



11262¹⁰
71.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CAPACIDAD FAGOCITICA Y MICROBICIDA DE
POLIMORFONUCLEARES DE NIÑOS CON SIDA
RELADOS CON *H. influenzae* tipo b

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A :

GERARDO MARTINEZ AGUILAR

ASESOR DR. JOSE IGNACIO SANTOS P.

MEXICO, D. F.

1997

SITIO DE REALIZACION DE LA TESIS:

Laboratorio de Inmunoquímica y Biología Celular y
Departamento de Infectología del Hospital Infantil de
México Federico Gómez.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INDICE	2
ANTECEDENTES	4
Epidemiología de la Infección por VIH	4
Fisiopatología de la infección por VIH	5
Infecciones bacterianas en adultos con VIH	6
Patogenia de las infecciones bacterianas asociadas con VIH	7
Infecciones Bacterianas en niños con Infección por VIH	8
LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES	10
Origen y maduración de los Neutrófilos	10
Fagocitosis	12
Opsonización y fagocitosis	12
Acontecimientos posfagocíticos - Estallido respiratorio	14
Incremento en el consumo de oxígeno	16
Consumo de glucosa via hexosa-monofosfato	16
Producción de metabolitos de oxígeno	16
Metodos de medición del estallido respiratorio	19
Quimioluminiscencia	19
Reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (NBT)	20
Actividad Microbicida	21
Degranulación	21
INFECCION POR VIH Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
PROBLEMA GENERAL	26
HIPOTESIS GENERAL	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
MATERIAL Y METODOS	28

Poblacion de estudio	28
Bacteria	28
Obtencion de PMNs	29
Viabilidad y pureza	30
Ensayo de quimioluminiscencia	30
Ensayo de capacidad bactericida	31
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	33
Características Clínicas y de Laboratorio de los pacientes y controles	33
Quimioluminiscencia de PMNs	33
Capacidad bactericida	34
Tablas de ANOVA	35
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43
TABLAS Y GRAFICAS	49

ANTECEDENTES

Epidemiología de la Infección por VIH

La pandemia de VIH/SIDA ha condicionado que el VIH (virus de inmunodeficiencia humana) sea uno de los patógenos más estudiados en este siglo. Se estima que cuatro millones de adultos y niños han desarrollado SIDA desde el inicio de la epidemia. Sin embargo, dado el periodo de latencia, estos datos informan de las personas que adquirieron la infección hace aproximadamente 10 años. Se calcula que para el año 2000 habrá 40 millones de infectados por VIH.¹

Aunque solo cerca de la mitad del total de casos de SIDA reportados han sido de países en desarrollo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de las tres cuartas partes del total de casos de SIDA acumulados a la fecha han ocurrido en estos países.²

Los primeros casos de SIDA en México iniciaron su padecimiento en 1981 y se notificaron en 1983.³ Desde este año hasta el 1º de abril de 1997 se han notificado 30 970 casos de SIDA. Puesto que en México como en la mayoría de los países existe retraso en la notificación y subnotificación es necesario tomar en cuenta estos factores, por lo que se estima que han ocurrido 44 254 casos acumulados.⁴ El análisis de las tendencias por factor de riesgo en adultos, indica que la epidemia de SIDA en México presenta un patrón cada vez más heterosexual, más rural y la transmisión sanguínea se encuentra bajo control. Así, paso de ser una epidemia de hombres homosexuales y mujeres transfundidas, a ser cada vez un padecimiento de transmisión heterosexual. De hecho, en mujeres adultas la transmisión heterosexual corresponde actualmente a la mitad de todos los casos acumulados (53.2%), pero si consideramos los casos notificados durante los primeros trimestres de 1991 y 1992 vemos que el porcentaje aumento de 42.0% a 81.4% en esta categoría, siendo 86.2% en el cuarto trimestre de 1996.⁵ Estos cambios en los factores de riesgo de adultos se reflejan en las categorías de transmisión en niños. En los casos acumulados de SIDA pediátrico las cifras para el primer trimestre son las siguientes: por vía sanguínea 40.0% en 1992, 28.6% en 1996 y 23.5% en 1997, por transmisión perinatal 55.0% en 1992, 71.4% en 1996 y 70.6% en 1997. Los casos acumulados a finales de este trimestre en menores de 15 años son 817, los que constituyen 2.63% del total de casos notificados en el país.⁶

Fisiopatología de la infección por VIH

La infección por VIH en adultos es caracterizada por un largo periodo de latencia clínica, estimándose un promedio de 10 años, periodo que depende de la vía de adquisición, el estado inmune del hospedero y características del virus^{6,7}. Los conceptos previos de patogénesis proponían que una respuesta inmune efectiva del hospedero o la activación de ciertos genes del VIH conducirían a este periodo de latencia viral. Ahora se sabe que la replicación viral persiste lentamente a través del periodo latente y continúa así durante toda la evolución de la enfermedad⁸. Durante la fase inicial de la infección los virus llegan a el tejido linfoide donde continúan su replicación e infectan a los linfocitos CD4 (linfocitos cooperadores) cuando pasan a través de los nodulos linfáticos⁹. Debido a que una gran proporción del total de linfocitos del cuerpo residen en los organos linfoides se comprende que la replicación viral persista a pesar de que no se detecta al virus en sangre. Estudios de hibridación in situ y el análisis de nodulos linfáticos por microscopia electronica muestran que cantidades importantes del VIH pueden ser encontradas en el tejido linfoide durante la llamada fase "latente de infección"¹⁰. Los virus observados en este tejido se encuentran unidos extracelularmente a las células dendríticas foliculares en el centro germinal del nódulo linfático. Las células dendríticas actúan como una trampa manteniendo células infectadas en el tejido linfoide y brindando un medio propicio donde células inmunocompetentes no infectadas pueden interactuar con células infectadas. Este proceso tiene efectos benéficos y deletéreos. El virus es secuestrado y puede ser eliminado por el sistema inmune del hospedero, pero por otra parte, provee de un medio ambiente rico en células CD4 en el cual tienen lugar nuevos ciclos de infección^{9,10}.

La capacidad del VIH para disminuir la población normal de linfocitos CD4, directa o indirectamente, ha sido objeto de una investigación minuciosa. La aparición de alteraciones inmunológicas antes de la progresión clínica de VIH sugiere que el virus afecta el sistema inmune por mecanismos indirectos. Muchas de las teorías de citopatogenicidad del VIH y de alteraciones del sistema inmune deben aun ser confirmadas, sin embargo, hallazgos recientes sugieren los siguientes mecanismos: destrucción directa de las células por el VIH, fenómenos autoinmunes, estimulación de linfocitos T por superantígenos, apoptosis, unión del receptor CD4 a gp120, alteración en la interacción CD4 con moléculas clase II del sistema principal de histocompatibilidad, y diversos cofactores virales (citomegalovirus, herpesvirus humano tipo 6)¹¹. Sin embargo, en los últimos dos años se han producido importantes cambios en el modelo conceptual de infección por VIH y progresión a SIDA. A partir de la

implementación de ensayos clínicos con inhibidores de proteasas de HIV ha sido posible tener una mayor comprensión de la dinámica entre VIH y la población de células infectadas in vivo y de la importancia de la presión selectiva en la emergencia de mutaciones virales.¹⁷ Posibles variaciones en la patogenicidad entre diferentes cepas de VIH deberán ser consideradas. En la misma forma las bases genéticas para determinar si la respuesta inmune del hospedero es efectiva o inefectiva deberá ser objeto de investigación continua.¹⁸

En base a lo mencionado previamente se comprende porque el VIH suprime profundamente la inmunidad mediada por células. Sin embargo, las personas afectadas muestran además diversas alteraciones en otros componentes de su sistema inmune como alteración de la inmunidad humoral, hipergamaglobulinemia, neutropenia, así como defectos en la función de sus células fagocíticas.¹⁹ Todas estas alteraciones condicionan una mayor susceptibilidad a infecciones agregadas, las cuales constituyen la causa principal de morbilidad y mortalidad en sujetos adultos infectados con VIH en quienes son frecuentes las infecciones por parásitos, virus, bacterias y hongos (*P. carinii*, *Toxoplasma gondii*, citomegalovirus, *H. Influenzae*, *S. Pneumoniae* y *Cryptococcus neoformans*)^{16, 17, 28, 29}

Infecciones bacterianas en adultos con VIH

Conforme la infección por VIH progresa las infecciones bacterianas desempeñan un papel más preponderante dentro del espectro de sus manifestaciones clínicas. La importancia de estas ha acentuado por cambios en los factores demográficos y de riesgo de la infección por VIH, uso frecuente de antibióticos de amplio espectro y el aumento substancial en la supervivencia global de estos pacientes.

A diferencia de las infecciones oportunistas, cuya prevalencia en poblaciones infectadas por VIH a menudo refleja la ecología de determinadas áreas del mundo, las infecciones bacterianas asociadas con este virus tienden a tener una distribución mundial uniforme. Por ejemplo en la serie de Nairobi al menos 25 % de las infecciones asociadas con VIH fueron debidas a infecciones bacterianas severas.²⁰ Del mismo modo, en los Estados Unidos y Europa, las autopsias han documentado infección bacteriana fatal en aproximadamente un 30% de los sujetos infectados con VIH/SIDA.^{17, 18} Sin embargo, en los Estados Unidos, las infecciones bacterianas tienen diferente

incidencia entre los distintos grupos demográficos y de riesgo. Su prevalencia es mayor en mujeres infectadas con VIH y drogadictos endovenosos, que en hombres infectados por contacto heterosexual. En estudios prospectivos de drogadictos infectados con VIH, las infecciones bacterianas severas, previas al diagnóstico de SIDA, se ha asociado con una mortalidad de aproximadamente al 25-33% de la mortalidad global del SIDA.²¹ Las infecciones bacterianas se han identificado también como fuertes predictores de progresión independientemente de la historia natural de la enfermedad y pueden de hecho, por sí mismas, ser capaces de acelerar su evolución.²² La asociación entre infecciones bacterianas serias e infección por VIH es tan fuerte que la neumonía y la bacteremia en adultos jóvenes han servido como marcadores de seropositividad para VIH en estudios de vigilancia poblacional.^{23,24}

Patogenia de las infecciones bacterianas asociadas con HIV

Los factores de la infección por VIH que se considera inciden directamente sobre los mecanismos inmunes del hospedero que brindan protección contra las bacterias se cuentan: disminución de Células CD4, disminución de la producción de citocinas y disminución del número de células fagocíticas (neutrófilos y mononucleares), debilitamiento gradual de la respuesta específica de anticuerpos. Estas alteraciones comprometen la competencia del hospedero para defenderse de prácticamente todas las clases de patógenos bacterianos.^{25,26}

Otros factores atribuibles al VIH que indirectamente predisponen a las infecciones bacterianas son: alteración de la integridad de la piel y las mucosas por infecciones oportunistas, hospitalizaciones y uso frecuente de catéteres durante periodos prolongado, hipoacididad gástrica inducida por el VIH que puede favorecer el subdesarrollo bacteriano en el tracto gastrointestinal y favorecer la presencia de infección, uso frecuente de antibióticos los cuales ejercen una presión selectiva sobre las floras intestinal y pulmonar normales, neutropenia inducida por infecciones o medicamentos, malnutrición asociada al VIH y finalmente las asociaciones fisiológicas y de comportamiento del uso de drogas intravenosas tales como: el cigarrillo, la higiene oral deficiente, la disminución del reflejo nauseoso y los métodos de utilización de drogas poco higiénicos, contribuyen a la incidencia de infección bacteriana en la población infectada por VIH.^{24,24,27}

