

11262

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado

2e)

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GOMEZ"

EFFECTO *In Vitro* DEL EXTRACTO DE *Staphylococcus aureus* SOBRE
LA QUIMIOTAXIS DE LAS CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE
NIÑOS CON ASMA BRONQUIAL E INFECCIONES RECURRENTES
DE VIAS AEREAS SUPERIORES

TESIS DE POSGRADO
Para obtener el grado académico de
MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

Presenta

Nelly Cisneros González

Asesor: Dr. Salvador Martínez-Cairo Cueto
Coasesores: Dr. José Ignacio Santos Preciado
Dr. Juan José L. Sierra Monge

México D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

Oi.No. 011/LBB/MEMK/II/96.

DR. ENRIQUE BAZUA RUEDA
Coordinador General de Estudios
de Posgrado, U.N.A.M.
Presente

At'n: Unidad de Registro e Información.

Informo a usted que el (la) C. NELLY CISNEROS GONZALEZ
aspirante al grado de MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS
con la tesis titulada "Efecto In Vitro de extracto completo de Staphylococcus aureus sobre la quimiotaxis de las células polimorfonucleares de niños con asma bronquial e infecciones crónicas recurrentes de vías aéreas superiores"

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

PRESIDENTE:	DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO
SECRETARIO:	DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA
PRIMER VOCAL:	DR. SALVADOR MARTINEZ-CAIRO CUETO
SEGUNDO VOCAL:	DR. JUAN JOSE L. SIERNA MONGE
TERCER VOCAL:	DR. JOSE RAMON PANIAGUA SIERRA
SUPLENTE:	DR. JOSE DANTE AMATO MARTINEZ
SUPLENTE:	DRA. NORIS MARLENE PAVIA RUZ

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 22 de febrero de 1996.

Vo. Bo

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

Vo. Bo.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
Director de la Facultad
de Medicina

11267
28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MEDICAS

**"Efecto *in vitro* del extracto de *Staphylococcus aureus*
sobre la quimiotaxis de las células polimorfonucleares de niños
con asma bronquial e infecciones recurrentes de vías aéreas
superiores"**

**AUTOR: DRA. NELLY CISNEROS GONZALEZ
ASESOR: DR. SALVADOR MARTINEZ-CAIRO CUETO
COASESORES: DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO
DR. JUAN JOSE L. SIENRA MONGE**

**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GOMEZ"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

INDICE

<i>RESUMEN</i>	3
<i>INTRODUCCION</i>	4
<i>GENERALIDADES</i>	4
<i>MATERIAL Y METODO.</i>	12
<i>METODO</i>	14
<i>ANALISIS ESTADÍSTICO</i>	18
<i>RESULTADOS</i>	19
<i>DISCUSION</i>	21
<i>REFERENCIAS</i>	27
<i>A N E X O S</i>	34

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar el efecto del extracto de *Staphylococcus aureus* Cowan I *in vitro* en la respuesta quimiotáctica de las células polimorfonucleares (PMN) de niños asmáticos con infecciones recurrentes de vías aéreas superiores.

MATERIAL Y METODOS: Se midió la migración al azar y la estimulación de la quimiotaxis en PMN con *Staphylococcus aureus* Cowan I y C5a en un grupo de 41 niños asmáticos con infecciones recurrentes de vías aéreas superiores, teniendo como grupo control a PMN de 10 niños sanos. Los PMN de ambos grupos se incubaron con extracto de *Staphylococcus aureus* Cowan I, C5a para medir quimiotaxis y solución de Hank para medir la migración al azar.

Análisis estadístico: se utilizaron pruebas no paramétricas de Friedman, Wilcoxon y U de Mann-Whitney.

RESULTADOS: El promedio de la medición para la migración al azar de los PMN del grupo en estudio fue de $23.8 \pm 6.1 \mu\text{m}$, y de $46 \pm 7.1 \mu\text{m}$, para el grupo control, con una diferencia estadística significativa. ($p < 0.001$) Con respecto a la quimiotaxis con *Staphylococcus aureus* y C5a en ambos grupos no existió diferencias significativa siendo el promedio para C5a en el grupo de enfermos de $91 \pm 21.3 \mu\text{m}$ y de $92 \pm 13.1 \mu\text{m}$ para el grupo de sanos y para el extracto bacteriano de $97 \pm 22.4 \mu\text{m}$ para los enfermos y de $92 \pm 18.3 \mu\text{m}$ para los sanos.

CONCLUSIONES: Existió una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos con respecto a la migración al azar, pero al agregar el estímulo la respuesta en ambos grupos fue similar es probable que existan otros mecanismos celulares que expliquen la frecuencia de presentación de las infecciones, que serán motivo de otras investigaciones al respecto.

INTRODUCCION

En la infección, los polimorfonucleares (PMN) participan en procesos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos. Estos pueden encontrarse afectados en forma general o particular, estas alteraciones pueden presentarse en forma congénita o adquirida.

Se ha intentado disminuir la morbilidad del asma bronquial por infecciones de vías aéreas superiores. Los pacientes asmáticos con infecciones recurrentes son resistentes al tratamiento convencional; esto se ha relacionado con defectos en los mecanismos de resistencia a las infecciones.

Algunos autores refieren que la utilización de extractos bacterianos, como el de *Staphylococcus aureus*, pueden disminuir la frecuencia de las infecciones asociados a las crisis asmáticas. Hasta el momento se han utilizado extractos bacterianos sin estudios controlados. Como antecedentes se conoce que los péptidos N-formil de las bacterias puede ser un importante factor quimiotáctico.

GENERALIDADES

Asma bronquial-Infección-Inflamación

El asma bronquial es una enfermedad de las vías respiratorias caracterizada por hiperreactividad bronquial, espasmo y edema traqueobronquial reversible espontáneamente o mediante medicamentos, en respuesta a diferentes estímulos alérgenos, sustancias químicas, microbios, medicamentos, etc.⁽¹⁾

El asma bronquial es la enfermedad crónica más frecuente en los niños. predomina dos veces mas en varones que en mujeres. Weitzman ⁽²⁾ refiere que la incidencia de asma en niños norteamericanos se ha incrementado más del 40%, y se ha reportado la prevalencia del 3.8% en menores de 17 años, y 7.6% de 6 a 11 años. ^(3,4) En México el grupo más afectados es el de los menores de 4 años. ⁽⁵⁾

Al asma bronquial se le ha clasificado en asma extrínseca o alérgica y asma intrínseca, provocada por agentes como medicamentos (ácido acetilsalicílico), estímulos físicos (aire húmedo, frío, ejercicio), irritantes químicos (ozono, bióxido de azufre) o infecciones de vías aéreas. ⁽⁶⁾

Estudios epidemiológicos realizados en grupos de niños asmáticos han demostrado que el asma alérgica o extrínseca es la más frecuente, (90% de los casos) y se controla con medidas ambientales o con hiposensibilización. ⁽⁴⁾

Se ha reportado que la cuarta parte de los niños con asma bronquial entre 1 y 8 años de edad, se relacionan con infecciones de las vías aéreas. ⁽⁷⁾

El 90% de las infecciones primarias de vías aéreas son de causa viral y el 10% o menos de causa bacteriana, los rinovirus causan del 8 al 10% de las nasofaringitis en los niños. De las bacterias las más frecuentes son *Streptococcus β hemolítico* y *Hemophilus influenzae B*. ⁽⁸⁻¹⁰⁾ (cuadro No. 1)

Las infecciones recurrentes se han relacionado con alteraciones en las funciones de los PMN y macrófagos, como la adherencia, migración o quimiotaxis, fagocitosis y actividad microbiciida intracélula. ⁽¹¹⁻¹⁵⁾

Los microorganismos causales de las infecciones producen factores quimiotácticos que son péptidos del grupo N-formil.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

Células polimorfonucleares

Se conoce que los PMN participan en los mecanismos de resistencia a infecciones bacterianas.

A partir de la descripción de la enfermedad granulomatosa crónica se sistematiza el estudio de la función de los PMN.⁽¹⁹⁾

Estas células derivan de células hematopoyéticas pluripotenciales localizadas en la médula ósea, que se identifican por una proteína de superficie (CD34+); su proliferación se regula por factores estimuladores de colonias producidos por macrófagos y linfocitos T.^(19,20)

La producción de los PMN se halla regulada por factores de crecimiento o citocinas que son glicoproteínas denominadas factores estimuladores de colonias (CSFs), interactúan con las células precursoras e inducen la proliferación^(21,22), crecimiento⁽²³⁾ y diferenciación celular^(24,25). Estas citocinas incluyen IL-1 que induce la producción de factor estimulador de colonias granulocito-macrófago granulocito, el factor estimulador de colonias de granulocito (GM-CSF y G-CSF), así como de la IL-3.⁽²⁶⁾

El desarrollo y maduración de los neutrófilos ocurre en dos fases una fase mitótica y una no mitótica, cada una de las cuales dura aproximadamente 1 semana. Durante la primera los mieloblastos maduran a promielocitos y mielocitos, proceso que se acompaña de la aparición de los gránulos citoplasmáticos de los PMN; la

fase no mitótica incluye el desarrollo de metamielocitos, neutrófilos en banda y neutrófilos segmentados o maduros. (Figura No. 1)

La presencia de receptores Fc para el proceso de fagocitosis inmune es en la etapa promielocítica; los receptores del complemento (CRI y CR3) aparecen en la etapa metamielocítica y de neutrófilo en banda. La capacidad bactericida se establece a partir de la etapa mielocítica y es mediada por mecanismos no oxidativos.⁽²⁶⁾

