

38  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**DETERMINACION DE VALORES DE REFERENCIA DE  
FAGOCITOSIS EN INDIVIDUOS SANOS DEL BANCO  
DE SANGRE DEL CENTRO MEDICO LA RAZA.  
DETERMINACION DE VALORES DE REFERENCIA DE  
FAGOCITOSIS MEDIANTE EL EMPLEO DE TECNICAS  
MICROSCOPICAS**

**INFORME SERVICIO SOCIAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
ADRIANA JUAREZ GARCIA**

ASESOR: O.F.B. IDALIA AVILA MIYASAWA

DR. GUILLERMO DEL REY PINEDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**1997**



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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo El informe de Servicio Social: Determinación de Valores de Referencia de Fagocitosis en individuos sanos del Banco de Sangre del Centro Médico la Raza. Determinación de Valores de Referencia de Fagocitosis mediante el empleo de Técnicas Microscópicas

que presenta la pasante: Adriana Juárez García  
con número de cuenta: B534223-5 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

- "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de octubre de 1976.

PRESIDENTE O.F.R. Idalia Avila Miyazawa

VOCAL O.F.R. Martha Patricia Campos Peón

SECRETARIO M.en C. Victor Zendejas Buitrón

1er. SUPLENTE O.F.R. René Damian Santos

2do. SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

Gracias :

A LA UNAM "FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN"

A mis sinodales:

QFB. Idalia Ávila Miyazawa  
Dr. Víctor Zendejas Buitrón  
QFB. Patricia Campos Peón  
MVZ. Ángel G. Martínez Sosa  
QFB. René Damián Santos

por su tiempo y paciencia dedicados a la revisión de este trabajo pero sobre todo por el deseo de que nosotros sus alumnos seamos mejores. Gracias por sus enseñanzas.

Dra. Malagón : Por el apoyo en la elaboración de mi tesis.  
Dr. Guillermo Del Rey, Dra. Lupita y QFB. Juanita Villegas por el apoyo y dedicación en la realización de esta tesis y la -  
amistad y confianza brindada a nosotros.

Gracias

Dios por el don de la vida porque has hecho de mí,  
una persona capaz de amar, aprender y agradecer. Gra  
cias mi Señor.

A mis padres:

Mamá por el amor y la constante preocupación  
de ser mejores.

Papá por tu vida sólo dedicada a tus hijos.

A mi abuela:

Por compartir con nosotros tu vida.

A mis hermanos:

Tavo, Bety, Rosa, Julio, Toño y Gloria por el gus  
to de vivir, compartir y crecer juntos.

A mis compañeros y amigos:

Por el tiempo, alegría y tristezas compartidas  
gracias Rosa, Gaby, Ernes, Elisa, Lucía, Evita, Hil-  
da, Matilde, Paulina, Javier, Loriz, Caro y Sergio.

A Salvador:

Por nuestro amor y por ser HOY el motivo que  
Dios me dio para ser más feliz. TE AMO.

A ti pedacito de Dios:

Por ser la alegría más grande. Salvador y yo  
te esperamos.

Adriana .

## Índice

### PARTE I

### Página

1.1	Resumen	1
1.2	Antecedentes	2
1.3	Generalidades	4
	1.3.1 Relación Hospedero-Parásito	
1.4	Mecanismos inespecíficos	9
	1.4.1 Fisiología corporal	
	1.4.2 Complemento	
	1.4.3 Inflamación y Fiebre	
	1.4.4 Interferón	
1.5	Mecanismos específicos	19
1.6	Fagocitos	21
	1.6.1 Polimorfonucleares	
	1.6.2 Función	
	1.6.3 Sistema Fagocítico Mononuclear	
1.7	Fagocitosis	30
	1.7.1 Opsonización	
	1.7.2 Quimiotaxis	
	1.7.3 Adherencia	
	1.6.4 Endocitosis	
	1.7.5 Digestión y muerte intracelular	
1.8	Alteraciones en la fagocitosis	39
1.9	Técnicas para evaluar fagocitosis	40
1.10	Inhibidores de la fagocitosis	46
1.11	Fagocitosis de <u>Candida albicans</u>	47
	1.11.1 Factores que predisponen a micosis	
	1.11.2 Quimiotaxis	
	1.11.3 Opsonización	
	1.11.4 Endocitosis	
	1.11.5 Desgranulación	

**PARTE II**

**Hoja**

<b>2.1</b>	<b>Objetivos</b>	<b>54</b>
<b>2.2</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>55</b>
2.2.1	Reactivos biológicos	
2.2.2	Reactivos químicos	
2.2.3	Material	
2.2.4	Población estudiada	
2.2.5	Justificación de la metodología	
2.2.6	Metodología	
2.2.7	Diagrama del método	
2.2.8	Cálculo de parámetros fagocíticos	
2.2.9	Métodos estadísticos	

**PARTE III**

<b>3.1</b>	<b>Resultados</b>	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>Discusión</b>	<b>79</b>
<b>3.3</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>83</b>
<b>3.4</b>	<b>Sugerencias</b>	<b>84</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>85</b>

Tablas

		Hoja
1. Mecanismos inespecíficos	1.4.1	9
2. Mediadores de la inflamación	1.4.2	14
3. Principales funciones de fagocitos mononucleares	1.6.3	28
4. Tejidos donde maduran los los monocitos y macrófagos	1.6.4	29
5. Oponinas que participan en la fagocitosis	1.7.5	30
6. Receptores membranales en en macrófagos involucrados en la endocitosis	1.7.6	33
7. Mecanismos no oxidativos	1.7.7	38
8. Mecanismos de defensa que que no permiten la proliferación de Candida	1.11.8	48
9. Oponinas que reconocen las células fagocíticas en las células fúngicas	1.11.9	51
10. Factores fúngicos que modulan el mecanismo fagocítico del hospedero	1.11.10	52
11. Modulan de la actividad fagocítica por citocinas y mediadores	1.11.11	53



**Figuras**

<b>1. Potencial de microorganismos asociados al humano</b>	<b>1.3.1</b>	<b>Hoja 6</b>
<b>2. Vías de activación de complemento</b>	<b>1.4.2</b>	<b>11</b>
<b>3. Patogénesis de la fiebre</b>	<b>1.4.3</b>	<b>17</b>
<b>4. Descripción de la respuesta inmune</b>	<b>1.5.4</b>	<b>19</b>
<b>5. Reducción del NAT</b>	<b>1.8.5</b>	<b>41</b>

## 1.1 Resumen

1

El proceso fagocítico es uno de los mecanismos más importantes de defensa, que permite al hospedero resistir con éxito una agresión. La evaluación de las diversas etapas fagocíticas permiten valorar la eficiencia del mecanismo. Existen varios métodos que evalúan la Fagocitosis. Un método sencillo es la reducción del Nitro Azul de Tetrazolio (NAT) en portaobjetos, que permite visualizar la activación del metabolismo oxidativo de la célula fagocítica y además permite evaluar cuantitativamente el proceso de endocitosis, medido como índice fagocítico y porcentaje de fagocitosis.

Se propone adaptar la técnica de reducción del NAT en portaobjetos, para su aplicación en la determinación de valores de referencia de porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico en donadores clínicamente sanos del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social para su posterior comparación en pacientes adultos inmunocomprometidos y politransfundidos.

Durante el período de septiembre a diciembre de 1994, se seleccionaron 280 donadores clínicamente sanos, a los cuales se les determinó : Índice Fagocítico, Porcentaje de Fagocitosis y Reducción de Nitro Azul de Tetrazolio con el siguiente método. En un portaobjetos se colocan 0.5 ml de sangre se incuban en cámara húmeda por 30 min, se lava con solución de Alsever, se adicionan levaduras opsonizadas con Candida albicans en NAT (0.1%), se incuban por 15 min, se lavan y se contrastan con Safranina (0.5%) y se evalúa al microscopio.

Los resultados fueron los siguientes:

	% de Fagocitosis	Índice Fagocítico	Reducción del NAT
Población Total (280)	74.85±10.12	1.91±0.48	100%
Mujeres (51)	74.3±8.41	1.90±0.40	100%
Hombres (229)	74.98±10.5	1.91±0.49	100%

El método es útil para conocer los valores de referencia de Fagocitosis e Índice Fagocítico.

No existe diferencia en el porcentaje de Fagocitosis, Índice fagocítico y Reducción del NAT entre ambos sexos.

## Indice

Tablas y Figuras	Hoja
Distribución por sexo en donadores 2.1	60
Distribución por grupos de edad 2.2	61
Concentración de leucocitos 3.1	72
Concentración de hemoglobina 3.2	73
Concentración de hematocrito 3.3	74
Porcentaje de fagocitosis 3.4	75
Distribución del índice fagocítico 3.5	76
Distribución del porcentaje de fagocitosis por edad 3.6	77
Indice fagocítico según la edad 3.7	78

## 1.2 Antecedentes

Antes de los trabajos de Metchnikoff la inmunidad se atribuía únicamente a los anticuerpos circulantes, después de los trabajos de Metchnikoff se crearon dos corrientes entre los investigadores, con respecto a la intervención de la fagocitosis y las inmunoglobulinas en la defensa del organismo contra microorganismos infecciosos (Barret,1972). Fue en 1892 cuando Elie Metchnikoff publica sus observaciones de la capacidad que tienen las células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos para matar a los microorganismos. Metchnikoff se impresionó por la rapidez con la que las bacterias eran ingeridas y destruidas dentro de estas células. Después Almoroth Wright resolvió la disputa entre la teoría celular y humoral al demostrar que ciertas sustancias del suero llamadas opsoninas aumentaban la actividad fagocítica. Este proceso en ese momento no fue bien entendido sino hasta dos décadas después. Sobre este mecanismo se ha hecho investigación de manera intensiva especialmente en pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) y con otros defectos en la función fagocítica (Quie, Mills, 1979).

Los polimorfonucleares por tener capacidad de ingerir microorganismos y matar, juegan un papel central en los mecanismos de defensa del hospedero. Estas células son las que están en mayor proporción en la sangre para defender contra microorganismos invasivos (Blenaff, 1986).

A fines del siglo XIX Elie Metchnikoff denominó macrófagos a las células fagocíticas porque eran capaces de digerir grandes partículas. En 1924 Aschoff introdujo el nombre de sistema retículo endotelial, término muy empleado todavía para agrupar varias clases de

células capaces de absorber colorantes vitales, actualmente denominado Sistema fagocítico mononuclear (Blenaff, 1986).

Desde que en 1873 Elle Metchnnikoff describió el ataque y la destrucción de un microorganismo por las células fagocíticas de Daphnia las técnicas para valorar la fagocitosis han tenido un amplio desarrollo, una de las técnicas más comunes es por reducción de Nitro Azul de Tetrazollo (NAT) que fue introducida en el área de la medicina clínica a partir de 1968 y ha sido utilizada en pacientes con infecciones recurrentes pero principalmente se usa para el diagnóstico de la Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) debido a la incapacidad de las células fagocíticas de estos pacientes para reducir el NAT a formazán durante la fagocitosis (Gifford, Malawista, 1970). Esta prueba de fagocitosis se realizó también en pacientes con lepra lepromatosa y pacientes con tuberculosis pulmonar avanzada activa mostrando defectos en la función endocítica de sus fagocitos circulantes, fundamentalmente leucocitos Polimorfonucleares (PMN) (Rojas, Domínguez, 1991).

Por otro lado se valora la fagocitosis por esta prueba con el fin de observar el efecto de algunos fármacos sobre la fagocitosis: antileproso (dapsana, etionamida, protionamida); antiinflamatorios (indometacina y talidomida) y ascorbato (Rojas, Domínguez, 1991). Con la cefoxilina, un antibiótico  $\beta$ -lactámico derivado de la cefamicin C se estimula la fagocitosis debido a que hay un incremento en la adherencia de neutrófilos por la acción sobre diferentes receptores de membrana celular MAC-1, LFA 1, LFA y P150,95 (Rodríguez, Barriga, 1993).

Algunos otros padecimientos como la deficiencia completa de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de leucocitos o el uso de D-penicilamina, dan por resultado una prueba anormal con NAT (Pacheco, Shearer, 1994).

### 1.3 Generalidades

#### 1.3.1 Relación Hospedero-parásito

El hombre durante su existencia siempre ha estado en contacto con microorganismos que han traído consecuencias de dos tipos :

a) Consecuencias dañinas. -Es decir provocar situaciones en las que el individuo (en este caso el ser humano) ve afectada su salud provocando morbilidad y mortalidad (Talaro,1993).

b) Consecuencias benéficas. -Participan en los procesos industriales de alimentos así como de medicamentos que son útiles a la especie humana, y aún más en las asociaciones de comensalismo dentro del organismo humano, que garantiza la homeostasis en la relación hospedero parásito (Talaro, 1993).

El cuerpo humano se ve expuesto constantemente a microorganismos, que son adquiridos por la exposición del cuerpo en el medio ambiente. Para que un microorganismo pueda penetrar depende de las condiciones del hospedero y la patogenicidad del mismo, algunos de éstos colonizan al hospedero (flora normal), algunos se pierden rápidamente (transitorios) y otros invaden los tejidos. Este contacto con microorganismos provoca infección, una condición en la cual los microorganismos patógenos penetran al hospedero, entran al tejido y se multiplican. Cuando los efectos acumulativos dañan o rompen los tejidos resulta una enfermedad infecciosa (Talaro,1993).

En la infección, dos resultados son posibles:

- a) Los mecanismos de defensa pueden erradicar la infección del tejido dañado o del órgano, por lo que el agente infeccioso es eliminado del tejido y no causa un daño mayor (Talaro,1993).
- b) Puede haber daño en el tejido y en el órgano, provocando la morbilidad y daños muy severos que pueden causar la muerte (Talaro,1993).
- c) Existe una tercera posibilidad por hiporespuesta del individuo hacia el microorganismo la cual es insuficiente para eliminarlo pero no permite que el microorganismo cause enfermedad convirtiendo a este individuo en un portador aparente.ver figura 1.3.1

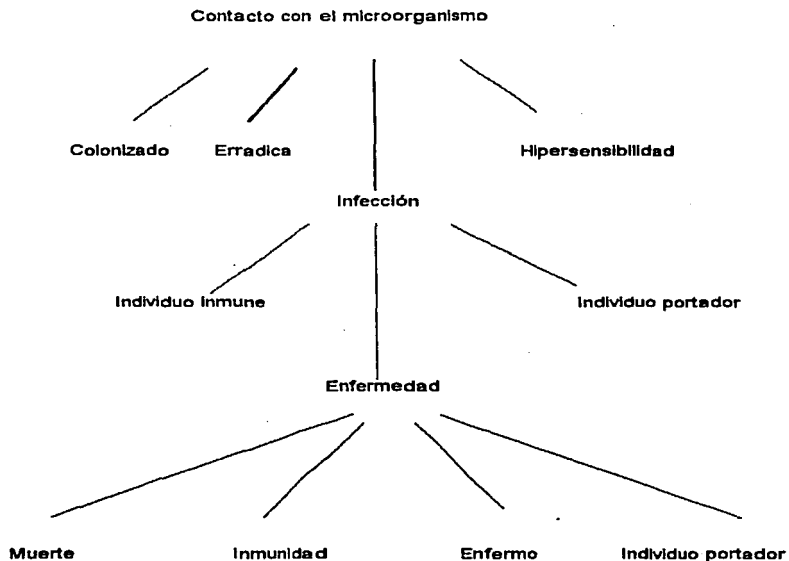


Fig. 1.3.1 Potencial de microorganismos asociados al humano (Talaro, 1993).