Infecciones Bacterianas en niños con Infección por VIH

Aunque presentan infecciones bacterianas frecuentes los adultos presentan una mayor incidencia de infecciones por oportunistas, mientras que, los niños con infección por VIH/SIDA presentan una mayor frecuencia de infecciones bacterianas tales como: bacteremia por gérmenes encapsulados, meningitis, neumonía, infección de vías urinarias, infección de piel y tejidos blandos, otitis media y gastroenteritis. Los primeros 52 pacientes pediátricos diagnosticados con VIH en el Hospital de niños de New Jersey (EUA) entre 1981 y 1983 tuvieron una incidencia de bacteremia de 45%²⁸. Otros autores han reportado que la incidencia de infecciones bacterianas serias en niños con infección sintomática por VIH se encuentra entre 38 y 57 %^{29,30}. En nuestra población hemos encontrado que 83 % de los niños con infección sintomática por VIH presentaron en promedio 2.5 infecciones durante el periodo de estudio³¹. Sin embargo si tenemos en cuenta la susceptibilidad normal del niño a las infecciones bacterianas, la naturaleza descriptiva y retrospectiva de estos estudios solo permitieron conocer la frecuencia elevada de infecciones bacterianas en esta población. Principi y cols efectuaron un estudio prospectivo comparativo de 27 niños con infección por VIH pareados con controles inmunocompetentes y seguidos durante un total de 543 meses (media por niño 19.4 ± 11). Estos autores encontraron que los niños con estadios avanzados de la infección por VIH tuvieron un número significativamente más alto de infecciones que los controles sanos (86 Vs 32) confirmando las observaciones de los estudios previos.³² Los factores que se han asociado con un mayor riesgo de infecciones bacterianas en niños con SIDA son: antecedente de infección oportunista, infección bacteriana por *H influenzae* o *S pneumoniae*, u otras bacterianas piógenas y cuentas de linfocitos CD4 menores de 400 cel/mm.³ Factores como hipergamaglobulinemia o manifestaciones inespecíficas como adenopatía y hepatoesplenomegalia no se han asociado con alto riesgo.³³ La combinación de inmadurez y disfunción inmunológica condicionan una mayor susceptibilidad de los niños con infección por VIH a infecciones bacterianas. La destrucción de los linfocitos CD4 es la principal alteración que conduce a la inmunocompetencia inmunológica en adultos con SIDA. En niños, la linfopenia es menos común y la disfunción inmunológica no se explica únicamente por la depleción de células T.³⁴ En pacientes pediátricos la disfunción inmunológica se manifiesta más comúnmente por inversión de la relación de linfocitos CD4/CD8,

hipergamaglobulinemia, y disminución de la respuesta blastogénica de células T a mitógenos como fitohemaglutinina (PHA) ^{35,36}. La susceptibilidad a infecciones con bacterias capsuladas en pacientes con infección por VIH, a pesar de que presentan hipergamaglobulinemia, se ha intentado explicar por alteración en las subclases de inmunoglobulinas. Church y colaboradores y Parkin y cols han reportado disminución de los niveles de IgG2 en sujetos con SIDA ^{37,38}. Asimismo, se han descrito defectos cualitativos en la respuesta humoral en adultos y niños con infección por VIH, ³⁹ y se ha encontrado disminución de la respuesta a antígenos específicos in vitro e in vivo. Borkowsky y asociados encontraron una discrepancia entre la respuesta humoral sérica y la inmunidad mediada por células a toxoides tetánico y diftérico en pacientes pediátricos con infección por VIH e inmunizados con los mencionados toxoides; la respuesta mediada por células estuvo presente con mayor frecuencia que un nivel protector de anticuerpos ³⁹. Estos autores consideraron que sus resultados son consistentes con la hipótesis de que la infección por VIH solo interfiere con la respuesta a antígenos presentados después de que la infección ha ocurrido, pero no interfiere seriamente con la respuesta humoral de linfocitos sensibilizados previo a la infección. La relativa inmadurez inmunológica del niño al adquirir la infección por VIH (al nacer o in útero), cuando se compara con el momento en que el adulto adquiere el virus, podría teóricamente, comprometer la respuesta del paciente pediátrico cuando se expone a agentes patógenos comunes. Bernstein y cols reportaron disminución de la respuesta humoral a antígenos dependientes de células T (ej. polisacáridos) y antígenos independientes de células T (ej. bacteriofago ΦX174). Los niños con SIDA tuvieron una respuesta primaria deficiente a estos antígenos y no presentaron evidencia de amplificación o el cambio esperado en las subclases de inmunoglobulinas ⁴⁰. Sin embargo en este artículo los autores reportan solamente 6 pacientes y dos de ellos fueron menores de 2 años de edad y no se evaluó la respuesta en niños sanos, por lo tanto no es posible saber con certeza si la pobre respuesta a antígenos se debe a la infección por VIH o a la inmadurez inmunológica normal contra antígenos polisacáridicos del niño menor de 2 años ⁴¹. Existen diferencias significativas en la función inmune entre niños con infección por VIH que han presentado infecciones bacterianas graves cuando se compara con la de niños que no las han presentado. La respuesta de linfocitos a mitógenos es significativamente menor en niños con infección bacteriana comparada con la de niños sin antecedentes de infección. ⁴² Además de las

alteraciones anteriormente mencionadas también se han reportado alteraciones cualitativas y cuantitativas en los neutrófilos de adultos y niños infectados por VIH.^{42,46} Dado que los neutrófilos desempeñan un papel muy importante contra infecciones bacterianas, los defectos en estas células fagocíticas podrían contribuir también a la mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas y micóticas del paciente con infección por VIH.

LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

La importancia de las células fagocíticas como mecanismos de defensa en infecciones bacterianas se conoce desde los estudios de Elie Metchnikoff hace más de 100 años. En experimentos con invertebrados marinos, Metchnikoff observó que ciertas especies de hongos podían ser ingeridas y destruidas por células fagocíticas, mientras que las que no llegaban a destruirse desencadenaban enfermedad diseminada y fatal. De estas observaciones se dedujo que las anomalías de las células fagocíticas posiblemente comprometían las defensas del hospedero. Un siglo más tarde se pudo demostrar este hecho al reconocerse entidades que se cursan con infecciones bacterianas y fúngicas fulminantes en casos de deficiencias cuantitativas o funcionales de los leucocitos polimorfonucleares.⁴⁷

Origen y maduración de los Neutrófilos

Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) derivan de las células hematopoyéticas pluripotenciales localizadas en la médula ósea. La producción y diferenciación de estas células depende de los factores estimuladores de colonias,⁴⁸ (moléculas glicoproteicas producidas por macrófagos y linfocitos T activados)⁴⁹ además de otras moléculas como lactoferrina neutrofilica y prostaglandina E₂ que actúan inhibiendo la producción y secreción de factores estimuladores o evitando en forma directa la proliferación de las células hematopoyéticas.⁵⁰

En la especie humana, los factores estimuladores de colonias se conocen como: 1) GM-CSF alta o Factor Estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos, 2) G-CSF o Factor Estimulador de Granulocitos, 3) M-CSF o Factor Estimulador de colonias de Macrófagos y 4) Interleucina 3 o Multi-Factor Estimulador de Colonias.⁴⁸ Estas glicoproteínas determinan la diferenciación del mieloblasto hacia las líneas monocítica o granulocítica. Cuando se diferencian hacia la serie

granulocítica, el desarrollo y maduración de los PMNs sucede en dos etapas (mitótica y no mitótica) con duración de una semana cada una de ellas. En la primera fase, la diferenciación es de mieloblasto → promielocito → mielocito, en la última etapa aparecen los granulos citoplasmáticos de los PMNs. En la etapa no mitótica, la diferenciación es de metamielocito → neutrófilos inmaduros o en banda → neutrófilos maduros o segmentados.⁵⁹ Cuando ocurre la maduración morfológica se producen cambios antigénicos, enzimáticos y funcionales en los neutrófilos segmentados.⁵¹ Durante la fase de promielocito aparecen los receptores Fc, los cuales, son funcionales poco después. Los receptores para complemento (CR1 y CR3) están presentes en las fases de metamielocito y neutrófilo inmaduro. Al mismo tiempo que ocurre la diferenciación de los receptores Fc, la célula es capaz de fagocitar, y durante la fase de mielocito ya posee actividad microbicida, dada principalmente por mecanismos no oxidativos, para alcanzar su funcionalidad total en la fase de neutrófilo en banda, donde ya presenta mecanismos oxidativos y desarrolla actividad quimiotáctica.⁵²

Los neutrófilos maduros, contienen un núcleo multilobulado altamente condensado, gran abundancia de granulos citoplasmáticos de varios tamaños que son morfológica, bioquímica y funcionalmente distintos. Los granulos primarios corresponden a lisosomas, también llamados granulos azarófilos, son peroxidasa positivos y generalmente más densos y grandes que los peroxidasa negativos. Contienen hidrolasas ácidas y diferentes enzimas, así como proteínas catiónicas con potente actividad bactericida y fungicida.⁵³ Los granulos secundarios o específicos son ricos en glicoproteínas y más numerosos que los azarófilos. Contienen lisozima, lactoferrina, proteínas fijadoras de vitamina B, citocromo b y receptores para quimioatrayentes como N-formil péptidos, CR3, laminina y componentes del complejo enzimático que produce peróxido de hidrógeno.^{54,55}

Los granulos terciarios se distinguen por la presencia de fosfatasa ácida, colagenasas y gelatinasa, algunos componentes y funciones relacionados con granulos específicos pueden residir en ellos.^{56,57}

La funcionalidad de los PMNs depende en gran parte de la constitución del citoesqueleto, el cual como en otras células posee microtúbulos, microfilamentos y en menor proporción filamentos intermedios. Hacia la periferia del citoplasma y en los pseudopodos, se encuentran filamentos de

actina y proteínas fijadoras de actina, formando una malla, mientras que el cuerpo de la célula lo forman filamentos intermedios y polímeros de tubulina que en alguna extensión penetran en el citoplasma periférico. La interacción de estas moléculas además de la miosina permiten la contractilidad de la célula y otras funciones como fagocitosis, endocitosis, pinocitosis, movilización de vacuolas, lisosomas y granulos hacia la periferia y superficie celular.⁵⁸

En ausencia de infección, el egreso de los PMNs de la médula ósea se limita a las células morfológicamente maduras que permanecen como reserva medular durante dos días aproximadamente, hasta que factores mecánicos de maduración celular y humorales desencadenan la liberación de estos a la circulación,⁵⁹ en donde tienen una vida media de 6 a 7 horas.⁶⁰ En individuos normales, número de PMNs varía de acuerdo a la edad, el conteo de neutrófilos de sangre periférica puede subestimar el valor real de neutrófilos en circulación ya que la mitad a dos terceras partes del total pueden encontrarse como neutrófilos marginados sobre el endotelio vascular secuestrados en vénulas o capilares, y ante situaciones de estrés, inflamación u otros factores, pueden liberarse y activarse para el proceso fagocítico.⁶¹

Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso que se realiza en dos etapas: fijación e ingestión de la partícula fagocitada. Cuando ocurre invasión tisular por diversos microorganismos, entre ellos bacterias, los PMNs localizan el proceso inflamatorio mediante los siguientes eventos: adherencia y marginación al endotelio vascular, migración transendotelial y quimiotaxis. La segunda etapa, la fagocitosis es el proceso de ingerir partículas muertas o no, opsonizadas o sin opsonizar a través de la formación de una vacuola endocítica.⁶²

Opsonización y fagocitosis

Algunos microorganismos y partículas inertes pueden ser ingeridos por los neutrófilos en ausencia de factores sericos, pero la mayoría de las bacterias deben ser cubiertas con opsoninas para que pueda producirse la fijación e ingestión por un neutrófilo.⁶³

La IgG específica y el complemento son los principales factores opsonizantes que promueven el reconocimiento y la ingestión de los microorganismos por los neutrófilos. Para que la actividad

opsonica de la IgG sea adecuada requiere que la region Fc de la molecula se encuentre intacta. Las subclases que principalmente participan son IgG1 e IgG3.⁵¹ Los anticuerpos estimulan la capacidad fagocitica mediante la neutralizacion de moleculas antifagociticas presentes en la superficie bacteriana (p.ej. polisacando capsular), la union fisica del microorganismo al neutrofilo, la activacion de la via clasica del complemento, la estimulacion del deposito de fragmentos opsonizantes de C3 sobre la superficie bacterina y la activacion del mecanismo de ingestion por la interaccion de IgG con su receptor en la membrana del neutrofilo. La activacion del complemento por la via alterna o clasica lleva al deposito de C3b y de C3bi sobre la superficie del microorganismo. Ademas, el deposito de C1q estimula la ingestion dependiente del receptor Fc.⁵¹ En la membrana del neutrofilo se encuentran receptores para IgG (FcγRI-RIII), pero no para otras inmunoglobulinas, y para C3b (CR-1) y C3bi (CR-3).⁵⁵ Estos receptores son bioquimica, topografica y funcionalmente distintos. El receptor C3b ademas de su sitio de union a iC3b, tambien presenta un dominio de reconocimiento de carbohidratos que puede desempenar un papel en la lectinofagocitosis. Algunos datos sugieren que los receptores Fc, median la fagocitosis por vias dependientes de calcio, mientras que CR-1 y 3 usan vias independientes de calcio.⁵⁶ Los receptores Fc,RII-III son de afinidad leve a moderada y son expresados constitutivamente, mientras la alta afinidad de Fc,RI esta presente solo despues de la estimulacion celular, por ejemplo por INF-γ.⁵⁷ No se han identificado reservas intracelulares de receptores Fc. En contraste, tales reservas se han descrito para CR-1 y CR-3, el ultimo claramente asociado con los granulos especificos. Estos receptores se movilizan rapidamente a la superficie despues de la estimulacion de la celula por diversos mediadores inflamatorios.⁵⁸

La contribucion relativa del anticuerpo y C3 en la opsonizacion es variable. La opsonizacion optima de patogenos encapsulados como *Streptococcus pneumoniae* y *H. influenzae* tipo b, requiere de anticuerpos anticapsulares tipo especifico, los cuales fijan C3 por activacion del complemento. Por otro lado la opsonizacion del estafilococo puede producirse en suero hiperimmune con altas concentraciones de IgG unicamente. En el suero normal, la opsonizacion de estafilococo puede ocurrir tanto por anticuerpos como por la activacion de la via alterna del complemento. Estos ejemplos de interaccion de microorganismos con opsoninas sericas, reflejan la variedad de reacciones posibles dependiendo del microorganismo, condiciones del hospedero y

probablemente, de las condiciones de cultivo del microorganismo el cual puede tener influencia en la naturaleza de la superficie del mismo ³⁸