Los mecanismos microbicidas oxidativos y función quimiotáctica de los PMN aparecen en la etapa de neutrófilos en banda.(Figura No. 2)

El número de PMN es diferente de acuerdo a la edad:

Número de leucocitos y PMN totales por edades

Edad	Leucocitos totales (10 ⁶)		PMN (10 ⁶)		
	Media	Limites	Media	Limites	%
Al nacer	18.1	(9.0-30.0)	11.0	(6.0-26.0)	61
12 hrs	22.8	(13.0-38.0)	15.5	(6.0-28.0)	68
24 hrs	18.9	(9.4-34.0)	11.5	(5.0-21.0)	61
1 semana	12.2	(5.0-21.0)	5.5	(1.5-10.0)	45
2 semanas	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(1.8-8.0)	54
16 años	7.8	(4.5-13.0)	4.4	1(1.8-8.0)	57

Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso biológico que realizan las células PMN para la eliminación de microorganismos o partículas extrañas y se han descrito los siguientes eventos: adherencia, quimiotaxis, interiorización mecanismos microbicidas; sucede tras la invasión a los tejidos por bacterias, hongos y otros microorganismos.⁽²⁷⁾ (Figura No. 3)

Adherencia

La migración y la adherencia al endotelio vascular, constituyen los eventos en el proceso fagocítico. La invasión bacteriana o la necrosis tisular inician la liberación de factores quimiotácticos, para los PMN, con el efecto de incrementar la adherencia vascular de las mismas. Este fenómeno es mediado por las glicoproteínas de superficie o moléculas de adhesión: C3bi ó CR3 y LFA-1 (Factor de adherencia de linfocitos tipo I), p150,95.^{27,28)} (Figura No. 4).

Quimiotaxis

La acumulación de células inflamatorias en los focos infecciosos es resultado de la migración dirigida de PMN y macrófagos denominada quimiotaxis. Este proceso es realizado por tres mecanismos: a) un mecanismo de reconocimiento a través de receptores sensoriales por los que las células detectan la presencia de quimioatrayentes, y por sus gradientes de densidad se determina la direccionalidad de la migración celular, b) un mecanismo transductor de la membrana por el que la información de dirección se transforma; en esta fase, ante el estímulo de factores quimioatrayentes, se produce polarización celular y

redistribución de los receptores de membrana, y c) un mecanismo de movimiento celular dirigido. La velocidad de las células está determinada por la velocidad de la polimerización del citoesqueleto y la membrana.⁽²⁷⁾

La quimiotaxis implica un movimiento con dirección, a partir del movimiento al azar o también llamado quimiocinesis,⁽²⁸⁾ esta migración dirigida es regulada por gradientes de concentración de factores quimiotácticos que incluyen C5a, producto de la ruptura de C5 durante la activación de la cascada de complemento (C5 C5a_{des arg} C3a), leucotrieno B₄ (LTB₄), producto del metabolismo vía lipoxigenasa del ácido araquidónico, factor activador de plaquetas (PAF) citocinas y productos de la síntesis proteica de bacterias como N-formil péptidos.^(29,30)

La polaridad, adhesividad de la membrana celular, y otras propiedades biofísicas de la célula como la polimerización de las proteínas del citoesqueleto y la secreción de componentes granulares del retículo endoplásmico contribuyen a la respuesta de quimiotaxis.⁽³¹⁾

Los PMN son capaces de detectar y de migrar direccionalmente en respuesta a pequeños gradientes quimiotácticos. Se conoce que estas células pueden diferenciar gradientes tan pequeños como del 0.1% a través de su superficie.⁽³²⁾

Así mismo, se ha demostrado que se liberan productos de los leucocitos al ambiente pericelular y dan lugar a la degradación de quimioatrayentes, esto sumado al aclaramiento de los mismos a nivel de los receptores ocupados (proceso de endocitosis del receptor unido al ligando), contribuye también a la regulación de la migración de PMN al sitio de inflamación.⁽³³⁾

La unión entre el quimioatrayente y el receptor en la superficie del PMN es un evento que ocurre en menos de 30 segundos. Concentraciones a saturación de N-formilpéptido ocupan el 50% de los 50,000 a 70,000 receptores específicos disponibles de PMN. Esta unión da como resultado el desencadenamiento del flujo intracélular de calcio (Ca^{2+}) y sodio (Na^+), con la consiguiente hiperpolarización de membrana e iniciación de una secuencia de pasos metabólicos que llevan a un reordenamiento de elementos del citoesqueleto para la orientación y migración de las células hacia el origen del gradiente quimiotáctico.^(34, 35) (Figura No. 5), existen además mecanismos de inhibición de la migración de los PMN.(Figura no. 6)

Opsonización y fagocitosis

En el sitio de la inflamación los PMN se activan y destruyen intracelularmente al agente extraño. En esta fase pueden participar anticuerpos y complemento que facilitan la ingestión de estos microorganismos, por lo que se definen como opsoninas.^(36,37)

Otras proteínas como la C reactiva, tufsina y la fibronectina también poseen capacidad opsónica inespecífica.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

Los PMN tienen en su membrana receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas, así como para activar C3b y C3bi, estos últimos receptores se conocen como CR1 y CR3.⁽⁴¹⁾

La interacción ligando-receptor es el determinante crítico de la unión de la célula extraña, y por otra parte esencial para la generación de las señales fagocíticas que inician el proceso de ingestión, mientras que los receptores Fc también

promueven la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG, induciendo la síntesis y liberación de oxidantes (superóxidos, peróxidos de hidrógeno, hidróxilos). La capacidad de los receptores CR1 y CR3 de promover fagocitosis es regulada.⁽⁴²⁾

Se ha descrito que los receptores del complemento se encuentran en dos estados, uno inactivo en el cual los receptores median la adherencia de partículas a los fagocitos pero durante la ingestión pueden fallar y otro activo en el que además de la adherencia permiten la ingestión, pero a diferencia de los receptores Fc no inducen la liberación de oxidantes.^(43, 44) (Figura no. 7)

Extractos bacterianos

Se ha intentado disminuir la frecuencia de asma bronquial no alérgica asociada a procesos infecciosos por medio de la administración oral o parenteral de extractos bacterianos. Se ha descrito que una gran concentración bacteriana induce quimiotaxis de células mononucleares de asmáticos no atópicos pero no tiene efecto quimiotáctico en los mononucleares de sujetos sanos.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ Los tratamientos con extractos bacterianos se han recomendado en la mayoría de los casos sin estudios controlados y se observa disminución en la frecuencia de las infecciones.⁽⁴⁸⁾ Los extractos bacterianos utilizados pueden ser polivalentes, con bacterias gram positivas y gram negativas o monovalentes, compuestos de un solo tipo de bacteria como el *Staphylococcus aureus* que es el más utilizado en México, en pacientes con infecciones recurrentes de vías aéreas superiores asociada a asma bronquial.⁽⁴⁹⁾

Se menciona en algunos artículos que los extractos bacterianos de *Staphylococcus aureus* Cowan I incrementan la resistencia no específica y tiene efecto inmunomodulador y regulador de la migración y fagocitosis.⁽⁴⁸⁾ Al igual que otros gérmenes, el *Staphylococcus aureus* es un potente inductor de IL-1 e Interferón γ en monocitos y macrófagos.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

Los pacientes asmáticos con infecciones recurrentes y resistentes al tratamiento convencional, tienen defectos en los mecanismos de resistencia a las infecciones, como disminución en la quimiotaxis, fagocitosis y opsonización de leucocitos polimorfonucleares, así como en la respuesta humoral y celular.⁽⁵³⁾

Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo investigar el efecto del extracto de *Staphylococcus aureus* Cowan I *in vitro* en la respuesta quimiotáctica de las células polimorfonucleares de niños asmáticos con infecciones recurrentes de vías aéreas superiores.

MATERIAL Y METODO.

1. Diseño del estudio

Ensayo biológico *in vitro*

2. Universo de trabajo

Se estudiaron PMN de niños con crisis asmáticas desencadenadas por infecciones recurrentes de las vías aéreas superiores, edades entre 2 y 8 años, con⁽⁵⁴⁾ con pruebas cutáneas negativas a los alérgenos más comunes del Valle de México. Los padres o tutores firmaron una carta de consentimiento informado.

El estudio fue autorizado por el Comité de Ética del Hospital Infantil de México

3. Descripción de las variables

Las variables independiente asma bronquial, y la dependiente quimiotaxis y quimiocinesis de las células PMN incubadas con extracto de *Staphylococcus aureus* Cowan I.

Operativamente cada variable se definió de la siguiente manera:

Asma bronquial e infección se consideró cuando las crisis asmáticas eran asociadas por infecciones de vías aéreas superiores, pruebas cutáneas negativas a los alérgenos más comunes del Valle de México.

Quimiocinesis se definió como el movimiento al azar de las células.

Quimiotaxis se consideró como el movimiento dirigido de las células.

El extracto de *staphylococcus aureus* fue preparado con la bacteria completa muerta por calentamiento.

Tamaño de la muestra

Se estimó un número de observaciones de 41 niños asmáticos con la fórmula para muestras simples.⁽⁵⁵⁾

Sólo se incluyeron niños con asma bronquial e infección recurrente de vías aéreas, sin tratamiento actual, enfermedades autoinmunes, cardiopatías ni nefropatías, que no asistieran a guarderías.

El diagnóstico de asma bronquial se realizó por historia clínica, exploración física y pruebas cutáneas a los alérgenos más comunes del Valle de México. El

estudio se llevó a cabo con pacientes del servicio de alergia pediátrica del Hospital Infantil de México.