El tipo y severidad de una infección depende de numerosos factores relacionados con la patogenicidad de los microorganismos. La patogenicidad se describe como la capacidad que tienen los microorganismos para causar una infección o enfermedad. Los microorganismos patógenos se han dividido tradicionalmente en dos grandes grupos, dependiendo de la relación hospedero-parásito :

**Patógenos primarios.-** Son capaces de causar infección y enfermedad en personas sanas con su sistema inmune normal. Los ejemplos incluyen al virus de la influenza, virus de la rabia, protozoarios como el Plasmodium vivax o falciparum y otros microorganismos. Los patógenos primarios están generalmente asociados con distintas enfermedades reconocibles y tienen una virulencia muy potente (Talaro, 1993).

**Patógenos secundarios o patógenos oportunistas.-** Las personas afectadas son pacientes inmunocomprometidos. Estos microorganismos no son considerados patógenos para los individuos sanos. Los factores que predisponen a una infección por este tipo de patógenos son los siguientes:

Edad avanzada, mal nutrición, defectos genéticos y adquiridos en el sistema inmune, mal funcionamiento de los mecanismos de defensa del hospedero, estrés físico y mental, transplante de órganos, cáncer, quimioterapia, defectos anatómicos, diabetes, enfermedades del hígado y traumas quirúrgicos, individuos prematuros y recién nacidos (Talaro, 1993).

En la infección, 3 resultados son posibles:

## Entrada a la Infección

El microorganismo entra a los tejidos del cuerpo por una ruta característica, la vía de entrada, usualmente es cutáneo o mucosal. La fuente del agente infeccioso puede ser exógeno (proveniente de otro individuo o un animal), o endógeno, que existe alrededor o en el cuerpo (flora normal o infección latente) (Talaro, 1993).

La entrada del microorganismo son por las mismas regiones anatómicas colonizadas por la flora normal: la piel, vía gástrica, vía respiratoria y vía urogenital. De hecho este fácil acceso por la flora normal algunas veces ayuda a penetrar cuando existe una disminución en la resistencia del individuo. La mayoría de los patógenos tienen que adaptarse al medio de entrada, que le provee un hábitat apropiado para su crecimiento (Rohit, 1993).

También algunos microorganismos pueden tener más de una entrada para producir la infección, por ejemplo el gonococo puede entrar e infectar la garganta y el ano además del tracto urinario; Mycobacterium tuberculosis entra en tracto respiratorio y tracto gastrointestinal; Corynebacterium diphtheriae puede infectar la garganta y la piel (Talaro, 1993).

## Tamaño del Inóculo

Otro factor crucial del curso de una enfermedad es la cantidad de microorganismos en la dosis de inoculación. Para muchos agentes la infección procede si hay un número mínimo llamado dosis infectante (Talaro, 1993).

El que los microorganismos puedan permanecer un corto o un largo tiempo también se debe al papel que tiene el sistema inmune, el cual combate a los agentes infecciosos. Los microorganismos tienen diferentes formas y mecanismos de penetración, por lo que el sistema inmune requiere una variabilidad de respuestas para cada tipo de infección.

#### 1.4 Mecanismos inespecíficos

Se conoce que los mecanismos de defensa se dividen en dos categorías: la respuesta innata o inespecífica y la respuesta adaptativa o específica .

La respuesta innata o inespecífica la poseen todos los individuos aunque no haya contacto previo con el microorganismo y no es de memoria. Ver tabla 1.4. 1

Tabla 1.4.1 Mecanismos Inespecíficos (Rolt, 1993).

Consideraciones genéticas	Inflamación y Fiebre
Fisiología corporal	Interferón
Factores humorales inespecíficos	Fagocitosis
Complemento	

##### 1.4.1 Fisiología corporal:

Barreras Físicas y Bioquímicas: piel, moco, cilios, pH ácido del estómago, lisozimas en varias secreciones, glándulas sebáceas, organismos comensales en intestino y vagina, espermia en semen.

#### 1.4.2 Complemento:

Es un grupo de 30 proteínas que puede ser activado de manera espontánea por varios microorganismos por la vía alterna, la cual es una reacción innata o inespecífica. El sistema de complemento puede ser activado también por vía clásica por el complejo antígeno-anticuerpo y por la vía de las lectinas (Holmskov, Malhotra, 1994). Ver figura 1.4.3. Su función principalmente es:

- 1.- Unirse a los microorganismos para favorecer la fagocitosis.
- 2.- La atracción de los fagocitos a los sitios de activación de complemento.
- 3.- Incrementan la permeabilidad vascular.
- 4.- Daña la membrana plasmática en bacterias Gram-negativas, virus y otros organismos produciendo lisis.
- 5.- Amplifica la respuesta inflamatoria.

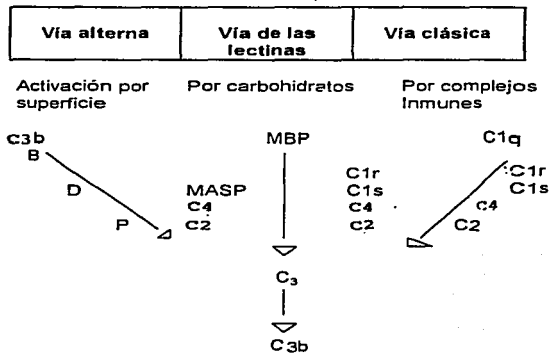


Fig. 1.4.2 Vías de activación de complemento. (Holmskov, Malhotra, 1994).

La proteína opsonisante principal es C3b que reconoce por lo menos tres diferentes receptores en la membrana plasmática; CR-2 (CD21) encontrada primeramente en linfocitos B, CR-3 (CD11b/CD18) que se encuentran en todos los fagocitos y algunos linfocitos, y CR4 (CD11c/CD18) que se encuentran en macrófagos principalmente y se ha expresado también en monocitos circulantes y neutrófilos(Brown, 1991).

Hay individuos con deficiencias de componentes de complemento que pueden activar sus dos vías, su suero puede promover normalmente la opsonofagocitosis pero es incapaz de matar indirectamente al microorganismo (Ross, Rosenthal, 1987).

El otro tipo de pacientes es por carencia de receptores, por ejemplo para IC3b, las características de estos pacientes son leucocitosis crónica con neutrofilia marcada e infecciones bacterianas recurrentes (Brown, 1991).

#### 1.4.3 Inflamación y fiebre

La inflamación es un mecanismo inducido por varios tipos de sustancias producidas por un daño físico o por la presencia de microorganismos. Cuando la inflamación es resultado de una invasión por microorganismos la función de la inflamación es localizar, destruir y eliminar al organismo. Se caracteriza por la acumulación de leucocitos en los sitios del tejido dañado o de la infección.

Se dan tres eventos principales durante esta respuesta:

- 1.- Un incremento del suministro sanguíneo en el área infectada.
  - 2.- Incremento en la permeabilidad de los capilares causada por la retracción de las células endoteliales y posiblemente por incremento en el transporte vesicular a través del endotelio.
  - 3.- Los leucocitos migran de los capilares al tejido hay un número mayor de neutrófilos y después se da la migración de monocitos y linfocitos. En la migración de neutrófilos, linfocitos y monocitos participan las moléculas de adhesión como son la  $\beta$ -2- integrina, LFA- 1 y CR3 que se unen ICAM- 1 e ICAM- 2. Además en la acumulación de neutrófilos participa ELAM que interactiva con un determinante Levis X presente en la superficie de glicoproteínas de neutrófilos (Rollit, 1993)
- Las reacciones inflamatorias son controladas por citocinas, por mediadores vasoactivos liberados de basófilos, plaquetas, células cebadas. Ver tabla 1.4.2. (Rollit, 1993).

Tabla 1.4.2. Principales mediadores de la inflamación los cuales incrementan el flujo sanguíneo, permeabilidad vascular y modulan el movimiento celular.

Mediador	Origen	Acción
Histamina	Basófilos Mastocitos Cebadas	Incrementa permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso
5-Hidroxi triptamina, serotonina	Plaquetas	Incrementa permeabilidad vascular
Factor quimiotáctico de neutrófilos	Células cebadas	Quimiotaxis de neutrófilos
Interleucina 8	Linfocitos	Quimiotaxis de células T y monocitos
C3a	Complemento	Degranulación de células cebadas, contracción de músculo liso.
C5a	Complemento	Quimiotaxis de macrófagos
Bradicinina	Sistema de cininas	Vasodilatación, contracción músculo liso e incremento de la permeabilidad vascular
Fibrinopéptidos y fibrina	Sistema de coagulación	Incrementa la permeabilidad y quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos
Prostaglandina E2 (PGE2)	Vía ciclooxygenasa	Vasodilatación, potencia el incremento de la permeabilidad
Leucotrieno B4 LTB4	Vía lipoxigenasa	Quimiotaxis de neutrófilos, junto con E2 incrementa la permeabilidad vascular
Leucotrieno D4 LTD4	Vía lipoxigenasa	Contracción músculo liso, incrementa la permeabilidad vascular

(Roitt, 1993).



## Fiebre

Hay dos respuestas asociadas a la inflamación; la primera involucra la alteración de la temperatura en el hipotálamo y la generación de la respuesta febril; la segunda involucra alteraciones en el metabolismo o en el hígado (Baumann, Gaudie, 1994). Los IL- 1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , IL- 6 son polipéptidos mediadores de fiebre producidos por el hospedero en respuesta a la presencia de microorganismos extraños y otros materiales pirogénicos exógenos (Dinarello Cannon, Mancilla, 1981), como sustancias mediadoras de la inflamación (Dinarello, Cannon, Wolf, 1988). IL - 1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , IL- 6 son pirogénos endógenos que inducen el incremento de metabolitos de ácido araquidónico, primeramente las prostaglandinas derivadas de la ciclooxigenasa, prostaciclina y tromboxanos (Dinarello, Cannon, Wolf, 1988). La IL- 1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , IL- 6 que son considerados para regular la respuesta febril posiblemente como un mecanismo protector. Estas citocinas median la fiebre a través de la inducción de PGE<sub>2</sub> (Baumann, Gaudie, 1994) que es un potente agente pirogénico cuando se introduce en el cerebro con efectos en el centro termoregulador (Dinarello, Cannon, Mancilla, 1991).

## Proteínas de Fase Aguda

En un proceso de inflamación se caracteriza por el aumento en la concentración de proteínas plasmáticas como la antitripsina ( $\alpha_1$ -AT),  $\alpha_1$  antiquimiotripsina, fibrinógeno, haptoglobina,  $\alpha_2$  ácido glicoprotéico, amiloide sérico A y proteína C reactiva llamadas proteínas de fase aguda (Buchner, Hugli, Ember, 1995). Las

proteínas de fase aguda son sintetizadas en hígado durante un proceso inflamatorio agudo y pueden actuar como inhibidores de proteasas, factores de coagulación y opsoninas. En algunos trabajos in vitro se ha demostrado que  $C_{5a}$  actúa como un potente mediador de la inflamación y estimula la síntesis de proteínas de fase aguda (Vogels, Cantoni, Carelli, 1993).

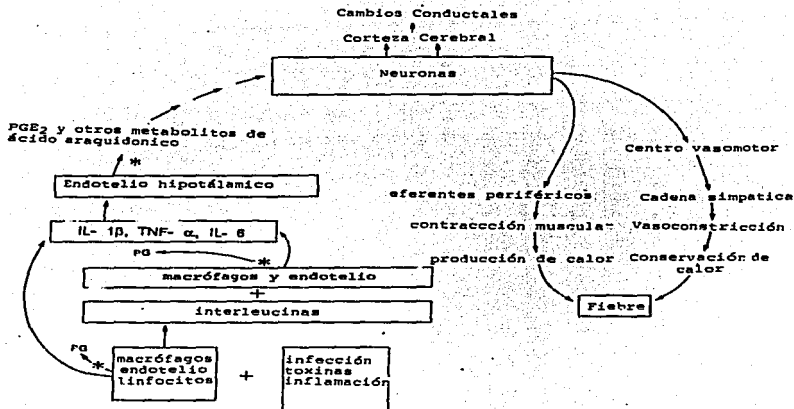


Fig. 1.4.3 Patogénesis de la fiebre (Dinarello, Cannon, Wolf, 1988)

PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>

#### 1.4.4 Interferón

Es una glucoproteína en humanos que se produce naturalmente por células infectadas. En humanos el interferón es producido principalmente por los fibroblastos y los leucocitos. Los tres principales tipos son: Interferón alfa, producto de leucocitos que es inducido por infecciones producidas por virus, bacterias y otros agentes; Interferón beta, un producto de fibroblastos, células epiteliales, y macrófagos en respuesta a infecciones producidas por virus; y el Interferón gama producto de linfocitos T y células NK, tiene actividad antiviral, participa en la activación de macrófagos, actúa sobre fibroblastos, participa en la activación y en la diferenciación de células B (Fikelman, Katona, 1988), y fundamentalmente en la regulación inmunológica a nivel de  $TH_1$  y  $TH_2$ .

Los dos primeros tipos son importantes en supresión no específica de infecciones virales, mientras que el interferón gama es parte importante de la respuesta específica (Talaro, 1993).

Los efectos antivirales del interferón- $\gamma$  se deben a que incrementan la expresión de moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad que facilitan el reconocimiento de antígenos virales, por activación de células NK y macrófagos que tienen la capacidad de destruir células infectadas por virus e inhibición directa de la replicación viral (Roitt, 1993). El interferón- $\gamma$  con macrófagos murinos tiene una importante actividad fungicida con H.capsulatum (Diamond, 1989).