La ingestión es el resultado de la interacción secuencial entre los ligandos opsonizantes distribuidos en forma homogénea en la superficie de la partícula y sus receptores presentes en la membrana del fagocito. Esta interacción inicia la polimerización de microfilamentos de actina del citoplasma que se encuentran por debajo del sitio de fijación de la partícula y como resultado se produce el flujo envolvente de la membrana celular alrededor de la partícula y su inclusión dentro de un fagosoma ³⁹

Acontecimientos postfagocíticos. Estallido respiratorio

La expresión de eventos postfagocíticos se refiere a la generación de actividad metabólica y a la descarga del contenido de los gránulos que se produce durante y después de la fagocitosis. Estos eventos inician con la fijación de microorganismos opsonizados a la membrana celular y por algunos mediadores solubles como C5a, I TB₄ y factor de activación de plaquetas. Las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos) tienen entre sus funciones la fagocitosis y destrucción de los microorganismos. Estas células, cuando son estimuladas también pueden liberar agentes tóxicos hacia el exterior, con el potencial para dañar microorganismos demasiado grandes para ser ingeridos, el tejido normal adyacente y células malignas. Las células fagocíticas realizan estas funciones a través de una variedad de mecanismos que pueden ser divididos convenientemente en aquellos que son dependientes de oxígeno y aquellos que no lo son ⁴⁰

El oxígeno es una molécula termodinámicamente reactiva y por lo tanto puede reaccionar con la mayoría de los elementos y con muchas moléculas orgánicas. Sin embargo, considerando su cinética, el oxígeno es más bien inerte y en la mayoría de los casos requiere un catalizador para superar esta barrera cinética. Esta propiedad es necesaria debido a que sin la barrera cinética la alta reactividad del oxígeno podría resultar en su depleción del medio ambiente y la pérdida de vida anaeróbica tal como la conocemos. La base de la cinética inerte del oxígeno es su configuración electrónica. En la mayoría de los casos los electrones se presentan en pares estabilizados por giros en dirección opuesta. Cuando este no es el caso, por ejemplo electrones

impares la molécula es un radical libre altamente reactiva. En las reacciones de oxidación el oxígeno acepta electrones de la molécula la cual es oxidada y en el proceso se reduce.¹¹

La reactividad del oxígeno puede ser incrementada por reducción o excitación. El oxígeno es reducido finalmente a agua por la aceptación de cuatro electrones, sin embargo puede ocurrir con la formación de intermediarios altamente reactivos por ejemplo el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH). La excitación ocurre cuando la absorción de energía desvía uno de los electrones impares del oxígeno a un orbital de energía más alta con inversión del giro (spin). El producto, oxígeno libre (O_2), puede ocurrir en dos formas: singletes de oxígeno delta (ΔO_2) en los cuales los pares de electrones más nuevos ocupan el mismo orbital (con el otro orbital vacío) y singletes de oxígeno sigma (ΣO_2) en los cuales los dos electrones, ahora con giros opuestos, ocupan diferentes orbitales.^{12,13}

Un rasgo característico de los neutrófilos es su respuesta a la estimulación con un marcado incremento en el consumo de oxígeno. Estudios iniciales indicaron que el estallido respiratorio de los neutrófilos no era necesario para la generación de la energía metabólica requerida para la fagocitosis. Sin embargo, el estallido respiratorio parece ser requerido para la actividad microbicida óptima como se evidencia por la disminución (pero no pérdida) de la actividad microbicida con la exposición de neutrófilos a condiciones hipóxicas^{14,15} y por la asociación de un defecto microbicida con la ausencia de el estallido respiratorio en los leucocitos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. (FC)¹⁶

El término estallido respiratorio se refiere a un importante y abrupto cambio en el metabolismo del oxígeno que ocurre cuando los fagocitos son estimulados y está formado por una serie de reacciones enzimáticas mediante las cuales los fagocitos estimulados convierten oxígeno en diversos metabolitos activos críticos para la actividad bactericida. Otras reacciones que incluyen quimoluminiscencia, oxidación de proteínas, renovación de lípidos y fijación y degradación de algunas hormonas también son incrementadas durante la fagocitosis.¹⁷

Inmediatamente después de su estimulación, las células fagocíticas desencadenan una serie de eventos que incluyen: a) consumo de oxígeno, b) producción de superóxido, c) producción de peróxido de hidrógeno, d) estimulación del flujo de glucosa a través de la vía hexosa-monofosfato, e) incremento en la producción de metabolitos de oxígeno como anión superóxido

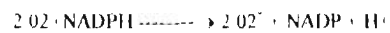
(OH) radical hidroxilo (OH), singletes de oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y d) incremento en la fijación de halógenos a proteínas o iodación.^{70,75}

a) Incremento en el consumo de oxígeno. Los neutrófilos en reposo consumen poco oxígeno y su energía la obtienen de la glicólisis anaeróbica. El estallido respiratorio de los neutrófilos no es necesario para la generación de energía metabólica requerida durante la fagocitosis, más bien ocurre para una óptima actividad microbicida apoyado esto en la observación de que la actividad microbicida disminuye cuando los neutrófilos son expuestos a condiciones de hipoxia.⁷⁶ Durante la ingestión de partículas, la captación de O_2 se incrementa importantemente sobre los valores basales. El incremento en la captación de oxígeno no se afecta por la exposición de las células a cianuro, lo cual indica que el estallido respiratorio no se debe al metabolismo mitocondrial. El principal papel del consumo de oxígeno es proveer suficiente sustrato para la formación de metabolitos de oxígeno que tienen acción microbicida. La determinación del consumo de oxígeno de los PMNs durante el proceso fagocítico constituye por tanto una forma de evaluar la capacidad microbicida oxidativa de los PMNs.⁷⁴

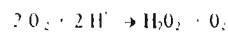
b) Consumo de glucosa via hexosa-monofosfato. La estimulación de los fagocitos también se asocia a un incremento en la oxidación de la glucosa via hexosa-monofosfato, que es hasta diez veces mayor que la producida por el ciclo de Krebs. El primer carbono de glucosa es oxidado a CO_2 con glucosa 6-fosfato por acción enzimática. El fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido (NADP) sirve como aceptor de electrones y dos moles de NADPH (forma reducida), se producen por cada mol de glucosa o fosfato oxidada. Durante la fagocitosis, una forma en la cual la oxidación del NADPH ocurre es a través del incremento de la actividad de una flavoproteína oxidasa que requiere del NADPH como sustrato. La oxidación del NADPH por esta oxidasa da lugar a la formación de superóxido (O_2^-), por la reducción de un electrón del oxígeno molecular. Un segundo mecanismo por el cual NADP puede ser generado durante el estallido respiratorio es a través del catabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), compuesto que es formado en cantidades importantes durante la ingestión de partículas o por la activación de células a través de otros estímulos.^{70,77}

c) Producción de metabolitos de oxígeno. Como respuesta a la estimulación de los fagocitos se activa un sistema de transporte de electrones transmembrana en el cual un nucleótido de pirimidina

(predominantemente NADP⁺ o NADPH) reduce oxígeno y dan lugar a la formación de metabolitos de oxígeno. Aunque algunos sistemas enzimáticos pueden catalizar la formación de anión superóxido a partir de O₂ durante el estallido respiratorio, la NADPH-OXIDASA es la principal enzima implicada en esta reacción. Algunos autores postulan que el mecanismo de activación enzimática se lleva a cabo a través de una proteína cinasa C (PK-C), después de una serie de eventos que se desencadenan al interactuar ligando-receptor, u ocurren a través de ácido araquidónico independientemente de la fosforilación⁷⁰⁻⁷². Dentro de la vacuola fagocítica y utilizando NADPH como sustrato, la NADPH-OXIDASA cataliza la reacción



Aunque una parte del superóxido producido se libera al espacio extracelular, la mayor cantidad de O₂⁻ se convierte rápidamente en H₂O₂ mediante dismutación. Este fenómeno puede ocurrir en forma espontánea como consecuencia del pH ácido encontrado en el fagosoma, siendo de gran importancia para la función microbicida de los PMNs, o bien el O₂⁻ producido puede escaparse de la vacuola fagocítica hacia el citoplasma y reducirse a H₂O₂ por la enzima superóxido dismutasa (SOD), reacción que es tóxica a la célula⁷³⁻⁷⁵.



Como mecanismo de protección ante estos metabolitos, un sistema dependiente de glutatión se activa y se produce la conversión del peróxido de hidrógeno donde participan las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa⁷⁵⁻⁷⁶.

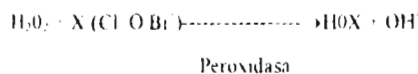
GSH (glutatión reducido)



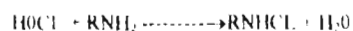
Glutatión peroxidasa

Al mismo tiempo que se llevan a cabo las reacciones donde participan anión superóxido y peróxido de hidrógeno, se producen otros compuestos oxidantes microbicidas como haluros oxidados y radicales hidroxilo.

Los haluros oxidados son potentes agentes microbicidas. Estos agentes se producen en los fagocitos mediante reacciones catalizadas por una peroxidasa, en donde el H₂O₂ es utilizado para oxidar tanto Cl como Br al correspondiente ácido hipohaloso



En los neutrófilos y monocitos, el Cl es el sustrato fisiológico y la reacción es catalizada por la mieloperoxidasa, una enzima con un grupo prostético semejante al hem y que se encuentra presente en altas concentraciones en los gránulos de estas células. En los tejidos, HOCl reacciona con aminas del medio para formar cloraminas que también tienen propiedades microbicidas como NH₂Cl.^{15,16}

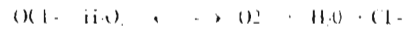


Además de la oxidación de haluros, los radicales formados tienen extraordinaria fuerza oxidante y son los responsables del daño tisular en los sistemas biológicos. El principal radical es OH[•] y se produce en la reacción "catalizada por metales" y descrita por Haber Weiss en donde el Fe⁺⁺⁺ es reducido a Fe⁺⁺ por el O₂ y después reoxidado a Fe⁺⁺⁺ por el H₂O₂ con la consecuente producción de OH[•]



La vía por la cual se obtiene hierro para esta reacción es a través de su liberación de la ferritina que ocurre cuando se expone a O₂.¹⁶

Durante esta misma reacción, un compuesto muy inestable y de alta energía, el singlete de oxígeno, también es producido a partir de la interacción de el ion hipohalito con el H₂O.



y de la rápida dismutación espontánea del superóxido⁷



Metodos de medicion del estallido respiratorio

Los pasos del metabolismo oxidativo de los PMNs pueden ser evaluados por diferentes metodos. La determinación de anion superóxido se realiza mediante la reducción de ferrocitocromo C a la forma ferrosa. El peróxido de hidrogeno puede detectarse por su reaccion con peroxidasa o por la oxidación de donadores de hidrogeno, en este ultimo caso puede utilizarse la oxidación de rojo fenol para medir el H₂O₂.⁷¹ Metodos ampliamente utilizados y que evaluan en conjunto el estallido respiratorio son quimioluminiscencia y reducción del colorante nitroazul de tetrazolio.

Quimioluminiscencia. Los neutrofilos estimulados por el contacto con diversos agentes que perturban la membrana celular emiten en forma abrupta energia luminosa (quimioluminiscencia). Se considera que el fenómeno luminescente es secundario a la generacion de las diversas especies oxidativas electronicamente excitadas (O₂^{•-}, H₂O₂, O₂), aunque no hay unanimidad en cuanto a la especie que principalmente produce el fenomeno.^{72,73} Se ha postulado que durante las reacciones donde el singlete de oxigeno y sus productos de oxidación pasan al estado de reposo se libera energia en forma de fotones y se capta una característica fluorescencia o quimioluminiscencia que puede ser medible. Bajo condiciones de anaerobiosis, en pacientes con FGC o en deficiencias o alteraciones de la enzima mieloperoxidasa (MPO), no ocurre el fenomeno luminescente. Estos hallazgos indican que la quimioluminiscencia es dependiente de la disponibilidad de O₂, la actividad de la oxidasa inicial para la formación de O₂^{•-}, H₂O₂ y la actividad de la MPO.⁷⁴

La respuesta quimioluminescente en los granulocitos puede ser magnificada con substratos secundarios como luminol (5-amino-2,3 dihydro-1,4- ftalazinediona) y lucigenina (10,10 -dimetil 9-9' dinitrato de biacridina). Ambos se utilizan para medir diferentes eventos metabolicos dentro del PMN. La respuesta amplificada por luminol refleja principalmente la actividad de la MPO.

