figura 3**; estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ). En contraste en el grupo de desnutridos infectados, los macrófagos respondieron menos al compararse con los macrófagos de eutróficos infectados, sin embargo no hubo diferencias en la respuesta con relación a los eutróficos sanos. En la misma **Figura** se visualiza la respuesta de quimioluminiscencia de los macrófagos estimulados con M-CSF e IFN- . En relación a la estimulación con IFN- , este estímulo incrementó los picos promedio de quimioluminiscencia hasta en un 80% con respecto al control (células no tratadas con citocina). El

M-CSF incrementó también esta respuesta pero fué menor comparada a la estimulación con IFN- .

**5. CAPACIDAD BACTERICIDA EN UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (U.F.C.) Y REDUCCION DE MTT.** Los resultados obtenidos en los porcentajes de muerte intracelular al probarse diferentes microorganismos se remarcen en la **Tabla 2**. Como puede observarse se denota una fuerte asociación entre las U.F.C. y la reducción de MTT, con un coeficiente de correlación de  $r= 0.902$ , para los 3 microorganismos. Así también en la **Tabla 2** se pueden observar los porcentajes de muerte intracelular. El mayor porcentaje de muerte intracelular se observó a los 90 minutos de interacción y fué mayor para *Staphylococcus aureus*, (99.3%) en comparación con los otros dos microorganismos. Con *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo un 45% de muerte intracelular. El microorganismo menos susceptible y con el menor porcentaje de muerte intracelular 28.5% fué *Salmonella typhimurium*. En base a estos resultados, se decidió en *Salmonella typhimurium*; ya que por ser un microorganismo intracelular facultativo y presentar un porcentaje de muerte intracelular bajo en células no tratadas con citocinas; nos permitiría visualizar un cambio más notable al tratamiento con estas citocinas.

**6. ACTIVIDAD BACTERICIDA CONTRA *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.** En la **Figura 4**, se representan los porcentajes de muerte intracelular determinados en los diferentes grupos de estudio al efecto de M-CSF e IFN- . Como se puede

observar la diferencia en la respuesta se da a los 90 minutos de interacción como había sido señalado previamente en la **Tabla 2**. En macrófagos aislados de niños eutróficos clínicamente sanos se obtuvo un porcentaje negativo de muerte intracelular, es decir hay incluso una sobrevida de la bacteria dentro de las células. Sin embargo al tratamiento con citocinas, esta actividad se incrementó hasta el 54% para IFN- y 25% para M-CSF. También se puede observar que los macrófagos de niños eutróficos con infección exhiben un incremento en su actividad bactericida a diferencia de los macrófagos de eutróficos sanos.

Tanto la infección como las citocinas parecen incrementar la respuesta bactericida; sin embargo a diferencia de IFN- el M-CSF ejerce una inhibición en la respuesta.

En los macrófagos estimulados de desnutridos con infección el comportamiento de la respuesta bactericida es menor sí la comparamos con los eutróficos infectados ( $P < 0.0001$ ); es decir estas células no parecen responder a la estimulación con estas citocinas.

## **X. DISCUSION:**

La función principal del sistema fagocítico mononuclear, constituido por los monocitos de la circulación y los macrófagos de los diferentes tejidos, implica funciones microbicidas mediadas por mecanismos oxidativos y no oxidativos (97). En estudios previos con modelos de experimentación animal se ha observado que la función del macrófago es modificada por la desnutrición proteico-calórica (98). Sin embargo, las modificaciones que se presentan no suelen ser completamente uniformes, preservándose integras ciertas actividades funcionales del macrófago (83,84). También existen algunas controversias en las actividades funcionales del macrófago en los modelos de desnutrición proteico-calórica, como son la fagocitosis, el metabolismo oxidativo, la capacidad microbicida y la síntesis de citocinas de estas células (84,85).

En este estudio se demostró que el metabolismo oxidativo de macrófagos de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda está afectado. Apoyando a estos resultados otros autores han reportado que la fagocitosis y la actividad del ciclo de la hexosa monofosfato en macrófagos peritoneales de rata está marcadamente disminuida (99,101). Redmond y colaboradores demostraron que durante la desnutrición calórica-proteica prolongada hay una falla

significativa en la actividad del estallido respiratorio en macrófagos residentes, macrófagos estimulados con LPS y macrófagos activados con BCG (100). En contraste, otros reportes muestran evidencias de que el metabolismo oxidativo de células macrófagicas en desnutrición proteíco-calórica no parece ser afectado de forma importante (85,101). Específicamente, en algunos estudios se ha demostrado que la liberación de intermediarios de oxígeno como peróxido de hidrógeno, radical hidróxilo y anión superóxido en células estimuladas con PMA de animales con desnutrición, tienen un estallido respiratorio normal (85,100).

Otros estudios empleando una variedad de sistemas experimentales in vitro han demostrado que la fagocitosis opsónica y no opsónica de los fagocitos mononucleares puede estar moderadamente disminuida, (99), normal (102,103) o estar aumentada en la desnutrición (104). Douglas y Schopfer(105) demostraron en monocitos derivados de niños con *Kwashiorkor* que hay fagocitosis normal de partículas de látex y eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos. Asimismo Keusch y colaboradores (106), usando un modelo de desnutrición proteíco-calórico en ratas, establecieron que los eventos morfológicos y degranulación se suceden de forma normal en macrófagos de ratas deficientes de dieta proteíca. Estos resultados apoyan la conclusión de que en la desnutrición proteíco-calórica no parece afectar seriamente las funciones fagocíticas de los macrófagos estudiados in vitro.(106,107).

Es importante mencionar con relación a estos reportes y a lo demostrado en este estudio que los efectos observados en la desnutrición proteico-calórica sobre los mecanismos oxidativos de macrófagos pueden depender, además de las limitaciones propias del modelo experimental del estudio aplicado, de la población de células (macrófagos peritoneales, alveolares, derivados de sangre periférica etc) así como del estímulo activador que es estudiado.

El macrófago depende de forma primaria de sus vías oxidativas para la eliminación de patógenos, así como de síntesis de proteínas antimicrobianas (108). Estas vías oxidativas puede ser ampliadas o ser más efectivas por inmunomoduladores como son las citocinas .

La disminución en el metabolismo oxidativo demostrada en este estudio parece corregirse al tratamiento con citocinas. La respuesta a IFN- resulta ser mayor que a M-CSF, en el macrófago del niño desnutrido. Sin embargo dicha corrección no alcanza los mismos niveles de respuesta observados en los macrófagos de un niño eutrófico infectado; es decir la infección ya tiene un profundo efecto en la respuesta de estas células en el hospedero desnutrido y es posible que la actividad inducida de forma primaria por la infección en el desnutrido alcance un umbral de saturación en el receptor de esta citocina que no permita la respuesta a la misma, probablemente por la falta de receptores de reserva a esta citocina.