### 1.5 Mecanismos específicos

La respuesta inmune tiene como características principales ser: específica, tener memoria ser inducible y transferible. Esta respuesta inmune adquirida se divide en:

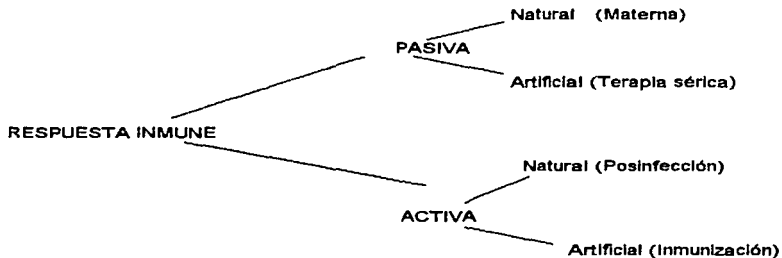


Fig. 1.5.4 Descripción de la respuesta inmune adquirida.

Esta respuesta inmunitaria tradicionalmente se ha dividido en respuesta humoral y celular. Las células centrales de la respuesta adquirida se dividen en dos categorías los linfocitos T, B y macrófagos.

Los linfocitos TH tienen diversas actividades: algunos están involucrados en la diferenciación de las células B, los linfocitos TH<sub>2</sub> consecuentemente en la producción de anticuerpos. Otro grupo de linfocitos TH interactúan con las células fagocíticas para ayudar a destruir al microorganismo invasor TH<sub>1</sub> y otros que reconocen a las células infectadas para destruirlas (linfocitos T citotóxicos).

Los linfocitos B enfrentan al microorganismo invasor por medio de la producción de anticuerpos, los cuales reconocen al microorganismo invasor de forma específica (Ortiz, 1987).

Los macrófagos tienen la función de presentar el determinante antigénico a los linfocitos TH para activar la respuesta inmune, iniciándose la cascada de citocinas que son las comunicadoras entre las células linfocitarias para establecer la producción de los efectores humorales y celulares, además de participar en la fagocitosis.

## 1.6 Células Protagonistas

1.6.1 Las células que tienen un papel primordial en el mecanismo de defensa inespecífico son los leucocitos polimorfonucleares y células del sistema fagocítico mononuclear que están encargadas de la función fagocítica.

Ambas estirpes se originan en médula ósea a partir de un precursor común, que pronto se diferencia en precursores específicos: mieloblasto que dará origen a la línea granulocítica (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), y el monoblasto que más tarde originará el sistema fagocítico mononuclear.

En la médula ósea, durante una etapa proliferativa que dura aproximadamente 6.5 días, el mieloblasto se diferencia en promielocito y después en mielocito.

Durante la etapa de maduración (1 a 7.5 días), el mieloblasto se diferencia en metamielocito, después en polimorfonuclear maduro segmentado.

Durante la maduración granulocítica hay un cambio progresivo del núcleo. Los nucléolos desaparecen, la cromatina se condensa y la masa nuclear antes redondeada, empieza a mostrar muescas y por último se segmenta. Estos cambios nucleares se acompañan de modificaciones citoplasmáticas bien definidas

### Mieloblasto

Su tamaño oscila de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro y tiene una proporción núcleo citoplasma alta. Por lo general el núcleo es redondo u oval, contiene cromatina delicada, afiligranada, teñido de modo uniforme. Hay de 3 a 5 nucléolos grandes muy desarrollados. En la membrana nuclear lisa no se observa condensación de cromatina. La cantidad de citoplasma de pequeña a moderada, es aglomerada (Mckenzie, 1991).

### Promielocito

Los gránulos primarios tienen una membrana fosfolípida que se tiñe con un colorante lipofilo sudán negro B. Mediante técnicas citoquímicas puede demostrarse que los gránulos contienen enzimas y otras sustancias, fosfatasa ácida, mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, lisozima, mucopolisacáridos sulfatados y otras proteínas básicas. El tamaño del promielocito oscila de 15 a 21  $\mu\text{m}$  dependiendo de la etapa del ciclo mitótico de la célula.

### Mielocito

Los gránulos secundarios están también circundados por una membrana fosfolípida que se tiñe con negro de sudán B. Se observan gránulos azurófilos grandes pero su síntesis ha cesado. Estos gránulos secundarios contienen fosfatasa alcalina y lisozima pero no fosfatasa ácida ni peroxidasa. En los gránulos secundarios se han identificado otras enzimas como aminopeptidasa, colagenasa y proteínas básicas. El núcleo disminuye de tamaño, en el mielocito joven pueden observarse nucléolos pero comúnmente no existen. El nucléolo es redondo u oval y con frecuencia excéntrico en las etapas tardías del mielocito, el núcleo puede mostrarse aplanado en un lado, contiguo al núcleo, se aprecia una zona clara que corresponde al aparato de Golgi, la proporción núcleo-citoplasma ha disminuido. Esta es la última etapa en que hay división mitótica.

### Metamielocito

Son menores que los mielocitos de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro pero su característica diferencial más visible es la depresión del núcleo que le da un aspecto de frijol. Los nucléolos no son visibles.



### Granulocito en banda

El mielocito se transforma en granulocito en banda (forma de haba), la cromatina muestra cambios degenerativos. La célula es algo menor 9 a 15  $\mu\text{m}$  que el mielocito. El citoplasma es rosáceo como en la etapa anterior, esta es la primera etapa de diferenciación que puede verse normal en sangre periférica.

### Neutrófilo polimorfonuclear

Se reconoce por un núcleo segmentado con dos o más lóbulos conectados por un filamento nuclear delgado. La mayor parte de los neutrófilos tienen de dos a cuatro lóbulos nucleares. El citoplasma del polimorfonuclear (PMN) contiene numerosos gránulos secundarios, puede haber gránulos primarios pero su escasez y la pérdida de sus cualidades de tinción hacen difícil su identificación .

#### 1.6.2 Función

Los neutrófilos deben salir de la sangre para defender a los tejidos contra organismos, la diapedesis comienza por la adherencia probablemente, el primer paso de migración extravascular (Yakuwa,1989); los neutrófilos se adhieren al endotelio vascular y se diseminan en la superficie del mismo. A la adherencia siguen agregándose neutrófilos y después atraviesan por diapedesis, el endotelio por las uniones de las células. Al movimiento a través del tejido, el neutrófilo es ayudado por sustancias como la colagenasa secretada de gránulos específicos de los neutrófilos al fusionarse con la membrana de los pseudópodos. Los neutrófilos pueden pasar a través de los tejidos o ser atraídos a áreas específicas por estímulos quimiotácticos.

Se ha demostrado recientemente que los PMN poseen dos mecanismos para aumentar la ingestión mediada por Ig G. Uno de los mecanismos empleados, es por exposición de los PMN al Factor Estimulador de Colonias y estéres de forbol in vitro . El mecanismo es

mediante receptores de PMN que reconocen la secuencia Arg-Gly-Asp (Brown,1991; Richardson, Brownlie,Shankland,1992).

En la superficie externa de neutrófilos humanos, se localizan componentes del sistema de la fase de contacto H-cinínogeno, precalicreína, factor XI y factor XII. (Henderson, Figueroa, Muller,1994).

Además de sus funciones principales de Fagocitosis y destrucción de microorganismos.Estimulan la coagulación al secretar una sustancia que activa al primer factor de contacto de la coagulación y convierte también el cinínogeno en cinina, las cininas causan vasodilatación e incrementan la permeabilidad vascular. Las cininas quimiotácticas atraen a los neutrófilos a los sitios de inflamación. Al principio los neutrófilos activan la producción de cininas pero conforme las células se acumulan y degradan a las propias cininas (Henderson, Figueroa, Muller,1994).

La función de los neutrófilos es también estimulada por la presencia de citocinas que aumentan o regulan su actividad microbicida (Diamond,1989).

El Factor de Necrosis Tumoral producido por macrófagos incrementa la adherencia de neutrófilos al endotelio vascular, mejora la fagocitosis y la desgranulación; libera metabolitos dependientes de oxígeno (Lantz,1993).

Cuando los neutrófilos ya son viejos o sufren apoptosis pueden ser fagocitados por macrófagos (Sevill,Henson,1989).

Durante la infección los PMN tiene una respuesta quimiotáctica, fagocítica y oxidativa incrementada durante una estimulación in vitro (Bass, Olbrantz, Szjeda,1986).

### Eosinófilo

Los eosinófilos se distinguen por la afinidad de sus gránulos a tinciones ácidas, están en pequeña proporción (1 a 5 %) en sangre periférica y prevalecen en tejido. Experimentan una maduración morfológica semejante a la de los neutrófilos e incluso es probable que tengan un precursor en común con basófilos. Hay factores que promueven su proliferación y diferenciación, ejem: factor estimulador de colonias, interleucina 5 y factores eosinopoiéticos. También muestran una respuesta quimiotáctica a C5a, y a factores producidos por células T (Gordon, 1991).

La fagocitosis de eosinófilos es pobre, pero degranulan rápidamente en presencia de factores quimiotácticos cuando se unen a los receptores de membrana para Ig G e Ig E. Forman fagolisosomas con actividad proteolítica. En los eosinófilos hay activación del mecanismo oxidativo con generación de peróxido de hidrógeno y probablemente superóxido. (Gordon, 1991).

En eosinófilos hay una enzima como la mieloperoxidasa en neutrófilos, esta enzima es la eosinofilo-peroxidasa que interactúa con el peróxido de hidrógeno, yoduros y cloruros para lisis algunos organismos como Trichinella. Aunque la principal fuente de actividad lítica son las proteínas catiónicas que se encuentran contenidas en gránulos que se liberan durante la degranulación y son tóxicas para parásitos. Estos gránulos además contienen aril sulfatasa y fosfatasa ácida y no contienen lisozima.

Los eosinófilos producen grandes cantidades del factor activador de plaquetas, leucotrienos, ejem: LTB4, LTC4 y prostaglandina E2. Su función principal es la actividad **proinflamatoria, anti-inflamatoria y actividad antiparasitaria** (Gordon, 1991).

### 1.6.3 Sistema fagocítico mononuclear

Las células del sistema fagocítico mononuclear incluyen promonocitos, monocitos circulantes y macrófagos. La línea celular se origina en médula ósea como célula progenitora para los granulocitos y monocitos-macrófagos. El tiempo de maduración en médula ósea desde el primer precursor monocítico a monocito maduro es de seis días, su vida media es de aproximadamente tres días en humanos y cerca de 18 hrs en ratones (Johnston, 1988).

#### Monoblasto

El núcleo es ovoide o redondo, pero puede estar plegado, la cromatina nuclear azul claro o púrpura está dispersa (afiligranada) y se observan con facilidad varios nucleólos. Las hormonas glicoproteicas participan en la diferenciación del monoblasto a promonocito.

#### Promonocito

La célula mide de 14 a 18  $\mu\text{m}$  de diámetro con abundante citoplasma azul grisáceo puede mostrar gránulos azurófilos finos, con mucha frecuencia, el núcleo es irregular y con una depresión profunda y una malla fina de cromatina. Los filamentos de la cromatina son más gruesos que los monoblastos.

#### Monocito maduro

Su tamaño oscila de 12 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro con un promedio de 18  $\mu\text{m}$ , siendo las células de mayor tamaño en sangre periférica. El citoplasma azul grisáceo está saturado de gránulos finos rodeados de membrana arenisca dispersa de manera uniforme. Tiene dos tipos de gránulos, que contienen peroxidasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa lo que hace pensar que sus lisosomas son semejantes al de los neutrófilos; otro tipo de gránulos no contienen fosfatasa alcalina, son heterogéneos en densidad celular, tamaño,

morfología y antígenos de superficie, su migración es al azar cuando no existe inflamación.

#### Función Monocitos

Los monocitos circulantes atraviesan el tejido en respuesta a un estímulo fisiológico y patológico. Sus funciones son :

-Células presentadoras de antígeno y células efectoras.

-Además de tener receptores para : Factor estimulador de colonias para macrófagos, Factor estimulador de colonias para macrófagos-granulocitos y para interleucina-2 (Espinoza,Bosco,Musso,1995).

-En ratones y humanos los monocitos /macrófagos tienen receptores para manosa y fucosa , además de tener receptores para CD4, células productoras de IL-1 y IL-8 (Roitt,1993).

La diferenciación de monocito a macrófago esta asociado a alteraciones en la expresión de moléculas de clase II HLA-DR (Novellino,Trejo,1991) además de una reducción en la capacidad de generar productos dependientes de oxígeno (Abramson,Gallini,1990).

#### Macrófagos

La transición de monocito a macrófago se caracteriza por un crecimiento celular progresivo, conforme madura el macrófago pierde peroxidasa pero recupera lisosomas y mitocondrias. El núcleo recupera su forma redonda y los nucleólos pueden visualizarse. Estas células maduran en tejido y en condiciones normales no regresan a sangre, pero en áreas de inflamación algunos pueden pasar a la linfa, llegando por último a la sangre (Mckenzie,1991). La activación del macrófago se da durante la infección por medio de

linfocinas; los macrófagos activados muestran un incremento en la capacidad de adherencia, incrementa la formación de pseudópodos, e incrementa el número de vesículas activadas. Su función principal es atravesar la pared endotelial de los vasos sanguíneos y migrar al sitio donde se encuentra el microorganismo invasivo (Johnston,1988).

tabla 1.6.3 Principales funciones de fagocitos mononucleares

**Funciones principales de los fagocitos mononucleares activados:**

- Actividad microbicida aumentada
- Actividad tumoricida aumentada
- Aumento de fagocitosis
- Aumento de quimiotaxis
- Aumento de pinocitosis
- Aumento del transporte de glucosa
- Aumento de la presentación del antígeno

(Johnston,1988)

Otra función importante del macrófago es su capacidad para quitar células dañadas y células viejas sin liberar el contenido histotóxico, como neutrófilos viejos o que sufrieron apoptosis (Savill,Henson,1989).

Se cree que esta interacción celular es por reconocimiento de carga y el pH que tiene el sitio de inflamación (Jonhston,1988).

También pueden presentar moléculas de clase II del MHC en la superficie por efecto de la interleucina 4 (Abramson, Gallini,1990).

tabla 1.6.4 Tejidos donde maduran los monocitos y macrotagos

Hígado	Células de Kupffer
Pulmón	Macrófagos alveolares
Cavidades seroso	Macrófagos pleurales y peritoneales
Hueso	Osteoclastos
Cerebro	Células de la microglia
Bazo	Macrófagos
Piel	Celulas de Langerhans y células de Grandstein
Nódulos linfáticos	Macrófagos de los nódulos
Pared intestinal	Macrófagos de la pared intestinal
Leche materna	Macrófagos de la leche
Placenta	Macrófagos placentarios
Riñón	Células del Mesagio

(Johnston,1988)

Anormalidades en la función de los monocitos-macrófagos

Está disminuida en los recién nacidos, en pacientes que se les administra corticosteroides y con terapia inmunosupresora, pacientes con diabetes mellitus, calcinados o pacientes con SIDA.

Hay una citotoxicidad defectuosa de los monocitos en pacientes con cáncer y pacientes con el síndrome de Wiskott-Aldrich y Enfermedad Granulomatosa Crónica (Johnston,1988).