Un solo médico trató a los pacientes en el servicio, los datos clínicos, de exploración física, el sexo y la edad del paciente se conocieron al término del estudio. Se incluyeron como controles de quimioquinesis y quimiotaxis de PMN a 10 niños sanos, por interrogatorio y exploración física, con edades similares a la de los pacientes.

METODO

Obtención de PMN

De 5 ml de sangre venosa periférica de los 41 niños asmáticos y de los 10 niños sanos. La sangre se obtuvo en jeringas desechables estériles heparinizadas (10 U de heparina por cada ml de sangre). La separación de las células se realizó con el método de Boyum modificado.⁽⁵⁶⁾

La sangre se colocó en tubos de plástico de 15 ml, se diluyó y mezcló con solución salina isotónica en volúmenes iguales, se agregaron 2 ml de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) con densidad de 1.077, se centrifugó 1500 rpm a 37°C durante 25 minutos. Se separaron las capas de mononucleares y PMN con eritrocitos, se lisaron los eritrocitos, se centrifugó nuevamente a 1500 rpm a 37°C durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de PMN, se hizo un lavado con solución salina, y se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos a 37°C, el botón de PMN se resuspendió en 1 ml de solución de Hank (SSBH), se realizó el recuento del número total de PMN obtenidos, y se valoró la viabilidad.

Recuento de PMN

La cuenta de PMN se realizó en el microscopio óptico de inmersión. Las células se depositaron en un alícuota a una concentración 1:4, se le agregó solución de Turk (80 µl de colorante y 20 µl de células en suspensión), para el conteo se utilizó una cámara de Neubauer se agregó 20 µl de la suspensión con colorante. Se contó el número de células por cuadrantes y se hizo el cálculo del número de células/ml con la siguiente fórmula: No. de cél/ml = No. de cél por cuadrante x 5 x10⁴. Se ajustaron a 2 000 000 de PMN /ml. Se midió la viabilidad celular por la técnica de exclusión de azul tripano obteniendo una viabilidad celular ≥ de 95%.

Método de preparación del extracto de *Staphylococcus aureus*.

La cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (12598 serotipo 1 NCTC 8530 National Collection of Type Cultures, London England) fue donada por el laboratorio de bacteriología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Se resembró en un medio sólido de agar sal de manitol (Bioxon) se incubó durante 24 horas a 37°C. se cultivó en caldo de soya tripticasa (Bioxon) en baño maría a 37°C durante 22 horas.

Se realizaron tres lavados con solución salina, se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 8 ml de SSBH y se centrifugó nuevamente a 5,000 rpm durante 15 minutos, el botón se lavó y se resuspendió en 5 ml de SSBH.

Para conocer la concentración de bacterias por ml, se determinó turbidez por el nefelómetro de Mc Farland. Se correlacionó con espectrofotometría a 540 nm. El número de bacterias se ajustó a 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por

ml. Se mataron por calentamiento en una autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 min.

La viabilidad bacteriana se determinó tomando una muestra de las bacterias sometidas a calentamiento, resemebrando en placas de medio sólido de agar sal de manitol, se incubó a 37°C por 24 hrs, no existió crecimiento. La concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry.⁽⁵⁷⁾

En un estudio preliminar se probaron diferentes concentraciones de proteínas del extracto (12 µg/ml, 30 µg/ml, 53 µg/ml, 87 µg/ml, 122 µg/ml) para conocer la concentración óptima de estímulo quimiotáctico de PMN en treinta donadores sanos.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 200 µl de la suspensión y se congelaron a 70°C.

Preparación de C5a

Se utilizó C5a como control quimiotáctico⁽⁵⁸⁾ que se obtuvo de suero AB activado. Como activador del suero se empleó zimosan (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml.

Preparación de zimosan

A 200 mg de zimosan se le agregaron 20 ml de solución salina al 0.85%, se incubó en baño maría a 37°C durante 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente, y centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se lavó con solución salina. Se prepararon alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se le agregó 20% (200 µl), de suero AB +

700 μ l de SSBH, se incubó de 25 a 30 minutos a 37°C de CO₂, y se centrifugó a 3000 rpm durante diez minutos y el sobrenadante se utilizó como quimioatrayente.

Medición de quimiotaxis

El ensayo quimiotáctico se realizó siguiendo la metodología de Falk, Goodwin y Leonard,⁽⁵⁹⁾ con una microcámara de Boyden de 48 pozos y filtros de nitrocelulosa de 120 μ m de espesor con poros de 3 μ m de diámetro los cuales fueron humedecidos en solución balanceada de Gey-HEPES-Albúmina antes de su uso, para realizar la quimiotaxis se utilizó solución de Hank.

C5a, el extracto bacteriano y la solución de SSBH se colocaron en los pozos inferiores de la cámara. En un volumen de 30 μ l por pozo. Los PMN se colocaron en los pozos superiores en volúmenes de 50 μ l de la suspensión celular de 2×10^6 ml. La cámara se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante una hora, se retiró la membrana de quimiotaxis y se fijó con etanol-agua 1:1 hasta que se tiñó.

Procedimiento de tinción de la membrana

Se colocó la membrana 10 minutos en agua en ebullición, después se tiñó con hematoxilina durante 8 minutos, se agregó agua en ebullición durante 10 minutos, se agregó ácido clorhídrico al 0.5%. Se colocó la membrana 10 minutos en agua destilada en ebullición, durante 30 segundos se tiñó con cromatropo, se agregó agua en ebullición durante 10 minutos, y alcohol durante 3 minutos, posteriormente propanol durante 3 minutos y propanol-xilol 1:1 también 3

minutos, después en un caja de Petri estéril con xilol se dejó reposar antes de realizar la lectura. Se fijó a un portaobjeto con resina histológica y se dejó secar.

La interpretación se realizó según el método de Zigmond y Hirsh⁽⁶⁰⁾ utilizando para tal efecto un microscopio de luz convencional, y se midió por observación con el objetivo de 40X la distancia migrada en micras (desde donde se encuentra la mayor densidad de células hasta el plano donde se observen cuando menos cinco células), que se traduce por el recorrido del tornillo micrométrico graduado.

Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado, cada alícuota de las sustancias utilizadas (extracto bacteriano, HHBS y C5a), se cubrió con papel aluminio para evitar conocer su contenido el cual se reveló al terminar el estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron métodos de estadística descriptiva para conocer las características de cada grupo. Todos los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar.

Posteriormente se calculó sesgo y curtosis para las variables las cuales no asumieron distribución normal. La prueba de Wilcoxon⁽⁶¹⁾ se usó para el análisis estadístico de las mediciones de quimioquinesis y quimiotaxis con HHBS, C5a y extracto bacteriano en el grupo de enfermos y de sanos. La prueba de U de Mann Whitney⁽⁶¹⁾ se utilizó para comparar la quimioquinesis y quimiotaxis entre los grupos de enfermos y sanos. La prueba de Friedman⁽⁶¹⁾ se usó para comparar quimioquinesis y quimiotaxis de C5a y extracto bacteriano. La concordancia interobservadores se analizó mediante el coeficiente de Kappa.⁽⁶²⁾ Se

consideraron significativas las diferencias con $p \leq 0.05$. Los cálculos se realizaron con el programa Number Cruncher Statistical System versión 4.2

RESULTADOS

Estandarización de la concentración de proteínas del extracto de *Staphylococcus aureus*

Como ya se mencionó se probaron diferentes concentraciones de proteínas del extracto de *Staphylococcus aureus*; estas concentraciones fueron 12 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 53 $\mu\text{g/ml}$, 87 $\mu\text{g/ml}$ y 122 $\mu\text{g/ml}$ para conocer la concentración óptima de estímulo quimiotáctico de PMN en treinta donadores sanos. La concentración de 53 $\mu\text{g/ml}$ fue la que produjo mayor estímulo de quimiotaxis a PMN de los donadores sanos similar al estímulo producido con C5a por lo que se decidió utilizar esta concentración para el ensayo de quimiotaxis en niños asmáticos. La media de la quimiocinesis en estas células fue de 42 μm (Gráfica No. 1)

La variabilidad inter e intraobservador fue de 80% en ambos casos.

Se estudiaron PMN de 41 niños con asma bronquial asociada a infecciones y 10 niños sanos. De los casos 25 (61%) fueron varones y 16 (39%) mujeres, la edad promedio fue de 4.4 ± 2 años. (Cuadro No. 2)

Treinta y un pacientes tuvieron más de 8 infecciones de vía aéreas que les desencadenaron crisis asmática, tres pacientes fueron hospitalizados más de 5 veces en un año. (Tabla 1)

Medición de la viabilidad de las células

Los recuentos diferenciales realizados después del proceso de separación de las células, demostró que más del 95% eran PMN. La viabilidad medida mediante la exclusión de azul de tripano fue mayor del 95%. El rendimiento del método empleado, para la obtención de las células fue mayor de 75%.