Cuando dicho sustrato es oxidado, se origina el anión aminofalato que es inestable, el cual al pasar al estado de reposo emite luz como mecanismo de pérdida de energía, magnificando de esta forma la luminiscencia. La quimioluminiscencia amplificada por lucigenina mide la oxigenación asociada a la oxidasa.^{75,77}

El análisis de quimioluminiscencia originalmente se desarrolló para examinar el estallido respiratorio celular, la producción de radicales oxidantes y la generación de otros agentes cuya función es eliminar los patógenos microbianos. Numerosos estudios han utilizado la quimioluminiscencia para evaluar los primeros cambios que ocurren en los granulocitos durante los procesos infecciosos y otros procesos patológicos. Algunos estudios han sugerido que los receptores de la superficie celular y los productos del metabolismo oxidativo de los granulocitos pueden reflejar el estado funcional de la célula. Diferentes estímulos pueden seleccionarse para discriminar los eventos relacionados con receptores de los que no requieren de estos para desencadenar el metabolismo oxidativo de la célula. Inmunoglobulinas y complemento opsonizan partículas y mediante receptores Fc y CR desencadenan la respuesta fagocítica y actividad metabólica celular. En contraste, estímulos solubles como PMA (fórbol-miristato-acetato) no requieren de receptores para que ocurra degranulación y estallido respiratorio. De esta forma de acuerdo a los estímulos utilizados, indirectamente pueden inferirse las condiciones de expresión de receptores. Las aplicaciones clínicas del análisis de quimioluminiscencia de los fagocitos son diversas y es una metodología sensible en la medición de la capacidad fagocítica y de la integridad del metabolismo oxidativo celular.⁷⁸

Reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (NBT). El colorante NBT en su forma oxidada es amarillo y funciona como aceptor de electrones de diversos donadores. Al reducirse el NBT, se forma un precipitado azul denominado formazán el cual es insoluble. Normalmente, un pequeño porcentaje de granulocitos obtenidos de sangre periférica pueden reducir en forma espontánea el colorante, pero ante condiciones o estímulos que desencadenen el estallido respiratorio, más del 80% de los PMNs pueden reducir el NBT. En la célula intacta, la reducción del colorante se lleva a cabo en su superficie y en los fagosomas y puede ser inhibida por la SOD la cual es un marcador de la producción de superóxido y por lo tanto dependiente de todos los factores que regulen la

formación de este compuesto. La reducción de NBT es un método para evaluar la actividad oxidativa de las células fagocíticas.¹⁵

Actividad Microbicida

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

Degranulación.

Todas las células fagocíticas implicadas en la muerte de microorganismos contienen enzimas hidrolíticas y otras proteínas microbicidas dentro de vesículas limitadas por membrana denominadas lisosomas. Como ya se ha mencionado, durante el proceso de maduración del PMN aparecen los granulos primarios o azurofilos en el estadio promielocítico y los granulos secundarios o específicos en el mielocítico. El contenido de estos granulos se ha estudiado extensamente mediante técnicas histoquímicas y bioquímicas. Se ha definido la secuencia por la cual ocurre la degranulación y se ha demostrado que durante la fagocitosis de partículas, la fusión de los granulos específicos con la membrana plasmática y la consecuente descarga de su contenido al líquido extracelular (exocitosis), precede a la fusión de la membrana con los granulos primarios, situación que permite proponer que los granulos específicos estén adaptados únicamente para funciones secretoras, ya que posterior a la acción de determinados estímulos los granulos específicos pueden fusionarse con la membrana en ausencia de fusión con los lisosomas primarios.¹⁵ Además, los granulos secundarios, a través de su fusión con la membrana plasmática contribuyen al recambio tanto de receptores como de la misma membrana, interviniendo de esta forma en la regulación de los fenómenos de agregación, migración y estallido respiratorio. Los granulos primarios, a través de su fusión con los fagosomas (fusión fagolisosómica), intervienen

principalmente en los mecanismos microbicidas intracelulares de los PMNs.^{41, 42} Los mecanismos microbicidas de los PMNs pueden ser divididos de acuerdo a su dependencia de oxígeno en: oxidativos y no oxidativos.⁴³

INFECCIÓN POR VIH Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

En 1988 Murphy y cols. evaluaron la integridad funcional de los neutrófilos en adultos con SIDA determinando la capacidad bactericida y la producción de superóxido. Con respecto a la capacidad bactericida, estos autores encontraron que la sobrevivencia de *S. aureus* después de 90 minutos de incubación con neutrófilos de 11 pacientes fue significativamente más grande cuando se comparó con 14 controles sanos (32.5 ± 3.86 vs 13.81 ± 1.39 P: .001). Por el contrario, la producción de superóxido fue mayor en los neutrófilos de los pacientes con SIDA que en los controles. Aunque estos autores demostraron disminución en la capacidad bactericida de los PMNs de adultos con SIDA para matar *S. aureus* in vitro, concluyeron que esta alteración no podía explicarse por los defectos en la producción de sustancias antimicrobianas dependientes de oxígeno.⁴²

Por otra parte, al evaluar la producción de superóxido (O_2^-) por los neutrófilos de 71 pacientes con infección por VIH en diferentes estadios de la enfermedad, se encontró que la producción in-vitro de O_2^- estuvo significativamente disminuida en los pacientes con infección por VIH cuando se comparó con la de neutrófilos de controles sanos, tanto en reposo como después de la estimulación. El grado de afectación en la producción de O_2^- fue más pronunciado en pacientes que tenían cuentas bajas de linfocitos CD4. Aunque en este estudio no se evaluó la actividad microbicida de los PMNs, los autores proponen que los trastornos en el metabolismo oxidativo de estas células pueden contribuir a la mayor susceptibilidad de estos pacientes a infecciones bacterianas serias e infecciones por algunos gérmenes oportunistas.⁴⁴

Al evaluar la función de neutrófilos de 6 pacientes con SIDA y Sarcoma de Kaposi (SK) en 22 pacientes con complejo relacionado al SIDA (CRS) y en 29 controles sanos, se encontró una disminución significativa en la quimiotaxis de los neutrófilos de los pacientes con CRS comparada con la de los pacientes con SIDA, SK o controles sanos. En este mismo estudio los sueros de pacientes con SIDA, SK y con CRS inhibieron, significativamente, la quimiotaxis de los neutrófilos de controles

sanos, el calentamiento del suero suprimió el efecto inhibitorio. Resultados similares se encontraron en la capacidad microbicida sobre *Candida albicans* por los PMN de los pacientes evaluados.¹⁰⁸⁰ Este estudio encontró defectos en la función de los neutrófilos y sugiere que estos pueden ser debidos, en parte, a factores séricos.

Además de su actividad fagocítica, los neutrófilos tienen actividad antiviral siendo la principal la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos (ACDA). En un estudio en que se comparó esta actividad en células PMNs y mononucleares de niños con infección por VIH con la de células de adultos infectados, adultos sanos y niños sanos de edad similar, se encontró que las células de niños VIH positivos incubadas con inmunoglobulina hiperimmune contra VIH tuvieron ACDA significativamente menor que la de los niños sanos. La ACDC de mononucleares de adultos sanos en presencia del plasma de niños con VIH fue significativamente menor que la de las mismas células en presencia del plasma de adultos VIH positivos, sintomáticos y asintomáticos. Estos experimentos evidenciaron que el defecto de la ACDA en PMNs de niños con infección por VIH es debida tanto a defectos de las células fagocíticas como a alteraciones en el plasma de estos pacientes.¹⁰⁸²

Los neutrófilos son un factor importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra aspergilosis. Los individuos afectados por VIH pueden adquirir aspergilosis invasiva sin presentar otros factores de riesgo como neutropenia o tratamiento con corticosteroides. Roilides y cols evaluaron la actividad antifúngica de PMNs vs *Aspergillus fumigatus* en 31 niños con infección por VIH (15 con linfocitos CD4 ajustadas por edad < 25% y 16 con CD4 < de 25%) y se comparó con la actividad de PMNs de controles sanos. La actividad microbicida no se encontró afectada en los niños VIH positivos con CD4 < de 25%, por el contrario, en los 16 niños con linfocitos CD4 < de 25% se encontró una disminución significativa de su actividad fungicida. Cuando los PMNs de los controles fueron incubados con el suero de los niños infectados por VIH se observó una supresión de la actividad antifúngica. Sin embargo, la incubación con las proteínas recombinantes de VIH gp120, gp41 y P24 no inhibieron la respuesta. Estos resultados sugieren la presencia de factores inhibitorios de la función fagocítica de PMNs en el suero de personas con infección por VIH y cuentas bajas de CD4.¹⁰⁸³

Aunque el hallazgo característico de la infección por VIH-1 es la depleción de los linfocitos CD4, concomitantemente se presenta una amplia gama de alteraciones en la función inmune de diversas células como se evidencia en los estudios mencionados previamente. En algunos casos estos defectos son debidos a afectación directa de la célula, mientras que otros son probablemente secundarios a factores séricos.

Debido a que el neutrófilo es la célula efectora primaria en las defensas del hospedero contra bacterias y ciertas infecciones por hongos, decidimos evaluar la función de estas células retándolas *in vitro* con *H. influenzae* tipo b, una de las bacterias que suelen ocasionar infecciones graves, -pero potencialmente prevenibles por inmunización- en pacientes pediátricos con infección por VIH.¹⁴ Nuestro propósito fue obtener un mayor conocimiento de los mecanismos involucrados en la susceptibilidad de estos niños a infecciones bacterianas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como consecuencia de las alteraciones en su función inmune, los niños con infección por VIH presentan una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas. Diversos autores han postulado que las alteraciones en la función de las células fagocíticas pueden contribuir a este incremento en susceptibilidad. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el VIH afecta las células fagocíticas no han sido completamente determinados. Comparada con la importancia de los mononucleares en el control de las infecciones virales el PMN tiene un papel determinante en la respuesta inmune a la invasión del hospedero por bacterias y hongos. Por lo tanto las alteraciones inducidas en los PMNs por VIH pudiesen conducir a deprimir su actividad fagocítica.

La eliminación de microorganismos causantes de infección, requiere de una adecuada función de las células fagocíticas, en cada uno de los eventos que se desarrollan durante el proceso de fagocitosis. Debido a que los gérmenes encapsulados ocasionan infecciones frecuentes en estos niños consideramos que la utilización de una bacteria de importancia clínica como *H. influenzae* tipo b nos permitira tener un mejor conocimiento de la función de los PMNs en niños con SIDA, además de determinar cual es el efecto del suero de estos niños en la función de estas células.

PROBLEMA GENERAL

¿Existen diferencias en la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA al compararla con la de polimorfonucleares de niños sanos retados in vitro con *H. influenzae* tipo b opsonizado con diferentes sueros?

HIPOTESIS GENERAL

La actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA es menor a la de polimorfonucleares de niños sanos retados in vitro con *H. influenzae* tipo b opsonizado con diferentes sueros.

OBJETIVO GENERAL.

Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA y de niños sanos retados in vitro con *H. influenzae* tipo b opsonizado con diferentes sueros.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1 - Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA y de niños sanos retados in vitro con *H. influenzae* tipo b opsonizado con suero hipogamaglobulinémico
- 2 - Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA y de niños sanos retados in vitro con *H. influenzae* tipo b opsonizado con suero hiperinmune contra Hib
- 3 - Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA y de niños sanos retados in vitro con *H. influenzae* tipo b opsonizado con suero de niños con SIDA

MATERIAL Y METODO

Población de Estudio. En el presente estudio se evaluaron PMN de niños con diagnóstico de infección por HIV que acudieron a la Clínica de Inmunodeficiencias (CIINDI) del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo de enero a septiembre de 1995. El proyecto se sometió y fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Institución con el registro HIM/94/004. Se incluyeron niños de 3 meses a 13 años de edad, de ambos sexos. Todos los pacientes cumplieron los criterios de los CDC para la definición de caso de SIDA⁸¹ en niños y la infección por VIH se corroboró por Eisa y Western blot en mayores de 18 meses y en menores de esta edad por medio de cultivo, identificación de Ag p24 o reacción en cadena con polimerasa.⁸⁴

Todos los pacientes tuvieron evidencia de inmunosupresión severa ($< 15\%$ CD4) de acuerdo a la nueva clasificación de los CDC para infección por VIH en niños⁸¹ y no presentaban evidencia de infección secundaria en el momento de entrar al estudio o en los 15 días previos. Todos se encontraban recibiendo terapia antirretroviral y profilaxis con trimetoprim sulfametoxazol para *P. carinii*. Se obtuvo consentimiento escrito del padre o tutor para que el niño participara en el estudio. Se excluyeron niños que presentaban alguna de las siguientes condiciones: pacientes que se encontraban recibiendo inmunomoduladores (Interferon, factor estimulante de colonias, inmunoglobulina IV), leucopenia (< 2.500) y pacientes que habían recibido previamente vacuna conjugada de *H. influenzae* tipo b.

Las muestras de sangre de los controles se obtuvieron de niños que se encontraban programados para cirugía electiva con edad de 3 meses a 13 años, de ambos sexos y con consentimiento escrito del padre o tutor.