## 1.7 Fagocitosis

### 1.7.1 Oponización

En este proceso se presenta de manera favorable el microorganismo invasor para que sea ingerido más fácilmente por el fagocito. Participan factores séricos denominados opsoninas, estas opsoninas son de diferente naturaleza. Las opsoninas incluyen anticuerpos (fundamentalmente IgG), componentes del complemento y proteínas de fase aguda. Fig.1.6.6 (Stossel, 1974).

Tabla 1.7.5 Oponinas que participan en la fagocitosis

Ig G1 e Ig G3	Alfa-2-globulina
C3b y C3bi	Proteína C-reactiva y las colecinas
Alfa-1-globulina	Ig M de ratón

(Saba,1975)

### 1.7.2 Quimiotaxis

Es la migración de los fagocitos profesionales al sitio de inflamación o hacia el microorganismo invasor. Esta migración es estimulada por los llamados factores quimiotácticos, producidos durante el proceso inflamatorio por la células involucradas. (Stossel, 1974)



Los agentes quimiotácticos incluyen fragmentos de proteínas que participan en el sistema de complemento, factores derivados del sistema de cininas, sistema fibrinolítico y otros productos derivados de leucocitos y plaquetas. Algunos productos bacterianos son factores quimiotácticos, como el LPS (Rolitt, 1993). Los mediadores son responsables de la movilización del leucocito, la motilidad del fagocito hacia la célula blanco que es regulada por los receptores de membrana plasmática. eventos metabólicos y la reorganización del citoesqueleto; hay una elevación de calcio libre intracelular cuando se da la adherencia de neutrófilos. (Petersen, Williams, Hallet, 1993).

### 1.7.3 Adherencia

El proceso que sigue a la opsonización es la adherencia del fagocito a las células opsonizadas. El movimiento de los fagocitos se debe a la interacción de los microtúbulos con la membrana que controla el movimiento y la distribución de las proteínas de transporte de la membrana, los receptores de superficie celular y las interacciones membrana-membrana o membrana-sustrato en la adherencia (Davidshon, 1988).

Antibióticos como la cefoxitina (cefalosporina) actúa en el leucocito sobre los diferentes receptores glicoproteicos en la superficie de la membrana celular como: Mac-1, LFA-1, p150-95, que se sabe que son mediadores en el mecanismo de adherencia (Rodríguez, Barriga, 1993).

#### 1.7.4 Endocitosis

Es el evento en el cual el fagocito envuelve al agente extraño dando origen a un fagosoma, éste se fusiona con los lisosomas para que tengan contacto con la partícula fagocitada dándose el fagolisosoma. En la tabla 1.7.6 se puede observar receptores en macrafagos que están involucradas en la endocitosis.

La glicólisis provee energía para el involucramiento, el cambio configuracional en la proteína de polimerización de la actina dentro de los filamentos, formación de pseudópodos los cuales rodean la vacuola fagocítica. El pH cambia después de la ingestión del microorganismo, el fagosoma empieza a acidificarse. Este medio ácido puede ser bactericida para algunos microorganismos (pneumococo), pero también es importante para la muerte intracelular por el sistema de peróxido de hidrógeno.

Una vez endocitados los microorganismos se encuentran con enzimas hidrolíticas de los lisosomas o gránulos citoplasmáticos. Los gránulos primarios o azurófilos conocidos así por que son los primeros en aparecer en la fase de maduración de los neutrófilos y los gránulos secundarios o específicos y estos gránulos van a ser liberados cuando los neutrófilos estén activados (Stossel, 1974).

Los complejos inmunes circulantes podrían interferir con la población endocítica de los fagocitos circulantes por bloqueo de receptores o por saturación de células; no está claro el efecto que la deficiencia endocítica pudiera tener en patologías como el lupus eritematoso (Rojas, Domínguez, 1991).

**Tabla 1.7.6 Receptores membranales en macrófagos involucrados en la Endocitosis**

<b>Receptores para Fc</b> a. FcRI (para Ig G gamma 2a)* b. FcRII (para Ig G gamma 1 y gamma 2b)* c. FcRIII (para Ig G gamma 3)
<b>Receptores para componentes de Complemento</b> a. CR1 (para C3b) b. CR3 (para C3bi)
<b>Receptores para Azúcares</b> a. Glicoproteínas con residuos terminales de manosa, fucosa, N-acetilglucosamina, y otros de origen microbiano (Adams, Hamilton, 1984).

\*. Receptores en ratón

### 1.7.5 Digestión y Muerte Intracelular

En el fagolisosoma va a haber procesos bioquímicos que tienen como fin la destrucción del agente extraño mediante diversos mecanismos. Los mecanismos que se presentan dentro del fagolisosoma son de tipo oxidativo y no oxidativo:

#### Mecanismos Oxidativos

##### Mieloperoxidasa

##### Independientes de Mieloperoxidasa

$H_2O_2$

Radicales  $OH^-$

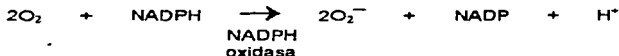
Singulete  $O_2^-$

Oxido nítrico NO

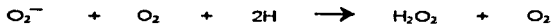
Durante la activación de los mecanismos oxidativos hay aumento de:

- a) consumo de oxígeno
- b) consumo de glucosa
- c) actividad del ciclo de las pentosas
- d) producción de peróxidos (Klebanoff, Rosen, 1979)

Las bases bioquímicas del estallido respiratorio son por la activación de la enzima NADPH oxidasa que cataliza la reducción de un electrón del  $O_2^-$  a expensas del NADPH.



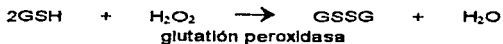
El peróxido es producido por la reacción del  $O_2^{\cdot -}$  que dismuta con otra molécula de  $O_2^{\cdot -}$  y es oxidado:



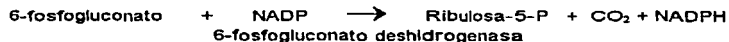
La oxidación de la glucosa es por la vía Hexosa Monofosfato.

El incremento de NADPH durante el estallido respiratorio es por la acción de:

- (a) La formación de  $O_2^{\cdot -}$
- (b) Por el sistema dependiente de glutatión que usa NADPH para detoxificar al  $H_2O_2$  que se oxida para formar agua.



Cada glucosa es metabolizada por la vía HMP que reduce dos moléculas de NADP a NADPH que permite formar los agentes reductores necesarios para continuar el estallido respiratorio:



(Babior, 1984; Quile, 1980),

#### Función de la Mieloperoxidasa

La producción de el halógeno oxidado empieza a ser catalizado por la Mieloperoxidasa que es generada durante el estallido respiratorio:

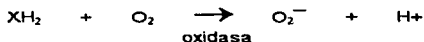


Durante este proceso se activa la oxidasa que cataliza la reacción general:



Esta reacción explica el aumento de la producción de oxígeno y producción de peróxido de hidrógeno, al igual que otras vías como la hexosa monofosfato.

La oxidasa que reduce al oxígeno hasta el anión superóxido, por la ayuda de la Superóxido Dismutasa (SPD), se reduce hasta peróxido de hidrógeno o puede reaccionar con peróxido ya formado dando radicales hidroxilo, los cuales son altamente reactivos.



La enzima mieloperoxidasa (MPO) junto con el haluro, por medio de la hidrólisis del peróxido incrementan su capacidad de atacar componentes cruciales de la replicación bacteriana. (Qiue, 1980).

Esta activación puede provocar la iodación de la pared celular microbiana, la producción de aldehídos bactericidas o el rompimiento oxidativo de enlaces peptídicos en las proteínas bacterianas (Qiue, 1980).

### Mecanismos no oxidativos

Tabla 1.7.7 Mecanismos no oxidativos

Lisozima Lactoferrina Proteínas Catiónicas Producción de NO
--

(Koib, 1992)

### Potencial de membrana

El potencial de membrana de las células fagocíticas muestra cambios cuando las células están expuestas a compuestos o partículas extracelulares. Estos cambios de potencial transmembranal se dice que es la cascada bioquímica para producir la quimiotaxis, fagocitosis y activación metabólica. (Bjerkness, Sjrusen, 1989).



### 1.8 Alteraciones de la Fagocitosis

Los principales desórdenes del mecanismo de defensa se deben principalmente a defectos en la línea celular y defectos opsónicos (Bjerkness, Bassoe, Sjorsen, 1989).

La Enfermedad Granulomatosa Crónica, caracterizada porque los leucocitos no son capaces de generar los productos oxidativos (Diamond, 1989). Esta anomalía se asocia a un error del metabolismo y disminuye la actividad NADPH oxidasa (Baehner, Nathan, 1968):

La fagocitosis se ve debilitada en las leucemias monocíticas, lupus eritematoso y deficiencia del complejo CD11-CD18 el cual es un complejo de glicoproteínas de adherencia a la membrana (Jonhston, 1988), Síndrome Rothmund-Thomson, asociado a neutropenia y baja respuesta quimiotáctica, Síndrome de Job, Síndrome de Chediak-Higashi y Leucemia aguda. (Ross, Rosenthal, 1987)

En algunas micosis como la aspergilosis, la fagocitosis puede estar disminuida. (Diamond, 1993)

### **1.9 Técnicas para evaluar la Fagocitosis**

Cada ensayo tiene ventajas y limitaciones, y el mejor es de acuerdo a los fines particulares que persiga el investigador.

**Reducción del Nitro Azul de Tetrazolio.**

Baehner y Natán observaron que los neutrófilos reducen el colorante cuando se daba el proceso de fagocitosis. Estas observaciones dieron como resultado el desarrollo de pruebas cuantitativas y cualitativas para la reducción del NAT. Las pruebas de reducción del NAT fueron introducidas en 1968 en el área de medicina clínica. Su principio es, el colorante entra al neutrófilo pasa a través de la membrana externa, y la fagocitosis promueve la reducción del colorante por un incremento de la permeabilidad de la célula resultado del metabolismo celular (Segal, 1974).

**Fundamento.-** Las reacciones redox que ocurren en los PMN que están fagocitando, como resultado de la activación de la membrana por un microorganismo que ha sido opsonizado, esta activación de las reacciones redox es por la activación de la enzima oxidasa que incrementa el consumo de oxígeno por medio de nucleótidos de pirimidinas, NADH y NADPH. (Baehner, 1979).

La oxidasa cataliza la reacción entre NADH formado en la vía glicolítica anaerobia y NADPH formado por la vía hexosa monofosfato .

La reducción del NAT es mediada por el singulete de oxígeno, el cual a su vez depende exclusivamente de un sistema dependiente de oxígeno (Baehner, 1979).

El NAT es una sal hidrosoluble de color amarillo en forma oxidada. La sal de tetrazolio puede utilizarse cuanti y cualitativamente, el colorante reducido se puede medir en un espectrofótometro después de su extracción con piridina, y si la prueba es cualitativa se observa con un microscopio simple (Segal, 1974).

El desarrollo del color azul en leucocitos se debe a la combinación de NADH, el NAT oxidado y NADH oxidasa para producir formazán (Baehner, Nathan, 1968).

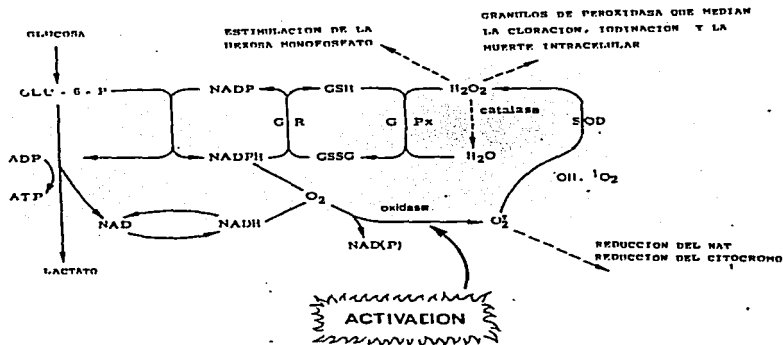


Fig. 1. 8. 5

MECANISMO DE REDUCCION DEL NAT

(Baehner, 1979).

### **Iodinación**

La técnica de Iodinación cuantitativa del leucocito valora la fagocitosis después de la ingestión. La prueba se basa en la conversión de yodo inorgánico a ácido triyodoacético precipitable después de la fagocitosis. El grado de Iodinación de los leucocitos que fagocitan se correlaciona con el grado de actividad microbicida de la célula (Pincus, Seymour, Klebanoff, 1971).

### **Espectrofotometría**

Stosel en 1973 propone su metodología para evaluar la fagocitosis, él separa físicamente las células que engieren partículas y células que no engieren partículas, las partículas empleadas fueron gotas de aceite con agentes emulsificantes, la cuantificación de aceite libre, se realiza por medio de un tinte lipofílico y se realiza por espectrofotometría (Rosen, Chait, 1991).

Hay métodos de fagocitosis que son específicos ya que es un ensayo para un tipo de partícula, en este caso para eritrocitos. Esta prueba de fagocitosis la proponen los autores para que sea una alternativa a realizarse en pacientes con anemia hemolítica autoinmune y la enfermedad ABO del recién nacido.

La técnica de cuantificación de fagocitosis de eritrocitos está basada en la oxidación específica del 2,7-diamonofluoreno por la actividad de la pseudoperoxidasa de la hemoglobina resultando la generación del azul fluoreno con una absorción de luz al espectro diferente al primer compuesto, su longitud de onda está entre 500 y 690 nm (Gebran, Romano, Pons, 1992).

### Naranja de Acridina

La tinción fluorocromo de naranja de acridina involucra células adheridas al vidrio, permite una evolución simplificada de los diversos aspectos de la fagocitosis de microorganismos en una sola prueba. La tinción con naranja de acridina permite observar la viabilidad de la célula durante el curso del ensayo, el número de bacterias ingeridas y la destrucción de microorganismos. Esta prueba es útil para evaluar alteraciones intrínsecas y extrínsecas de la función fagocítica y microbicida de los neutrófilos (Bellinati, Melki, Colieto, et al , 1989).

### Quimioluminiscencia

Utiliza la liberación de energía que se da durante el estallamiento oxidativo. La quimioluminiscencia se mide usando un fotomultiplicador en un equipo de centelleo estándar, como la cantidad de centelleo producida durante la fagocitosis será dependiente de la cantidad y/o el tipo de partícula ingerida y esto resulta de la interacción entre agentes oxidantes y partículas ingeridas por tanto la respuesta está relacionada con la muerte microbiana (Qule, 1980).

### Fluorescencia

Se ha utilizado para medir la producción de  $H_2O_2$  por medio de la 2',7', diclorofluoresceína la cual difunde dentro de la célula, donde los grupos acetato son hidrolizados por las esterasas intracelulares formando DCHF (diclorofluoresceína) que no es fluorescente, es polar y empieza a migrar dentro de la célula. Cuando se

expone al peróxido, se oxida a un producto altamente fluorescente, el 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Bass, Olbrantz, Szjeda, 1986).