Medición de quimiotaxis y quimiocinesis

Después de incubar los PMN a 37°C con HHBS C5a y extracto bacteriano de *Staphylococcus aureus* por 30 min, se tiñó la membrana de quimiotaxis y se leyó al microscopio. El valor de la quimiocinesis fue mayor en los sanos que en los enfermos ($46 \pm 7.1\mu\text{m}$, y $23.8 \pm 6\mu\text{m}$ respectivamente) con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), no existió diferencia significativa entre el grupo de sanos y enfermos ($p = 0.1$) en la medición de la quimiotaxis con C5a y el extracto de *Staphylococcus aureus*. (Cuadro No. 2 y Gráfica No. 2),

Existió una diferencia estadísticamente significativa al comparar quimiocinesis y quimiotaxis con *Staphylococcus aureus* y C5a de células de niños sanos ($p < 0.01$). Siendo esta diferencia mayor en los niños enfermos. ($p < 0.001$) (Cuadro No. 3 y Gráfica No. 2)

DISCUSION

Se ha descrito por algunos investigadores que extractos de bacterias *in vitro* inducen o activan la migración dirigida de las células mononucleares y PMN en pacientes asmáticos no atópicos, en estos estudios se señala también que estos extractos bacterianos no tienen efecto quimiotáctico en los mononucleares y PMN provenientes de pacientes sanos. ^(46,48,63)

Los extractos bacterianos pueden funcionar como superantígenos, ya que se ha demostrado que estimulan a las células T a través de moléculas de antígeno mayor de histocompatibilidad clase II que interactúan con las células presentadoras de antígenos. La estimulación selectiva de las células T por proteínas o extracto de *Staphylococcus aureus* se expresan mediante un receptor (TCR) por medio de una cadena β con segmentos de genes variables. El desdoblamiento de los péptidos antigénicos y los otros componentes TCR juegan un importante papel en el reconocimiento de los superantígenos. ⁽⁴⁸⁾ Otros estudios corroboran que el estímulo de toxinas bacterianas durante la infección y en respuesta a superantígenos liberan interferon γ que actúa sinérgicamente con IL-12 en la producción de IL-4, IL-10 e IL-13 ⁽⁶⁴⁾ demostrándose la relevancia de la inmunorregulación. ⁽⁶⁵⁾

En la literatura se ha informado que los extractos bacterianos de *Staphylococcus aureus* Cowan I pueden incrementar la resistencia inespecífica y tienen un efecto inmunomodulador y regulador de la migración de las células inflamatorias así como de la actividad fagocítica. ⁽⁶⁶⁾

En un estudio realizado por Tyski y colaboradores refieren que la respuesta quimiotáctica de los PMN se estimula a bajas concentraciones (10^{-9}) de lipasa purificada de *Staphylococcus aureus*, además de que la respuesta es dosis dependiente,⁽⁶⁷⁾ Spagnuolo demostró *in vitro* que la endotoxina de *Staphylococcus* estimulaba la motilidad y adherencia de los granulocitos.⁽⁶⁸⁾ Así mismo otro investigador⁽⁶⁹⁾ refiere que bajas concentraciones de bacterias autólogas inducen quimiotaxis de mononucleares de pacientes asmáticos.

Como también ya se mencionó , se ha confirmado en estudios experimentales que el sitio de acoplamiento de toxina de *Staphylococcus aureus* en los dominios α I y α II de moléculas de clase II reaccionan en forma cruzada con las moléculas DR adyacentes, este entrecruzamiento puede ser importante en la inducción de la reactividad de las células T .⁽⁷⁰⁾

Los pacientes asmáticos con infección crónica recurrente, resistentes o que manifiestan resistencia al tratamiento convencional, pueden tener defectos en los mecanismos de resistencia de las infecciones como disminución de la quimiotaxis, fagocitosis, opsonización y alteraciones en la respuesta inmune humoral y celular. ⁽⁵³⁾

Los resultados de este estudio demuestran que existe una disminución en la quimiocinesis de las células PMN de niños con asma bronquial asociada a infecciones recurrentes de las vías aéreas y al comparar la actividad de quimiocinesis de los PMN de los niños sanos se observó que existió una diferencia significativa. ($p < 0.001$)

Esta alteración en la disminución de la migración de las células PMN puede sugerir una relación con la recurrencia de las infecciones en estos pacientes; otros autores han descrito observaciones semejantes. ^(63,66)

Es importante señalar que existen otros factores que pueden afectar el movimiento al azar de las células como la acidez del medio intracelular, la temperatura, los nutrientes. ⁽⁷¹⁾

Asimismo la quimiotaxis es mediada por receptores, por lo tanto el hecho de que se encontrará una disminución de la quimiotaxis no se puede asegurar que fuera por un defecto en los receptores de las células pero tampoco se puede descartar. ⁽⁷²⁾

También puede haber influido la presencia o no de quimioquinas en el medio celular, estas moléculas pueden activar a las células PMN por lo que son quimiotácticas, entre estas se menciona a la IL-3, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, la IL-8, factor activador de plaquetas y LTB₄, son más potentes como quimiotácticos que C5a. Algunas quimioquinas son selectivas para algunas poblaciones leucocitarias, por ejemplo la proteína 1 β para los macrófagos (MIP- β). ⁽⁷³⁾

En la actualidad se desconocen todavía muchas funciones de moléculas o sustancias que pudieran funcionar como quimioquinas, se supone que contribuyen en forma selectiva para controlar la migración de los leucocitos en las áreas de inflamación. Hay otras moléculas naturales o sintéticas derivadas o semejantes a productos bacterianos que son quimiotácticas para los neutrófilos y los macrófagos como la metionina leucina y fenilalanina (Met-leu-the) estos péptidos se unen al receptor y bloquean en la misma terminal la respuesta de los

leucocitos, de tal forma que algunas proteínas de bacterias pueden generar señales específicas en los receptores para C5a y LTB₄ que se generan en los sitios de inflamación. Las moléculas generadas en los sistemas de coagulación como fibrina, el péptido b y la trombina atraen a los fagocitos y posteriormente se estimula la liberación de IL-8 por monocitos activados que inducen a neutrófilos y basófilos funcionando como un factor quimiotáctico.

Las modificaciones en la concentración de los factores intracelulares como los cationes bivalentes causan una reducción en el movimiento de la célula y cuando se trata de Ca²⁺, se produce una reducción en la locomoción y en ocasiones en el movimiento al azar, el Ca²⁺ es muy importante en la traducción de señales en la función de los microfilamentos para el movimiento de la célula. ^(74,75)

La disminución de Mg²⁺ en neutrófilos de ratas se traduce como una alteración en la orientación de la célula por diferentes gradientes. Los PMN pueden moverse en ausencia de Na⁺ o K⁺ pero pueden tener una decremento en la respuesta a factores quimiotácticos en la ausencia de K⁺ extracelular. ⁽⁷⁶⁾

En este trabajo se encontró que al agregar extracto completo de *Staphylococcus aureus* Cowan I la quimiotaxis fue semejante en ambos grupos. (cuadro No. 3)

El mayor efecto quimiotáctico para los PMN se logra cuando se incuba con los productos de microorganismos y plasma activado con complemento; el *Staphylococcus aureus* además de que estimula la quimiotaxis también estimula la adherencia de estas células, ⁽⁷²⁾ sin embargo algunos autores han demostrado que algunas fracciones de *Staphylococcus aureus* como la β toxina o la esfingomielina C, inhiben in vitro la locomoción de neutrófilos y monocitos. ⁽⁴⁸⁾

En nuestro estudio encontramos que el extracto completo de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 53 µg por ml de proteína de esta bacteria estimulo la quimiotaxis de las células PMN al igual que la fracción C5a del complemento, no encontrándose diferencias significativas entre ambos (p=0.1); este estímulo fue similar entre el grupo de niños asmáticos con infección y el grupo de niños sanos, aunque hay que hacer notar que el estímulo fue mayor en los niños enfermos tanto con C5a como con extracto bacteriano. Esto se explica porque las células poseen receptores para C5a y receptores para péptidos N formil que representa productos bacterianos, estos receptores tienen un alta afinidad para estos péptidos que inducen el flujo transmembranal de K⁺ y Ca²⁺ a través de la membrana plasmática, teniendo como resultado la polarización de la membrana celular. ^(74,75,76)

El efecto de la administración de extractos bacterianos se ha estudiado en pacientes con infecciones recurrentes de vías respiratorias y asma bronquial con reducción en la frecuencia de infecciones de 2.14% a 1 %, y con disminución de las manifestaciones clínicas hasta del 60%. Así mismo, se ha observado una inmunomodulación en las concentraciones de inmunoglobulinas particularmente con un incremento en las cifras de IgA.⁽⁷⁷⁾

Se ha demostrado que existe un aumento en la producción de factor liberador de histamina por el gran número de linfocitos T en el alveolo de asmáticos no atópicos, y se ha reportado una correlación positiva entre los niveles de hiperreactividad bronquial y la producción espontánea de factor liberador de histamina.⁽⁷⁸⁾ La histamina que es liberada durante un proceso inflamatorio como una crisis asmática modula la quimiotaxis, quimioquinesis adherencia y degranulación de β glucuronidasa de neutrófilos y eosinófilos, en estos pacientes

existe un aumento en la producción de histamina y de receptores H1 y H2 esto puede causar inhibición en la quimioquinesis, quimiotaxis y/o adherencia de estas células; en los pacientes asmáticos estudiados en esta tesis pudo haber sucedido que los receptores de histamina de los PMN tomados de la sangre periférica se encontraran saturados, dando los resultados ya comentados.

Por lo tanto concluimos, dado que la respuesta al estímulo con C5a y extracto de *Staphylococcus aureus* fue semejante, es posible que los mecanismos de quimiotaxis en las células de estos pacientes se encuentren en condiciones normales, y el hecho de que se encontrará quimioquinesis disminuida plantea interrogantes en los diferentes mecanismos de regulación por lo que sería necesario investigar otras funciones y factores subcelulares en estos pacientes así como otros aspectos del sistema inmunológico.