Se realizaron ensayos preliminares utilizando PMNs de adultos voluntarios "sanos" con el propósito de adiestrarse en las técnicas de separación de células, manejo de equipo de laboratorio y de instrumentos de medición y estandarización de los ensayos. De igual forma se realizaron experimentos repetidos de quimoluminiscencia y de capacidad bactericida para determinar la relación célula bacteria más adecuada para la realización de los experimentos, encontrándose que la relación 200:1 fue la más adecuada (gráfica 1).

Bacteria:

Se utilizó una cepa ATCC 33533 de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). La bacteria se conservó en leche semidescremada a -70°C . A partir de esta se realizaron siembras en agar chocolate enriquecido con factores de crecimiento X y V. Para determinar la fase logarítmica tardía de crecimiento de la bacteria, (gráfica 2) se tomaron 5 unidades formadoras de colonias y se

colocaron en 20 ml de medio BHI (Brain Heart Infusion) adicionado de factor de crecimiento al 2%, se incubaron a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%. Se tomaron alícuotas para realizar la medición de la absorbancia cada 4 horas en un espectrofotómetro marca Beckman modelo 26 a una longitud de onda de 515 nm, una vez que se encontró la fase logarítmica tardía de crecimiento de la bacteria, en promedio a las 18 hrs (absorbancia de 0.533) se realizaron diluciones del medio de cultivo para determinar el número de unidades formadoras de colonias que correspondía a esa absorbancia. El cálculo del número de bacterias se efectuó con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de colonias (ufc)} = \frac{\text{número de ufc} \times \text{factor de dilución}}{0.01}$$

Para la realización de cada experimento se colocó la bacteria en medio de cultivo de la forma previamente descrita y después de 18 horas se ajustó a una absorbancia de 0.533 nm (2.7×10^8 bacterias/ml). Se centrifugó a 6 000 RPM por 10 minutos a 4°C, se tiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con solución fisiológica al 0.9%, finalmente la bacteria se suspendió en solución balanceada de Hank's con pH de 7.2. La opsonización de la bacteria se efectuó con distintos sueros al 10% suero humano hipogamaglobulinémico, suero AB hiperinmune contra Hib (48 30 µg/ml de anticuerpos anti-PRP-avexo 1-), y suero de los niños con SIDA. Para opsonizar la bacteria, esta se colocó en tubos para microcentrifuga (Eppendorf) con los distintos sueros a 37°C por 30 minutos.

Obtención de Leucocitos PMNs:

Los leucocitos PMNs fueron obtenidos de sangre venosa periférica de los niños con SIDA y de los controles sanos. Se extrajeron 5 ml de sangre en jeringas desechables, estériles, se utilizó como anticoagulante 10U de heparina (Heparin-1000, 20th Century Chemical de México, S.A. de C.V.) por cada mililitro de sangre.

La separación se realizó siguiendo la metodología de Boyum modificada, que permite la separación de PMNs de mononucleares mediante un gradiente de densidad y centrifugación, y de los eritrocitos mediante lisis hipotónica⁸⁵. La sangre heparinizada se colocó en tubos de poliestireno y se diluyó volumen a volumen con solución salina al 0.85% pH 7.2. En la base del tubo, se colocaron 2 ml de Ficoll-hypaque con una densidad de 1.077. Se centrifugó durante 25 minutos a 1500 RPM a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante que incluía la capa de mononucleares (Utilizada para la determinación de subpoblación de linfocitos). El sedimento se

resuspendió en 5 ml de Sol. lítica (EDTA, NH₄Cl, NaHCO₃, H₂O), y se dejó el tubo en reposo 5 minutos hasta que los glóbulos rojos se lisaron totalmente. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, quedando únicamente el botón de polimorfonucleares. Se agregó 1 ml de sol. lítica y se completó el tubo con sol. salina. Se centrifugó durante 15 minutos a 4^o C a 1500 RPM. Finalmente se resuspendió el botón de PMNs en 1 ml de solución balanceada de Hanks (pH 7.2).

Para el conteo de los PMNs se preparó una suspensión de células y colorante de Turk (20 µl de la suspensión de células y 80 µl de colorante). Se colocaron 20 µl en cámara de Neubauer, por medio de microscopía de luz, se determinó el número de células por cuadrante. Posteriormente se calculó el número total de células/ml con la siguiente fórmula:

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

c) Viabilidad y pureza

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

Ensayo de Quimioluminiscencia

La evaluación del metabolismo oxidativo o producción de intermediarios de oxígeno por los PMNs se realizó por un ensayo de quimioluminiscencia in-vitro de acuerdo con lo descrito por Fasmon³⁰ en un luminómetro LKB-Wallac 1251, el cual contiene un fotomultiplicador que convierte los fotones liberados en unidades de corriente eléctrica, de tal forma que la quimioluminiscencia se expresa en mV. Se utilizó como amplificador de la respuesta, el sustrato luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinedona, Eastman Kodak Co., Rochester NY). El luminol fue preparado y se conservó como solución 275 µM y diluido en HBSS para una concentración final de 1 µM en cada vial. En cada ensayo, se colocaron en tubos para luminómetro (Luminometer Cuvettes) 6x10⁷ bacterias+3x10⁵ PMNs (relación 200:1) ajustándose a un volumen de 900 µl con HBSS, los tubos se colocaron en el luminómetro y se matuvieron a 37^oC procediéndose a la lectura basal (2 ciclos), después de esta se añadieron 100 µl de luminol a cada tubo (volumen final de 1 ml) y se leyeron durante 30 ciclos. Cada ensayo se

realizo por duplicado, registrandose los picos maximos (promedio) para cada condicion de opsonizacion

Ensayo de capacidad bactericida: El ensayo se realizo de acuerdo a la tecnica descrita por A Ferrante⁸⁷ con algunas modificaciones. En tubos eppendorf marcados como tiempo 0' y tiempo 30' para cada una de las condiciones de opsonizacion, se colocaron 6×10^6 bacterias previamente opsonizada con dos tipos de suero: hiperimmune y suero de niños con SIDA como se describio previamente. se añadieron 3×10^5 PMNs (rel 20:1) se agrego HBSS para alcanzar un volumen final de 0.5 ml y se incubaron durante 30 minutos en agitacion y con temperatura constante de 37°C. Cada ensayo se realizo por duplicado. Despues de este tiempo se agregaron a cada tubo 500 µl de amikacina a una concentracion de 16 µg/ml y se incubaron nuevamente por 30 minutos para matar las bacterias extracelulares. (Se utilizó amikacina ya que se corroboró la susceptibilidad de esta cepa in vitro y es un antibiotico que no penetra la membrana celular). Despues de la incubación los tubos marcados como tiempo 0' se centrifugaron a 1500 RMP, se lavaron 2 veces en HBSS, y posteriormente se agrego 1 ml de solución salina para lisar los PMNs, diferentes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) se sembraron en placas de agar chocolate, despues de 24 horas de incubacion en atmosfera de CO₂ al 5% se determino el numero de ufc. Los tubos marcados como tiempo 30' se incubaron por 30 minutos mas y despues se les realizo el mismo procedimiento. Los resultados se expresaron como el logaritmo de la reduccion de ufc despues de la incubacion

$$\text{INDICE BACTERICIDA}(\log_{10}) = \frac{\text{ufc a los 0 min}}{\text{ufc a los 30 min}}$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de muerte bacteriana

Analisis estadistico: Se utilizo estadistica descriptiva para la presentacion de los datos en tablas y graficas. Las caracteristicas clinicas y demograficas se analizaron por medio de estadistica no parametrica. La contrastacion de los resultados de quimioluminiscencia y capacidad bactericida se realizo por medio de analisis de varianza de dos vias. Este modelo se utilizo con el proposito de determinar el efecto que los factores grupo (sida-sano), tipo de suero (hipogamaglobulinemico, hiperimmune y suero de pacientes con SIDA) y la interaccion grupo-tipo de suero tuvieron sobre las variables dependientes.

La fórmula para el modelo utilizado es: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i\beta_j + \epsilon_{ijk}$

i - pacientes

j - sueros

k - grupos

μ - efecto total

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LOS PACIENTES Y CONTROLES

Las características demográficas y clínicas de la población de estudio se muestran en la tabla No.1. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las características clínicas y de laboratorio entre los pacientes y los controles. La edad promedio de los pacientes fue de 73.3 meses (18.7-152.7) y de 55 meses (19.9-121.1) para los controles. No existieron diferencias significativas entre los pacientes y los controles sanos con respecto a edad, sexo, y número de PMNs (tabla 2). Al momento del estudio todos los niños con infección por VIH tenían inmunosupresión severa (linfocitos CD4 < 15 %) y se encontraban recibiendo profilaxis para *P. carinii* con Trimetoprim/sulfametoxazol. 2 pacientes se encontraban recibiendo AZT, 3 ddI y 5 AZT+ddC. Aunque algunas de las manifestaciones clínicas de la infección por VIH fueron diferentes, todos los pacientes tenían antecedentes de haber presentado infecciones bacterianas de repetición (otitis, sinusitis, neumonía, sepsis). Ni los pacientes ni los controles presentaban evidencia clínica de infección bacteriana o por oportunistas al momento del estudio.

QUIMIOLUMINISCENCIA DE PMNs

Cuando se utilizó una relación de PMN/bacteria de 200:1, el pico de la actividad quimioluminiscente ($X \pm DS$ mV) de PMNs opsonizados con suero hipogamaglobulinémico fueron de 25.33 ± 24.91 mV para los niños con SIDA Vs 53.5 ± 21.01 mV para los controles $p < 0.01$. Cuando el suero hiperinmune AB o el suero autólogo fue usado como opsonina, los PMN de niños con SIDA solo incrementaron su respuesta a 54.64 ± 34.24 y 52.41 ± 38.73 Vs 139.73 ± 22.39 y 128.54 ± 36.80 para los controles $p=0.000$ y $p=0.000$ respectivamente (tabla 3).

Los efectos considerados en el análisis de varianza fueron grupo, tipo de suero y la interacción grupo-tipo de suero. Se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles y entre tipo de suero en los controles. (Tabla 5)

CAPACIDAD BACTERICIDA DE PMNS

La capacidad bactericida de PMN de niños con SIDA, independientemente del suero utilizado para opsonizar la bacteria fue significativamente menor que la de los PMNs del grupo control. La capacidad bactericida ($\bar{X} \pm DS$) de PMNs retados con Hib opsonizado con suero AB hiperimmune fue 1.62 ± 0.47 para los niños con SIDA Vs 5.64 ± 2.39 para los controles, $p < 0.000$. Cuando el suero de los niños con SIDA fue usado como opsonina, los PMNs de niños con SIDA mostraron una capacidad de 1.64 ± 0.43 versus 4.67 ± 1.2 para los controles, $p < 0.000$ (Tabla No 4)

Tabla de ANOVA para QUIMIOLUMINISCENCIA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Significancia de F
Grupo	59771.93	1	59771.93	64.14	.000
Tipo suero	39933.84	2	19966.92	21.43	.000
Grupo-Tipo de suero	9366.17	2	4683.08	5.03	.010
Residual	50324.95	54	931.94		
Modelo	109071.93	5	21814.39	23.41	.000
Total	159396.89	59	2701.64		

R Cuadrada = 684

R Cuadrada Ajustada = 655

Tabla de ANOVA para CAPACIDAD BACTERICIDA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Significancia de F
Grupo	126.99	1	126.99	132.72	.000
Tipo suero	2.59	1	2.59	2.70	.109
Grupo-Tipo de suero	2.62	1	2.62	2.73	.107
Residual	34.45	36	.96		
Modelo	132.19	3	44.06	46.05	.000
Total	166.63	39	4.27		

R Cuadrada = 793

R Cuadrada Ajustada = 776

Las diferencias encontradas entre grupos y entre sueros en los resultados de los experimentos de quimioluminiscencia se compararon con análisis de varianza de una vía. Los resultados son mostrados en las tabla 3.

DISCUSION

Los niños con infección por VIH tiene un alto riesgo de desarrollar infecciones bacterianas y debido a que los neutrófilos constituyen la célula efectora primaria en las defensas del hospedero contra infecciones por bacterias y por ciertos hongos, es importante determinar su capacidad funcional. Con el propósito de mejorar los conocimientos sobre los factores que pueden influir para la mayor susceptibilidad de estos pacientes a infecciones por agentes bacterianos, en este estudio se evaluó la capacidad fagocítica y microbicida de PMNs retados *in vitro* con Hib. Se evaluaron los mecanismos oxidativos asociados a la capacidad fagocítica de PMNs de pacientes pediátricos con inmunosupresión severa por VIH a través de un ensayo de quimioluminiscencia. La capacidad bactericida fue determinada mediante un ensayo en placa en el cual se sembraron alícuotas de la mezcla de PMNs/bacteria, después de incubación se determinó el número de unidades formadoras de colonias (aplicando un índice bactericida). Existieron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad fagocítica y microbicida entre los PMNs de los niños con SIDA y los del grupo control evidenciado en los picos de quimioluminiscencia de polimorfonucleares retados con *H. influenzae* tipo b opsonizada con suero hiperinmune, con suero con hipogamaglobulinemia, y con sueros de niños con SIDA, siendo menores en niños enfermos que en niños sanos, y observándose también una capacidad bactericida significativamente menor en los PMNs de niños con SIDA.