IFN- es una de las principales señales de iniciación para el aumento de intermediarios de oxígeno en monocitos, resultando importante en la capacidad citotóxica de estas células (109). A diferencia de esta señalización, en este estudio se observó que IFN- incrementa el metabolismo oxidativo en el macrófago del niño desnutrido, sin embargo no alcanza el incremento observado en los macrófagos de los niños eutróficos con infección, por lo que se sugiere que no sea la única señal involucrada en esta respuesta. En estudios previos, y apoyando nuestros resultados, se ha observado que el tratamiento con IFN- aumenta los mecanismos oxidativos en macrófagos de animales con desnutrición proteico-calórica, a diferencia de otros estímulos, como LPS (110). No obstante esta respuesta no es del 100% en comparación con los controles sugiriendo algunos defectos en la señalización a dicha citocina (110).

El macrófago expresa más de 40 tipos de receptores involucrados en el reconocimiento y la activación de estas células. Dentro de ellos están los receptores para IgG (Fc), receptores de complemento (C3), receptores de manosa y receptores para diferentes citocinas (5). Considerando que la función efectora es resultado de una interacción de ligando-receptor, así como de las señalizaciones que se produzcan durante esta interacción y en base a la falta de respuesta óptima a citocinas activadoras como M-CSF e IFN- observada sobre el metabolismo oxidativo y demostrada en este estudio, podría sugerir la existencia de alteraciones

en la expresión de receptores o reciclaje del receptor, puntos sumamente interesantes e importantes los cuales no fueron valorados en este estudio. Estas hipótesis, en cierta manera han sido apoyadas por estudios no con macrófagos sino con células fagocíticas PMN de niños desnutridos, en donde se ha demostrado una disminución en la expresión de receptores para opsoninas, reflejándose en valores más bajos en porcentaje de muerte bacteriana en los PMN de niños con desnutrición e infección (28).

La función microbicida es otro aspecto sumamente importante en la efectividad funcional del macrófago. Al respecto, hay evidencias de que la maquinaria microbicida de macrófagos es modificada por la desnutrición (111). Otros investigadores han reportado lo contrario, que la capacidad bactericida de macrófagos derivados de monocitos humanos y macrófagos de peritoneo de rata contra ciertos agentes patógenos es preservada. (112,113). Con resultados similares, en este estudio se demostró que la función microbicida permanece intacta al menos contra *Salmonella typhimurium*, microorganismo con el cual se valoró la actividad bactericida de estas células. Es importante mencionar que la integridad de la capacidad bactericida está implícita en tiempos cortos de interacción célula:bacteria, generalmente tiempos de 90 minutos.

Estos resultados contrastan a los reportados en literatura con *Salmonella*, en donde se ha evidenciado que hay un incremento en la susceptibilidad a la infección experimental

en ratas desnutridas por este microorganismo, con respecto al grupo control, ya que la dosis letal 50 fué menor en las ratas con desnutrición ( $4 \times 10^8$ ) U.F.C, en comparación con ( $1 \times 10^{11}$ ) U.F.C. en el grupo control (114). En otros estudios también se ha demostrado que el ayuno prolongado por 72 horas en ratas, en donde se provoca una desnutrición aguda con un 30% de deficit en el peso de los animales, hay incremento en la mortalidad debido a la sepsis experimental por *Salmonella typhimurium* con relación a los animales que recibieron dieta normal durante la infección experimental (115). Además se ha observado que la depuración de la bacteria se dificulta en los animales con desnutrición, determinandose un número de bacterias mayor en el hígado y bazo durante el curso natural de una infección con *Salmonella typhimurium* estudiada por 7 días (113). Asimismo, existen otros reportes que mencionan la disminución de capacidad bactericida contra otros agentes como *Candida albicans*, *Mycobacterium* y *Listeria monocytogenes* (114,115,116).

Nuestros resultados, que no muestran alteración de la función microbocida en macrófagos derivados de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda, podría estar relacionado a los mediadores que se hayan producido in vivo después de la infección. Dichos mediadores podrían estar actuando sobre la respuesta de estas células contra *Salmonella typhimurium*, ya que la célula efectora que se estudia tiene ya cierta maquinaria de activación provocada

por la infección per se. Además se ha reportado en la literatura que la capacidad del macrófago de responder con una determinada actividad también va a depender directamente de la respuesta primaria desencadenada por un estímulo determinado, presentandose sinergismos y antagonismos hacia un segundo estímulo (116).

A pesar de que el metabolismo oxidativo está disminuido en el macrófago del desnutrido infectado, la capacidad bactericida no se ve modificada. Al respecto también se puede mencionar que el macrófago es un arsenal de distintos mecanismos efectores para la eliminación de patógenos y no depende unicamente del metabolismo oxidativo (117). Se podría sugerir que otros mecanismos efectores que no fueron objeto de este estudio como la producción de intermediarios de nitrógeno o la liberación de citocinas como TNF, pudieran estar actuando para la eliminación de *Salmonella* en el macrófago del desnutrido infectado que lo hacen responder igual al eutrófico infectado.

Por otro lado, la desnutrición no solo implica la disminución en las funciones efectoras, sino más bien mecanismos de desregulación en estas funciones (alteraciones en su expresión). Muchos trabajos incluyendo este, han intentado esclarecer los mecanismos fisiopatológicos inducidos por el estado nutricional y es claro que la desnutrición en asociación a infección es compleja. Una de las diferencias en este trabajo es la evaluación más directa de la función del macrófago en la desnutrición. Sin embargo

no hay que dejar de mencionar que este estudio presenta limitaciones propias a un estudio clínico a diferencia de un modelo animal, en donde en el modelo clínico a pesar de la aplicación de los criterios de selección de sujetos a estudiar, pueden intervenir otros factores generalmente asociados al hospedero como: genética, estado hormonal, fisiología etc, que limitan la identificación clara y precisa en los defectos de las células efectoras.

En este estudio, la probabilidad de modulación de algunas funciones del macrófago del niño desnutrido con citocinas abre nuevas expectativas de investigación y propone nuevos retos para esclarecer los mecanismos afectados en estas células efectoras de la inmunidad. Más aún, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se podría sugerir que la activación de macrófagos en el hospedero desnutrido con infección parece estar estrechamente asociada a la disfunción en la respuesta a citocinas, muy probablemente a alteración en la expresión o señalización de receptores de citocinas, aspectos de suma importancia, los cuales no han sido investigados en la desnutrición.

Finalmente, la caracterización e identificación de los mecanismos alterados en las células efectoras del hospedero desnutrido conducirá en un futuro al diseño de terapéuticas inmunomoduladoras más apropiadas a estos pacientes.

## XI. CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados podemos concluir los siguientes puntos:

1. El metabolismo oxidativo en macrófagos de niños desnutridos infectados esta disminuido en respuesta a la estimulación in vitro con FMLP.
2. Tanto IFN- como M-CSF, son citocinas activadoras que incrementan el metabolismo oxidativo de los macrófagos de niños desnutridos. Siendo mayor este incremento al tratamiento con IFN- . Sin embargo, estos incrementos en la respuesta fagocítica son menores a los observados en los macrófagos de niños eutróficos infectados.
3. A pesar de la disminución en el metabolismo oxidativo, la función microbiciada de los macrófagos de niños desnutridos en reto a la infección in vitro con *Salmonella typhimurium* permanece inalterable, al menos durante fases tempranas de la interacción célula:bacteria.