#### Marcadores radioactivos

Un gran número de métodos de los existentes para valorar fagocitosis utilizan marcadores radioactivos como Uridina  $^3$ [H] y Cromo  $^{51}$ [Cr] (1985). Como las pruebas que existen para medir la capacidad de adherencia de los neutrófilos que evalúa el papel primario de los neutrófilos en la inflamación y la patogenicidad de enfermedades donde los neutrófilos tienen un papel importante (Yakuwa, Inque, Watanabe, 1989).

#### Citometría de flujo

También se han realizado ensayos que utilizan citometría de rayos laser que permiten la identificación de células, además podemos conocer el número de levaduras ingeridas y porcentaje de levaduras muertas después de la fagocitosis. La muestra es llevada a un flujo de luz en una cámara, el flujo hidrodinámicamente orienta a la célula al centro del torrente de luz, la concentración de las células y el rango del flujo son ajustados para dar un flujo secuencial de células suficientemente espaciadas. El rango del flujo permite medir 1000 células por segundo. En la región de sensibilidad el rayo laser cruza las células después de ser originado de un laser de Argón donde la luz de excitación puede variar entre las longitudes de onda específicas. Como el enfoque del rayo laser se da en cada

célula, la luz es dispersada, absorbida o emitida como fluorescencia entonces una fracción de luz emitida es colectada por varios lentes ópticos y son transmitidos a través de filtros por fotomultiplicadores. Los fotomultiplicadores miden la intensidad de la luz y la transforman en signos ópticos dentro de pulsos eléctricos, los cuales son amplificados, procesados y se presentan en forma de frecuencia dimensional (histogramas).

El método es eficiente y permite valorar un número grande de muestras con alto grado de precisión evitando así el trabajo laborioso de la observación al microscopio (Buschmann, Winter, 1989; Bjerkness, Bassoe, Sjursen, 1989).

#### Capas bacterianas

Es un método sencillo, observacional por medio de capas bacterianas en placas, en donde se agregan las células fagocíticas, que después se tiñen con Giemsa y se observan placas blancas en los sitios donde se dio la fagocitosis. El método no necesita un manejo aséptico, ni equipo especial y es rápido (Seki, Mural, Sakurada, 1989).

### 1.10 Inhibidores de la Fagocitosis

Hay microorganismos que pueden evadir la fagocitosis como consecuencia de una interacción de algunas de sus estructuras con los fagocitos, por ejemplo: cápsulas bacterianas, proteína A de Staphylococcus, proteína M de la fimbria de Streptococcus. Además de Mycoplasma y Neisseria gonorrhoeae que ataca a los PMN (Bjerkness, Bassoe, Sjursen, 1989).



### 1.11 Fagocitosis de Candida albicans

La diseminación de la candidiasis se da de un 11 a un 27 % en pacientes con leucemias agudas o pacientes con transplante de médula ósea, provocando un 95% de mortalidad en estos pacientes (Greenfield, 1992). Las infecciones de Candida también se encuentran en pacientes hospitalizados y pacientes inmunocomprometidos. La incidencia de infección parece haberse incrementado en las últimas dos décadas y que incluso puede ser un riesgo para individuos sanos(Thompson,Witton,1992).

Calderone y Braun dicen que hay tres categorías de interacciones del hospedero y Candida. La primera categoría involucra la interacción de receptores de complemento CR3 con arginina - glicina ácido aspártico. La segunda involucra proteínas de la superficie de Candida probablemente manoproteínas que interactúan con lectinas y azúcares de la membrana celular de la célula fagocítica. La tercera categoría involucra las mananas de Candida con receptores aún no identificados en las células del hospedero (Greenfield 1992).

tabla 1.11.8 Mecanismos de defensa que no permiten la proliferación de *Candida*

Mecanismos de defensa que no permiten la proliferación de *Candida*

1. Barreras físicas: piel, mucosas, superficies epiteliales y algunos factores del tracto respiratorio.
2. Flora bacteriana y acidez gástrica.
3. Complemento.
4. Fagocitosis.
5. Células asesinas naturales.
6. Inmunidad celular por linfocitos T

(Greenfield, 1992).

#### 1.11.1 Factores que predisponen a diversas micosis

1.-Tamaño de las formas fúngicas, por ejemplo:levaduras de 2  $\mu\text{m}$  para las formas filamentosas de Coccidioides immitis y sus esférulas a veces de un diámetro mayor de 100  $\mu\text{m}$ .

2.-Diversos sitios antigénicos, por ejemplo:Los hongos dimórficos causan micosis endémicas por inhalación de esporas y dentro del hospedero exhibe nuevos sitios antigénicos. Ejemplo levaduras para Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, y esférulas de Coccidioides immitis. Hongos monomórficos. La aspergilosis es iniciada por la inhalación de restos de conidias y en tejido las conidias exponen diferentes sitios antigénicos para después germinar a hifa. Las fases de crecimiento son diferentes en el hospedero

3.-Amplia variación de productos fúngicos: toxinas, exoenzimas y péptidos (Diamond, 1989).

### 1.11.2 Quimiotaxis

Los fagocitos son atraídos por las células fúngicas al sitio de reconocimiento, el hospedero produce factores quimiotácticos (ejem. C5a, generado por la activación de complemento por presencia de antígenos fúngicos, LTB4 e interleucina 8) son los mediadores predominantes de la movilización de leucocitos. La movilidad del fagocito es regulada por la respuesta interactiva de los receptores de membrana plasmática, eventos metabólicos y reorganización del citoesqueleto (Diamond,1993).

### 1.11.3 Opsonización

Los componentes de complemento generados por la interacción fúngica con factores séricos, macrófagos y neutrófilos contribuyen a la generación de factores opsonicos y quimioatrayentes para las células fagocíticas. Algunas subclases de IgG pueden incrementar la opsonización. El ataque subsecuente a la célula blanco es mediada por una variedad de interacciones de los receptores de las células fagocíticas con factores séricos o factores intrínsecos en la superficie de células fúngicas (Diamond,1989). Los factores opsonicos predominantes involucrados en la interacción con células fagocíticas varían de acuerdo a las fases de crecimiento o diferenciación de las especies fúngicas (Diamond,1993).

#### 1.11.4 Endocitosis

En algunos trabajos realizados se conoce que existe un incremento en la capacidad de los neutrófilos para ingerir a Candida albicans debido a un incremento en el número de unidades de reconocimiento en los receptores neutrófilos, el incremento es producido por antibióticos (Rodríguez, Barriga,1993).

#### 1.11.5 Degranulación

Sustancias como peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y ácido hipocloroso y sustancias liberadas por neutrófilos activados que incluyen lactoferrina, lisozima, proteínas catiónicas con actividad proteolítica (catepsina G) y defensinas peptídicas que pueden tener actividad fungistática o fungicida (Diamond, 1989).

Aunque específicamente para la especie de Candida, los monocitos tienen más capacidad para matar pseudohifas de Candida que los neutrófilos (Shuit,1979).

tabla 1.11.9

## Opsoninas que reconocen las células fagocíticas en las células fúngicas

Tipo de receptor	Fagocito	Sitio de reconocimiento en la célula fúngica	Célula fúngica patógena
Lectina	Monocito/ macrófago	Manosa/manana	Candida spp.
	Monocito macrófago	$\beta(1,4)$ oligoglucósidos; N-acetil glucosamina	Conidias de Aspergillus spp.
	PMN, monocito/macró- fago	Glucanas	Blastoconidias de <u>Candida</u> <u>albicans</u> vivas o muertas.
Secuencia de RDG	PMN, monocito/macró- fago	Opsoninas séricas	Candida spp.
Fc de la IgG	PMN, monocito/macró- fago	Opsoninas IgG	<u>Candida</u> <u>albicans</u> , hifas de Aspergillus spp.
C3 (CR1, CR3, o CR4)	PMN, monocito/macró- fago	Opsoninas C3b, iC3b, o C3d	Blastoconidia de Candida spp, hifa y conidia de Aspergillus spp.

Diamond, 1993.

La presencia de opsoninas séricas o constituyentes de la pared celular de los hongos estimula la adherencia y la fagocitosis de PMN, acompañados por la activación del metabolismo oxidativo y la liberación de las enzimas lisosomales (Hilger, Denlay, 1980).

tabla 1.11.10 Factores fúngicos que modulan el mecanismo fagocítico del hospedero

Características de las células fúngicas	Efectos en la fagocitosis
Hidrofobicidad de <u>Candida albicans</u> Manosa, manana	Muerte rápida de PMN Inhibición del metabolismo oxidativo en PMN
Actividad de enzimas en la superficie celular	Acciones de elastasas, proteasas o fosfolipasas incrementan la destrucción de la célula hospedera
Receptores de complemento en <u>Candida albicans</u>	Inhibición del ataque del fagocito e ingestión de la célula fúngica
Liberación de adenosina de <u>C. albicans</u>	Modula la activación metabólica de los PMN
Liberación de sustancias de alto peso molecular	Disminuyen la actividad candidacida de los PMN
Liberación de inhibidores de complemento <u>A. fumigatus</u>	Disminución de la respuesta quimiotáctica y opsónica
Unión de opsoninas a la pared celular	Efecto sobre la respuesta candidacida
Producción de amonio por <u>C. albicans</u>	Forma monocloroaminas con HOCl <sup>+</sup> generado por PMN; y activan el sistema de la mieloperoxidasa por las altas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y prolongar la respuesta candidacida

(Diamond 1993)

Tabla 1.11.11 Modulación de la actividad fagocítica por citocinas y mediadores

Mediadores	Efectos sobre fagocitosis
Interferón $\gamma$	Disminuye la infección en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica
GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , INF $\gamma$ en ratones infectados con <u>C. albicans</u>	Produce inmunidad in vivo contra <u>C. albicans</u>
Inoculación intracerebral IL-1 a) IL-1 b) G-CSF o GM-CSF	Da protección a desafíos intracerebrales a ratón con <u>A. fumigatus</u> o <u>S.aureus</u>
Células fagocíticas incubadas con : IL-1, IL-3, Interferón $\gamma$ TNF $\alpha$ , GCSF, M-CSF y GM-CSF	Protege a ratones infectados con <u>Candida albicans</u> , los cuales presentan neutropenia.

(Diamond, 1993)

## 2.1 Objetivos

### Objetivo General :

Adaptar la técnica de Reducción de Nitroazul de Tetrazolio (NAT) en portaobjetos, para la determinación de valores de referencia del porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico y activación del metabolismo oxidativo en individuos sanos para su posterior comparación en pacientes inmunocomprometidos y politransfundidos.

### Objetivos específicos:

Evaluar la relación entre el número de leucocitos y los siguientes parámetros: porcentaje de fagocitosis, índice fagocítico y metabolismo oxidativo.

Evaluar por grupos etéreos y sexo, sus parámetros del porcentaje de fagocitosis, índice fagocítico y metabolismo oxidativo.

### Planteamiento del problema:

Dentro del programa de Determinación de los Valores de Referencia de Fagocitosis en individuos sanos en el BCSMR se pretende establecer los valores de actividad fagocítica de células de sangre periférica, estos valores serán de utilidad, como referencia cuando se realicen evaluaciones de esta actividad en pacientes hemofílicos y politransfundidos.



## 2.2 Material y métodos

### 2.2.1 Reactivos biológicos

Mezcla de sueros

Suspensión de levaduras ajustada a  $10 \times 10^8$  lev/cél

Cepa de *C. albicans*

Agar Dextrosa Papa

Carbohidratos (glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa).

### 2.2.2 Reactivos Químicos

Reactivos •Sigma, ••Merck, •••Técnica Química

Nitro Azul de Tetrazolio•

Medio Eagle's•

Glucosa  $C_6H_{12}O_6$  ••

Citrato Trisódico  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  ••

Acido cítrico ••

Fosfato de potasio (monobásico)  $KH_2PO_4$ •••

Fosfato de potasio (dibásico)  $K_2HPO_4$  •••

Cloruro de sodio NaCl ••

Cloruro de potasio KCl ••

Hidróxido de sodio NaOH ••

Safranina •

Azida de sodio •

Colorante de Wright •

### 2.2.3 Material

Todo el material de vidrio fue marca Pyrex

Tubos de ensaye de 13x100 mm

Pipetas serológicas 1,2,5, y 10 ml

Pipetas paster

Cajas de Petri

Pipeta para globúlos blancos

Portaobjetos

Asa bacteriológica

Mechero Bunsen

Aplicadores de madera

Gasas

Porta filtros para jeringa

Filtros milipor 0.22 $\mu$ m

Cámara de Neubauer (Lumycite)

Centrífuga clínica (IEC HN II)

Balanza analítica (Sartorius)

Potenciometro (Beckman)

Refrigerador (Revco)

Autoclave (Amerex Instruments inc)

Incubador a 37°C (Imperial II)

Nefelómetro (Behring)

#### 2.2.4 Población Estudiada

Se utilizaron 280 muestras de sangre del Banco Central de Sangre (BCS) del Centro Médico "La Raza". Se incluyeron muestras de individuos que previamente se seleccionaron para ser donadores de sangre.

El trabajo realizado fue un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

Los criterios de inclusión fueron los utilizados por la Norma Oficial Mexicana para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, publicada el 18 de julio de 1994.

##### Criterios de Inclusión

- Individuos con un intervalo de edad de 18 a 65 años .
- Individuos con un peso igual o mayor a los 50 kg.
- Individuos con intervalo de tensión arterial entre 180 y 90 mm Hg para la sistólica y entre 100 y 50 para la diastólica.
- Con pulso que oscilara entre 50 y 100 pulsaciones por minuto.
- Con límites normales de temperatura.
- Individuos que su intervalo de donación será de dos meses.
- Con un valor de hemoglobina mínimo de 13.5 g/dl en hombres y 12.5 g/dl en mujeres.
- Individuos con un valor de hematocrito igual o mayor al 41% en hombres y el 38% en mujeres.
- Individuos con un tiempo mayor de seis meses después de su última transfusión.

-Individuos que no presenten estas enfermedades :

Epilepsia

Diabetes grave

Enfermedades neoplásicas

Hepatitis

-Individuos que no tengan antecedentes de :

Paludismo

Brucelosis

Hepatitis

Tuberculosis

Enfermedad de Chagas

-Individuos en los que su última intervención quirúrgica haya sido con un tiempo mayor a seis meses.

-Individuos que no tengan extracción dentaria en los últimos tres días.

-Aquellas personas que no han sido objeto de vacunación contra viruela, sarampión, fiebre amarilla, poliomeilitis y parotiditis. Además de rubeóla y rabia.