La integridad funcional de los PMNs en pacientes adultos con HIV se ha evaluado por diversos autores. La producción de superóxido, fagocitosis y capacidad bactericida de PMNs contra *Staphylococcus aureus* se ha reportado disminuida en adultos con SIDA.^{12,13} Ellis y cols. evaluaron la función de los neutrófilos en adultos con SIDA y con complejo relacionado al SIDA, y encontraron que la quimiotaxis de PMNs está más disminuida en estadios tempranos de la enfermedad que en pacientes cuyo padecimiento está más avanzado (SIDA + Sarcoma de Kaposi). En este mismo trabajo, observaron que las alteraciones en los neutrófilos son en parte debidas a anomalías en el suero de estos pacientes.⁸¹ En otro estudio, Nielsen y cols. observaron resultados similares en los que los pacientes con una duración corta de la enfermedad tenían una respuesta quimiotáctica alterada, mientras que en pacientes con una evolución más prolongada del

padecimiento dicha respuesta era normal.⁸⁹ Por el contrario Baldwin y cols. encontraron que la generación de superóxido, fagocitosis, capacidad bactericida y actividad citotóxica dependiente de anticuerpos (ACDA) de PMNs eran normales en la mayoría de los pacientes con SIDA.⁹⁰ Incremento en la fagocitosis y en la generación de productos reactivos de oxígeno de neutrófilos fue demostrada por Ryder y cols.⁹¹ y por Bandres y cols.⁹² Sin embargo Pitrak y cols.⁹³ en un estudio en el que evaluaron mecanismos oxidativos mediante quimioluminiscencia en PMNs de 71 adultos con SIDA, encontraron que el estallido respiratorio de los PMNs era más deficiente cuanto más avanzaba la enfermedad y las cuentas de CD4 disminuían. Estos autores especularon que la disminución en el metabolismo oxidativo de neutrófilos observada pudiera no solo estar implicada en la patogénesis de infecciones bacterianas y oportunistas, sino también en la de la propia infección por VIH. La naturaleza de estas contradicciones no es clara. En parte puede ser explicada por diferencias en las manifestaciones clínicas de la infección por VIH o por presencia de infección secundaria en los pacientes estudiados. Por ejemplo, Ellis⁸¹ y Nielsen⁸⁹ estudiaron pacientes con SIDA. Sin embargo, las principales manifestaciones clínicas de SIDA fueron diferentes. En el estudio de Ellis, la principal manifestación de SIDA fue sarcoma de Kaposi y solamente 33% de los pacientes con SIDA y 18% de los pacientes con complejo relacionado a SIDA tenían antecedentes de infecciones bacterianas, por el contrario, en el estudio de Nielsen la mayoría (17/18) de los pacientes tuvieron infecciones oportunistas. En el resto de los estudios señalados anteriormente no se proporciona información acerca de las manifestaciones clínicas de la infección por VIH en los pacientes. La gran mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han efectuado en adultos con SIDA y han utilizado *Staphylococcus aureus* o gérmenes oportunistas para retar a las células fagocíticas.

Es posible también que las diferencias observadas entre los estudios se debieran a la metodología empleada para la realización de los ensayos. Todos los autores que reportan disminución en la actividad de los PMNs en pacientes con VIH usaron células libres de suero autólogo,^{42,44,81} por el contrario en algunos de los estudios que reportan incremento de la actividad de los PMNs, las células no estaban libres de suero.^{89,90} Por ejemplo, Bandres y cols. utilizaron células de sangre periférica sin separar para determinar fagocitosis y estallido respiratorio de los PMNs.⁹²

Aparentemente la presencia de suero autólogo juega un papel determinante en la actividad funcional de los leucocitos PMNs en pacientes con infección por VIH.

En nuestro estudio, todos los niños con infección por VIH tenían inmunosupresión severa (CD4 < 150) de acuerdo a la nueva clasificación de los Centros para Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica⁸⁴ y todos tenían antecedentes de infecciones bacterianas de repetición (otitis media, sinusitis, neumonía). Para la realización de los ensayos de quimiluminiscencia y capacidad bactericida, los PMNs de los controles sanos y de los niños con SIDA fueron utilizados sin presencia de suero autólogo. Cuando se utilizó suero autólogo para opsonizar al Hib, los PMNs de los niños con VIH no mostraron respuesta, y tampoco mostraron supresión de la actividad. Por el contrario, los PMNs de los niños sanos presentaron una respuesta mayor. En un estudio en que se evaluó la actividad funcional de PMNs en 63 pacientes con infección por VIH-1, cuando las células fueron incubadas sin suero autólogo tanto la quimiluminiscencia de los PMNs como la actividad enzimática intracelular se encontraron disminuidas en todos los estadios de la enfermedad. No se observó supresión en la QI de PMNs cuando las células se incubaron con suero autólogo, por el contrario, se observó incremento en la QI de los PMNs de los pacientes con SIDA.⁹¹ Estos resultados son similares a los publicados por Ellis, quien reportó que la quimiotaxis en los neutrófilos de los individuos sanos incubados con el suero de los pacientes con SIDA o con CRS fue significativamente mayor que la quimiotaxis de neutrófilos incubados con suero normal. Los PMNs de los pacientes con SIDA tuvieron quimiotaxis normal cuando fueron incubados con suero autólogo, mientras que la quimiotaxis de una fracción pura de los PMNs estuvo deprimida en estos pacientes.⁸¹

El papel del suero en la función de los PMNs de pacientes con infección por VIH aun no se ha esclarecido. En estudios en los que se ha encontrado incremento de la QI de PMNs de donadores sanos en presencia de suero de pacientes con infección por VIH, se ha sugerido que este fenómeno es debido a la influencia de antígenos de VIH sobre los PMNs.^{94, 95} El incremento de la liberación de anión superóxido por los neutrófilos bajo la influencia del suero también pudiera estar mediada por citocinas y factores solubles.^{96, 98}

Los estudios mencionados previamente se han realizado en adultos con infección por VIH-1. No existen estudios que evalúen la función de leucocitos PMNs contra agentes bacterianos en

población pediátrica con infección por VIH. Sin embargo, debido a que los PMNs han mostrado ser los elementos celulares más importantes del sistema inmune del hospedero para el control de infecciones por ciertos hongos, se ha evaluado la actividad funcional de estas células contra hifas de *Aspergillus fumigatus*. En 31 niños infectados con VIH se encontró que la actividad microbicida de los niños con linfocitos CD4 < 25% no estaba alterada, pero sí estuvo significativamente disminuida en pacientes con CD4 < 25% comparados con PMNs de controles sanos. La incubación de PMNs con el suero de los niños con infección por VIH suprimió la actividad antifúngica de los PMNs normales comparada con el suero normal. Este efecto no se observó con la incubación de los PMNs con las proteínas recombinantes de VIH gp120, gp41 y p24.¹⁵⁷ Los factores que pueden causar el defecto de los PMNs pueden estar relacionados con el virus o con el hospedero. Las partículas virales o componentes de otros virus pueden afectar directamente la función de los PMNs.¹⁵⁸ Se ha encontrado que péptidos sintéticos de la envoltura viral y glicoproteínas recombinantes de la envoltura de VIH (gp120 y gp41) tienen propiedades inmunosupresoras en algunos otros sistemas.¹⁶⁰

Factores del hospedero tales como linfocinas y monocinas liberadas por linfocitos y monocitos infectados pueden ser responsables del defecto en la función de PMNs. A este respecto se ha encontrado que el factor b transformante de crecimiento celular, el cual tiene propiedades inmunosupresoras,¹⁶¹ así como otras citocinas de linfocitos Th2 de la respuesta inmune (interleucina 4-10) pueden ser los factores que supriman la función de los fagocitos en pacientes con infección por VIH.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Por otra parte el aparente efecto supresor del suero de pacientes con infección por VIH puede estar relacionado a disminución en la producción de otras citocinas de linfocitos Th1, tales como el interferón g, ya que este favorece la actividad antifúngica de PMNs normales o alterados contra hifas de *A. fumigatus*.¹⁶⁴ El papel exacto que desempeñan estos patrones de citocinas (Th1/Th2) en las alteraciones del sistema inmune de pacientes con VIH no ha sido determinado. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que el patrón de producción Th2 predomina en niños con Síndrome de Omenn, en pacientes con esclerosis sistémica o en enfermedad crónica por rechazo en pacientes transplantados. Así mismo, niveles altos de CD30 soluble (un marcador asociado con respuesta del tipo Th2) fueron encontrados en el suero de virtualmente todos estos pacientes, los cuales correlacionaron con la actividad y severidad de

estas enfermedades. Estos hallazgos probablemente contribuyan a el planteamiento de nuevas preguntas acerca del rol que desempeñan estas citocinas en pacientes con infección por VIH/SIDA.¹⁰⁵

Ademas de los factores anteriormente mencionados, los resultados aparentemente contradictorios sobre el papel del suero en la función de los neutrófilos de pacientes con SIDA pudieran ser secundarios a que los diferentes microorganismos con los que se han retado a los PMNs requieran diferentes condiciones de opsonización.

Desde que se reconocieron los primeros casos de SIDA las infecciones bacterianas fueron implicadas como eventos que contribuyen a la morbilidad en niños con infección por VIH.^{16,17,18}

La importancia de las infecciones bacterianas fue enfatizada por la inclusión de éstas dentro de la primera clasificación pediátrica de los CDC para la infección por VIH en niños menores de 13 años de edad.¹⁹⁶

Los principales gérmenes asociados con la infección por VIH en niños incluyen, entre otros, aquellos patógenos bacterianos encontrados con frecuencia en la práctica pediátrica de rutina, en niños con función inmunológica normal. *S. pneumoniae* y *H. influenzae* tipo B frecuentemente ocasionan infecciones graves y/o recurrentes en estos niños (meningitis, sepsis, neumonía).^{16,17,18}

Por lo tanto, en este trabajo se utilizó *H. influenzae* tipo b, bacteria de importancia clínica en la práctica pediátrica en general y en este grupo de pacientes en particular. Los PMNs de niños con SIDA fueron retados con este germen opsonizado con distintos sueros. Nuestros resultados muestran que la respuesta quimiluminiscente de los neutrófilos de niños con SIDA es significativamente menor a la de los PMN de niños sanos. Esta diferencia existió tanto en los neutrófilos en condiciones basales, como cuando los PMNs fueron retados con *H. influenzae* tipo b opsonizado con suero sin anticuerpos (hipogamaglobulinémico) o con suero hiperinmune.

Debido a las controversias anteriormente mencionadas sobre el papel del suero en la función de estas células, se utilizó suero de los niños con SIDA para opsonizar la bacteria y retar a los PMNs de los niños sanos y de los niños con SIDA.

Los PMNs de los niños sanos al ser retados con la bacteria opsonizada con el suero de niños con SIDA presentaron estallido respiratorio y capacidad bactericida eficaces y similares a los obtenidos con el suero hiperinmune anti-*H. influenzae* tipo b, esto sugiere que no existen

factores inhibitorios en el suero de niños con SIDA. Así mismo la función de los PMNs de los niños con infección por VIH no mejoró con la opsonización de la bacteria con suero autólogo pero tampoco se observó disminución de su respuesta.

Los resultados de este estudio señalan una profunda alteración en la actividad fagocítica de los PMNs de niños con SIDA cuando son **retados** in-vitro con H. influenzae tipo b. La función de los PMNs de los niños sanos y de los niños con SIDA no disminuyó cuando la bacteria fue opsonizada con el suero de niños con SIDA, por lo tanto podemos suponer que las alteraciones observadas en PMNs de niños con SIDA no son debidas a factores séricos y probablemente sean atribuibles a defectos intrínsecos a nivel celular.