4. No se encontraron diferencias en la función microbicida de macrófagos de niños desnutridos con relación a lo observado en macrófagos de eutróficos infectados.

5. Además en la evaluación de esta función los macrófagos de desnutridos infectados no responden a la estimulación con IFN- ni con M-CSF.

6. Estos resultados parecen sugerir defectos a nivel de la expresión de receptores, dado el poco incremento observado a la estimulación in vitro de estas citocinas.

## XII. BIBLIOGRAFIA:

1. **Gross RL**, Newberne PM: Role of nutrition in immunologic functions. *Physiol.Rev.*1980;60:188-302.
2. **Nossal JV**: Life, Death and the Immune System. *Scientific American.*1993;269:3:20-30.
3. **Charles A**, Janeway Jr: How the Immune System Recognizes Invaders. *Scientific American.*1993;3:40-47.
4. **Keusch GT** : Nutrition as determinant of host response to infection and the sequelae of infectious diseases. *Sem. Infect.Dis.*1979;2:265-303.
5. **Lewis CE**, McGee J,OD: The Natural Immune System: The Macrophage. ed (CE Lewis). *Oxford University. Press.*1991;1-74.
6. **William R**, Beisel, MD: Nutrition Biochemistry and Metabolism with Clinical Applications. ed. *Linder.* 2a Edition.1991;508-542.
7. **Chandra**, R.,Newberne: Nutrition, Immunity and Infection, Mechanisms of Interacciones. *Plenum.Press*, New York, NK.1977;1-9.
8. **Gershwin ME**, Beach R, Hurley LS: Nutrition and Immunity. *Academic Press. New.York.* NK.1984;1-15.
9. **Santos JI**, Arredondo JL and Vitale JH: Nutrition Infection and Immunity. *Pediatric Annals.*1983;12:3:183.
10. Evaluation of the Population of Central America and América and Panama (INCAP) and Nutrition Program. Washington

DC: Centers for Disease Control 19xx US. Dept of Health,  
*Education and Welfare publication HSM;72-8120.*

11. **Peréz-Hidalgo C, ed:** Encuestas Nacionales en México.  
Volumen III: Estudios en grupos especiales, México, D.F.  
División de Nutrición del Instituto Nacional de la Nutrición  
" Salvador Zubirán", 1976 p 35-46.

12. **Madrigal H, Avila A:** Encuesta Nacional de Alimentación en  
el medio rural 1989. México, D.F. Instituto Nacional de la  
Nutrición " Salvador Zubirán ". *Comisión Nacional de la  
Alimentación*, 1990.

13. **Avila Curiel A, Chavez Villasana A, Shamah Levy, TY  
Madrigal, Fristch H:** La desnutrición Infantil en el Medio  
Rural Mexicano: Análisis de las Encuestas Nacionales de  
Alimentación. *Rev. Salud. Pública.* 1993;35:6:658-665.

14. **Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología.**  
Encuesta Nacional de Nutrición. Resultados Nacionales por  
Regiones México D.F.; *DGE-SSA*, 1988.

15. **Waymack JP, Robbe E, Alexander JW:** Effect of Transfusion  
immune function in a traumatized animal model, II: Effect on  
Mortality rate following septic challenge. *Arch.  
Surg.* 1987;122:935-939.

16. **Waymack JP Warden GD, Miskell P et al:** Effect of varying  
number and volume of transfusions on mortality rate septic  
challenge in an animal model. *Worlds. J. Surg.* 1987;11:387-391.

17. **Vega Franco Leopoldo:** Temas cotidianos sobre Alimentación  
y Nutrición en la Infancia. Editor Francisco Mendez  
Cervantes. México. D:F: 1988. p.153.

18. **Chandra RK:** Nutrition and Immunity: An Overview. *J.Nutr.* 1994;124:S233-S335.
19. **Van Oss CJ:** Phagocytosis as surface phenomen. *Ann Rev. Microbiol.* 1978;32:19-39.
20. **Root R and Cohen S, Myron:** The Microbicidal Mechanisms of Human Neutrofilis and Eosinophils. *Rev Infect.Dis.* 1981;3:565-598.
21. **Chandra RK:** Cell-Mediated Immunity in Nutritional Imbalance. *Fed.Proc.* 1980;39:3088-3092.
22. **Chandra RK, Seth V, Chandra S:** Polymorphonuclear leucocyte function in malnutrition and the immune response. *Raven.Press New York. NY.* 1977:271.
23. **Arbo A, Pavia N, Santos JI:** Phagocyte function in malnourished children. in press.
24. **Chandra RK Chandra S, Ghai OP:** Chemotaxis random mobility and mobilization of polymorfonuclear leucocyte in malnutrition. *J.Clin.Path.* 1976;29:224-227.
25. **Chandra RK:** Nutrition as critical determinat in susceptibility to infection. *World.Rev. Nutr.Diet.* 1976;15:166
26. **Santos JI:** Nutrition infection and Immunocompetence. *Infect.Dis.Clin. of North.Am.* 1994;8:1:243-267.
27. **Soria, R, Arbo S, Basurto C and Santos JI:** Capacidad de reconocimiento ópsonico de neutrófilos poliformonucleares de niños con desnutrición. *Bol. Med. Hosp. Infant. de Méx.* 1990. 76:607-611.

28. **Soria C:** Expresión de receptores Fc RIII, CR1 y CR3 en neutrófilos polimorfonucleares de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda. *Tesis de Maestría en Ciencias Medicas Universidad Nacional Autónoma de México.* 1995.
29. **Carr R, Davies JM:** Abnormal FcRIII expresión by neutrofilis from very preterm neonates. *Blood.* 1990;76:607-611.
30. **Johnston RB Jr:** Current Concepts: Monocytes and Macrophages. *N.Engl.J.Med.* 1988;318:747-752.
31. **Nathan, CF Murray HW and Cohn ZA:** The Macrophage as an effector cells. *N. Engl.J.Med.* 1980;303:622-626.
32. **Unkeless, JC:** Function and Heterogeneity of Human Fc receptors for Immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* 1989;83:355.
33. **Unanue ER:** Macrophages antigen-presentating cells and phenomenon of antigen handling and presentation. In *Fundamental Immunology*, 2nd edn (ed. W. Paul). 1989;95-115.
34. **Schlesinger LB, Bellinger-Kawahara GG, Payne NR and Hordwitz MA:** Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by monocyte complement receptors and complement component C3. 1990. *J. Immunol.*;144:2771-80.
35. **Silverstein SC, Greenberg S, Di virgilio F, and Steinberg TH:** The Phagocytosis: In *Fundamental Immunology* (ed. W. Paul). Raven. Press, New York. 1989.
36. **Andrew PW, Jackett PS and Lowrie DB:** Killing ligand degradation of microorganism by macrophages: In *Mononuclear phagocytes: Physiology and Pathology* (ed TR Dean and W Jessup) Elsevier. New. York. 1985.