REFERENCIAS

1. Magnussen H., Nowak D., Roles of hyperresponsiveness and airway inflammation in bronchial asthma. *Respiration* 1989;55:65-74.
2. Skobeloff E M, Spivey W H, Clair S S, Schoffstall J M , The influence of age and sex on asthma admissions. *JAMA* 1992;268:3437-3440.
3. Weitzman M, Gortmaker S L , Sobol A M, Perrin J M. Recent trends in the prevalence and severity of childhood asthma. *JAMA* 1992;268:2673-2677.
4. Wuthrich B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;90:(suppl):3-10.
5. Martínez-Cairo C S, Salas R M, Segura M H . Los aspectos epidemiológicos del asma bronquial en la República Mexicana. *Gac Méd Méx*1995;131:277-282.
6. Matthys H. Definition and assessment of asthma. *Lung* 1990; (suppl): 51-56.
7. Louis M H, Lanz M. Hyposensitization with bacterial vaccine in infectious asthma. *JAMA* 1969;208:1379-1383.
8. Infecciones de vías respiratorias superior. En: Santos JI, Villaseñor SA, Muñoz O, de. *Manual de Infectología*. México:Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica AC.,1995:8-12.
9. Rachelefsky G S, Katz R M, Siegel S C. Chronic sinus disease with associated reactive airway disease in children. *Pediatrics* 1984;73:526-529.
10. Guiscafré G H . Infecciones del tracto respiratorio superior. En Kumate J, Gutierrez G, Muñoz O, Santos JI, de *Manual de Infectología*. Mexico : Mendez Editores., 1992:165-176.
11. Friedman R, Akerman M, Wald E, Casselbrant M, Friday G, Fireman P. Asthma and bacterial sinusitis in children. *J. Allergy Clin Immunol* 1984;74:185-9.
12. Rotrosen D, Gallin J I. Disorders of phagocyte function. *Ann Rev Immunol* 1987;5:127-50.
13. Mowat A G, Baum J. Polymorphonuclear leucocyte chemotaxis in patients with bacterial infections. *BJM* 1971;3:617-619.

14. S.H. Zigmond. Mechanism of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes Nature 1974;111:450-52.
15. Martínez-Cairo CS . Espinoza AJ, López RM. Quimiotaxis defectuosa de las células PMN de pacientes con asma bronquial Arch Invest Med 1981;12:505-515.
16. E. B. Cramer, L.C. Milks, and G.K. Ojakian. Transepithelial migration of human neutrophils: An in vitro model system. Proc. Natl Acad. Sci. 1980;77:4069-73.
17. Senda N, Tamura H, Shibata N, Yoshitake J, Kondo K, Tanaka K. The mechanism of the movement of leucocyte Exp Cell Res 1975;91:393-407.
18. Macnab R M, Koshland E. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. Proc Nat Acad Sci 1972;69:2509-2512.
19. Wilkinson P C, Haston W S. Chemotaxis: An Overview. Methods in enzymology 1988;162:3-17.
20. Berendes H, Bridges RH, Goos RA. A fatal granulomatous disease of childhood: the clinical study of de novo syndrome. Minn Med 1957;40:309-312.
21. Schiffmann E, Corcoran B A, Wahl S M, N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. Proc Nat Acad Sci 1975;72:1059-1062.
22. Pulus LM, Bromeyer HE, Kurland SI. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation J Exp Med 1979;150:257-267.
23. Haslett C, Savill JS, Meagher L. The neutrophil . Curr Opin Immunol 1989;2:10-18.
24. Snyderman R, Smith ChD, Verghese MW: Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptor: roles of a guanine-nucleotide regulatory protein and polyphosphoinositide metabolites J Leuk Biol 1986;40:765-800.
25. Walker RI, Willemze R, Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis Rev Infect Dis 1981;3:505-598.
26. Glasser L, Fiederlein R L. Functional differentiation of normal human neutrophils. Blood, 1987;69:937-944.
27. Zigmond S H. Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. J cell biology 1978;77:269-287.

28. Malech H L, Gallin J I. Neutrophils in human diseases. *N England J Med* 1987;317:687-694.
29. Howard T H, Winkelstein J A, Tsan M F, Zinkham W H. Observations on the motile behavior of individual neutrophil from a patients with recurrent bacterial infections. *Blood* 1978;52:1212-18.
30. Aguayo Maldonado J, Salmero E F, Bonal P P, Aguayo M A, Loscertales A M, Gomez V J, et al. Importance of the function of polymorphonuclear neutrophils in intrinsic and extrinsic asthma. Interaction of whole serum in the control of cellular activity. *An Esp Pediatr.* 1989;30:435-42.
31. Gallin J I. Abnormal phagocyte chemotaxis: pathophysiology, clinical manifestations and management of patients. *Rev infectious diseases* 1981;3:1196-1220.
32. Fletcher MK, Gallin JI, Degranulating increase the availability of receptors on human neutrophils for the chemoattractant f-met-leu-phe *J immunol* 1980;124:1585-88.
33. Allen R.A. , Traynor AE, Ommann GM, Jesaitis AJ., The chemotactic peptide receptor. Phagocytic defects I, Abnormalities outside of the respiratory burst. *Hematology /Oncology Clinics of North America* 1988;2:33-59.
34. Seligmann BE, Gallin JI, Comparison of indirect probes of membrane potential utilized in studies of human neutrophils *J cell Physiol* 1983;115:105-10.
35. Root RK, Ryan JL, Humoral immunity and complement In: Principles and practice of infectious diseases: GL Mandell, GR Douglas & JE Bennets eds. New York: Wiley Medical, 1985 pp31-57.
36. Horowitz MA, Phagocytosis of microorganisms *Rev Infect Dis* 1982;4:201-225.
37. Johnston RB, Klempner MR, Alper CA, The enhancement of bacterial phagocytosis by serum: the role of complement components and two cofactors. *J Exp Med* 1969;129:1275-1290.
38. Jasin HE. Human heat labile opsonins: evidence for their mediation via the alternative pathway of complement activation. *J immunol* 1972;109:26-31.

39. Joiner KA, Brown EJ, Frank MM. Complement and bacteria-chemistry and biology in host defense. *Ann Rev Immunol* 1984;2:461-491.
40. Constantopoulos A, Najjar VA, Smith JW, Tuftsin deficiency: A new syndrome with defective phagocytosis *J Pediatr* 1972;80:564-572.
41. Fearon DT. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B-lymphocyte and monocyte. *J Exp Med* 1980;152:20-30.
42. Soria Rodriguez C G. Expresión de receptores Fc γ RIII, CRI y CR3 en neutrofilos polimorfonucleares de niños con desnutrición e infección bacteriana aguda. Tesis Facultad de Medicina UNAM. México D.F.
43. Scribner DJ, Fahrney D. Neutrophil receptors for IgG and complement their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *J Immunol* 1976;116:892-96.
44. Baehner RL, Boxer LA. Disorder of polymorphonuclear leukocyte function related to alterations in the integrated reactions of cytoplasmic constituents with the plasma membrane. *Semin Hematol* 1979;16:148-162.
45. Matusiewicz R, Rusiecka-Matusiewicz K. In vivo and in vitro granulocyte migration in patients with extrinsic and intrinsic bronchial asthma *Allergy* 1987;58:425-428.
46. Vascotto M, Fossi E, Viancin E, Guerrini L,. Efficacy of a polyvalent bacterial vaccine administered by aerosol in the treatment of children with respiratory infections. *Minerva-Pediatr* 1985;37:409-14.
47. Fontana V S, Salinitro A S, Wolte H I, Moreno F. Bacterial vaccine and infectious asthma. *JAMA* 1965;208:1379-1383.
48. Bessler W G, Kleine B, Martinez Alonso C, Bresert L, Strecker M, Wiesmüller K H. Biological activity of bacterial surface components: bacterial extracts and defined bacterial cell wall components as immunomodulators. *Lung* 1990;suppl 1:707-715.
49. Palma C A G, Palma C M L. Immunomodulation with bacterial extracts in respiratory diseases. *Lung* 1990;168(suppl):732-6.

50. Sullivan S J, Zigmond S H, Chemotactic peptide receptor modulation in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1980;85:703-711.
51. Kato K, Shirosita K, Dorasaws S, Mizukoshi N, Yamamoto K, Azuma et al. Staphylococcal enterotoxin a induce interferon (IFN)-production in spleen cell from BCG immunized mice:the IFN production on dependent on leukotriene C4 but not dependent on interleukin 2. *Immunobiol* 1990;181:40-50.
52. Harada H, Kasahara T, Ogota K, Shiori-Nakano K, Kawa T. Effect of *Staphylococcus aureus* COWAN I bacteria on mitogenic response of human B cell subsets. *Immunol* 1982;47:557-67.
53. Wald E R, Guerra N, Byers C. Upper respiratory tract infections in young children:duration of and frequency of complications. *Pediatrics* 1991;87:129-133.
54. Pavia-Ruz N, Lopez P, Santos J I, Infección respiratoria recurrente en el niño:evaluación clínica y de laboratorio *Bol Med Hosp Infant Mex* 1991;48:385-397.
55. Michael S Kramer. Chapter 13: Statistical inference for continuous variables en *Clinical epidemiology and biostatistics*. Quebec Canada - Springer-Verlag 1988:158.
56. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocyte from human blood. *Scand J Clin Lab Med* 1980;95:429-439.
57. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
58. Leukocyte Chemotaxis: Microfilter method of evaluation. In: *Investigacion of phagocytes in diseases*: SD Douglas, PG Quie, eds. New York. Churchill Livingstone,1981 ppl5-19.
59. Falk W, Goodwin RH, Leonard EI: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol Methods* 1980;33:239-247.
60. Zigmond SH, Hoesh JG, Leucocyte locomotion and chemotaxis. *J Exp Med* 1973;11:137-150.
61. Siegel S *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta* Editorial Trillas. México. D.F. 1986.