CONCLUSIONES

1. Los PMN de niños con SIDA tienen capacidad fagocítica y bactericida disminuida contra *Haemophilus influenzae* tipo b in vitro, comparada con los PMN de controles sanos.
2. El suero de niños con SIDA no inhibe la función fagocítica de PMN de niños sanos.
3. Los PMN de niños con SIDA tienen un defecto intrínseco que incide sobre su actividad fagocítica y microbicida contra *Haemophilus influenzae* tipo b.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Shaw-FY, Andrusis DP. AIDS in the developed world: implications for the provision and financing of care. *AIDS* 1997; 11:1305-1309
- 2 - Quinn TC, Ruff A, Halsey N. Pediatric acquired immunodeficiency syndrome: special considerations for developing nations. *Pediatr Infect Dis J* 1992;11:558-568
- 3 - Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos. Boletín Mensual SIDA/FTS. 1988;1-2:219
- 4 - CONASIDA/EPIDEMIOLOGIA SIDA/FTS 1997;3-1-1-XIII
- 5 - CONASIDA. Situación del SIDA en México. Datos actualizados hasta el cuarto trimestre de 1996. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 1997;17(1):27-37
- 6 - Moos AR, Bacchetti P. Natural history of HIV infection. *AIDS* 1989;3:55-61
- 7 - Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, et al. Long Term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994;8:1123-1128.
- 8 - Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749-54
- 9 - Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993;262:1011-1018
- 10 - Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362:355-358
- 11 - Dalglish AG. Immunobiological aspects of HIV treatment. *Curr Opin Immunol* 1993;5:608-614
- 12 - Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* 1995; 267:483-489
- 13 - Haynes BF, Pantaleo G and Fauci AS. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 1996;271:324-328
- 14 - Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV induced disease. *Nature* 1996;384:529-534
- 15 - Tyor WR, Steyn L, Wesselingh, Griffin JW et al. Unifying Hypothesis for the pathogenesis of HIV-Associated Dementia complex, Vacuolar myelopathy and Sensory Neuropathy. *J of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1995;9:379-388.
- 16 - Grant HI, Gold JWM, Rosenblum M et al. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: The development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *AIDS* 1990;4:519-521
- 17 - Stein M, O'Sullivan P, Wachtel T et al. Causes of death in persons with human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 1992;93:387-390
- 18 - d'Arminio MA, Vago LL, Lazzarin A, et al. AIDS-defining diseases in 250 HIV infected patients, a comparative study of clinical and autopsy diagnoses. *AIDS* 1992;6:1159-64
- 19 - Diamond RD. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1991;13:480-486
- 20 - Gilks CF, Brindle RJ, Otieno LS, et al. Life-threatening bacteremia in HIV-1 Seropositive adults admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1990;336:345-9

- 21 - Selwyn P, Alcubes P, Hartel D, et al. Clinical manifestations and predictors of disease progression in a cohort of injecting drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1992;327:1697-1704
- 22 - Alcubes P, Schoenbaum FF, Klein RS. Correlates of rate of decline of CD4+ lymphocytes among intravenous drug users infected with human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol* 1993;137:989-1000
- 23 - Schuchat A, Broome CV, Hightower A, Costa SJ, Parkin W. Use of surveillance for invasive pneumococcal disease to estimate the size of the immunosuppressed HIV-infected population. *JAMA* 1991;265:3275-9
- 24 - Fife D, Crane GL, Bishburg E. Cumulative AIDS incidence and altered mortality from bacterial infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6:1203-8
- 25 - Fauci AS. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med* 1991;114:678-693
- 26 - Pos O, Stevenhagen A, Meenhorst PJ, et al. Impaired phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by granulocytes and monocytes of AIDS patients. *Clin Exp Immunol* 1992;88:23-28
- 27 - Belistos PC, Grrenson JK, Yardley JH, et al. Association of gastric hypoacidity with opportunistic enteric infection in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1992;166:277-284.
- 28 - Siegal FP, Oleske J. Management of the acquired immune deficiency syndrome: is there a role for immune globulins? In clinical use of intravenous immunoglobulins. London: Academic Press, 1986:373-383
- 29 - Krasinski K, Borkowsky W, Boonk S, et al. Bacterial infections in human immunodeficiency virus infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:323-328
- 30 - Bernstein LJ, Kneger BZ, Novick B, et al. Bacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome in children. *Pediatr Infect Dis J* 1985;4:472-475
- 31 - Martinez G, Navarrete S, Samudio G, et al. Infecciones bacterianas en niños con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1992;49:485-492
- 32 - Principi N, Marchisio P, Tomaghi R, et al. Occurrence on infections in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:190-3
- 33 - Pelton SI, Klein JO. Bacterial Diseases in Infant and Children with Infections Due to Human Immunodeficiency Virus. In Pizzo PA and Wilfert CM eds. *PEDIATRIC AIDS* 1th ed. Williams&Wilkins Baltimore Maryland 1991:199-208
- 34 - Stiehm R and Wara D. Immunology of HIV. In Pizzo PA and Wilfert CM eds. *PEDIATRIC AIDS* 1th ed. Williams&Wilkins Baltimore Maryland 1991:95-112
- 35 - McNamara JG. Immunologic abnormalities in infants infected with human immunodeficiency virus. *Semin perinatol* 1989;13:35-43
- 36 - Shannon KM, Ammann AJ. Acquired immune deficiency syndrome in childhood. *J pediatr* 1985;106:332-342
- 37 - Church JA, Lewis J, Spotkov JM. IgG subclass deficiencies in children with suspected AIDS (letter). *Lancet* 1984;1:279.
- 38 - Parkin JM, Helbert M, Huges CI, et al. Immunoglobulin G subclass deficiency and susceptibility to pyogenic infections in patients with AIDS-related complex and AIDS. *AIDS* 1989;3:37-39
- 39 - Borkowsky W, Steele C J, Grubman S, et al. Antibody responses to bacterial toxoids in children infected with human immunodeficiency virus. *J of pediatrics* 1987;110:563-566

- 40 - Bernstein I.J, Ochs HD, Wedgwood RJ et al. Defective humoral immunity in pediatric acquired immunodeficiency syndrome. *J pediatr* 1985; 107:352-357
- 41 - Wemberg GA, Granoff DM. Immunogenicity of *H. Influenzae* type b polysacchonde-protem conjugate vaccines in children with condition associated with impaired antibody responses in type b polysaccharide vaccines. *Pediatric* 1990;85 (suppl) 654-661
- 42 - Murphy PM., Lane HC., Fauci AS., Gallin JL. Impairment of Neutrophil Bactericidal Capacity in Patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases* 1988; 158: 627-630
- 43 - Musher D et al. The effect of HIV Infection on Phagocytosis and Killing of *Staphylococcus aureus* by Human Pulmonary Alveolar Macrophages. *The American Journal of the Medical Sciences* 1990; 299:158-163
- 44 - Pitrak DL., Bak PM, DeMarais P, et al. Depressed Neutrophil Superoxide Production in Human Immunodeficiency Virus infection. *J Infect Diseases* 1993; 167: 1406-1410.(cambiar y dejar como 71)
- 45 - Roilides F, Holmes A, Blake C et al. Impairment of Neutrophil Antifungal Activity against Hyphae of *Aspergillus fumigatus* in Children Infected with Human Immunodeficiency Virus. *J. Infect. Diseases* 1993; 167:905-911
- 46 - Roilides F, Holmes A, Blake C, et al. Defective antifungal activity of Monocyte-Derived Macrophages from human Immunodeficiency Virus-Infected Children against *Aspergillus fumigatus*; *J. Infect. Diseases* 1993;168:1562-1565
- 47 - Rotrosen D, Gallin JI. Disorders of phagocyte function. *Ann Rev. Immunol* 1987;5:127-150
- 48 - Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; 67:257-267
- 49 - Walker RI, Willemze R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Rev Infect Dis* 1981;3:505-598
- 50 - Pulis LM, Bromcyer HF, Kurland SI, et al. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. *J Exp Med* 1979;150:257-267
- 51 - Lichtman MA, Weed RI. Alterations of the cell periphery during granulocyte maturation: relationship to the cell function. *Blood* 1972;39:301-316
- 52 - Glasser L., Fiederlein R.I. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood*, 1987; 69: 937-944.
- 53 - Ganz T., Selsted M.E., et al. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; 76:1427-35.
- 54 - Berger M, O'Shea J, Cross AS, et al. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest* 1984;74:1566-1571
- 55 - Fletcher M.P, Gallin JI. Human neutrophils contain an intracellular pool of putative receptors for the chemoattractant N-formyl-methionyl-leucyl-phenilalanine. *Blood* 1983; 62:792-9
- 56 - Dewald B, Bretz V, Baggiolini. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J Clin Invest* 1982;70:518-525
- 57 - Petrequin PR, Todd FR, Devall LJ, et al. Association between gelatinase release and increased plasma membrana expression of the Mol glycoprotein. *Blood* 1987;69:605-610
- 58 - Stossel T.P., *The Phagocyte System. Structure and Function. Functions of phagocytes. En Hematology of Infancy and Childhood.* D.G. Nathan y E.A. Osby eds. 3a edicion Saunders Co. Philadelphia USA 1987: 779-793.

- 59 - Malech HL. Phagocytic Cells Egress from Marrow and Diapedesis. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Ed. Gallin JI, Goldstem IM, Snyderman R. Raven Press, Ltd, New York 1988:298-308
- 60 - Athens JW, Hoob OP, Roob SO, et al. Leukokymetics studies IV. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J Clin Invest* 1961;40:989-995
- 61 - Athens JW, Hoob OP, Roob SO, et al. Leukokymetics studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J Clin Invest* 1961;40:159-164
- 62 - Malech HL, Gallin JI. Current Concepts. Immunology: Neutrophils in human diseases. *The New Engl J Med* 1987;317:687-694
- 63 - Hemzel FP. Antibodies. In Mandell, Douglas and Bennett, eds. *Principles and Practice of INFECTIOUS DISEASES* 4th ed. Churchill Livingstone New York 1995:42-57
- 64 - Bobak DA, Gauthier TA, Frank MM, et al. Modulation of FcR function by complement subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture derived macrophages. *J Immunol* 1987;138:1150-1156
- 65 - Messner RP, Jelinek J. Receptors for human gamma-globulin on human neutrophils. *J Clin Invest* 1970;49:2165
- 66 - Lew DP, Andersson T, Hied J, et al. Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature* 1985;315:509-511
- 67 - Petroni KC, Shen L, Guyre PM. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN- γ and glucocorticoids. *J Immunol* 1988;140:3467-3472
- 68 - O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BF et al. Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J Immunol* 1985;134:2580-2587
- 69 - Southwick FS, Stossel TP. Contractile protein in leukocyte function. *Semin Hematol* 1983;20:305
- 70 - Klebanoff SJ. Phagocytic Cells. Products of Oxygen Metabolism. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Ed. Gallin JI, Goldstem IM, Snyderman R. Raven Press, Ltd. New York 1988:391-444
- 71 - Gahbig FG, English D. The arachidonate dependent activator of the subcellular neutrophil NADPH oxidase acts independent of phosphorylation. *Clin Res* 1986;34:657
- 72 - Sadler K L., Badwey J A. Second messengers involved in superoxide production by neutrophils. *Function and Metabolism Phagocytic Defects II Abnormalities of the respiratory burst*. *Hem Onc Clin. of North Am* 1988, 2:185-200
- 73 - Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. Functions Related to Microbicidal Activity. In *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press Ltd. New York 1985:87-112
- 74 - Holmes B, Page AR and Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin Invest* 1967;46:1422-1432
- 75 - Root RK, Cohen MS. The microbial mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev. of Inf Dis* 1981;3:565-597
- 76 - Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, et al. Neutrophils and Host Defense. UCLA Conference Ann. of Int Med 1988;109:127-142
- 77 - Lasmon CS, Cole PJ, Williams AJ, and Hatings M. The measurement of opsonic and phagocytic fuction by luminol-dependent chemiluminescence. *Immunol* 1980;41:67-74

- 78 - Steele RW. Clinical Applications of Chemoluminescence of granulocytes. *Rev of Infect Dis* 1991;13:918-925
- 79 - Arbo S AFH, Santos JJ. Efecto de la Clindamicina sobre la función de los Neutrofilos Polimorfonucleares. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina U.N.A.M. 1988
- 80 - Klebanoff SJ. antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Sem Hematol* 1975;12:117-142
- 81 - Ellis M, Gupta S, Galant S, et al. Impaired Neutrophil Function in Patients With AIDS or AIDS-Related Complex. A Comprehensive Evaluation. *J Infect Diseases* 1988;158:1268-1276
- 82 - Szele CM, Mitchell C, Roberts RL, Stehm LR. Deficient Polymorphonuclear Cell and Mononuclear Cell Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Pediatric and Adult Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Diseases* 1992;166:486-493.
- 83 - Centers for Disease Control. Revised Classification System for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years ago (1994). *MMWR* 1994;43:1
- 84 - Pizzo PA, Wilfert C. Antiretroviral therapy and medical management of the human immunodeficiency virus-infected child. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:513
- 85 - Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;21:77-91
- 86 - Eason CS, Cole PJ, Williams AJ and Hatings M. The measurement of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent chemiluminescence. *Immunol* 1980;41:67-74
- 87 - Tan AM, Ferrante A, Goh DH et al. Activation of the Neutrophil Bactericidal Activity for Nontypable Haemophilus influenzae by Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin. *Pediatric Research* 1995;37:155-159
- 88 - Randomized Blocks: Special Case of two Way ANOVA en Kleinbaum, Kipper, Muller eds. *Applied Regression Analysis and other Multivariable methods*. PWS-KENT Publishing Company 1988
- 89 - Nielsen H, Kharazmi A, Faber V. Blood monocyte and neutrophils functions in the acquired immune deficiency syndrome. *Scand J Immunol* 1986;24:291-296
- 90 - Haldwin GC, Gasson JC, Quan SG, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances neutrophil function in acquired immunodeficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2763-2766
- 91 - Ryder MI, Winkler JR, Weinreb RN, et al. Elevated phagocytosis, oxidative burst, and F-actin formation in PMNs from individuals with intraoral manifestation of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988;1:346-353
- 92 - Bandres JC, Trial J, Mashe DM, et al. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage I Immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993;168:75-83
- 93 - Gabrilovich D, Ivanova I, Serebrovskaya I, et al. Clinical Significance of Neutrophil Functional Activity in HIV Infection. *Scand J Infect Dis* 1994;26:41-47
- 94 - Gabrilovich D, Avdeeva I.A, Serebrovskaya I, et al. Impact of HIV positive sera on functional activity of polymorphonuclear neutrophils from healthy donors. *Scand J Immunol* 1993;37:159-164