37. **Stossel TP**: The mechanical responses of white blood cells: In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (ed *J.I. Gallin IM Goldstein and Snyderman*) Raven Press. 1988.
38. **Jeffrey P**, Ravecht and Jean Pierre K: Fc Receptors. *Ann. Immunol.* 1991, 217:427-92.
39. **Law, BK**: C3 receptors on macrophages. *J. Cel. Sci.* 1988; 9 Suppl. 67-97.
40. **Gabign TG**, and Babior BM: The killing of pathogens by phagocytes. *Ann. Rev. -Med.* 1981; 32:318-26.
41. **Griffin FM**, Griffin JA and Silverstein SC: Studies on the mechanism of phagocytes II. The interaction of macrophage with anti-immunoglobulin IgG coated bone marrow derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1976; 144:788-809.
42. **Aderem AA**, Wright SD, Silverstein SC and Cohn ZA: Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 1985; 161:617-22.
43. **Snyderman R**, and Fudman EG: Demonstration of chemotactic factor receptor on macrophages. *J. Immunol.* 1980; 124:2754-7.
44. **Snyderman R** and Uting RJ: Phagocyte cells, stimulus-response coupling: Basic Principles and Clinical correlates (ed *J.I. Gallin IM, Goldstein and R Snyderman*) Raven Press. New York. 1988.
45. **Portonoy DA**, Jacks and DJ, Hinrichs: Role of the hemolysis for intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 1988; 167:1459-1471.

46. **Ley V**, Andrew NW, Robbins ES and Nussenzweig V:  
Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* stain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 1988;168:649-59.
47. **Shurin SB** and Stoseel TP: Complement (C3) activated phagocytosis by lung macrophages. *J. Immunol.* 1978;120:1305-12.
48. **Armstrong, JA** and Darcy Hart. P: Response of 92 cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 1975;134:713-40.
49. **Alpuche Aranda Celia M**, Racoosin LE Swanson JA and Miller: *Salmonella* Stimulate Macrophage Spacious Phagosomes. *J. Exp. Med.* 1994:179:601-608
50. **Thorne JKI**, Oliver RC and Barret AJ: Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases. *Infect. Immun.* 1976;14:555-63.
51. **Babior BM**: The Respiratory burst of Phagocytes. *J. Clin. Invest.* 1984;73:599-601.
52. **Klebanoff SJ**: Phagocytes cells: Products of oxygen metabolism. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (ed JI Gallin IM. Goldstein and Snyderman) Raven Press New York. 1988.
53. **Ward PA**, Warren JS, and Johnson KJ. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 1988;5:403-8.
54. **Mc Phail LC**, and Snyderman R: Activation of respiratory enzyme in human polymorfonuclear leucocytes by chemoattractants and other soluble stimuli evidence that

oxidase activated by different transductional mechanisms. *J.Clin.Invest.* 1983;72:192-200.

55. **Wright SD** and Silvertstein SC: Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic from human monocytes. *J.Exp. Med.* 1983;158:2016-23.

56. **Papadimitriou JM** and Ashaman RR: Macrophage current view on their differentiation structure and function. *Ultrastruct.Path.* 1989;13:343-72.

57. **Kemmerich B**, Rossing TH and Pennington JE: Comparative oxidative microbicidal activity of human blood monocytes and alveolar macrophages and activation by recombinant gamma interferon. *Am.Rev.Res.Dis.* 1987;266-9.

58. **Johnston RB**: Enhancement of phagocytosis-associated oxidase metabolism as a manifestation of macrophage activation. *Lymphokines.* 1981;3:33-56.

59. **Samuelson B**, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammartrom S, and Malmsteim C: Prostaglandins and Tromboxanes. *Ann. Rev. Biochemis.* 1978;47:977-1079.

60. **Stefan HE**, Kaufman: Immunity to intracellular bacteria. *Ann.Rev. Immunol.* 1933;11:129-163.

61. **Nathan CF**: Secretory products of macrophages. *J.Clin.Invest.* 1987;79:319-26.

62. **Elsbach, Pand Weiss J**: Phagocyte cells oxygen independent antimicrobial system: In Inflammation Basic Principles and clinical correlates (ed. *J.I Gallin IM Goldstain and R Snyderman*) Raven New York. 1988.

63. **Adams DO** and **Hamilton TA**: The cells biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 1984;283:318.
64. **Mc Cawley JL**, **Korchak MH** et al: Interferon- correlates the will respiratory burts defect in vitro in Monocyte Derived Macrophages from glycogen Storage Disease Type 1b Patients. *Pediatr. Res.* 1993;34:3:265.
65. **Becherman HP**, **Rogers HW** **Carbett JA**, **Schreiber RD**, **Mc Daniel ML**, **Unanue ER**: Release of nitric oxide during the cells-independent pathway of macrophage activation its role in resistance to *Listeria monocytogenes*; Roles of reactive oxygen or nitrogen intermediates, rate phagocytosis and retention of bacteria in endosomas. *Clin. Exp. Immunol.* 1992;88:492-498.
66. **Buxton IL**, **Cheek DJ**, **Echkman D**, **Westfall DP**, **Sanderskm Keef KD**: NG-nitro-L-Arginine Methylester and other Alkyl esters of Arginine are muscarinic receptor antagonists. *Cir. Res.* 1993;73:387-395.
67. **Leibovitch SJ**, **Polverini PJ**, **Fong TW** **Harlow LA**, **Koch AE**: Production of angiogenic activity by human monocytes requieres and L-arginine/nitric oxide syntethase dependent effector mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91:4190-4194.
68. **Mc Neil RL**, **Tannasagran JB**, **Meigs** and **Taylor** Acidification of phagosomas iniciated before lysosomal enzyme activity is detected. *J. Cell. Biol.* 1983;97:692-702.
69. **Leher RI**: The fungicidal mechanism of human monocytes I. Evidence for mieloperoxidase-linked and mieloperoxidase

independent candidicidal mechanisms. *J. Clin. Invest.* 1975;55:338-46.

70. **Lehrer RI** and **Cline MJ**: Leucocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J. Clin. Invest.* 1969;48:1478-88.

71. **Dale DC**: Granulocyte colony-stimulating factor in infectious disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1993;63:363-373.

72. **Dale DC**: Granulocyte colony-stimulating factor in infectious disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1993;63:363-373.

73. **Klasing Kirk C**: Nutritional Aspects of Leukocyte Cytokines. *J. Nutr.* 1988;118:1436-46.

74. **Hackett SP**, **Stevens DL**: Streptococcal toxic shock syndrome: Synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 by monocytes stimulated with pyrogenic exotoxin A and streptolysin O. *J. Infect. Dis.* 1992;165:879-885.

75. **Gallay P**, **Barras C**, **Tobias PS**, **Clandra T**, **Glauser MP**, **Heumann D**: Lipopolisaccharide (LPS)-binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS. *J. Infect. Dis.* 1989;215:216-22.

76. **Tsukaguchi K**, **Yoneda T**, **Yoshikawa M**, **Narita et**: Interaction between interleukin 1 and TNF necrosis factor production by peripheral blood monocytes and nutritional disturbance in active pulmonary tuberculosis. *Kekakku.* 1991;66(7):477-84.