-Los sujetos que no tengan probabilidad por sus prácticas sexuales o por su exposición a condiciones de alto riesgo de adquirir infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o por el virus de la hepatitis.

-No homosexuales

-No heterosexuales con varios compañeros sexuales

-No ejerzan prostitución

-No farmacodependientes que usan la vía intravenosa

**-No hemofílicos y politransfundidos**

**-Individuos con pruebas serológicas negativas para anti-VIH, anti-VHC, anti-HBc, VDRL y anti-Brucella (Buñuel, Buñuel, 1991).**

#### **Criterios de No Inclusión**

**-Individuos que no cumplan con los requisitos mencionados anteriormente para ser candidatos a donadores de sangre.**

### Distribución de la población

De los 280 donadores estudiados, 51 fueron del sexo femenino (18.2%), y 279 del sexo masculino (81.8%) (tabla 1 , gráfica 1 ).

Por edad los donadores se clasificaron desde los 18 hasta los 60 años; se distribuyeron de la manera siguiente: de 18 a 23 hubo 71 donadores (25.4%); de 24 a 29, 75 donadores (26.8%); de 30 a 35, 54 donadores (19.3%); de 36 a 41, 37 donadores (13.2%); de 42 a 47, 21 donadores (7.5%); de 48 a 53, 14 (5.0%); de 54 a 60, hubo 8 donadores (2.9%).

La edad promedio de la población fue de 31 años, ver tabla 2 y gráfica 2 .

Tabla 2.1

#### DISTRIBUCION POR SEXO DE DONADORES BCS CMNR

HOMBRES	279	81.80%
MUJERES	51	18.20%

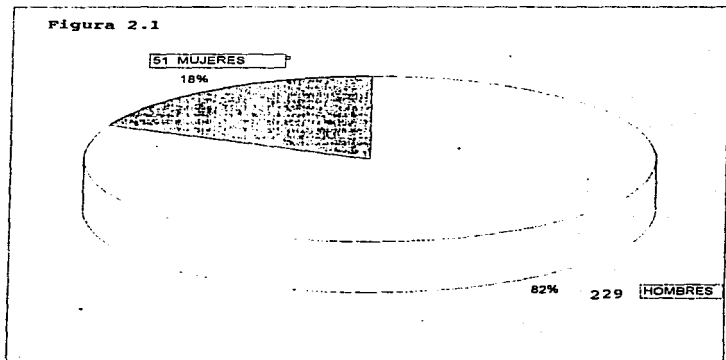


Tabla 2.2

DISTRIBUCION POR GRUPOS DE EDAD EN BCS CMNR					
RANGO DE EDAD	FRECUENCIA		PORCENTAJES		
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES	
18-23	60	11	21.40%	3.90%	
24-29	61	14	21.80%	5.00%	
30-35	43	11	15.30%	3.90%	
36-41	30	7	11.00%	2.50%	
42-47	16	5	5.70%	1.80%	
48-53	11	3	3.90%	1.00%	
54-60	8	0	2.80%	0.00%	

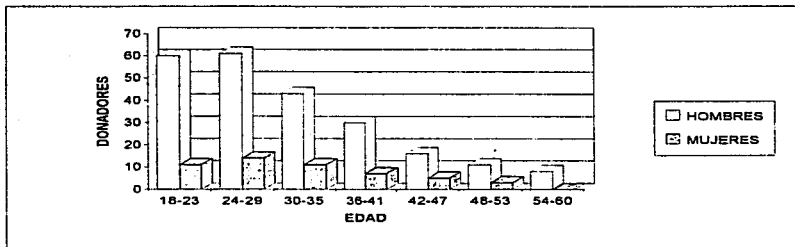


Fig. 2.2 Donadores por grupos de edad

### 2.2.5 Justificación de la metodología

La metodología que se utilizó obtiene las células fagocíticas de una manera sencilla que permita un ensayo rápido y práctico.

Se compararon muestras de sangre con EDTA y citrato; además de muestras de muestras de sangre sin anticoagulante.

Los parámetros evaluados para realizar esta comparación fueron los siguientes: porcentaje de fagocitosis, índice fagocítico y número de células adheridas al vidrio.

Las muestras de sangre se obtuvieron de donadores del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Perinatología. Los resultados fueron los siguiente:

Muestras de sangre con anticoagulante

Promedio de células adheridas al vidrio en 0.5 ml de sangre = 183

Promedio del porcentaje de fagocitosis = 34

Promedio del índice fagocítico = 2.0

Muestras de sangre sin anticoagulante

Promedio de células adheridas al vidrio = 182

Promedio del porcentaje de fagocitosis = 71

Promedio del índice fagocítico = 1.7

Se utilizó esta metodología que ofreció mejores resultados en los parámetros fagocíticos además de que utilizaba menos tiempo y era de fácil adaptación en cualquier laboratorio clínico.

Se eligió la muestra de sangre sin anticoagulante que permitió observar mejor los parámetros fagocíticos porque la sangre con anticoagulante tiene un serio problema por



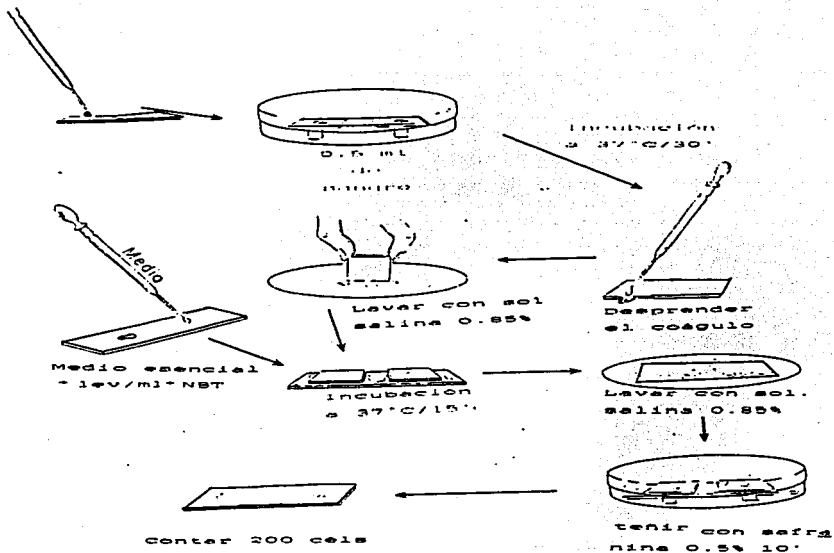
la tendencia de los neutrófilos a acumularse, esto impide la identificación y conteo de los neutrófilos en forma individual.

### 2.2.6 Metodología

El NAT es una solución hidrosoluble de color amarillo claro que forma azul formazán, insoluble con la reducción. Se efectúa una prueba simple en la láminilla en la cuál las células se incuban con NAT, después las células se contratiñen con safranina y se examinan al microscopio, se consideran positivas las células que reducen el NAT (Pacheco, Shearer, 1994).

Se empleo 1 ml de sangre por donador de los cuales se tomaron los parámetros siguientes: sexo, edad, número de leucocitos por mililitro, hematocrito y concentración de hemoglobina, los parámetros fagocíticos evaluados fueron por ciento de fagocitosis, índice fagocítico y reducción del NAT.

2.27 ELABORACION DE FIBRIN



### 2.2.8 Cálculo de parámetros fagocíticos:

$$\text{porcentaje de fagocitosis} = \frac{\text{células que fagocitan}}{\text{células totales}}$$

$$\text{índice fagocítico} = \frac{\text{levaduras ingeridas}}{\text{células que fagocitan}}$$

$$\text{porcentaje de reducción del NAT} = \frac{\text{células que fagocitan y reducen NAT}}{\text{células que fagocitan}}$$

### 2.2.9 Metodos estadísticos

Para el manejo estadístico se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión.

Media

$$x = \frac{\sum X}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \frac{\sum(X_i - X)}{n-1}$$

$$S = \sqrt{S^2 = \frac{\sum(X_i - X)^2}{n-1}}$$

Coefficiente de Variación

$$C.V. = \frac{S}{X} (100)$$

Regresión lineal y correlación

El análisis de regresión es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables y cuando se emplea este método de análisis el objetivo final por lo general es predecir o estimar el valor de una variable, correspondiente a un valor dado de otra variable.

Correlación

Se refiere a la medición de la intensidad de la relación entre las variables.

$$r = \frac{N\sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{[\sum X^2 - (\sum X)^2][\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}$$

(Wayne, 1977)

### 3.1 Resultados

#### Leucocitos

El número de células blancas sólo se obtuvo de 209 donadores los cuales presentaron la distribución siguiente: De  $3.0 - 5.0 \times 10^6$  cels/ml., la frecuencia del número de donadores fue de 25 (12 %); de  $5.1 - 7.0 \times 10^6$  cels/ml la frecuencia fue de 118 donadores (56 %); en el intervalo  $7.1 - 9.0 \times 10^6$  cels/ml fue de 52 donadores (25 %) y en el intervalo  $9.1 - 10 \times 10^6$  fue de 14 donadores (6.7 %). De la distribución presentada se encontró que la mayor frecuencia se obtuvo en el segundo intervalo de  $5.1 - 7.0 \times 10^6$  cels/ml.

El valor promedio del número de leucocitos del estudio fue de  $5.1 \times 10^6$  cels/ml. De acuerdo al sexo el número de leucocitos, se distribuyó según se muestra en la tabla 3.1 y

Fig. 3.1

#### Hemoglobina

De las muestras analizadas se conoce que la cantidad de hemoglobina se distribuyó de la manera siguiente: 11 - 13 g/dl, 2 donadores, (0.71 %); 13.1 - 15, 61 donadores (21.8 %); 15.1 - 17, 169 donadores, (60.4 %); 17.1 - 18, 48 donadores, (17.1 %).

La concentración de hemoglobina en la población fue de 16 g/dl. Ver distribución de acuerdo al sexo en tabla 3.2 y Fig 3.2.

### Índice Fagocítico

El índice fagocítico de 280 muestras se distribuyeron de la manera siguiente; en el intervalo de 1 a 2 lev/cél, 211 donadores (75.3 %); 60 donadores en el intervalo de 2 a 3 lev/cél, (21.4 %), y 3 a 4 lev/cél, 10 donadores (3.6 %) (tabla 3.5 y Fig. 3.5).

El valor promedio de la muestra fue:  $IF = 1.91 \pm 0.48$ .

En el índice fagocítico de acuerdo al sexo encontramos que para hombres el valor promedio fue 1.9; desviación estándar,  $Sx = 0.4$ ; y un coeficiente de variación,  $CV = 25.6$ . Para los donadores de sexo femenino, el valor promedio fue 1.9; desviación estándar de 0.4 y con coeficiente de variación,  $CV = 21$ .

### Reducción del Nitrito Azul de Tetrazolio

Para el metabolismo oxidativo que se da durante la fagocitosis, se uso la reducción del NAT, con la relación de levadura de color azul en células que fagocitaron y el número total de levaduras fagocitadas.

### Hematocrito

Valor de Hematocrito, que para su facilidad de manejo se realizaron los siguientes intervalos: 39 - 44 %, 38 donadores (13.6 %), 45 - 50 %, 151 donadores (53.8 %), 51 - 56 %, 90 donadores (32.1 %), y en el último intervalo de 56 - 61 %, 1 donador (0.36 %).

De la concentración de hematocrito, el promedio en la población fue de 48 % y la agrupación de los valores de hematocrito. Se pueden observar en la tabla 3.3 y Fig.

3.3.

Para valorar la actividad fagocítica se evaluó la ingestión por medio del por ciento de fagocitosis e índice fagocítico y reducción de la sal de tetrazolio (NAT).

### Porcentaje de Fagocitosis

En el porcentaje de fagocitosis se realizaron los intervalos siguientes encontrándose de esta manera: 48 - 54 %, 10 donadores (3.6 %); 55 - 61 %, 20 donadores (7.1 %); 62 - 68 %, 45 donadores (16.1 %); 69 - 75 %, 69 donadores (24.7 %); 76 - 82 %, 71 donadores (25 %); 83 - 89 %, 39 donadores (13.9 %); 90 - 96 %, 25 donadores (8.9 %); y de 97 - 100 %, 1 donador (0.4 %), tabla 3.4 y Fig. 3.4

Encontrándose en la muestra total un valor promedio de porcentaje fagocitosis de 74.84 %.

Y en la distribución de fagocitosis de acuerdo al sexo se obtuvo: para hombres un valor promedio 75 %, una desviación estándar  $S_x = 10.5$ , y un coeficiente de variación,  $CV = 7.1$ . En mujeres se encontró que el porcentaje de fagocitosis, 74 %, desviación estándar,  $S_x = 8.4$  y un coeficiente de variación,  $CV = 11.3$ .

Se obtuvieron los siguientes resultados:

y = porcentaje de fagocitosis	y = índice fagocítico
x = edad	x = edad
r = 0.02	r = 0.07
r = 0	r = 0
x = concentración de leucocitos	x = concentración de leucocitos
r = - 0.09	r = - 0.06
r = 0.01	r = 0
x = hemoglobina	x = hemoglobina
r = - 0.08	r = - 0.08
r = 0.01	r = 0.01
x = hematocrito	x = hematocrito
r = - 0.06	r = - 0.15
r = 0	r = 0.02
x = índice fagocítico	x = porcentaje de fagocitosis
r = 0.32	r = 0.32
r = 0.1	r = 0.1



Los 280 donadores se agruparon por bloques de edad, se obtuvo el valor promedio del porcentaje de fagocitosis para cada bloque, los cuales fueron semejantes. Tabla 3.6 y

Fig. 3.6.

De manera semejante se realizó para el índice fagocítico observar tabla 3.7 y Fig. 3.7.