- 95 - Gabrilovich D, Kozhich AT, Rosly IM, et al. The synthetic peptide from HIV increases functional activity of granulocytes in healthy subjects. *AIDS* 1991,5:889-892
- 96 - Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, et al. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1985,135:2069-2074
- 97 - Djeu JJ, Matsushima K, Oppenheim JJ, et al. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte derived neutrophil chemotactic factor (M-C). *J Immunol* 1990,144:2205-2211
- 98 - Gabrilovich D, Shepeleva GK, Serebrovskaya L, et al. Mononuclear cells from HIV infected patients produce factors which enhance functional activity of polymorphonuclear neutrophils from healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 1992,89:663-667
- 99 - Abramson JS, Midis FL. Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infections. *Rev Infect Dis* 1988,10:326-341
- 100 - Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* 1985,230:453-5
- 101 - Kekow U, Wachsman W, McCutchan JA, et al. Transforming growth factor- β and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990,87:8321-8325
- 102 - Abramson SL, Gallin JL. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1990,144:625-630
- 103 - Sheater GM, Clerici M. T helper cell immune dysfunction in asymptomatic HIV-1 seropositive individuals: the role of TH1-TH2 crossregulation. *Chem Immunol* 1992,54:21-43
- 104 - Rex JH, Bennett JE, Gallin JL, et al. In vivo interferon therapy augments the in vitro ability of chronic granulomatous disease neutrophils to damage *Aspergillus* hyphae. *J Infect Dis* 1991,163:849-852
- 105 - Romagnani S. Th1-Th2 Paradigm and its role in human diseases. *ICHS NEWS* 1997, March:4-5
- 106 - Centers for Disease Control. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1987,36 (suppl. 1s):1s-15s

Tabla 1

CARACTERISTICAS CLINICAS Y DEMOGRAFICAS DE LOS PACIENTES

PACIENTE	EDAD	TRANSMISION	PORCENTAJE DE CD4	CLASIFICACION CDC	CARACT. CLINICAS ANTES DEL TRATAMIENTO
No.1	4a4 m	PERINATAL	5	B3	INFECCIONES BACTERIANAS
No.2	3a 5m	PERINATAL	6	B3	INFECCIONES BACTERIANAS ENCEFALOPATIA
No.3	5a 2 m	PERINATAL	10	A3	LINFADENOPATIA
No.4	12 a	SEXUAL	1	C3	SINDROME DE DESGASTE
No.5	6a5m	PERINATAL	1	C3	SINDROME DE DESGASTE
No.6	9a 2m	PERINATAL	8	B3	INFECCIONES BACTERIANAS CANDIDIASIS ESOFAGICA
No.7	1a 6m	PERINATAL	5	C3	INFECC. BACTERIANAS SERIAS CRIPTOSPORIDIASIS
No.8	9a 3 m	PERINATAL	4	B3	INFECC. BACTERIANAS SERIAS
No. 9	6a 11m	PERINATAL	7	B3	NEUMONITIS INTERSTICIAL LIFOIDEA
No.10	2a 6m	PERINATAL	10	B3	INFECCIONES BACTERIANAS

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

Tabla 2

CARACTERISTICAS CLINICAS Y DEMOGRAFICAS DE PACIENTES Y CONTROLES

CARACTERISTICA	SIDA	CONTROL	VALOR DE P*
	N = 10	N = 10	
EDAD	55.58 ± 23.29	73.3 ± 41.46	0.36
SEXO	4 F/6M	6M/4F	0
POLIMORFONUCLEARES	3.4 X10⁶ ± 1.9X10⁶	2.9X10⁶ ± 1.7X10⁶	0.54
PORCENTAJE CD4	< 15 %	-----	-----

* U de Mann-Whitney

Tabla 3

ACTIVIDAD QUIMIOLUMINISCIENTE DE POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES CON SIDA Y CONTROLES

TIPO DE SUERO	PACIENTE CON SIDA n = 10	CONTROL n = 10	VALOR DE P*
Suero Hipogamaglobulinémico	25.33 ± 24.91 6.38--83.56	53.5 ± 21.01 25.69--86.27	0.01
Suero Hiperinmune	54.64 ± 34.24 15.0--106.08	139.73 ± 22.39 117.29--194.30	0.000
Suero de niños con SIDA	52.41 ± 38.73 11.61--117.200	128.54 ± 36.80 87.14--194.65	0.000

* Analisis de Varianza

Tabla 4

**CAPACIDAD BACTERICIDA DE PMNs DE NIÑOS CON SIDA Y CONTROLES SANOS RETADOS
CON *H. Influenzae* tipo b OPSONIZADA CON SUERO HIPERINMUNE Y SUERO DE NIÑOS CON SIDA**

Tipo de Suero	SIDA n = 10	Control n = 10	Valor de P*
Suero hiperinmune	1.62 ± 0.47	5.69 ± 2.39	0.000
Suero de niños con SIDA	1.64 ± 0.43	4.67 ± 1.2	0.000

* Analisis de Varianza

Tabla 5

RESPUESTA QUIMIOLUMINISCIENTE DE POLIMORFONUCLEARES DE ACUERDO AL TIPO DE SUERO

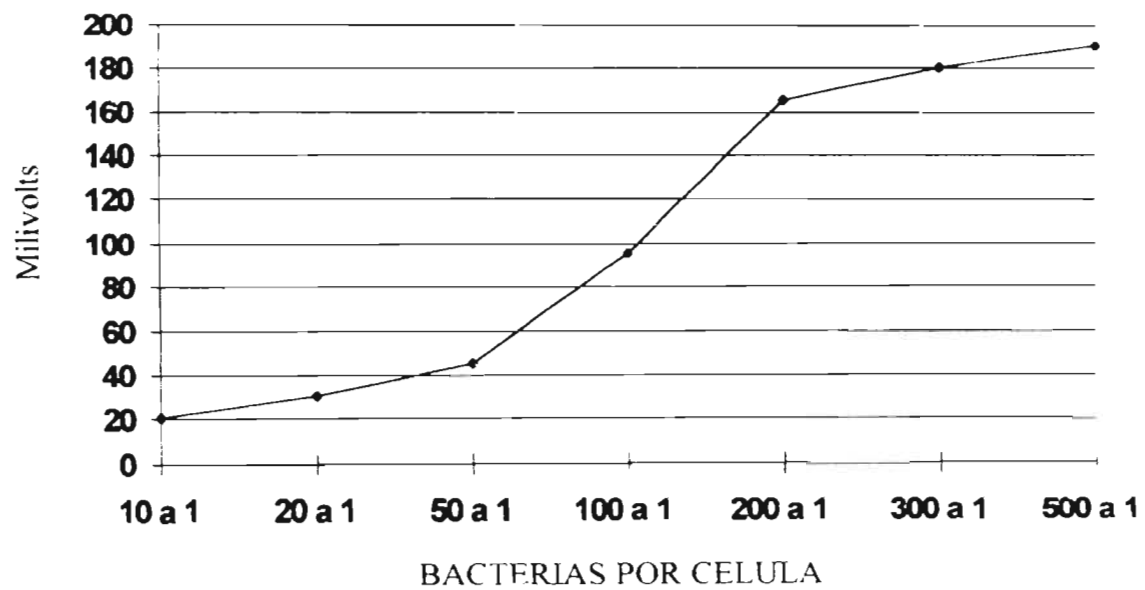
TIPO DE SUERO GRUPO	HIPOGAMAGLOBULINEMICO n = 20	HIPERINMUNDE n = 20	SIDA n = 20	VALOR DE P*
CONTROL	53.5 ± 21.01	139.73 ± 22.39**	128.54 ± 36.80**	0.000
	25.69--86.27	117.29--194.30	87.14--194.65	
SIDA	25.33 ± 24.91	54.64 ± 34.24	52.41 ± 38.73	N S
	6.38--83.56	15.0--106.08	11.61--117.200	

* Análisis de Varianza

** La diferencia entre medias fue significativa (Scheffe test)

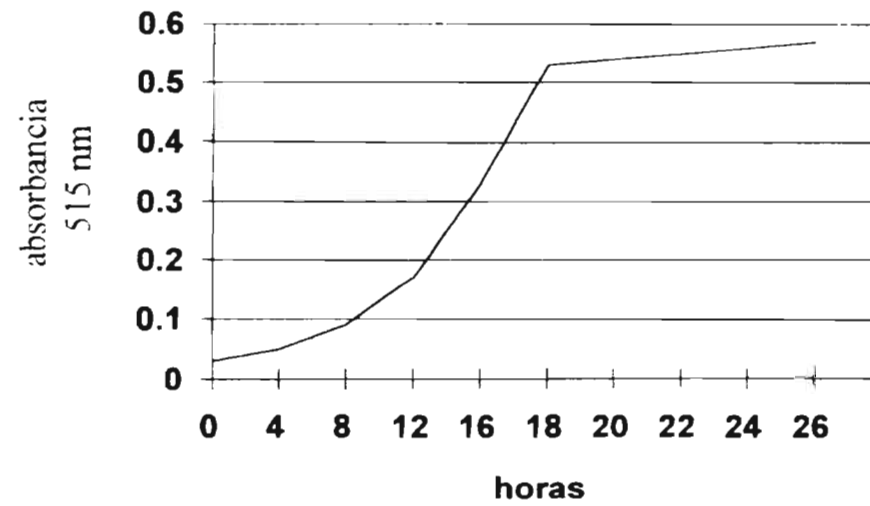
Gráfica 1

Quimioluminiscencia de acuerdo a la relación Bacteria-Célula Hib-PMNs

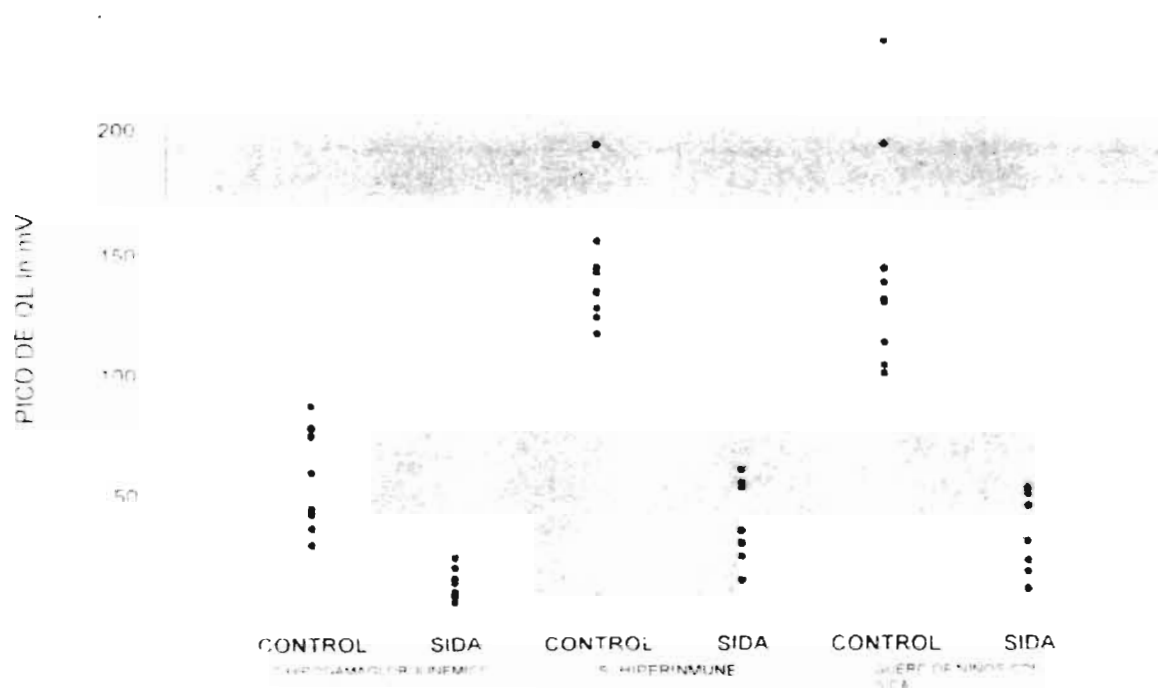


Gráfica 2

Curva de crecimiento de *H. influenzae* tipo b



GRAFICA 3
 QUIMIOLUMINISCENCIA DE PMNs DE NIÑOS CON SIDA Y CONTROLES SANOS
 RETADOS CON H. influenzae type b *



GRAFICA 4
 CAPACIDAD BACTERICIDA DE PMNs DE NIÑOS SANOS Y DE NIÑOS CON
 SIDA RETADOS IN VITRO CON H. influenzae tipo b *