62. Merino CE. Observaciones y mediciones E. Moreno Altamirano L. Cano-Valle F (De). *Epidemiología Clínica UNAM México* 1988;pp59-83.
63. Zak-Nejmark T, Malolepszy J, Kraus Filarska M, Nadobna G, Jutel M, Stankiewicz M. Autologous bacteria induce chemotaxis of peripheral blood mononuclear cells (MNC) from non-atopic Asthmatics. *Clin exp allergy* 1992;22:863-6
64. Skeen MJ, Miller MA, Shinnick TM, Ziegler HK. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, and modulation by other cytokines. *J Immunol* 1996;156:1196-206
65. Gimeno R, Codony Servat J, Plana M, Rodríguez Sanchez JL, Juárez C. Stat1 implication in the immune response to superantigens in vivo. *J Immunol* 1996;156:1378-86.
66. Fontana V S. Gamma interferon is produced by human natural killer cells but not T cell during staphylococcus aureus stimulation. *Infect Immunity* 1993;61:3117-3122.
67. Tyski S, Tylewska S, Hryniewicz W, Jeljaszewicz J. Induction of human neutrophils chemotaxis by staphylococcal lipase. *J Med Microbiol* 1987;9:433-9
68. Spagnuolo PJ, Ellner JJ. Comparative stimulation of granulocyte adherence and chemotaxis by bacterial products. *Infect Immun* 1980;27:519-24.
69. Bacigaluppi JE, Negroni R, Severino HM. Bacterial allergy in allergy rhinitis and bronchial asthma. *Ann Allergy* 1979;42 :95-8.
70. Hargreaves RE, Brehm RD, Tranter H, Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI. Definition of sites on HLA-DR1 involved in the T Cell response to staphylococcal enterotoxins E and C2. *Eur J Immunol* 1995;25:3437-44
71. Wilkinson PC, Russell RJ, Allan RB. Leucocytes and chemotaxis. Agents and actions 1977;supl3:61-70.
72. Zigmond SH, ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors *J Cell Biol* 1977;75:606-616.
73. Tanimoto Y, Takahashi K, Kimura I. effects of cytokines on human basophil chemotaxis *Clin Exp Allergy* 1992;22:1020-5

74. Schreiner A, Vaala D, Kinetics of locomotion of human granulocyte populations. *Acta Path Microb Scand* 1978;86:205-209.
75. Sullivan SJ, Zigmond S H, Chemotactic peptide receptor modulation in polymorphonuclear leukocytes *J Cell Biol* 1980;85:703-711.
76. Mattoli S, Mattoso VL, Cellular and biochemical characteristics of bronchoalveolar lavage fluid symptomatic nonallergic *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:794-802.
77. Palma Carlos AG, Palma Carlos ML Non specific immunomodulation in respiratory infections *Allerg Immunol* 1990;22:181-5.
78. Seligmann B.E. Fletcher M P, Gallin J Y Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion degranulation and membran potencial changes. *J immunology* 1983;130:1902-1908.

A N E X O S

CUADRO No. 1

Síndrome Clínico	Agente Etiológico	
	Virus	Bacteria
Rinofaringitis	Rinovirus Influenza Coronavirus Parainfluenza Sincicial respiratorio ECHO Adenovirus. Reovirus. Herpes Simple	S pyogenes H. influenzae B pertussis M. pneumoniae
Faringoamigdalitis		
1. Purulenta-membranosa	Adenovirus Epstein-Barr (mononucleosis infecciosa)	
2. Con vesículas o úlceras	Herpes virus hominis (herpes simple) Coxsackie	
Laringotraqueobronquitis	Parainfluenza. Sincicial respiratorio Influenza. Adenovirus. ECHO Coxsackie A	
Epiglottitis		H. influezae tipo B
Traqueítis bacteriana	Probable antecedente viral con cualquiera de los virus arriba mencionados	Staphylococcus aureus Streptococcus B S.pyogenes
(9,10)		

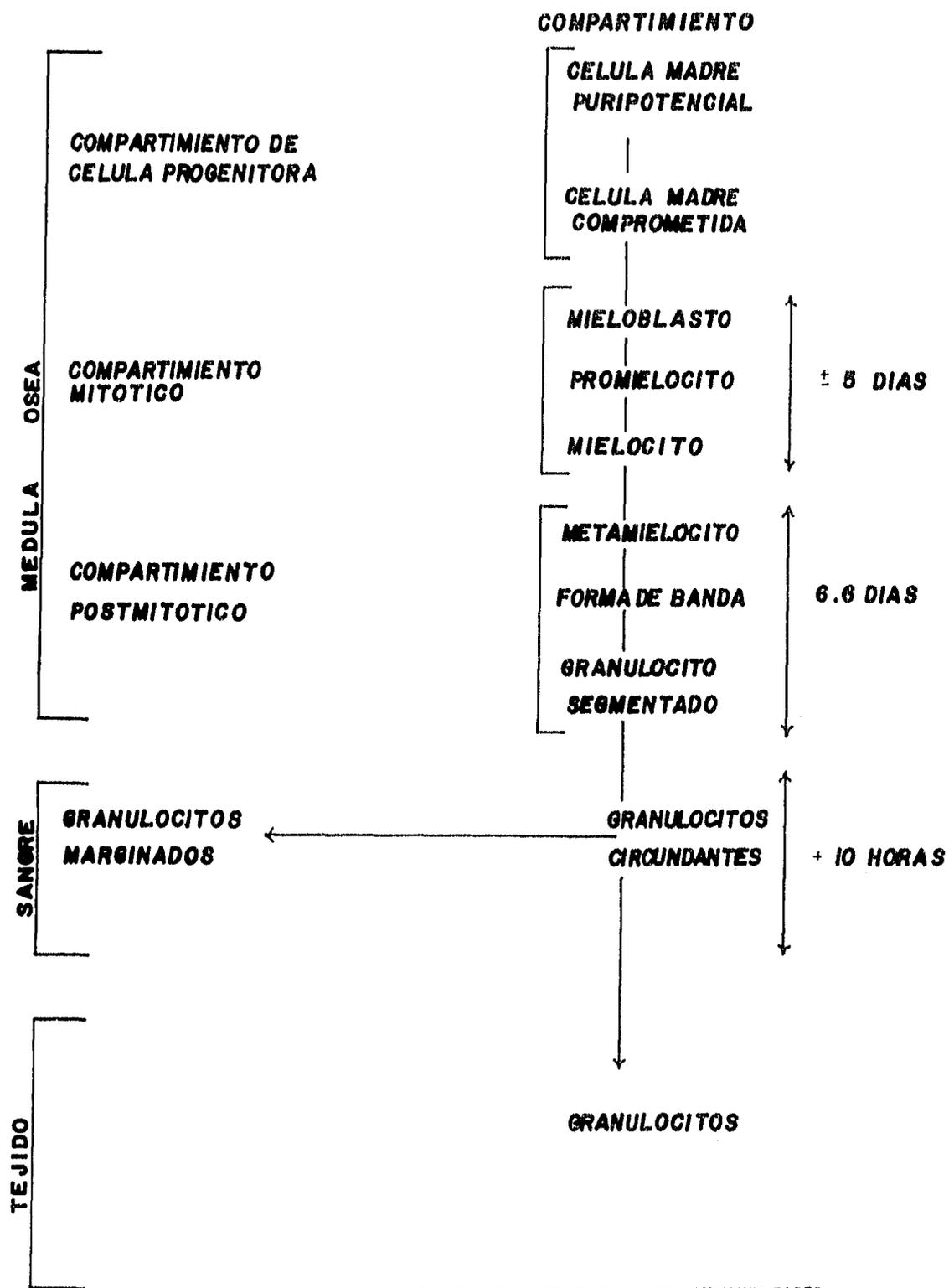
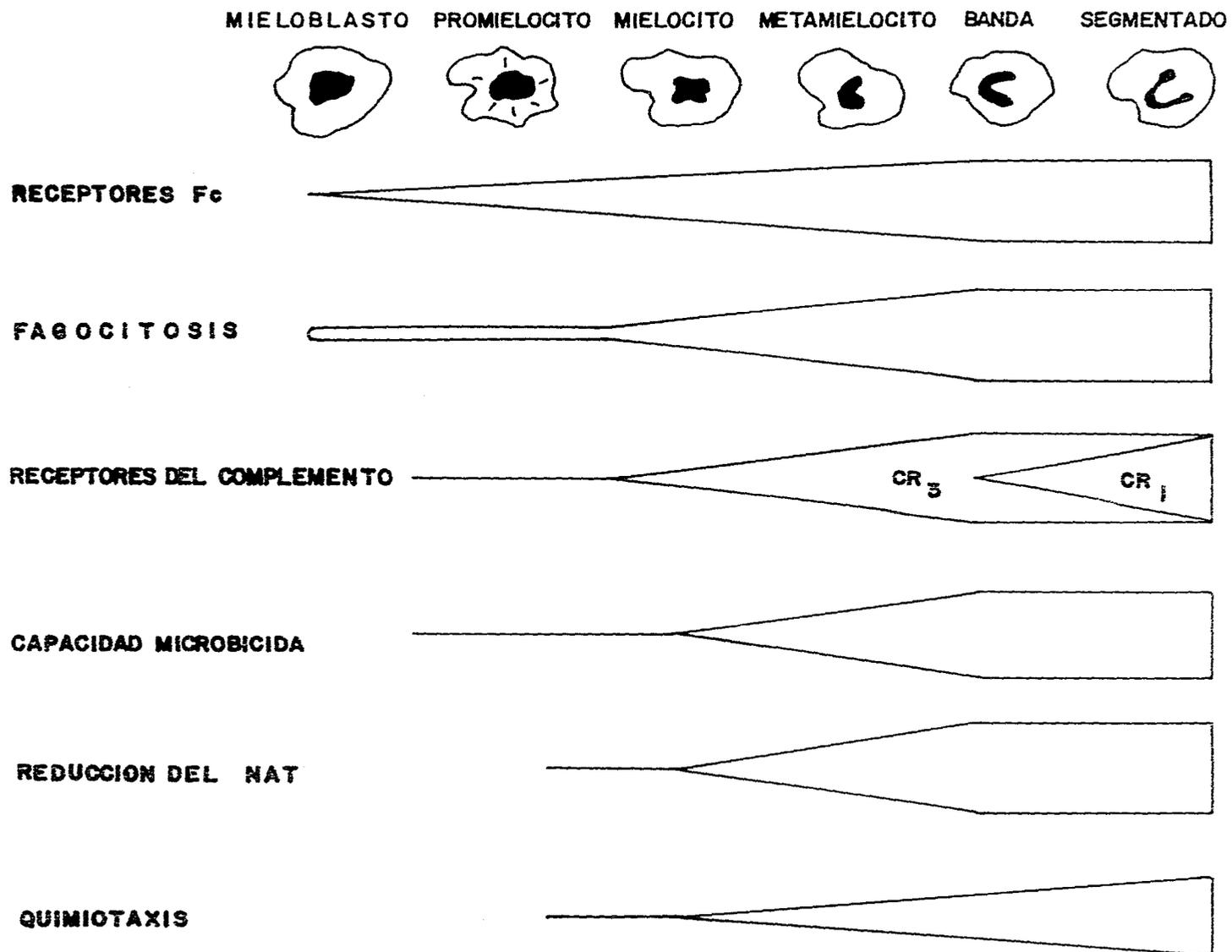