Tabla 3.1

CONCENTRACION DE LEUCOCITOS EN DONADORES POR SEXO EN BCS CMNR				
CONCENTRACION DE LEUCOCITOS	FRECUENCIA		PORCENTAJE	
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES
3.1 A 5.	20	5	36.0%	2.30%
5.1 A 7.	100	1R	47.80%	8.60%
7.1 A 9.	40	12	19.10%	5.70%
9.1 A 9.9	12	2	5.70%	0.98%

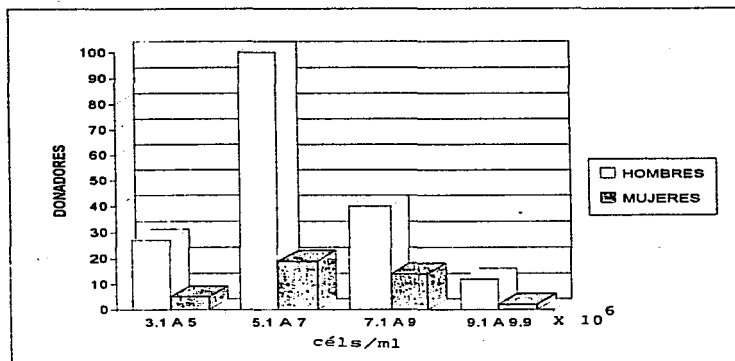


Fig. 3.1 Concentración de leucocitos de donadores

Tabla 3.2

CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA EN DONADORES BCS CMNR					
CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA	FRECUENCIA		PORCENTAJE		
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES	
11.1 A 13	2	0	0.70%	0.00%	
13.1 A 15	19	42	6.80%	15.00%	
15.1 A 17	161	8	57.50%	2.90%	
17.1 A 18	47	1	16.80%	0.36%	

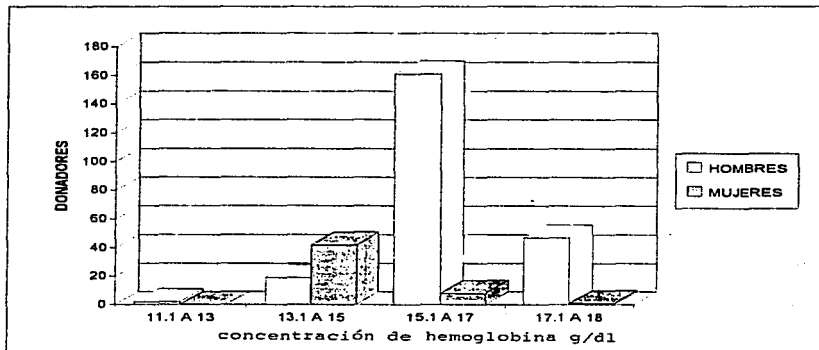


Fig. 3:2 Concentración de hemoglobina en donadores

Tabla 3.3

HEMATOCRITO EN DONADORES BCS CMNR					
PORCENTAJE HEMATOCRITO	FRECUENCIA		PORCENTAJE		
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES	
39 A 44 %	12	26	4.30%	9.30%	
45 A 50 %	132	19	47.00%	6.80%	
51 A 56 %	84	6	.03%	2.10%	
57 A 61 %	1	0	2.54%	0.00%	

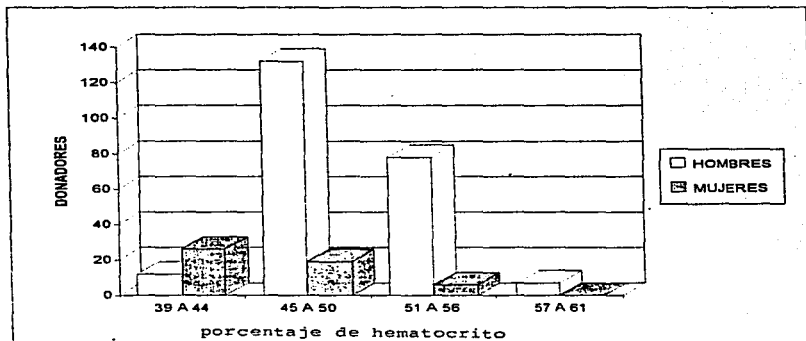


Fig.3.3 Concentración de hematocrito en donadores

Tabla 3.4

PORCIENTO DE FAGOCITOSIS EN DONADORES DEL BCS CMNR					
RANGOS % FAGOCITOSIS	FRECUENCIA		PORCENTAJES		
	MUJERES	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	
48-54	0	10	0.00%	3.60%	
55-61	1	19	0.40%	6.50%	
62-68	14	31	5.00%	11.10%	
69-75	12	57	4.30%	20.40%	
76-82	15	58	5.20%	20.00%	
83-89	7	32	2.50%	11.40%	
90-96	2	23	0.70%	8.20%	
97-100	0	1	0.00%	0.40%	

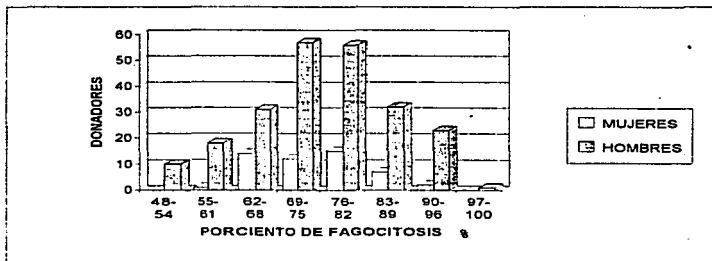


Fig. 3.4 Porciento de fagocitosis en donadores

Tabla 3.5

DISTRIBUCION DEL INDICE FAGOCITICO EN LA POBLACION ENTRADA					
INDICE FAGOCITICO	FRECUENCIA		PORCENTAJE		
	MUJERES	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	
UNA A DOS	40	171	14.30%	61.10%	
DOS A TRES	11	49	3.90%	17.50%	
TRES A CUATRO	0	10	0.00%	3.60%	

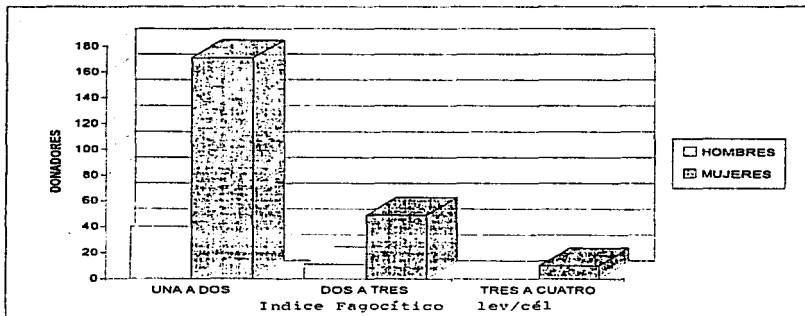


Fig. 3.5 Índice fagocítico en donadores

Tabla 3.6  
DISTRIBUCION DEL PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS SEGUN LA EDAD

Rangos de edad	$\bar{X}$ de fag	DE	CV
18 a 23	74.9	10.8	14.4
24 a 29	74.0	10.2	13.7
30 a 35	75.8	10.0	13.1
36 a 41	75.2	9.2	12.2
42 a 47	70.3	9.1	13.0
48 a 53	79.8	7.4	9.2
54 a 60	76.4	10.2	13.3

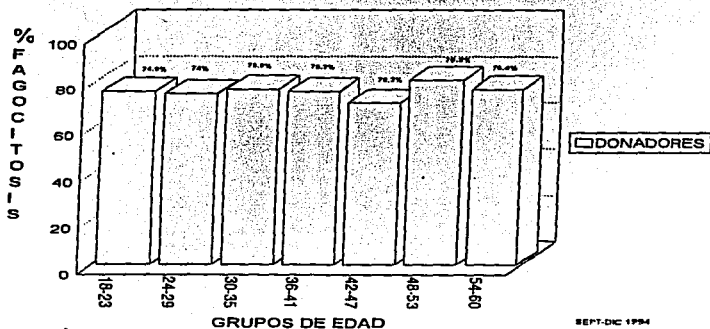


Fig. 3.6

Porcentaje de fagocitosis por grupos de edad

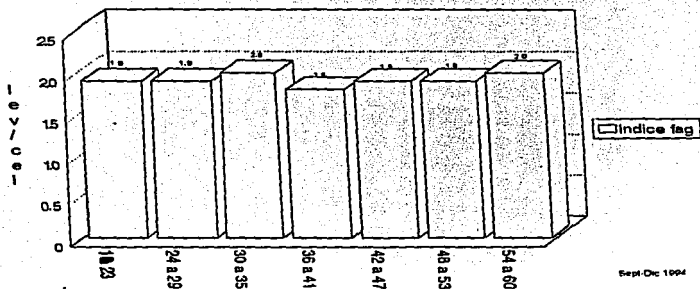
SEPT-DIC 1994

Tabla 3.7

## INDICE FAGOCITICO SEGUN LA EDAD

78

Rangos de edad	Indice fagocitico	DE	CV
18 a 23	1.9	0.49	26
24 a 29	1.9	0.42	22
30 a 35	2.0	0.51	24
36 a 41	1.8	0.50	26
42 a 47	1.9	0.41	22
48 a 53	1.9	0.48	25
54 a 60	2.0	0.51	25



Sept/Oct. 1994

Fig.3.7 Promedio del índice fagocítico según la edad



### Discusión

Se pudo comprobar por los coeficientes de correlación que no existió relación de los parámetros fagocíticos y las demás variables. Entonces se considera que la fagocitosis no tiene una relación directamente proporcional o inversamente proporcional con las variables analizadas. Aunque se debe considerar que todos los individuos examinados son normales y que consecuentemente en el presente trabajo, no se detectó ninguna variación fuera de  $\pm 2S$ .

### Edad

Se sabe que las variaciones de la fagocitosis se observan principalmente en los extremos de la vida, es decir recién nacidos está comprobado en humanos y animales (trabajo realizado en cerdos) (Zendejas 1988). En humanos se conoce que la función fagocítica se ve disminuida en los recién nacidos debido a la deformación de los neutrófilos (Quie, 1979); además se confirma en los trabajos realizados en neonatos (Gómez, 1990).

Ya que en nuestro trabajo participaron individuos mayores de 18 años, teniendo la muestra poblacional una edad promedio de 31 años no existieron alteraciones en la fagocitosis. No hay diferencia en cada grupo de edad comparado, es decir los valores del porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico son semejantes.

### Concentración de leucocitos

Se observó que no hay relación directa con la actividad fagocítica. Debido a que los sujetos de estudio no varían su concentración de leucocitos.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

En diversos trabajos fagocíticos se conoce la concentración de leucocitos utilizada para cada ensayo, mediante suspensiones de células con concentración bien definida, en nuestro caso no se controló de esa manera, sino que se realizó contando aproximadamente doscientas células por cada muestra.

#### Porcentaje de Fagocitosis

En la literatura revisada, los trabajos realizados por Rojas en 1987 y 1991, Zendejas en 1987, que utilizaron una metodología semejante mostraron un porcentaje de fagocitosis por arriba del 70 %. Rojas obtuvo un promedio de  $83 \pm 8$  %. En el trabajo realizado por Zendejas en individuos adultos de un promedio de edad de 23 a 26 años, se encontró que el porcentaje de fagocitosis fue de  $77 \pm 2.3$  %. Con una metodología semejante Thompson y Wilton en 1992 realizaron ensayos fagocíticos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas del cual se obtuvo 83.2 %. Cuando se utilizaron levaduras como Candida albicans, Candida tropicalis y Saccharomyces cerevisiae se obtuvo un porcentaje mayor del 70 % en el trabajo realizado por Schult en 1979. Por técnica fluorescente se valoró la fagocitosis de más del 60 % para Candida albicans por Lyman y Walsh en 1994. Cuando Richardson y colaboradores en 1992 valoran la fagocitosis en individuos adultos sanos obtuvieron un porcentaje de fagocitosis 87.6 %.

#### Porcentaje de Fagocitosis por diferentes técnicas en humanos.

Rojas	Zendejas	Thompson y Wilton	Lyman y Walsh	Richardson	Schult
$83 \pm 8$ %	$77 \pm 2.3$ %	83 %	60 %	87.6 %	70 %

En nuestro estudio los resultados de fagocitosis fueron de 74 % - 84 % utilizando condiciones de trabajo semejantes a las de Rojas y Zendejas en cuanto a la adherencia de las células, la ingestión y la observación al microscopio, aunque ellos hayan utilizado otra levadura, además comparando nuestro trabajo con otros en los cuales utilizaron Candida albicans y obtuvieron valores promedio de fagocitosis por arriba de un 70 %.

#### Reducción del Nitro Azul de Tetrazolio

En nuestro resultado no hubo variación en la reducción del NAT, pues en todas las muestras hubo una reducción de aproximadamente el 100 %, éste resultado lo atribuimos a que la evaluación de la reducción del colorante es un método observacional subjetivo aunque en los trabajos realizados en individuos adultos por Rojas y Zendejas si hubo una variación del 20 % entre los dos. Rojas reporta  $64 \pm 8$  % y Zendejas un  $80 \pm 2.1$  % de reducción del NAT.

#### Índice Fagocítico

En la valoración del índice fagocítico, Zendejas en 1987 reportó un  $2.3 \pm 0.06$  para Saccharomyces cerevisiae en una muestra de individuos adultos sanos, y cuando Lyman y Walsh en 1994 utilizaron cepas de Candida albicans obtuvieron un índice fagocítico de  $1.81 \pm 0.08$  pero anteriormente Richardson y Smith en 1981 habían comparado cepas virulentas y cepas atenuadas de Candida albicans y mostraron un valor de índice fagocítico para una cepa virulenta  $1.67 \pm 0.2$  y para una cepa atenuada de  $1.81 \pm 0.2$ .

Nuestro valor obtenido por el método empleado fue de  $1.91 \pm 0.48$  es decir de una a dos levaduras por célula como lo mencionan los autores citados, pero es importante señalar que

el índice fagocítico puede variar por la concentración de las levaduras y el tiempo de opsonización y no así por el tiempo de ingestión, como lo demostraron Richardson y Brownlie en 1992.

Por lo que consideramos que nuestro trabajo es útil para valorar la fagocitosis y puede ser reproducible, ya que nuestro valor obtenido para una población de individuos adultos sanos y con los criterios de selección mencionados es semejante a los valores referidos por los autores mencionados.

Se sugiere que el trabajo es útil debido a que la actividad fagocítica en pacientes que presentan cuadros de inmunodeficiencia como son los diabéticos y los pacientes con SIDA es diferente comparado con la de individuos sanos, se cree que esta actividad se ve incrementada, aunque existen autores que proponen que la actividad fagocítica en un proceso de infección se ve disminuida. Esta contradicción puede tener diferentes causas como son: métodos para evaluar la respuesta fagocítica, la purificación y el estado de activación de los fagocitos, el tiempo y la severidad de la infección.

Lo que es claro para algunos autores es que durante un proceso de infección hay cambios morfológicos en los fagocitos circulantes, especialmente en leucocitos polinucleares que reflejan fundamentalmente la infección (Stevens, Bryant, Huffman, 1994).

Se propone que este trabajo pueda ser utilizado para comparar la actividad fagocítica de pacientes inmunocomprometidos.

### Conclusiones

El porcentaje de fagocitosis de los Individuos sanos en función de los criterios de selección fue de 74.84 %.

El índice de fagocítico fue de 1.5 a 2.4 levaduras ingeridas por célula .

La capacidad de reducir NAT fue del 100% .

La concentración de leucocitos no correlacionó con el porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico en Individuos sanos según los criterios de selección.

No existió diferencia en la actividad fagocítica en Individuos sanos en un rango de edad de 18 a 60 años.

No se encontró diferencia entre los parámetros fagocíticos y el sexo.