77. **Braley SF.** & Kauffman CA: Protein malnutrition and febrile response in the Fisher rat. *J. Leukocyte Biol.* 1988;43:36-40.
78. **Hoffman-Goetz L,** Mc Farlane D, Bristrian BR & Black Burn GL: Febrile and plasma iron response of rabbits injected with endogenous pyrogen from malnourished patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981;34:1109-1116.
79. **Bhaskaram P** & Sivakumar B: IL-1 Malnutrition. *Arch. Dis. Child.* 1986;61:182-85.
80. **Bell R** & Hoffman-Goetz L: Effect and protein deficiency on endogenous pyrogen-mediated acute phase protein response. *Cand. J. Physiol. Pharmacol.* 1983;61:376-80.
81. **Drabik MD,** Schnure FC, Mok KT, Moldawer LL, Dinarello CA, Blackburn GL & Bistrain BR: Effect of protein depletion and short-term parenteral refeeding on the host response to interleukin 1- administration. *J. Clin. Med.* 1987;109:509-516.
82. **Nimmanwudipong T,** Cheadlewg, Appel SH, Polk HC: Effect of protein malnutrition and immunomodulation on immune cell populations. *J. Surg. Res.* 1992;52:3:233-8.
83. **Santos JI,** García Lloret MI, Arbo A et al: Farmacomodulación de la respuesta inflamatoria en la desnutrición. *Rev. Infect. Microb. (ed esp).* Jul, 1992 p17.
84. **Shawn J,** Skerrelt Herderson WR: Alveolar macrophage function in rats with severe protein calorie malnutrition. Arachidonic Acid metabolism Cytokine Release an antimicrobial Activity. *J. Immunol.* 1989;144:1052-1061.

85. Flores HS, Villalpando S, Fajardo GA: Evaluación antropométrica del estado de nutrición de los niños. Procedimientos y estandarización y significado. *Bol. Med. Hosp. Inf. de Méx.* 1990;47:10:725-735.
86. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by centrifugation and granulocytes by combination centrifugation and sedimentation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968;21(97S):77-91.
87. Tennant JR: Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation.* 1964;2:685.
88. Nakagura Akira and Nathan CF: A simple Method for Counting Adherent Cells: Application to cultured Human Monocytes, Macrophages and Multinucleated Giant Cells. *J. Immun. Meth.* 1983;56:261-268.
89. Yam LT, Licy Crosby WH: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 1971;55:283.
90. Brown BA: In Hematology: Principles and Procedures. ed Lea and Febiger, Philadelphia, 1984, pp 127-130.
91. Muller-Peddinghaus R: In vitro determination of phagocyte activity by luminol and lucigenin-amplified chemiluminescence. *Int. J. Immunopharmacol.* 1984;6:455.
92. Reilstab Philipp and Shcaffner Andres: Endotoxin suppresses the generation of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by "resting" and lymphokine-activated human blood-derived macrophages. *J. Immunol.* 1989;142:2813-2820.

93. **Albrecht D** and **Jungi TW**: Luminol-enhanced Chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1993;54:300-305.
94. **Nathan CF**, **Murray HW**, **Wiebe ME**, **Rubin BY**: Identification of interferon gamma as the lymphokine that activated human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 1983;158:670-689.
95. **Peck R**: A one Plate Assay for Macrophage Bactericidal Activity. *J. Immun. Meth.* 1985;82:131-140.
96. **Siegel Sidney**: Estadística no paramétrica: Aplicada a las ciencias de la conducta. Ed. trillas 1991 pp 199.
97. **Murray M**, **CH**, **Jaungbhani CF**, **Nathan and ZA**: Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity II. The role of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 1979;150:950.
98. **Garre MA**, **Boles JM**, **Youinoupy**: Current concepts in immune of arrangement in due to under nutrition. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 1987;11:3:309-313.
99. **Keusch GT**, **SD Douglas G**, **Hammer** and **K Braden**: Antibacterial functions of macrophage in experimental protein calorie malnutrition II. Cellular and Humoral factors for chemotaxis phagocytosis and intracellular bactericidal. *J. Infect. Dis.* 1978;138:134.
100. **Redmond et al**: Impaired Macrophage Functions in Severe Protein-Energy Malnutrition. *Arch. Surg.* 1991;126:192-196.

101. **Martin TR**, L Altman and OF Alvarez: The effects of severe protein calorie malnutrition on antibacterial defense mechanism in rat lung. *Am.Rev. Resp. Dis.*1983;128:1013.
102. **Jakab GJ** GA Warr, and CL Astry: Alterations of pulmonary defense mechanism by protein depletion diet. *Infect. Immun.*1981;34:610.
103. **Moriguchi S**, S Sone, and Kischino: Changes of Alveolar macrophage in protein-deficient rats. *J. Nutr.*1983;113:40.
104. **Cooper WC**, RA Good, and T Mariani: Effects of protein insufficiency on immune responsiveness. *Am.J.Clin.Nutr.*1974;27:647.
105. **Douglas SD**, Shoffer K: Phagocytic function in protein calorie malnutrition. *Clin. Exp.Immunol.*1974;74:121-128.
106. **Keusch GT**, Douglas SD Braden K et al: Antibacterial functions of macrophages surface IgG receptors. *J. Infect.Dis.*1978;138:125-133.
107. **Shennib H**, RC J Chiu DS, Muldler and JO Lough: Depression and delayed recovery of alveolar macrophage functions starvation and refeeding. *Surg.Gynecol. Obstet.*1981;158:535.
108. **Elsbach P**, Weiss JA: Revaluation of roles of the O<sub>2</sub> dependent and O<sub>2</sub>-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev.Infect.Dis.*1983;5:848-853.
109. **Martin JH** & Edwards SW: Interferon-enhances monocyte cytotoxicity via enhanced reactive oxygen intermediate production. Absence of effect macrophage cytotoxicity is due to failure to enhance reactive nitrogen intermediate production. *Immunol.*1994;81:592-597.

110. **Reynolds JV**, Johnston R Jr: Impairments of macrophage activation and granuloma formation by protein deprivation in mice. *Cell. Immunol.* 1992;139:2:493-504.
111. **Suskind RM**: Malnutrition and the Immune Response. Raven Press. New York. 1997, p 1.
112. **Petro TM**, and JK Bhattacharjes: Effect of dietary essential amino acid limitations upon the susceptibility to *Salmonella typhimurium* and the effect. *Infect. Immun.* 1981;32:251.
113. **Bhaskaram P**: Macrophage functions in severe protein energy malnutrition. *Indian J. Med. Res.* 1980;71:247.
114. **Kauffman A Carol**, Bradley: Effect of protein malnutrition on Salmonellosis and Fever. *Infect. Immun.* 1987;56:1000-1002.
115. **Alpuche CM**, Pavia NM, Arbo A et al: The effect of acute starvation on macrophage functions and host susceptibility to *Salmonella typhimurium* infection IV. Congress, Asoc, Panamericana de Infectología. Febrero p 21. 1989, Caracas Venezuela.
116. **Beisel WR**: Synergism and Antagonism of parasitic Diseases an Malnutrition. *Rev. Infect. Dis.* 1982;4:746.
117. **Hibbs JB**, Zednek Vauverin and Taintor: L- arginine is requiered for expression of the activity macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 1987;138:550-565.

*XIII. CUADROS TABLAS Y FIGURAS*

CUADRO 1

RESPUESTA INMUNE EN DESNUTRICION

GELULAS INMUNES Y/O COMPONENTES	FUNCIONES	ACTIVIDAD
<i>Linfocitos T</i>	<i>Respuesta celular</i>	<i>disminuida</i>
<i>linfocitos B</i>	<i>Anticuerpos</i>	<i>Normales ó aumentadas</i>
<i>IgA Secretora</i>	<i>Producción</i>	<i>disminuida</i>
<i>Complemento</i>	<i>componentes C3 y factor B</i>	<i>variables niveles</i>
<i>Fagocitos PMN</i>	<i>QUIMIOTAXIS FAGOCITOSIS RECEPTORES FC MECANISMOS MICROBICIDAS PRODUCCION DE CITOCINAS (IL-1)</i>	<i>disminuida disminuida bajos disminuidos</i>
<i>Macrófagos</i>	<i>PRESENTACION DE ANTIGENO</i>	<i>bajos deficiente</i>

\* Modificado de Beisel, Chandra, y Raymond  
J.Nutr. 1994 ; Arch.Surg. 1991 ; Rev.Infect.Dis, 1982

**CUADRO 2**  
**FUNCION DE PMN EN NIÑOS CON DESNUTRICION SEVERA**

<i>FUNCION</i>	<i>EUTROFICOS</i>	<i>DESNUTRIDOS</i>	<i>SIGNIFICANCIA</i>
<i>Adherencia (%)</i>	<i>69.9 : 14.1</i>	<i>86.2 : 5.6</i>	<i>P&lt;0.001</i>
<i>Quimiotaxis (um)</i>	<i>101 : 5.19</i>	<i>87.0 : 6.19</i>	<i>P&lt;0.05</i>
<i>Reducción de NBT (DO)</i>	<i>0.463 : 0.02</i>	<i>0.367 : 0.03</i>	<i>P&lt;0.01</i>
<i>Capacidad Bactericida (UFC)</i>	<i>2.16 : 0.18</i>	<i>1.70 : 0.13</i>	<i>P&lt; 0.05</i>

*Santos JI. Nutrition, Infection and Immunocompetence*  
*Infectious Dis. Clinics of N.A. 1994,8:253*

TABLA 1  
 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES  
 INCLUIDOS EN ESTE ESTUDIO

	NO INFECTADOS		INFECTADOS	
	EUTROFICOS		EUTROFICOS	DESNUTRIDOS
No. de pacientes	15		15	15
Edad (meses)	16.4 : 6.4		15.7 : 7.5	14.4 : 6.1
Peso (Kg)	12.5 : 0.5		11.0 : 0.3	5.4 : 0.2
<i>Desn.3er grado *</i>	-	-	-	15
<i>Inf.Vias.Resp.Bajas</i>	-	-	12	11
<i>Abscesos múltiples</i>	-	-	1	-
<i>Meningitis bacteriana</i>	-	-	1	1
<i>Diarrea</i>	-	-	-	3
<i>Celulitis periorbitaria</i>	-	-	1	-

\* *Desnutrición conforme las Tablas de NCHS y los criterios de Waterlow*

TABLA 2

ACTIVIDAD BACTERICIDA POR REDUCCION DE MTT Y U.F.C.  
EN MACROFAGOS DE EUTROFICOS SANOS\*

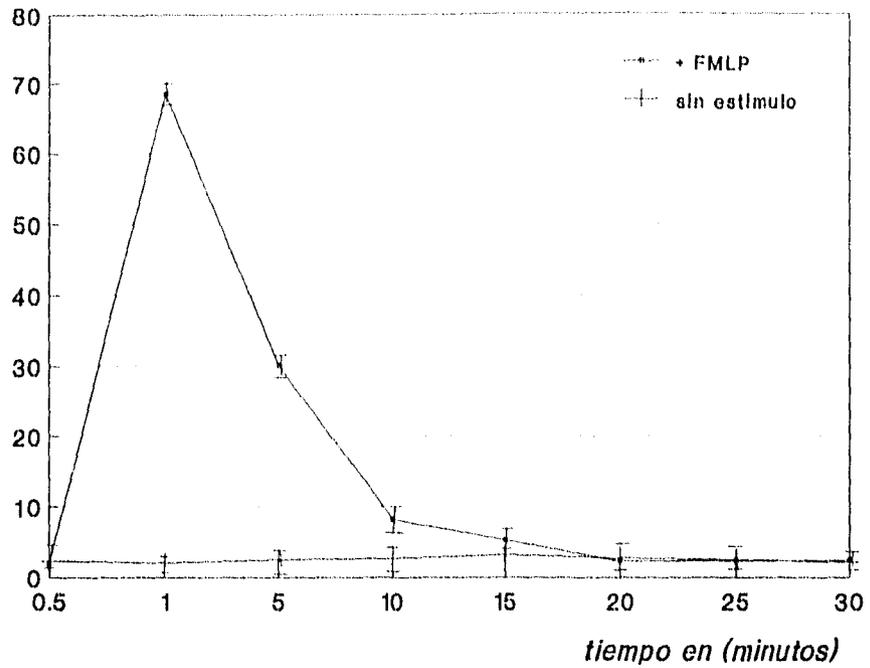
Microorganismos	Conteo de colonias U.F.C./ml		%	Reducción de MTT Abs. a 650 nm		
	t0	t90		t0	t90	%
<i>S.aureus</i> ATTC <sup>oo</sup> 2593	1.5 X 10 <sup>8</sup>	1.5 X 10 <sup>5</sup>	99.3	.689	.014	97.9
<i>S.typhimurium</i> wt <sup>o</sup> ATCC 14028	2.8 X 10 <sup>8</sup>	2.0 X 10 <sup>8</sup>	28.5	1.210	.907	25.0
<i>K.pneumoniae</i> K8 <sup>ooo</sup>	1.0 X 10 <sup>7</sup>	4.5 X 10 <sup>6</sup>	45	1.090	.436	40.0

\* Los resultados representan el promedio de muestras por duplicado en n=5

<sup>oo</sup> p<0.001 Wilcoxon  
<sup>ooo</sup> p<0.001

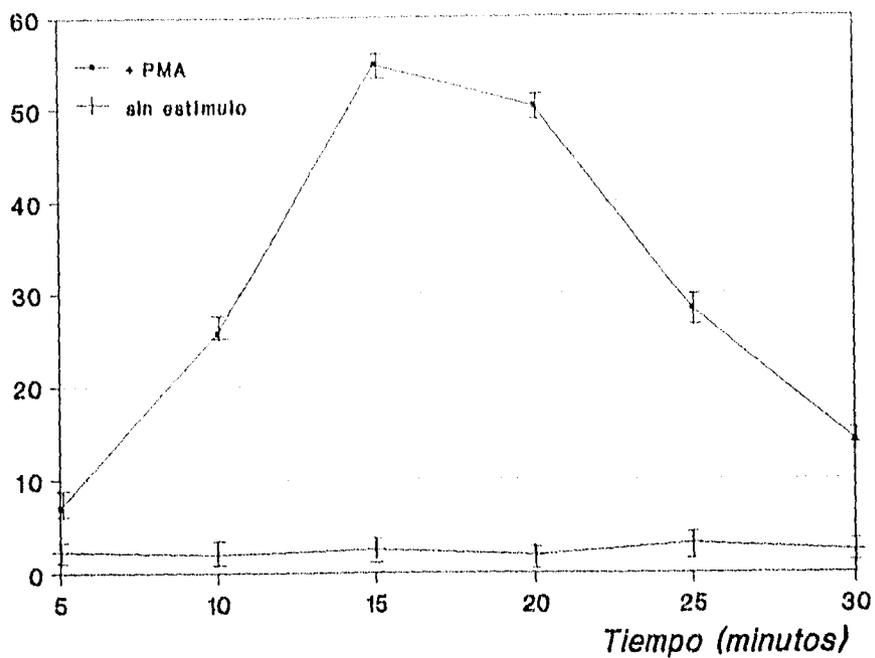
<sup>o</sup> NS : No significativa

Quimioluminiscencia (mv) X 100,000 células/ml

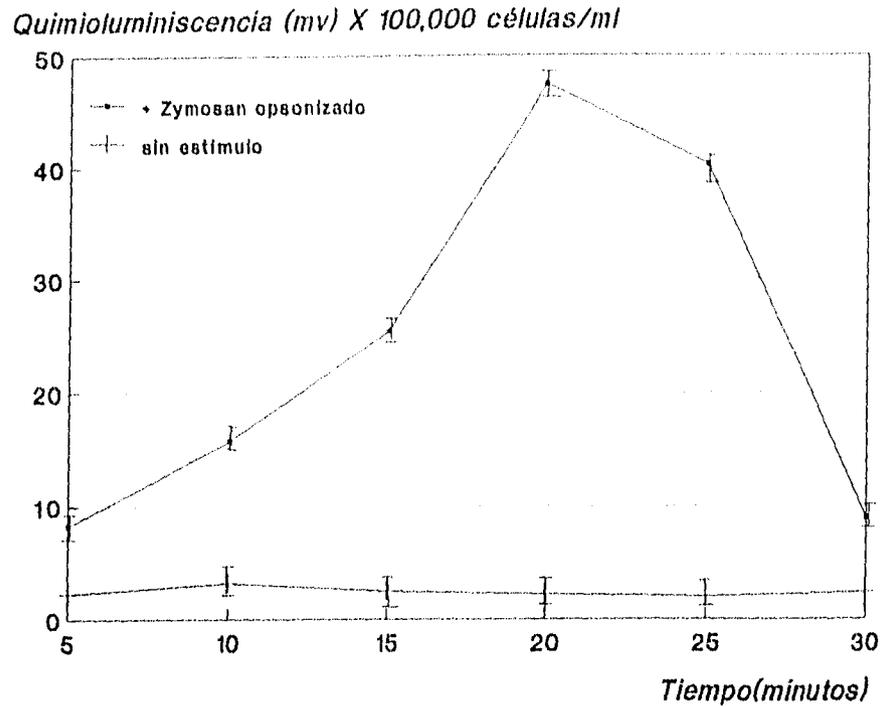


**FIGURA 1A. RESPUESTA QUIMIOLUMINISCENTE A LA ESTIMULACION CON FMLP**  
Se muestra la cinética en el metabolismo oxidativo de macrófagos en respuesta al estímulo del péptido FMLP  $10^{-6}$  M. Cada punto representa el pico de quimioluminiscencia; E.E.S. de muestras por duplicado en un total de 10 niños eutróficos.

Quimioluminiscencia (mv) X 100,000 células

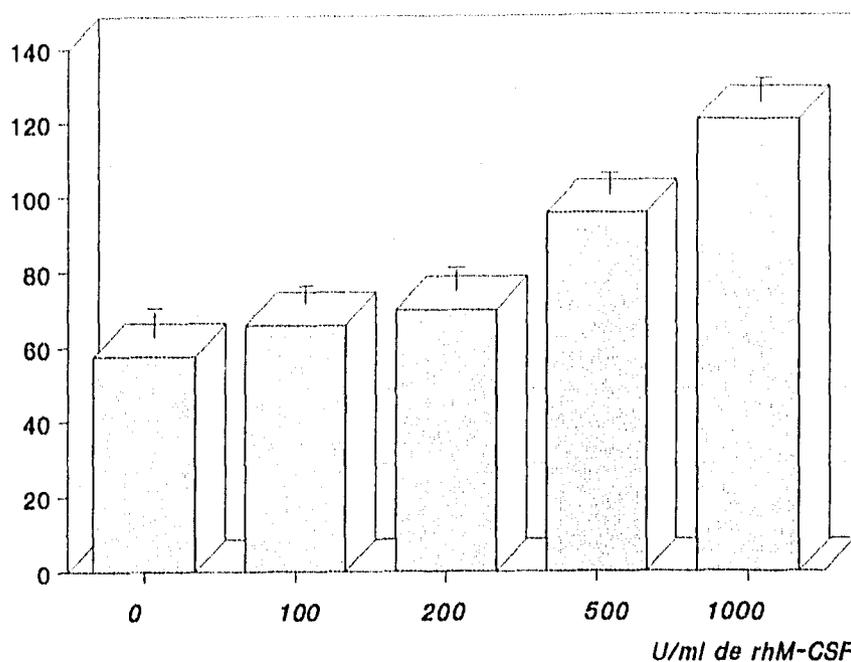


**FIGURA 1B. RESPUESTA QUIMIOLUMINISCENTE A LA ESTIMULACION CON PMA.** El metabolismo oxidativo en respuesta al estímulo soluble de PMA en macrófagos alcanza el pico máximo a los 15 minutos y disminuye a los 25 minutos . Cada punto representa el pico de quimioluminiscencia: E.E.S. de muestras por duplicado de 10 niños eutróficos evaluados.



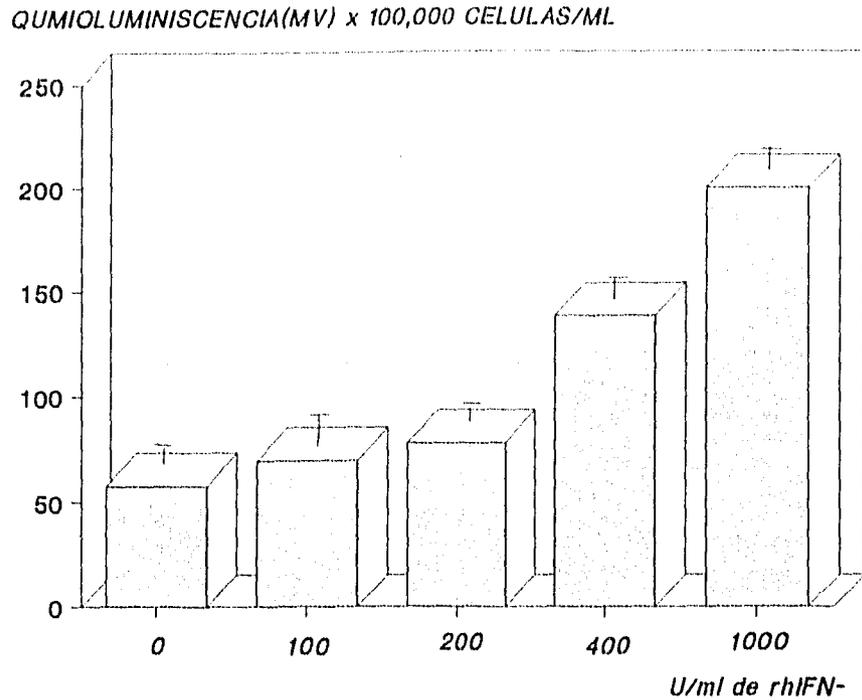
**FIGURA 1C. RESPUESTA QUIMIOLUMINISCENTE A LA ESTIMULACION CON ZYMOSAN OPSONIZADO.** En la gráfica esta indicado el pico de quimioluminiscencia inducido en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica que fueron estimulados con Zymosan. La cinética en el metabolismo oxidativo es más retardada, alcanzándose el pico a los 20 minutos.

QUIMIOLUMINISCENCIA (MV) x 100,000 CELULAS/ML



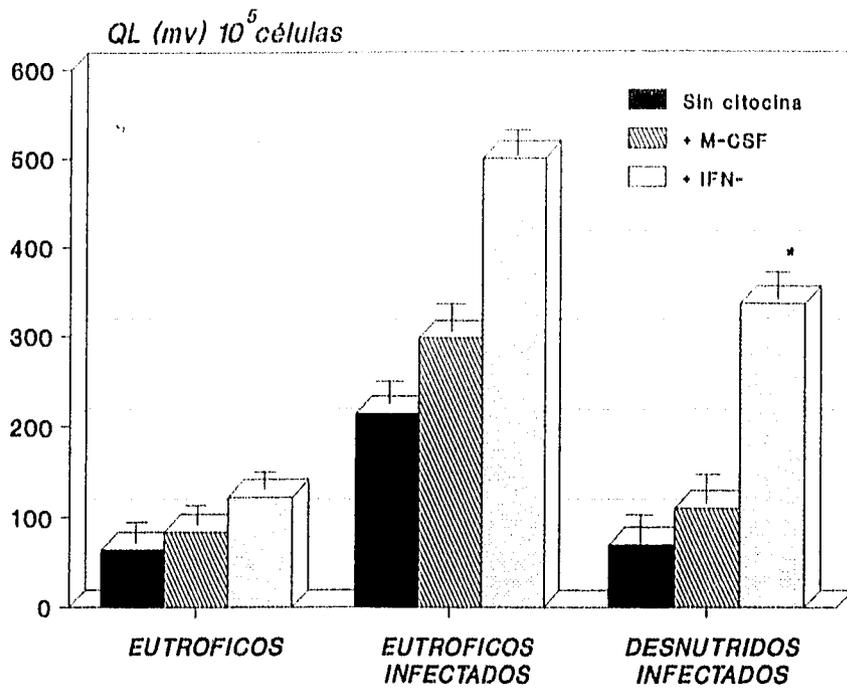
**FIGURA 2A. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE M-CSF SOBRE LA QUIMIOLUMINISCENCIA DE MACROFAGOS A LA ESTIMULACION CON FMLP.** Monocapas de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica se trataron con distintas concentraciones de M-CSF recombinante y posteriormente se estimularon con FMLP, encontrándose diferencias significativas a concentraciones de 500 y 1000 U/ml de esta citocina.

\*  $P < 0.001$  con citocina (U de Wilcoxon).



**FIGURA 2B.EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IFN- EN LA QUIMIOLUMINISCENCIA DE MACROFAGOS A LA ESTIMULACION CON FMLP. Los macrófagos se incubaron con IFN- recombinante por 48 horas y después se se evaluo la respuesta quimioluminiscente.Se encontraron diferencias significativas a 400 y 1000 U/ml.**

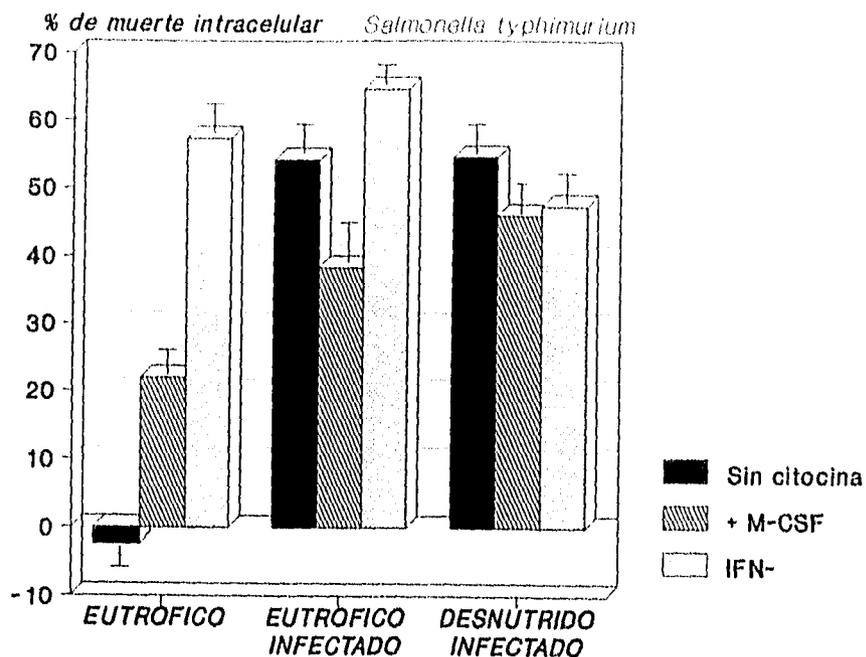
**\* P< 0.001 con citocina (U de Wilcoxon).**



**FIGURA 3. EFECTO DE M-CSF e IFN- EN EL METABOLISMO OXIDATIVO DE MACROFAGOS.** Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.S. de la respuesta quimiluminiscente de macrófagos estimulados con y sin citocina de los grupos de estudio.

\*  $P < 0.001$  eutrófico vs desnutrido

\*\*  $P < 0.001$  vs control sin citocina (Friedman)



**FIGURA 4. ACTIVIDAD BACTERICIDA DE MACROFAGOS CONTRA *Salmonella typhimurium*** En esta figura se representa el porcentaje de bacterias muertas : el E.E.S evaluado por la reducción de MTT para los grupos de estudio. Las monocapas de macrófagos se infectaron in vitro con *Salmonella typhimurium* en una relación de 20 bacterias por macrófago.

•  $P < 0.01$  desnutrido vs eutrófico infectado