FIG. 1. CINETICA DE LA MADURACION DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES

FIG. 2. MADURACION FUNCIONAL DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES



EL NEUTROFILO EN LA INFLAMACION

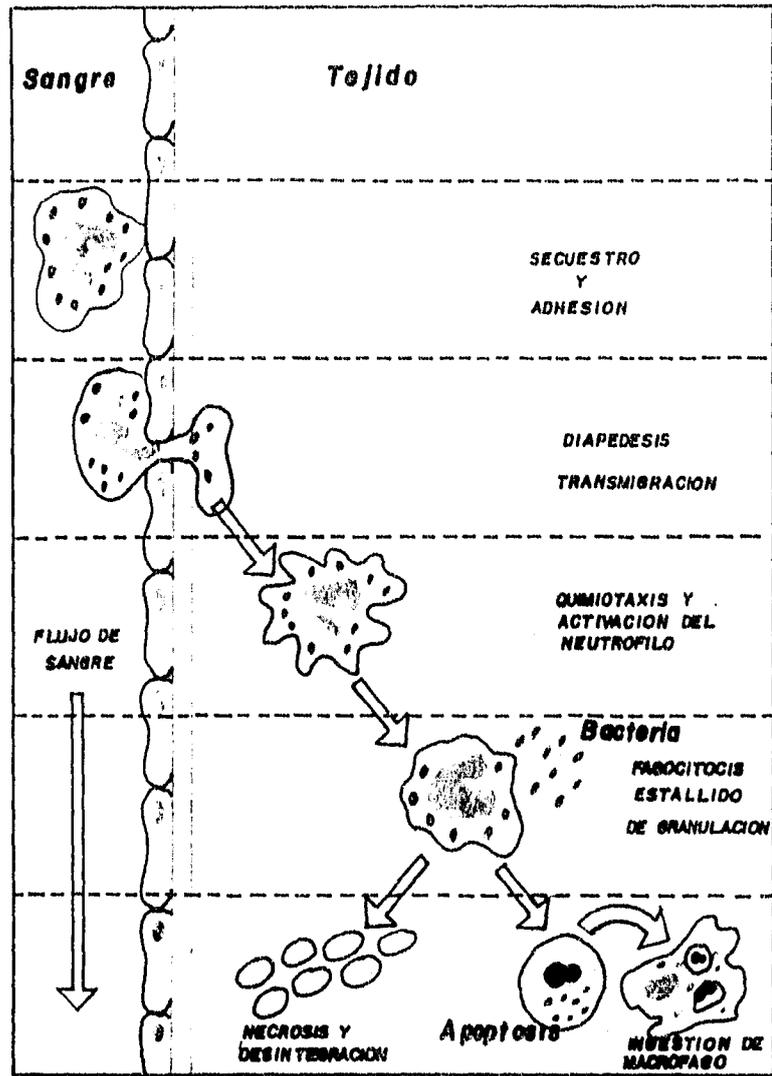
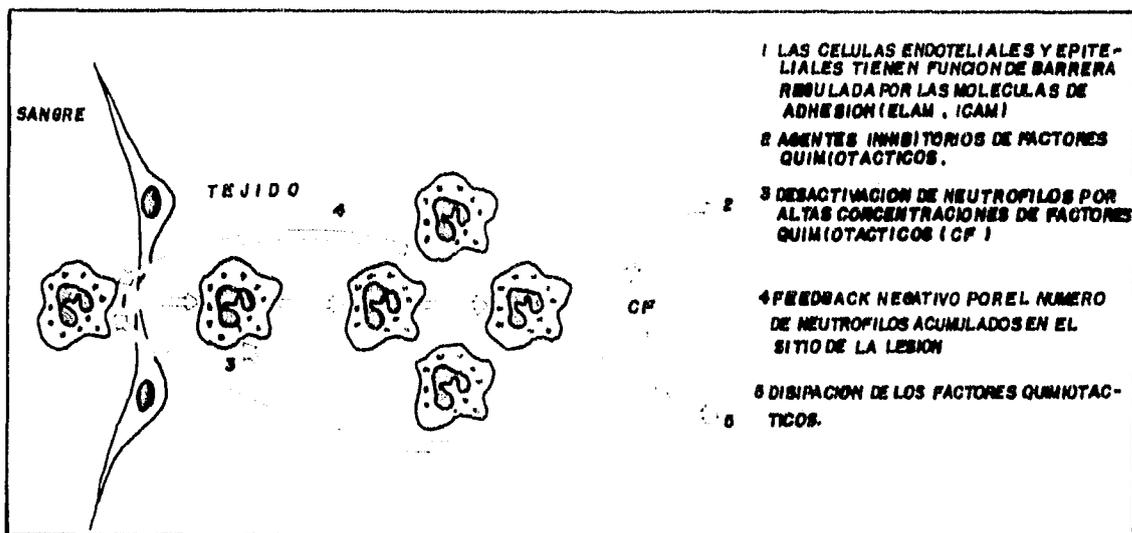


FIG. No 3



INHIBICION DE LA MIGRACION DE NEUTROFILOS

FIG. No 6

OPSONIZACION Y FAGOCITOSIS BACTERIAL.

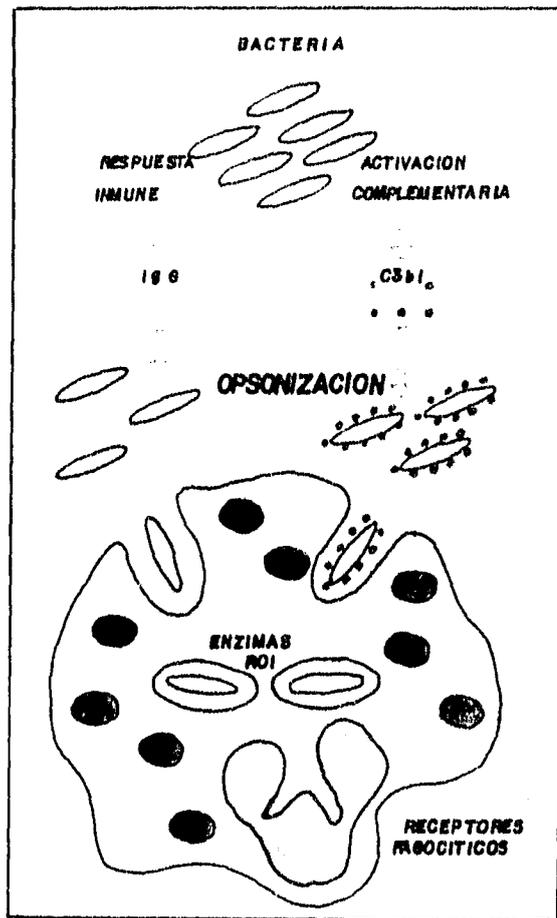
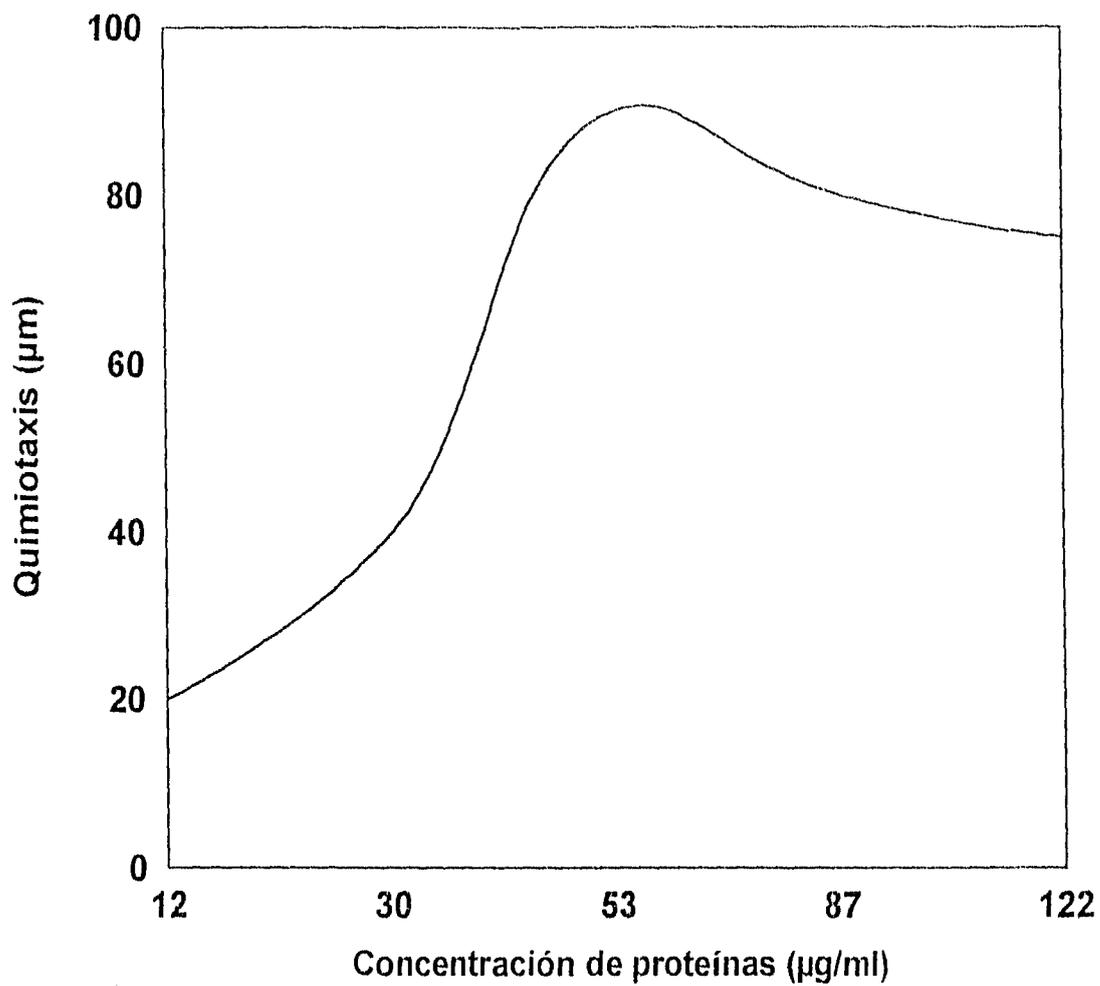


FIG. No 7



Gráfica No. 1. Estandarización de la concentración del extracto de *Staphylococcus aureus* Cowan I para un mayor estímulo de quimiotaxis en células PMN de donadores sanos. Se observó mayor estímulo a concentración de proteínas de 53 µg/ml .

TABLA No. I
NIÑOS CON ASMA BRONQUIAL E INFECCION

Núm.	EDAD (Años)	SEXO	PESO	GRADO DE DESNUT.	INFECC. POR AÑO	HOSP. POR AÑO	QUIMIO- CINESIS	QUIMIO- TAXIS (C5a)	QUIMIO- TAXIS (Bacteria)
							µm	µm	µm
1	4	F	14	0	8	6	30	150	150
2	4	M	17	0	12	2	30	70	90
3	8	F	27	0	10	1	20	90	80
4	7	F	23	0	15	4	30	65	95
5	4	M	13	0	10	2	20	75	150
6	6	M	17	II(20%)	9	3	20	105	90
7	6	F	22	0	8	4	20	95	135
8	8	F	34	0	24	1	30	115	120
9	7	M	26	0	15	1	30	100	120
10	2	M	12	0	18	1	35	100	90
11	5	F	17	0	18	4	30	100	90
12	3	M	11	II(26%)	12	1	30	90	100
13	7	F	22	0	12	3	30	150	100
14	3	F	12	0	12	0	20	150	150
15	2	F	12	II(20%)	18	0	30	80	70
16	4	F	17	0	8	1	30	85	90
17	4	M	18	0	12	0	30	75	100
18	5	M	19	0	6	0	30	50	50
19	7	M	27	0	18	2	30	75	100
20	7	M	21	0	6	0	20	90	80
21	2	M	15	0	12	1	15	90	100
22	6	F	29	0	12	1	15	85	90
23	5	M	20	0	24	12	30	100	105
24	4	M	17	0	7	0	30	85	80
25	6	M	32	0	12	0	15	90	95
26	5	M	20	0	12	3	30	90	85
27	8	F	35	0	12	0	20	90	80
28	6	F	17	0	5	0	20	85	80
29	6	M	19	0	6	0	20	90	80
30	5	M	16	I(12%)	6	2	20	90	90
31	3	F	10	III(33%)	6	1	18	90	150
32	8	M	33	0	6	1	20	95	90
33	5	M	29	0	10	0	20	90	80
34	1	F	10	II(16%)	10	0	24	109	92
35	2	M	9.7	III(31%)	10	10	30	100	90
36	5	F	16	I(12%)	6	0	20	60	80
37	2	M	13	0	12	1	15	70	90
38	2	M	11	0	5	2	15	60	80
39	2	M	15	0	10	2	20	70	95
40	5	M	18	0	24	1	20	90	105
41	4	M	12	0	10	1	15	90	90

Cuadro No. 2.

**Características de edad y sexo estudiadas en niños con asma bronquial
infecciosa y niños sanos**

Característica	sanos (10)	enfermos (41)
edad (años) *	4.4 ± 2.1	4.4 ± 2
Sexo (m/f) **	5/5	25 /16

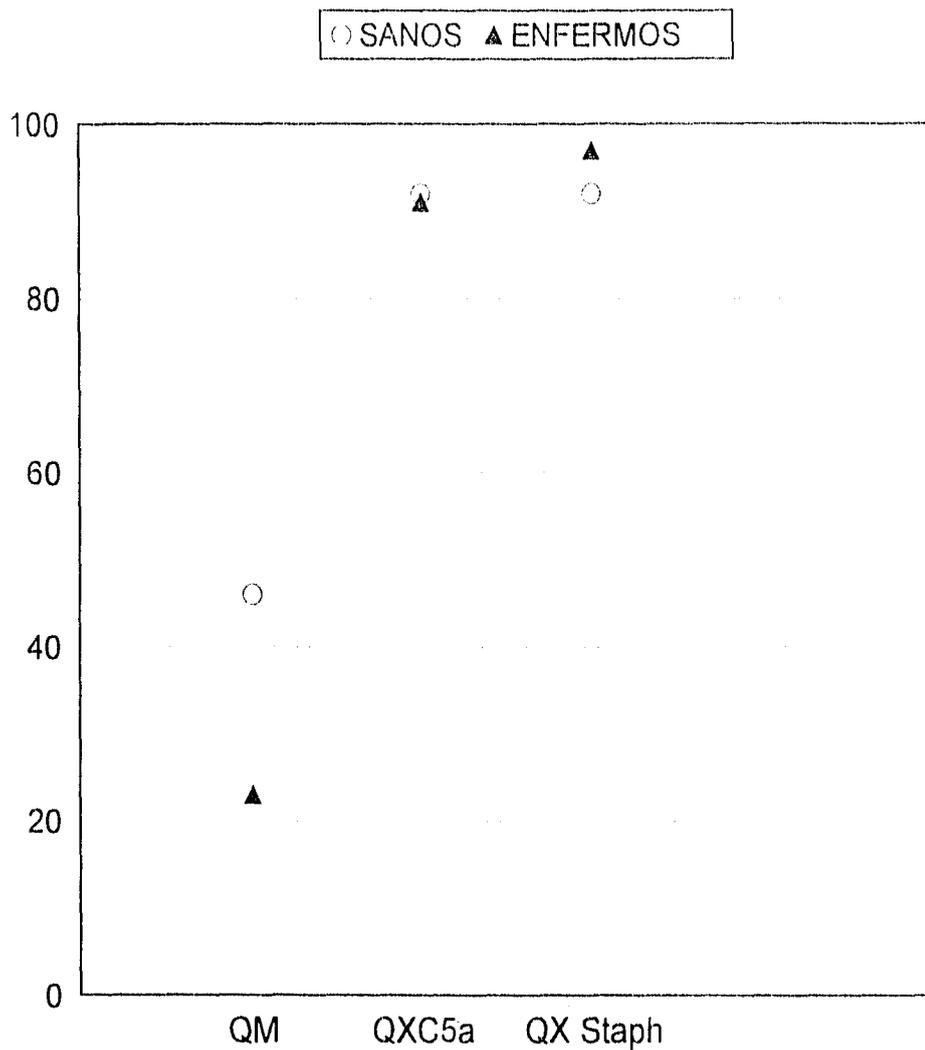
* Media ± DE; ** Frecuencias absolutas

Cuadro No. 3.

Comparación de las variables de quimioquinesis y quimiotaxis en niños con asma bronquial infecciosa y niños sanos

Variable	Sanos	Enfermos	p
Quimioquinesis	46 ± 7.1 μm	23. ± 86 μm	p<0.001
Quimiotaxis C5a	92. ± 32 μm	91 ± 21.3μm	p=0.1
Quimiotaxis extracto bacteriano	92 ± 23 μm	97 ± 22.4μm	p=0.1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE QUÍMICA



Gráfica No. 2 Medición de quimiocinesis y quimiotaxis. Después de incubar a PMN a 37°C, con HHBS, C5a y *Staphylococcus aureus*, se obtuvo una quimiocinesis de 46 µg para los sanos y 23.8 µg para los enfermos ($p < 0.01$) en la medición de la quimiotaxis no existió diferencia significativa entre ambos grupos, pero entre la quimiocinesis y quimiotaxis de ambos grupos para C5a y el extracto si se observó diferencia significativa ($p < 0.001$)