La técnica es sencilla, no obstante de ser semicuantitativa nos permite obtener un valor de referencia que nos ayude evaluar la actividad fagocítica.

### Superencias

Debido a que la respuesta inmune en recién nacidos se ve disminuida es más recomendable valorar la respuesta fagocítica en estos individuos para obtener un valor de referencia que sea aplicable en estos pacientes.

Se puede utilizar ésta metodología para evaluar la actividad fagocítica en pacientes hemofílicos inmunocomprometidos que asisten al BCS CMNR, que son seropositivos para HIV en el período de 1987-1994 en el cual existían 34 pacientes con rango de edad de 16 a 45 años (Jiménez López, 1995).

Bibliografía

1. Abramson SL, Gallini JI: IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 1990; 144: 2:625-630.
2. Adams DO, Hamilton TA: The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev. Immunol*, 1984; 2:238-318.
3. Babior BM :Oxidants from phagocytes : Agents of defense and destruction. *Blood*, 1984 64 (5): 956-966.
4. Bach FJ: *Inmunología*, N edición; México D,F: Limusa, 1984:105-123.
5. Baehner RL: Influence of oxygen and its reduced by products on polymorphonuclear phagocytic function. It's physiology and pathology symposium o phagocytosis. Tokio, Japan. 1977:121-133.
6. Baehner RL, Nathan DG: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granomatous disease. *The New England J Med*, 1968;278 (18): 271-276.
7. Barret J: *Inmunología*, 1era edición, México, D.F. . Nueva Editorial Interamericana, 1972: 148-149.
8. Bass AD, Olbrantz P, Szejda P, et al: Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *J Immunol*, 1986; 136 (3): 860-865.
9. Baunaman H; Gauldie J: The acute phase response. *Immunology Today*, 1994; 15 (2): 74-80.
10. Bellinati PR, Melki SE, Colieto GM: Evaluation of fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions. *J Immunological Methods*, 1989; 119:189-196.

11. Blgs BA; Hewish M; Kent S; et al: HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of Toxoplasma gondii. J Immunol, 1995; 154(11): 6132-9.
12. Bjerkness R, Bassoe F, Sjursen H: Flow cytometry for the study of phagocyte function. Rev Infect Dis, 1989; 11 (1): 16-23.
13. Blenaff Bb, Unanue KE : *Imunología, 2ª edición, Argentina, Médica Panamericana, 1986* : 89-92.
14. Brown JE: Complement receptors and phagocytosis. Current Opinion in Immunology, 1991; 3: 76-82.
15. Buchner RR, Hugli TE, Ember J.A: et al: Stimulation of acute-phase protein specific mRNA and protein synthesis by human C5a anaphylatoxin. J. Immunol, 1995, 155: 308-315.
16. Buñuel S, Buñuel C, Marzo L: Los requisitos previos a la donación de sangre. Sangre, 1993; 38 (3): 511-514.
17. Buschman H, Winter M: Assessment of phagocytic activity of granulocytes using laser flow cytometry. J. Immunol Methods, 1989; 124: 231-234.
18. Corti G; Paridisi F: Pathogenic mechanisms responsible for producing a secondary immunodeficiency state. J Chemotherp, 1994; 6, Suppl.3: 6-10.
19. Cronstein BN, Welsman : The adhesion molecules of inflammation. Arthritis and Rheumatism, 1993; 36(2) : 147-157.
20. Davidshon: *Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio, 8ª edición; Barcelona: Salvat editores, 1988: vol II 1045-1046.*
21. Diamond R: Immune response to fungal infection. Rev. Infectious Diseases, 1989; 2: Suppl7. S1600-S1603.



22. Diamond R: Interactions of phagocytic cells with *Candida* and other opportunistic fungi. *Arch Med Res*, 1993; 24 (4): 361-369.
23. Dinarello CA; Cannon JG; Mancilla J; et al : Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: Induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells: *Brain Research* ,1991;562:199-206.
24. Dinarello CA; Cannon JG; Wolff SM: New concepts on the pathogenesis of fever. *Reviews of Infectious Diseases*, 1988; 10(1):168-189.
25. Espinoza DI, Bosco MC, Musso T, et al : Interleukin-2 and human monocyte activation: *J Leucocyte Biology*, 1995; 57:13-16.
26. Fikelman FD, Katona IM, Mosmann TR, et als : INF gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune response. *J Immunol*, 1988; 140:1022-1027.
27. Gebran SJ, Romano EL, Pons HA, et al: A modified colorimetric method for the measurement of phagocytosis and antibody dependent cell cytotoxicity using 2,7-diaminofluorene. *J Immunol Methods*,1992; 151:255-260.
28. Gifford RH, Malawista ES: A simple rapid micromethod for detecting chronic granulomatous disease of childhood. *J Lab Clin Med*, 1970; 75 (3): 511-519.
29. Ghis I, Tauber AI : Activation mechanisms of adherent human neutrophils. *Blood*, 1990; 76 (6): 1233-1239.
30. Gómez R: Adaptación y estandarización de microtécnicas: muerte intracelular y fagocitosis para su aplicación en neonatos sanos a término. Facultad de Química UNAM,1990: 55-67.
31. Gordon Reeves: Lecture notes on Immunology, Second edition; Paris, Blackwell Scientific Publications, 1991: 91-93.

32. Greefield RA: Host defense system interactions with *Candida*. *J. Medical Veterinary Mycology*, 1992; 30: 89-104.
33. Henderson L, Figueroa C, Mulle W: Assembly of contact phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood*, 1994; 84 (2): 474-478.
34. Hilger A, Danley D: Alteration of polymorphonuclear leucocyte activity by viable *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 1980; 27 (3): 714-720.
35. Holmskov U, Malhotra R, Sim R, et al: Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunology Today*, 1994; 15(2): 67-73.
36. Hussein RH, Hoadley ME, Hutchinson JJP, et al : Intracellular killing of *Candida albicans* by human polymorphonuclear leucocytes: comparison of three methods of assessment. *J Immunol Methods*, 1985; 81: 215-221.
37. Jiménez López Salvador: Seroprevalencia de marcadores de enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión sanguínea en pacientes hemofílicos. IMSS Centro Médico "La Raza". UNAM. 1995; 51-53.
38. Johnston RB : Monocytes and macrophages. *The New England Journal of Medicine*, 1988; 318 (12): 747-751.
39. Jawetz E; Melnick JL; Adelberg EA; et al: *Microbiología médica*, 13a; México D.F; El manual moderno, 1990: 138.
40. Klebanoff SJ, Rosen H: Phagocytosis its physiology and pathology. Tokio, Japan. Symposium on phagocytosis; 1979: 109-133.
41. Kolb H, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunology Today*, 1992; 13 (5): 157-159.
42. Lantz M, Bjornberg F, et al : Adherence of neutrophils release of soluble Tumor Necrosis Factor Receptor forms. *Journal of Immunology*, 1994; 152: 1362-1368.

43. Lavalle C, Rojas O, Nava et al: Función endocítica intrínseca de los leucocitos polimorfonucleares en el lupus eritematoso sistémico. Arch Invest Med. 1984; 15:35-44.
44. Lyman CA, Walsh: Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leucocytes. Infection and Immunity, 1994; 62 (4): 1489-1493.
45. Lynam E, Scott S, Rachan Yvan: Lypopolysaccharide enhances CD11b/CD18 function but inhibits neutrophil aggregation. Blood, 1994; 83: 3303-3311.
46. Marodi L, Korchak H, Johnston R : Mechanisms of host defense against Candida species. J Immunol, 1991; 146 (8): 2783-2789.
47. Martin E, Bhakdi S. Flow cytometry assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of Staphylococcus aureus by peripheral blood leukocytes. J Clin Microbiol, 1992; 30 (9): 2246-2255.
48. McKenzie S S: Hematología Clínica. Primera edición. México, D.F.; El Manual Moderno; 1991: 51-56.
49. Morris AG: Interferons. Immunology, 1988; Suppl 1:43-45.
50. Novellino PS, Trejo YG, Fernández O, et al: Relación entre expresión de HLA-DR de superficie y reducción del NBT en monocitos de pacientes con cáncer colorrectal. Sangre, 1991; 36 (2): 99-103.
51. Ortiz Ortiz L: Inmunología, 1ª edición; México D.F.; 1987: 7-13.
52. Pacheco SE; Shearer WT: Aspectos de laboratorio de inmunología. Clínica Pediátrica de Norteamérica, 1994; 4:653-683.
53. Petersen M, Williams D, Hallett B: Cross-linking of CD11b or CD18 signals release of localized Ca + from intracellular stores in neutrophils. Immunology, 1993; 80:157-159.
54. Pincus SH, Seymour J, Klebanoff SJ: Quantitative leucocyte iodination. The New England J Med, 1971; 284 (14): 744-750.

55. Quie PG, Mills M: Bactericide and metabolic function of polymorphonuclear leukocytes. *Pediatrics Supplemet*, 1979;719-721.
56. Quie PG: The phagocytic system in host defense. *Scand J. Infect Dis, Suppl.* 1980; 24: 30-32.
57. Richardson MD, Smith H: Resistance of virulent and attenuated strains of Candida albicans intracellular killing by human and mouse phagocytes. *J Infectious Diseases*, 1981; 144 (6): 557-564.
58. Richardson MD, Smith H: Production of germ tubes by virulent and attenuated strains of Candida albicans. *J Infectious Diseases*, 1981; 144 (4): 565-569.
59. Richardson MD, Brownlie CE, Shankland GS : Enhanced phagocytosis and intracellular killing of Candida albicans by GM-CSF-activated human neutrophils. *J Medical Veterinary Mycology*, 1992; 144 (30): 117-128
60. Roberts, NJ: Impact of temperature elevation on immunologic defenses: Reviews of *Infectious Diseases*. 1991; 13: 462-472.
61. Rodriguez B, Barriga C, De la Fuente: In vitro effect of cefoxitin on phagocytic function and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human neutrophils. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 1993; 16 (1): 39-50.
62. Roitt I, Brostoff J, Male D: *Immunology*, 3th edition; USA: Mosby, 1993: 1.1-1.5, 12.1 - 12.6, 13.0, 15.15.
63. Rojas O, Oltza A, Chavéz Y, et al: Phagocytic activity of circulating polymorphonuclear leucocytes from patients with advanced pulmonary tuberculosis under treatment. *Rev Lat-Amer Microbiol*, 1987; 29:137-44.

64. Rojas O, Domínguez L, Arce P cols: Efecto de algunas drogas antileprosas sobre la actividad fagocítica in vitro de los leucocitos polimorfonucleares. *Dermatología Revista Mexicana*, 1991; 35 (6): 391-396.
65. Rosen H, Bryce M, Chait A : Phagocytosis of opsonized oil droplets by neutrophils. *J Immunol Methods*, 1991; 144: 117-125.
66. Ross S, Rosenthal P, Berberich M, cols: Killing of Neisseria meningitidis by human neutrophils implications for normal and complement-deficient individuals. *J. Infectious Diseases*, 1987; 155 (6): 1266-1275.
67. Saba TM: A specific opsonins . In: *The Immune system and infectious diseases*. Karger Basel, 1975: 489-504.
68. Segal WA: Nitroblue-tetrazolium tests. *The Lancet*, 1974; 23:1248-1252.
69. Seki K, Murd M, Sakurada J, et al: A simple method for observation of phagocytosis on bacterial thin layer. *Microbiol Immunol*, 1989; 33 (1): 81-85.
70. Seville S, John, Henson P, Haslett C: Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages mediated by novel charge-sensitive recognition a mechanism. *J. Clin Invest*, 1989;84:1518-1527.
71. Schuit KT: Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeast by human monocytes and neutrophils. *Infection and Immunity*, 1979; 24 (3): 932-938.
72. Smith R: Resistance of virulent and attenued strains of *Candida albicans* intracellular killing by human and mouse phagocytes . *J. Infectious diseases*, 1981; 144:553-564.
73. Steel DM, Whitehead AS: The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 1994;15 (2): 81-87..

74. Stevens DL, Bryant AE, Huffman et al: Analysis of circulating phago cyte activity measured by whole blood luminescence: correlation with clinical status. J Inf Dis, 1994; 170:1463-72.
75. Stossel PT: Phagocytosis (First of Three Parts). The New England J Med, 1974; 290 (15): 717-723.
76. Stossel PT: Phagocytosis (Second of Three Parts). The New England J Med, 1974, 290 (14): 774-780.
77. Stossel PT: Phagocytosis (Third of Three Parts). The New England J Med, 1974; 290 (13): 833- 839.
78. Talaro K, Talaro A: Foundations In microbiology, USA, W C Brown Publishers, 1993: 326-330.
79. Thompson J, Witton: Interaction Intracellular killing of C. albicans blastospores by human leucocytes, monocytes and monocytes-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. Clin Exp Immunol, 1992; 87: 316-321.
80. Vogds MT, Cantony L, Carell M, et al: Role of acute-phase proteins in Interleukin-1 induced non specific resistance to bacterial infections in mice. Antimicrob Agents Chemother, 1993; 37 (12): 2527-33.
81. Wagner DK, Collins LC, Sohnle PG: Inhibition of neutrophil killing of Candida albicans pseudohyphae by substances which quench hypochlorous acid and chloramines. Infect Immune, 1986; 51:731-735.
82. Wayne WD: Bioestadística, Primera edición; México: Limusa, 1977: 6-14, 244-286.
83. Yakuwa N, Inque T, Watanabe, et al: A novel neutrophils adherence test effectively reflects the activated state of neutrophils. Microbiol Immunol, 1989; 33 (10): 843-852.

84. Zendejas BV: Efecto de la edad en los niveles de fagocitosis en cerdos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, 1987: 57-75.

## Glosario

NA <sup>+</sup>	Nitro Azul de Tetrazolio
PMN	Polimorfonuclear
ECG	Enfermedad Granulomatosa Crónica
MAC	Receptores de membrana
CR	Receptor de complemento
CR3	Receptor de complemento y molécula de adhesión
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
ELAM	Molécula de adhesión
Arg-Gly-Asp	Arginina-glicina-aspártico
Factor XI	Factor tromboplastínico
Factor XII	Factor Hageman
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
C3a y C5a	Fragmentos de complemento con actividad de anafilotoxinas
IL-1-IL-10	Interleucinas
NK	Células asesinas
LFA	Antígenos funcionales de leucocitos
TH	Células T cooperadoras
INFs	Interferón
LPS	Lipopolisacárido
CD <sub>4</sub>	Marcadores de superficie
NO	Oxido nítrico
FcR	Receptores para Fc
Uridina	Uridina



$^{51}\text{Cr}$  Cromo radioactivo

GCSF Factor estimulador de colonias de granulocitos

M-CSF Factor estimulador de colonias de macrófagos

GM-CSF Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos