



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE REDUCCIÓN DE NBT EN PLACA, PARA DETERMINAR % DE FAGOCITOSIS E ÍNDICE FAGOCÍTICO, Y LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE REDUCCIÓN DE NBT, PARA USO EN RECIÉN NACIDOS.

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el Título de:  
**QUIMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

P r e s e n t a:  
**JULIETA FONSECA MURGA**



LO SUBIÓ  
222  
DE NUESTRA REFLEXIÓN

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

267054



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.

*A DIOS*

**Por haberme permitido concluir con mis estudios  
profesionales.**

*A MI ABUELITA*

**Esther Alvarez +  
Por su interes de que pudiera estudiar**

*A MIS PADRES*

**Jesús Fonseca Salazar  
Julia Murga Alvarez  
Por todo el apoyo que me brindaron  
en el transcurso de mi formación academica**

***A MI HERMANO***  
**Lucio Fonseca Murga**  
**y a sus hijos**  
**Por el apoyo que me brindaron en**  
**la elaboración de los portaobjetos**

***A MIS HERMANAS***  
**Elsa georgina**  
**Norma Linda**  
**Por el apoyo que me brindaron al cuidar**  
**a mi hija durante el trabajo experimental**

***A MIS HERMANAS***  
**Veronica, Rosa Ma.+**  
**Ma. de la Concepción, Ma. Isabel**  
**Por el apoyo que me brindaron en su momento**

***A MI ESPOSO E HIJA***  
**José Martín Mejía Calderón**  
**Dulce Esperanza Mejía Fonseca**  
**Por la paciencia que mostraron**

**UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A:**

**Instituto Nacional de perinatología**

**INPer**

**y**

**Hospital Infantil de México**

**"Federico Gómez"**

**Por haberme permitido realizar mi trabajo experimental en sus instalaciones**

**A:**

**Dr. Ruben Marroquin Segura**

**y**

**Dr. Guillermo Del Rey Pineda**

**por su asesoría durante el trabajo**

## ÍNDICE

- <b>Resumen</b>	<b>1</b>
- <b>Marco Téorico</b>	
- <i>Anatomía y funcionalidad del sistema linfático humano</i>	<b>2</b>
- Vasos linfáticos	<b>2</b>
- Médula ósea	<b>3</b>
- Tumo	<b>3</b>
- Ganglios linfáticos	<b>4</b>
- Bazo	<b>5</b>
- Amígdalas	<b>6</b>
- <i>Sistema de defensa humano</i>	<b>6</b>
- Resistencia no específica a la infección	<b>6</b>
- El sistema inmunitario cutáneo	<b>6</b>
- Aparato lagrimal	<b>9</b>
- El sistema inmunitario de las mucosas	<b>9</b>
- Saliva	<b>11</b>
- Secreciones corporales	<b>11</b>
- Inflamación	<b>12</b>
- Fiebre	<b>13</b>
- Sebo	<b>13</b>
- pH ácido	<b>13</b>
- Ácido hialurónico	<b>13</b>
- Lisozima	<b>13</b>
- Jugo gástrico	<b>13</b>
- Células NK	<b>13</b>
- Fagocitosis	<b>14</b>
- Resistencia específica a la infección	<b>15</b>
- Principales características de las respuestas inmunitarias	<b>16</b>
- Fases de las respuestas inmunitarias	<b>17</b>
- El sistema del complemento	<b>18</b>
- Citocinas	<b>19</b>
- <b>Fundamentación</b>	
- <i>Quimiotaxis</i>	<b>20</b>
- <i>Opsonización</i>	<b>21</b>
- <i>Ingestión</i>	<b>21</b>
- <i>Muerte intracelular</i>	<b>21</b>
- <i>Valoración de trastornos del sistema fagocítico</i>	<b>22</b>
- <i>Estudios funcionales</i>	<b>22</b>
- Quimiotaxis	<b>22</b>
- Pruebas con azul de tetrazolio	<b>22</b>
- Destrucción intracelular	<b>23</b>
- Quimioluminiscencia	<b>23</b>
- Prueba radiactiva de la fagocitosis	<b>23</b>
- <b>Planteamiento del problema</b>	<b>24</b>

- <b>Objetivos</b>	<b>25</b>
- <b>Hipótesis</b>	<b>26</b>
- <b>Material y Métodos</b>	<b>27</b>
- <i>Reactivos</i>	<b>28</b>
- <i>Material biológico</i>	<b>28</b>
- <i>Aparatos</i>	<b>29</b>
- <i>Métodos</i>	<b>29</b>
- Obtención de leucocitos PMN	<b>30</b>
- Reducción del NBT en placa	<b>30</b>
- Reducción del NBT por espectrofotometría	<b>30</b>
- <b>Resultados</b>	<b>31</b>
- <b>Discusión de Resultados</b>	<b>64</b>
- <b>Conclusiones</b>	<b>66</b>
- <b>Propuestas y/o recomendaciones</b>	<b>67</b>
- <b>Apendice A: Abreviaturas utilizadas</b>	<b>69</b>
- <b>Apéndice B: Preparación de soluciones</b>	<b>71</b>
- <b>Apéndice C: preparación del material biológico</b>	<b>74</b>
- <b>Apéndice D: métodos estadísticos</b>	<b>75</b>
- <i>Media poblacional</i>	<b>75</b>
- <i>Varianza y desviación estándar</i>	<b>75</b>
- <i>Intervalo de confianza</i>	<b>76</b>
- <i>Docimasia de hipótesis</i>	<b>77</b>
- <i>La t de Student</i>	<b>77</b>
- <i>Análisis de diseños de grupos pareados: Observaciones pareadas</i>	<b>78</b>
- <b>Referencias bibliográficas</b>	<b>81</b>

## RESUMEN

La **Fagocitosis** es el mecanismo de defensa inespecífico más importante del organismo. Se efectúa por macrófagos y polimorfonucleares (PMN). Los PMN son los mediadores de la primera fase de la inflamación, y una vez activados producen, entre otros mediadores, una respuesta oxidativa cuando llevan a cabo la fagocitosis y muerte.

Existen diversas técnicas para valorar la funcionalidad de los PMN, de ellas la más común es la reducción del NBT, de la cual existen variantes. En el presente estudio se analizaron, adaptaron a microtécnica, se estandarizaron y finalmente se compararon dos variantes de esta técnica las cuales son: Reducción de NBT en placa y Reducción de NBT medida espectrofotométricamente.

Para poder realizar dicho estudio se dividió la técnica en tres partes:

- 1) Obtención y purificación de leucocitos;
- 2) Técnica de NBT en placa y;
- 3) Técnica de reducción de NBT espectrofotométrica.

Las fases estudiadas de cada una de las técnicas son las siguientes. Para la primera; Utilización de anticoagulantes, volumen de la muestra, método para lisar eritrocitos, evaluación de la recuperación de leucocitos con el gradiente Alsever-gelatina, mínima concentración de leucocitos viables, porcentaje de viabilidad en leucocitos, para la segunda; tamaño de la superficie de adhesión, número de células funcionales y adheridas a la placa, tiempo de adhesión de los PMN a la placa, relación PMN/Lev, concentración del NBT, para la tercera; modificación a los volúmenes de los reactivos, modificación de los reactivos, utilización de microplaca para ELISA, concentración de leucocitos, utilización de cianuro de potasio, equipos para la lectura y barrido espectrofotométrico del formazan.

Para ambas técnicas de reducción de NBT se utilizaron como partículas a fagocitar, *Cándida albicans* muerta y ópsonizada y Zymosan-A. Para la técnica en placa se midieron el Porcentaje de Reducción, Porcentaje de Fagocitosis e Índice Fagocítico. Para la técnica espectrofotométrica se midió el Porcentaje de Fagocitosis únicamente. Los resultados obtenidos en promedio son:

~Para la técnica en placa con *Cándida albicans*, Porcentaje de Reducción de 99.32%, Porcentaje de Fagocitosis de 99.49% e Índice Fagocítico de 2.59.

~Para la técnica en placa con Zymosan-A; Porcentaje de Fagocitosis 99.69%.

~Para la técnica espectrofotométrica con *Cándida albicans*, Porcentaje de Fagocitosis de 89.03%.

~Para la técnica espectrofotométrica con Zymosan-A; Porcentaje de Fagocitosis de 94.07%.

En el análisis estadístico empleado (t pareada) no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos estudiados, por lo que podemos concluir que los resultados que se obtienen en cada una de las pruebas ya sea en placa o espectrofotométrica son similares para la población estudiada. Por lo que se puede emplear cualquiera de éstas dependiendo del material y equipo del que se disponga.

También se obtuvieron los mismos resultados empleando como partícula a fagocitar *Cándida albicans* muerta y ópsonizada en lugar de Zymosan-A.



## MARCO TEÓRICO

### **ANATOMÍA Y FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA LINFÁTICO HUMANO**

El sistema linfático consiste de un líquido denominado linfa, vasos que transportan la linfa que se llaman vasos linfáticos, y diversas estructuras y órganos que contienen tejido linfático. De manera esencial, el tejido linfático es una forma especializada de tejido conectivo reticular que contiene un gran número de linfocitos. El estroma (armazón) del tejido linfático es una malla de fibras y células reticulares (fibroblastos y macrófagos fijos). Una excepción para esto es el timo, el cual tiene un estroma que es en cierta forma diferente, compuesto de tejido reticuloepitelial.

El tejido linfático se presenta en el cuerpo de diferentes maneras, el tejido linfático difuso no enclaustrado por una cápsula. Esta es la forma más simple del tejido linfático se encuentra en la lámina propia (tejido conectivo) de la membrana mucosa del aparato gastrointestinal, de las vías respiratorias, el aparato urinario y el aparato reproductor. También se encuentra en condiciones normales en el estroma o en casi todos los órganos del cuerpo<sup>(1)</sup>. Los **ganglios linfáticos** se encuentran rodeados por una cápsula fibrosa, penetrada por los vasos linfáticos aferentes<sup>(2)</sup>. Poseen unas concentraciones de forma oval de tejido linfático que por lo general consiste de una región central de tinción clara (azul con tinción de Hematoxilina-Eosina<sup>(3)</sup>) que consiste de grandes linfocitos (**centro germinal**) y una zona periférica, que se tiñe de azul más oscuro y que esta formada de linfocitos pequeños (**corteza**). La mayor parte de los ganglios linfáticos son solitarios, pequeños y discretos. Tales ganglios se encuentran rara vez en la lámina propia de las membranas mucosas del aparato gastrointestinal, vías respiratorias, aparato urinario y aparato reproductor. Algunos ganglios linfáticos se presentan en agregaciones múltiples, grandes y en partes específicas del cuerpo. Entre estos se encuentran las amígdalas en la región faríngea y folículos linfáticos agregados (placas de Peyer) en el íleon del intestino delgado. Las congregaciones de ganglios linfáticos también se presentan en el apéndice.

Los **órganos linfáticos** del cuerpo -los ganglios linfáticos, el bazo y el timo- también contienen tejido linfático enclaustrado por una cápsula de tejido conectivo. Puesto que la médula ósea produce linfocitos, también se le puede considerar como un componente del sistema linfático<sup>(1)</sup>.

### **Vasos linfáticos**

Los vasos linfáticos se originan como vasos microscópicos en los espacios que existen entre las células llamadas capilares linfáticos. Los capilares linfáticos pueden encontrarse solos o en plexos extensos. Se originan en todo el cuerpo, pero no es un tejido avascular, en el sistema nervioso central, la pulpa espléndida y la médula ósea. Son un poco más grandes y más permeables en una dirección solamente que los capilares sanguíneos.

Los capilares linfáticos también difieren de los capilares sanguíneos en que tienen extremos ciegos; los capilares sanguíneos tienen un extremo arterial y un extremo venoso. Además los capilares linfáticos están adaptados desde el punto de vista estructural para asegurar el retorno de las proteínas al sistema cardiovascular cuando se salen de los capilares. El examen minucioso de los capilares linfáticos revela que hay diminutas aberturas entre las células endoteliales haciendo que la pared del capilar permita el paso del líquido fácilmente pero evita que el flujo del líquido salga del capilar, opera como una especie de válvula en un solo lado o de una sola vía. La superficie externa de las células endoteliales de la pared capilar están unidas al tejido circulante por estructuras que reciben el nombre de **filamentos de fijación**. Cuando hay edema, se presenta una acumulación excesiva de líquido en el tejido, lo cual provoca inflamación tisular. Esta inflamación produce el tirón de los filamentos de fijación, provocando aberturas incluso entre las células más grandes de tal manera que mayor cantidad de líquido puede fluir de los capilares linfáticos.

Los capilares linfáticos se unen para formar vasos linfáticos cada vez más grandes, que reciben el nombre de **vasos linfáticos**, los vasos linfáticos recuerdan a las venas en cuanto a estructura se refiere pero tienen paredes más delgadas y más válvulas al tiempo que contienen ganglios linfáticos a intervalos diversos a lo largo de su trayecto. Los vasos linfáticos de la piel viajan en el tejido

subcutáneo laxo y por lo general siguen el trayecto de las venas. Los vasos linfáticos de las vísceras por lo general siguen el trayecto de las arterias, formando plexos alrededor de ellas. Por último los vasos linfáticos liberan su linfa en dos conductos principales -el conducto torácico y el conducto linfático derecho<sup>(1)</sup>

### Tejido linfático

Los tejidos linfoides pueden clasificarse en dos grupos: 1) los **órganos generadores**; son aquellos en los que los linfocitos surgen, maduran y los que son capaces de reconocer antígenos propios son eliminados o inactivados, 2) los **órganos periféricos**; son aquellos en los que los linfocitos maduros responden a antígenos extraños

Dentro de los órganos linfoides generadores de los mamíferos están la médula ósea, de donde surgen todos los linfocitos, y el timo, donde alcanzan un estadio de madurez los linfocitos T.

Los tejidos linfoides periféricos son los ganglios linfáticos, el bazo, los tejidos linfoides asociados a mucosas y el sistema inmunitario cutáneo<sup>(1)</sup>.

### Órganos generadores

#### Médula ósea

Durante la vida fetal, la generación de todas las células sanguíneas, llamada **hematopoyesis**, ocurre inicialmente en islotes sanguíneos y después en el hígado y el bazo. Esta función la asume gradualmente la médula ósea, y progresivamente la de los huesos planos, de forma que en la pubertad la hematopoyesis tiene lugar sobre todo en el esternón, las vértebras, los huesos ilíacos y las costillas. La médula roja que se encuentra en estos huesos consta de una estructura reticular similar a una esponja, localizada entre las trabéculas largas. Los espacios de esta estructura están llenos de células grasas y de precursores de células sanguíneas, que maduran y salen a través de la densa red de senos vasculares que desembocan en el sistema circulatorio

Todas las células sanguíneas se originan en una **célula madre** comprometida a diferenciarse a lo largo de una estirpe en particular, es decir, eritroide, megacariocítica, granulocítica, monocítica y linfocítica. Las citocinas estimulan la proliferación y maduración de las células precursoras de la médula ósea. A muchas de estas citocinas se les llama también "Factores estimulantes de colonias" (CSF, del inglés *colony-stimulating factors*), porque se prueba por su capacidad de estimular el crecimiento y desarrollo de varias colonias de leucocitos a partir de la médula ósea. Las citocinas hematopoyéticas producidas por células estromales y macrófagos de la médula ósea, lo que proporciona el ambiente local para la hematopoyesis, y por los linfocitos T estimulados por el antígeno, lo que proporciona un mecanismo de aprovisionamiento de leucocitos que pueden consumirse durante las reacciones inmunitaria e inflamatoria.

La médula contiene linfocitos B maduros que se han desarrollado a partir de células progenitoras<sup>(4)</sup>.

#### Timo

Un órgano linfático, por lo general bilobulado, el **Timo**, se localiza en el mediastino superior, por atrás del esternón y entre los pulmones. Los dos **lóbulos del timo** están próximos y unidos por una capa envolvente de tejido conectivo. Cada lóbulo está enclaustrado por una **cápsula** de tejido conectivo. La cápsula emite extensiones en los lóbulos que se llaman **trabéculas**, las cuales dividen a los lóbulos en pequeños **lobulillos**. Cada lobulillo consiste de una **corteza** periférica que se tiñe intensamente (azul) y una **médula** central que se tiñe ligeramente. La corteza esta compuesta casi por completo de linfocitos empaquetados con fuerza y son estructuras pequeñas, medianas y grandes, se mantienen en su lugar por tejido reticular. Puesto que el tejido reticular del timo difiere de origen y estructura del que generalmente se encuentra en otros órganos linfáticos, recibe el nombre de tejido de soporte **reticuloepitelial**. La médula consiste principalmente de células epiteliales y más que nada de linfocitos ampliamente distribuidos, y su retículo es más celular que fibroso. Además la médula contiene unas estructuras características denominadas **corpúsculos tímicos (de Hassall)**, capas concéntricas de células epiteliales.

El timo es una glándula importante en el lactante y alcanza su tamaño máximo de cerca de 40 gramos durante la pubertad. Después de la pubertad, la mayor parte del tejido del timo se reemplaza por grasa y tejido conectivo. En el momento en que la persona alcanza la madurez, la glándula se atrofia pero sigue siendo funcional<sup>(1)</sup>

Los linfocitos del timo, también llamados **timocitos**, son linfocitos T en diferentes estadios de maduración. Los precursores que están comprometidos en la estirpe de las células T entran en la corteza tímica a través de los vasos sanguíneos. No se sabe si entran en el timo precursores de las células B y no sobreviven, o si existen mecanismos que aseguran la entrada al timo solo de células comprometidas en el desarrollo de linfocitos T. Los timoratos más inmaduros no expresan receptores para los antígenos o los marcadores de superficie incluidos CD4 y CD8, que son característicos del fenotipo maduro. Estas células inmaduras migran desde la corteza hacia la médula y entran en contacto con las células epiteliales, los macrófagos y las células dendríticas.

En la ruta hacia la médula los timocitos comienzan a expresar receptores para los antígenos y marcadores de superficie presentes en los linfocitos T maduros periféricos. De esta forma la médula contiene en su mayor parte células T maduras y sólo células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> maduras salen del timo y entran en la sangre, la linfa y los tejidos linfoides periféricos<sup>(4)</sup>

## Órganos periféricos

### Ganglios linfáticos

Las estructuras ovales o en forma de frijol localizadas a lo largo de los vasos linfáticos se llaman **ganglios linfáticos**. Tienen unas dimensiones que van desde 1 hasta 25 milímetros de longitud. Un ganglio linfático contiene una ligera depresión en un lado que recibe el nombre de **hilio**, en donde los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos deferentes salen del ganglio. Cada ganglio está cubierto por una cápsula de tejido conectivo denso que se extiende en el nódulo. Las extensiones capsulares reciben el nombre de **trabéculas**. En posición interna a la cápsula se encuentra una red de soporte de fibras reticulares y de células reticulares (fibroblastos y macrófagos). La cápsula, las trabéculas y las fibras reticulares así como las células constituyen el estroma (almazón) del ganglio linfático. El parénquima de un ganglio linfático es un tejido especializado y se divide en dos regiones: corteza y médula. La **corteza externa** contiene linfocitos empaquetados de manera densa y dispuestos en masas que se denominan **nódulos linfáticos**. Los nódulos con frecuencia contienen áreas centrales que se tiñen de claro (azul), los **centros germinales**, en donde se producen los linfocitos. La región interna de un ganglio linfático se denomina **médula**. En la médula, los linfocitos están dispuestos en cadenas que se denominan **cordones medulares**. Estos cordones también contienen macrófagos y células plasmáticas.

La circulación de la linfa a través de un ganglio incluye a los vasos linfáticos aferentes (que van hacia el centro), senos en el ganglio y vasos linfáticos eferentes (que se alejan del centro). Los vasos linfáticos aferentes entran a una superficie convexa del ganglio en varios puntos. Contienen válvulas que se abren hacia el ganglio de tal manera que la linfa se dirige hacia adentro. Una vez dentro del ganglio, la linfa entra a los senos, en donde se encuentra una serie de conductos irregulares. La linfa de los vasos linfáticos aferentes entra a los senos corticales exactamente por dentro de la cápsula. Desde ahí circula a los senos medulares entre los cordones medulares. Desde estos senos la linfa por lo general circula en uno o dos vasos linfáticos aferentes. Los **vasos linfáticos eferentes** son más amplios que los vasos aferentes y contienen válvulas que se abren alejándose de los ganglios para dirigir la linfa fuera del ganglio. Los ganglios linfáticos están distribuidos por todo el cuerpo, generalmente se encuentran en grupos. De manera típica, estos grupos están dispuestos de dos maneras **superficiales y profundos**.

La linfa pasa de los espacios tisulares a través de los vasos linfáticos o de su vía de regreso al sistema cardiovascular se filtran a través de los ganglios linfáticos. Cuando la linfa pasa a través de los ganglios, filtra las sustancias extrañas. Estas sustancias quedan atrapadas por fibras reticulares en el ganglio <sup>(1)</sup>.

En áreas particulares del ganglio están secuestradas diferentes clases de linfocitos y células accesorias no linfoides. Los folículos son las áreas ricas en células B de los ganglios linfáticos. Los

foliculos primarios contienen de formas predominante linfocitos B maduros en reposo que, aparentemente, no han sido estimulados recientemente por antígenos

Los centros germinales, que aparecen en respuesta a la estimulación por antígenos proteícos dependientes de células T cooperadoras, contienen numerosos linfocitos grandes. *Los centros germinales son los lugares donde las células B estimuladas por el antígeno proliferan y dan lugar a una progenie que produce anticuerpos con una elevada afinidad por el antígeno.*

Las células dendríticas foliculares, que residen en los centros germinales, muestran los antígenos sobre su superficie y activan de forma selectiva a las células B que se unen al antígeno con alta afinidad. Las células plasmáticas completamente desarrolladas salen de los centros germinales y pueden migrar fuera de los ganglios linfáticos a otros tejidos

Los linfocitos T se localizan de forma predominante entre los folículos y en la corteza profunda, las llamadas áreas parafooliculares. La mayor parte de estas células T son células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> entremezcladas con células CD8<sup>+</sup> relativamente escasas.

*Los ganglios linfáticos son los lugares en los que se inician las respuestas de las células T frente a los antígenos proteícos que llegan en la linfa*

La organización anatómica de los ganglios linfáticos origina múltiples lugares de interacción entre las diferentes clases de linfocitos. Las células dendríticas localizadas en las áreas ricas en células T presentan los antígenos a las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>. Las células dendríticas foliculares de los centros germinales presentan los antígenos a las células B activadas y de memoria. Los linfocitos B que entran en el ganglio a través de la sangre deben atravesar las zonas ricas en células T cooperadoras en su camino a los folículos, lo que aumenta al máximo las posibilidades de interacción cooperadora entre las células B y T<sup>(4)</sup>

## **Bazo**

El **bazo**, estructura oval, es la masa más grande de tejido linfático que se encuentra en el cuerpo, su dimensión es de cerca de 12 centímetros de longitud. Está situada en el hipocondrio izquierdo entre el fondo del estómago y el diafragma. Su **superficie visceral** contiene los contornos de los órganos adyacentes a él -la impresión gástrica (del estómago), la impresión renal (del riñón izquierdo) y la impresión cólica (de la acotadura izquierda del colon). La **superficie diafragmática** es lisa y convexa, conserva y se adapta a la superficie cóncava del diafragma a la cual se encuentra adyacente.

El bazo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso y de fibras musculares lisas. La cápsula, por su parte, está cubierta de una membrana serosa, el peritoneo. Al igual que los ganglios linfáticos, el bazo contiene un hilio, trabéculas, fibras reticulares y células reticulares. La cápsula, las trabéculas, las fibras reticulares y las células reticulares constituyen el estroma del bazo.

El parénquima del bazo consiste de dos tipos diferentes de tejido que se denominan pulpa blanca y pulpa roja. La **pulpa blanca** es más que nada tejido linfático, principalmente linfocitos, dispuestos alrededor de las arterias denominadas arterias centrales. En diversas áreas, los linfocitos se engruesan y forman los ganglios linfáticos que se denominan nódulos esplénicos (**corpúsculos de Malpighi**). La **pulpa roja** consiste de senos venosos llenos de sangre y cordones de tejido esplénico denominados **cordones esplénicos (de Billroth)**. Las venas están íntimamente asociadas con la pulpa roja. Los cordones esplénicos consisten de eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y granulocitos.

La arteria esplénica y la vena así como los vasos linfáticos eferentes pasan a través de los hilos. Puesto que el bazo no tiene vasos linfáticos aferentes o senos linfáticos, no filtran a la linfa. Una función esplénica clave relacionada con la inmunidad es la producción de las células B, la cual desarrolla células plasmáticas productoras de anticuerpos. El bazo también fagocita bacterias y destruye a los eritrocitos dañados así como a las plaquetas. Además, el bazo almacena y libera sangre en caso de demanda, como ocurre durante la hemorragia. Los impulsos simpáticos causan que la musculatura lisa de la cápsula del bazo se contraiga. Durante el desarrollo fetal temprano, el bazo participa en la formación de células sanguíneas; cerca del 10% de la población tiene **bazos accesorios**, que por lo general se encuentran cerca del hilio del bazo primario o están embebidos

en la cola del páncreas. En general, los bazoos accesorios tienen cerca de un centímetro o menos de diámetro<sup>(1)</sup>.

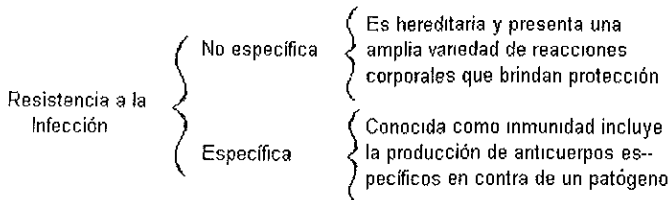
### Amígdalas

Las **amígdalas** son congregaciones múltiples de ganglios linfáticos grandes embebidos en una membrana mucosa. Las amígdalas están dispuestas en un anillo en la unión de la cavidad oral y la faringe. La **amígdala faríngea única** o **adenoides** está embebida en la pared posterior de la nasofaringe. Las **amígdalas palatinas** están situadas en la fosa amigdalina entre los arcos faringopalatinos y el glosopalatino. Estas son las únicas que se retiran de manera común en la amigdalectomía. Las **amígdalas lingüales** están dispuestas en par y se localizan en la base de la lengua y pueden retirarse cuando se realiza amigdalectomía.

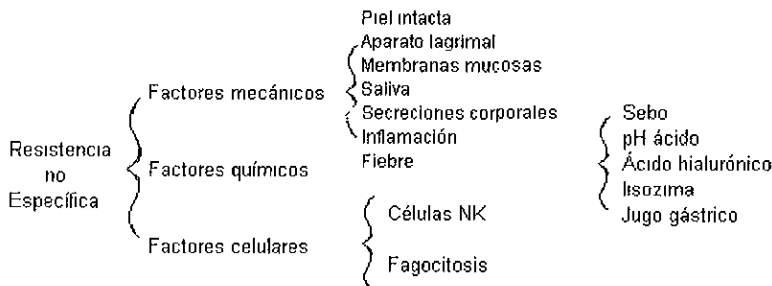
Las amígdalas están situadas de manera estratégica para proteger en contra de la invasión de sustancias extrañas. Desde el punto de vista funcional las amígdalas producen linfocitos y anticuerpos<sup>(1)</sup>.

### SISTEMA DE DEFENSA HUMANO

El cuerpo humano continuamente intenta mantener la homeostasia contrarrestando las actividades de los organismos productores de la infección, que se denominan patógenos, o de sus toxinas. La capacidad para combatir la infección a través de las defensas del cuerpo recibe el nombre de resistencia. La vulnerabilidad o falta de resistencia se llama susceptibilidad. Las defensas contra las enfermedades se pueden agrupar en dos grandes áreas importantes: la resistencia no específica y la resistencia específica<sup>(1)</sup>.



**La resistencia no específica a la infección:** se compone de 1) Factores mecánicos 2) Factores químicos y 3) Factores celulares<sup>(1)</sup>



### FACTORES MECÁNICOS

#### El sistema inmunitario cutáneo (Piel intacta)

La piel es el órgano más grande del cuerpo y la principal barrera física entre el organismo y el ambiente externo. Además, la piel es un participante activo en la defensa del huésped, con la

capacidad de generar y apoyar reacciones inmunitarias e inflamatorias locales. Muchos antígenos extraños entran en el organismo a través de la piel, de forma que muchas respuestas inmunitarias se inician en este tejido.

**Componentes celulares del sistema inmunitario cutáneo**

La piel consta de una epidermis separada de la dermis subyacente por una membrana basal. Cada una de ellas consta de poblaciones celulares que pueden desempeñar papeles activos en las reacciones inmunitarias (figura 1).

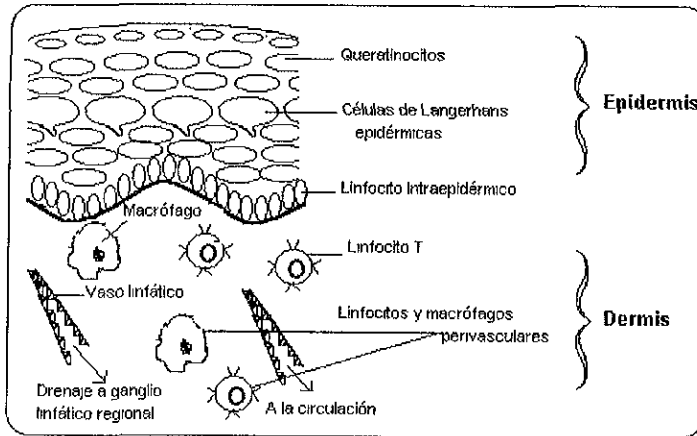


Figura 1 · Componentes celulares del sistema inmunitario Cutáneo(4)

**Queratinocitos:** Las células epiteliales de la epidermis o queratinocitos, producen varias citocinas, como la interleucina-1 (IL-1), el GM-CSF, la IL-3, el TNF y la IL-6; y tras activarse por citocinas derivadas de la célula T como el IFN- $\gamma$ , los queratinocitos secretan quimiocinas que estimulan la quimiotaxis y activación de los leucocitos. Aunque estos hallazgos sugieren que los queratinocitos pueden potenciar la inflamación local y la activación linfocitaria, no se sabe si las citocinas producidas por los queratinocitos pueden alcanzar la dermis, donde se localizan la mayor parte de los linfocitos y otros leucocitos.

Además de servir como fuente de citocinas, la exposición al IFN- $\gamma$  puede hacer que los queratinocitos expresen moléculas de clase II del MHC. Esto es parecido a la inducción de la expresión de la clase II en los macrófagos y otras poblaciones celulares. Los queratinocitos también expresan co-estimuladores que pueden diferir de los co-estimuladores de las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Sin embargo, no está claro si los queratinocitos actúan como APC iniciando las reacciones de células T.

**Células de Langerhans epidérmicas:** Las células de Langerhans son células con largas prolongaciones que derivan de la médula ósea que se localizan en la región suprabacilar de la epidermis. Se piensa que un precursor de la médula ósea origina células que residen en la piel como células de Langerhans epidérmicas, algunas de las cuales migran a órganos linfoides donde son identificadas como células dendríticas interdigitantes.

**Linfocitos intraepidérmicos:** Dentro de la epidermis hay una pequeña subpoblación de linfocitos. En los seres humanos constituyen solo el 2% de los linfocitos asociados a la piel (el resto reside en la dermis), y la mayor parte son células T CD8<sup>+</sup>. Las células T intraepidérmicas expresan un grupo de receptores más restringidos que los linfocitos T de la mayor parte de los otros tejidos. En los ratones, muchos linfocitos intraepidérmicos son células T que expresan la forma  $\gamma\delta$  del receptor.

para el antígeno. Esto es también verdad para los linfocitos intraepiteliales del intestino, lo que plantea la posibilidad de que las células T y al menos en algunas especies, puedan estar comprometidas únicamente en el reconocimiento de antígenos que se encuentran en las superficies epiteliales. No obstante, ni la especificidad de esta subpoblación de células T se han definido con claridad.

El medio ambiente inmunológico (homing) de estas células T a la epidermis puede estar controlado por moléculas de adhesión específicas. Las células T intraepidérmicas, como algunas células T de la dermis, expresan un hidrato de carbono sializado, llamado antígeno de linfocitos cutáneos-1 (CLA-1, del inglés *cutaneous lymphocyte antigen-1*), que es reconocido por la selectina-E, que se identificó en un principio como una molécula endotelial que se induce precozmente en las respuestas inflamatorias. La mayor parte del determinante CLA-1 se sintetiza cuando las células T se activan en el microambiente cutáneo, quizás en respuestas a citocinas. Un número pequeño de células T circulantes expresan el CLA-1, y pueden adherirse a las células endoteliales que expresan la selectina-E. No se sabe si la selectina-E se expresa en las células epidérmicas, ni si desempeñan algún papel en el epidermotropismo de algunos linfocitos T.

**Macrófagos y linfocitos dérmicos:** Los tejidos conectivos de la dermis contienen linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), predominantemente de localización perivascular, y macrófagos dispersos. Esto es muy parecido a lo que ocurre en los tejidos conectivos de otros órganos. Las células T suelen expresar marcadores fenotípicos típicos de las células activadas o memoria, como el CD45RO y cantidades elevadas de la cadena  $\gamma$  del receptor para la IL-2 (CD25).

#### **Iniciación de las respuestas inmunitarias en la piel.**

Cuando un antígeno proteico se introduce en la piel, ya sea por aplicación tópica o inyección, tres tipos de células actúan como APC. *Las células de Langerhans proporcionan la principal vía de presentación a las células T nativas de los antígenos que penetran por vía cutánea.* Las células de Langerhans unen el antígeno a su superficie y lo procesan: llevan el antígeno procesado, migran desde la epidermis a los vasos linfáticos y de aquí a los ganglios linfáticos, donde residen en las regiones paraoligulares de la corteza. Aquí las células de Langerhans que ahora se llaman células dendríticas interdigitantes, presentan el antígeno a las células T CD4<sup>+</sup> nativas que han entrado en el ganglio a través de las HEV. En su estado de reposo, es decir, sin estimulación extrínseca, las células dendríticas son las APC más potentes del cuerpo. Por el contrario, otras APC como los macrófagos y los linfocitos B pueden necesitar activarse para desarrollar la capacidad de presentar antígenos a las células T y estimularlas. La principal razón para esto es que las células dendríticas expresan espontáneamente niveles elevados de moléculas de clase II del MHC como co-estimuladores, como la glucoproteína B7. Es interesante señalar, que las células de Langerhans frescas aisladas no activan a los linfocitos T, pero adquieren la capacidad de hacerlo tras un cultivo corto (1 a 2 días). Se cree que este período de cultivo es análogo *in vitro* a la migración de las células de Langerhans desde la epidermis a los ganglios linfáticos. Las células de Langerhans se diferencian a APC potentes durante esta migración, asegurando que la activación de las células T se produzcan en los ganglios linfáticos y no en la piel donde entro el antígeno. Los macrófagos dérmicos y las células endoteliales venulares pueden presentar antígenos a los linfocitos T en la dermis. La mayor parte de estas células T dérmicas están activadas previamente o son células memoria. Por lo tanto, las reacciones de las células T frente a los macrófagos o frente a los antígenos asociados al endotelio en la dermis, pueden ser más importantes para la generación de respuestas efectoras frente al antígeno en los sujetos previamente inmunizados que en las respuestas primarias frente a antígenos que se encuentran por primera vez.

#### **Fases efectoras de las respuestas inmunitarias en la piel.**

El principal tipo de respuesta inmunitaria mediado por la célula T en la piel es la **hipersensibilidad retardada (HR)**. Esta es una reacción frente a antígenos proteicos solubles o sustancias químicas que pueden unirse a proteínas propias y modificarlas, creando nuevos determinantes antígenicos. La HR es una respuesta inmunitaria mediada por células que resultan de la activación de las células T y de la secreción de citocinas.

Se sabe mucho menos acerca de la inmunidad humoral en la piel. La IgA secretora está presente en las secreciones de la piel, como el sudor, y su importancia la sugiere la observación clínica de que los pacientes con déficit de IgA son susceptibles de sufrir infecciones cutáneas piógenas. Dado que rara vez se encuentra linfocitos B en los tejidos cutáneos, es probable que la IgA sea producida por células B activadas en los ganglios linfáticos y se transporte a la piel a través de la circulación. La piel también es un lugar importante de reacciones de hipersensibilidad inmediata medida por IgE, causadas por la liberación de mediadores químicos a partir de los mastocitos dérmicos<sup>(4)</sup>.

### **Aparato lagrimal**

El aparato lagrimal es un grupo de estructuras que fabrican y eliminan las lágrimas. En condiciones normales, las lágrimas se eliminan por evaporación o pasan a la nariz tan rápido como se producen. Las lágrimas se diseminan sobre la superficie del globo ocular por medio del parpadeo. La acción del lavado continuo de las lágrimas ayuda a mantener los microbios de tal manera que no permanezcan en la superficie del ojo. Si una sustancia irritante o un gran número de microbios hace contacto con el ojo, las glándulas lagrimales comienzan a secretar con mayor abundancia. Las lágrimas entonces se acumulan con mayor rapidez de lo que pueden eliminarse. Esto es un mecanismo protector para diluir y eliminar las sustancias irritantes o los microbios<sup>(1)</sup>.

### **El sistema inmunitario de las mucosas (Membranas mucosas)**

Los epitelios mucosos son barreras entre los ambientes interno y externo, y por lo tanto, son una importante primera línea de defensa. Además, *las respuestas inmunitarias frente a antígenos orales difieren en algunos aspectos fundamentales de las que se producen frente a los antígenos que se encuentran en otros lugares*. Las dos diferencias más llamativas son la mayor abundancia de IgA que se produce en asociación a los tejidos mucosos, y la tendencia de la inmunización oral con proteínas para inducir la tolerancia de las células T en lugar de su activación. Tales observaciones han establecido de forma convincente la importancia fisiológica y la unicidad del sistema inmunitario de las mucosas. En comparación se sabe poco acerca de las respuestas inmunitarias en la mucosa respiratoria, a pesar de que la vía aérea es un lugar importante de entrada de antígenos. Es probable sin embargo, que las características de las respuestas inmunitarias sean básicamente iguales en todos los tejidos linfoides asociados a mucosas.

### **Componentes celulares del sistema inmunitario de las mucosas**

En la mucosa del sistema gastrointestinal, se encuentra un gran número de linfocitos en tres regiones principales dispersos a lo largo de la lámina propia, en las placas de Peyer y dentro de la capa epitelial (figura 2). Las células de cada lugar tienen características fenotípicas y funcionales diferentes.

**Linfocitos intraepiteliales:** La mayor parte de los linfocitos intraepiteliales son células T. En los seres humanos, la mayor parte son células CD8<sup>+</sup>. De forma llamativa, en los ratones aproximadamente el 50% de los linfocitos intraepiteliales expresan la forma  $\alpha\delta$  del TCR. Como los linfocitos intraepiteliales son células  $\gamma\delta$ . Aunque esta proporción no es impresionante, todavía es mayor que las que se encuentran en las células T de otros tejidos. Los linfocitos intraepiteliales que expresan tanto el TCR  $\alpha\beta$  como el  $\gamma\delta$ , muestran una diversidad limitada de receptores para el antígeno, siendo dominantes pocos genes V. Todos estos hallazgos apoyan la idea de que los linfocitos intraepiteliales tienen un número limitado de especificidades que es distinta de la mayor parte de las células T, y que pueden haber evolucionado para reconocer antígenos intraluminales que se encuentran con frecuencia.

Los linfocitos intraepiteliales expresan una nueva integrina llamada HML-1 (antígeno del leucocito de la mucosa humana-1, del inglés, *human mucosal lymphocyte antigen-1*), que se compone de una cadena  $\alpha$  unida a una cadena  $\beta 7$ . Se cree que esta molécula de adhesión interviene en el medio ambiente inmunológico de las células T particulares al epitelio intestinal o en su retención en ellos.

**Linfocitos de la lámina propia:** La lámina propia intestinal contiene una población mixta de células. Comprenden linfocitos T, la mayor parte de los cuales son CD4<sup>+</sup>, y tienen un fenotipo de



células activadas. Es probable que las células T reconozcan y respondan inicialmente a los antígenos en los ganglios linfáticos mesentéricos regionales, y vuelvan al intestino a poblar la lámina propia. Este origen es similar al propuesto para las células T en la dermis cutánea. Además, la lámina propia contiene un gran número de linfocitos B activados y células plasmáticas, así como macrófagos, eosinófilos y mastocitos

**Foliculos linfoides de la mucosa:** Las **Placas de Peyer** son folículos linfoides organizados en la mucosa del intestino delgado. Folículos similares a nivel morfológico y funcional abundan en pequeño número en la mayor parte de los sistemas gastrointestinal y respiratorio. Las **amígdalas faríngeas** son también folículos linfoides del baso y de los ganglios linfáticos, las regiones centrales de los folículos son áreas ricas en células B que contienen a menudo centros germinales.

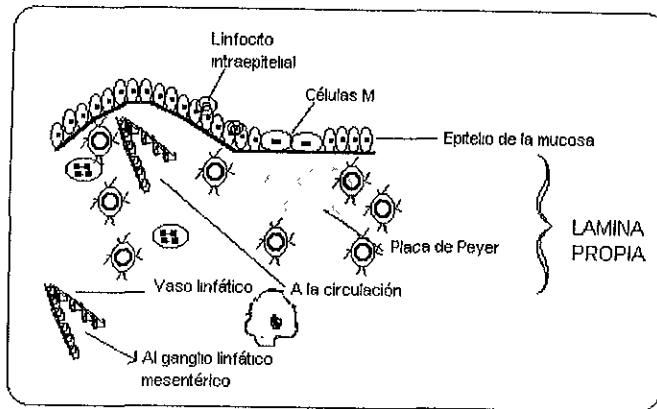


Figura 2 ...Componentes celulares del sistema inmunitario de las mucosas(4)

Las Placas de Peyer también contienen un número pequeño de células T CD4<sup>+</sup>, principalmente en las regiones interfoliculares. En los ratones adultos, del 50 al 70 % de los linfocitos de las Placas de Peyer son células B, y del 10 al 30% células T. Algunas de las células epiteliales que cubren las Placas de Peyer son <<células M (de membrana)>> especializadas. Las células M carecen de microvilli, realizan pinocitosis activa, y transforman macromoléculas desde la luz intestinal a los tejidos subepiteliales. Se cree que desempeñan un papel importante en el transporte de antígenos a las placas de Peyer

### Inducción de las respuestas inmunitarias en las mucosas

La mayor parte de los antígenos que se administran por vía oral entran desde la luz intestinal a los linfáticos mesentéricos, donde se inician las respuestas inmunitarias. Algunos antígenos proteicos pueden transportarse a través de las células M a las Placas de Peyer, donde son capaces de estimular a los linfocitos T y B. Aunque se puede inducir a las células epiteliales intestinales a que expresen moléculas de clase II del MHC, por ejemplo, exponiéndolas a IFN- $\gamma$ , no hay pruebas de que estas células sean capaces de presentar antígenos y estimular a los linfocitos T. Los linfocitos que se activan en los ganglios mesentéricos pueden volver a poblar la lámina propia o a los ganglios linfáticos mesentéricos, y finalmente, a la circulación sistémica. De este modo, los compartimentos del sistema inmunitario mucoso se conectan entre sí y con el resto del sistema inmunitario.

### Producción de IgA

La IgA es la clase principal de anticuerpo que puede secretarse de forma activa y eficaz a través del epitelio. Por lo tanto, tiene un papel crítico en la defensa frente a patógenos intestinales y

respiratorios, y en la transferencia pasiva de inmunidad en la leche y el calostro de las madres a sus hijos. El tamaño de la superficie intestinal es responsable de la enorme cantidad de IgA que se produce. Se calcula que una persona normal adulta de 70 Kg secreta aproximadamente 3 g de IgA al día, responsable del 60 al 70% de la producción total de anticuerpos

En el sistema gastrointestinal, el proceso de producción de IgA se inicia con la entrada de antígenos proteicos a las Placas de Peyer. Aquí los antígenos estimulan a los linfocitos T específicos de las regiones interfoliiculares así como a los linfocitos B de los folículos. Algunos de los linfocitos B se diferencian a células productoras de IgA y migran a la lámina propia. Las dos citocinas responsables del cambio al isotipo IgA son el TGF- $\alpha$  (que puede ser producido por las células T y por las células estromales no linfoides) y la IL-5. Algunas células B activadas migran a los centros germinales de las Placas de Peyer, donde proliferan y sufren mutaciones somáticas en los genes de la Ig, lo que produce la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Esto probablemente es similar a la secuencia de acontecimientos que ocurre en los folículos linfoides del bazo y de los ganglios linfáticos. Después de ser generadas las células B productoras de IgA puede residir en la lámina propia o migrar a otros tejidos mucosos u órganos linfoides

Existen diversas razones por las cuales las cantidades de IgA producidas en el sistema inmunitario de las mucosas son mayores que las producidas en otros tejidos. Primero, las células B que expresan IgA tienden a migrar de forma selectiva a las Placas de Peyer y a la lámina propia. Esto se ha demostrado inyectando células B que expresan IgA estimuladas por su antígeno en la circulación sistémica de animales normales no inmunizados. Se desconocen los receptores que intervienen y las adenasas responsables de este cambio. Segundo, las células T cooperadoras productoras de IL-5 son más numerosas en las Placas de Peyer que en otros tejidos linfoides. Aunque el sistema inmunitario de las mucosas es el lugar de mayor producción de IgA, y de IgA de origen secretor. Otros tejidos linfoides y la médula ósea, pueden producir este isotipo, dando lugar a IgA sérica

La IgA secretora forma un dímero que se mantiene unido por la cadena J, que se secreta y sintetiza de forma coordinada con ella. (Por el contrario, la IgA sérica suele ser un monómero que carece de cadena J) Una vez que se secreta este dímero a la lámina propia se transporta a través de las células epiteliales a la luz intestinal mediante una proteína llamada **Componente secretor** (o receptor poli-Ig). El componente secretor es sintetizado por las células epiteliales de la mucosa y se expresa en su superficie basal y lateral. La forma asociada a la membrana es una glucoproteína de aproximadamente 100 kD con 5 dominios homólogos a los dominios de la Ig, por lo que pertenece a la superfamilia de las Ig. La IgA dimerica, secretada, que contiene la cadena J se une al componente secretor asociado a la membrana y forma complejos covalentes sobre las células epiteliales de la mucosa. Este complejo se introduce en la célula epitelial por endocitosis y es transportado en vesículas a la superficie luminal. Aquí el dominio extracelular del componente secretor, que lleva la molécula de IgA, sufre proteólisis y deja los dominios transmembranoso y citoplasmático unidos a la célula epitelial, liberando la IgA unida a la luz intestinal. El componente secretor es también responsable de la secreción de IgA a la bilis, la leche, el esputo y la saliva. Aunque se ha estudiado más extensamente su capacidad de transporte de IgA, el componente secretor es capaz de transportar IgM a la secreción intestinal. En las secreciones, la IgA sirve para neutralizar los microorganismos y las toxinas<sup>(4)</sup>

### Saliva

La saliva producida por las glándulas salivales lava los microbios de la superficie de los dientes y la mucosa de la boca, como las lágrimas lavan los ojos. Esto evita la colonización por parte de los microorganismos<sup>(1)</sup>.

### Secreciones corporales

La limpieza de la uretra por parte del flujo de orina representa otro factor mecánico que evita la colonización de microbios en el sistema urinario. La secreción vaginal también desplaza microbios alejándolos del cuerpo<sup>(1)</sup>

## Inflamación

Cuando las células son dañadas por microorganismos, agentes físicos o agentes químicos, se establece la reacción de inflamación (respuesta inflamatoria). La lesión se puede observar como una forma de tensión.

**Síntomas:** La inflamación es una respuesta de defensa del cuerpo ante la agresión debida al daño de los tejidos que por lo general se caracteriza por cuatro síntomas fundamentales: enrojecimiento, dolor, calor y aumento de volumen. Un quinto síntoma puede ser la pérdida de la función en el área lesionada. La pérdida de la función depende del sitio y de la extensión de la lesión. La respuesta inflamatoria sirve como una medida protectora y de defensa. Es un intento para eliminar microbios, toxinas o material extraño en el sitio de la lesión con objeto de evitar la diseminación a otros órganos y preparar el sitio para la reparación de los tejidos. Así, la respuesta inflamatoria es un intento para restablecer la homeostasis de los tejidos<sup>(1)</sup>.

**Fases:** Los procesos moleculares/celulares que se presentan durante una reacción inflamatoria son: a) Vasodilatación, b) Aumento en la permeabilidad vascular y c) Infiltración celular. Estos cambios son desencadenados de manera principal por mediadores químicos que están ampliamente distribuidos de modo secuestrado o inactivo a través del cuerpo y se liberan o activan localmente en el sitio de la inflamación. Después de su liberación tienden a inactivarse con rapidez para asegurar el control del proceso inflamatorio.

Existe elevación en el aporte sanguíneo del área afectada debido a la acción de aminas vasoactivas tales como histamina y 5-hidroxitriptamina y por mediadores almacenados dentro de las células cebadas. Estas moléculas se liberan a) como consecuencia de la producción de anafilotoxinas ( $C3_a$  y  $C5_a$ ) que echan a andar a receptores específicos en las células cebadas b) Después de la interacción del antígeno con IgE en la superficie de células cebadas o c) Por daño físico directo a las células. Otros mediadores tales como Bradiquininas y Prostaglandinas se producen en el lugar o las plaquetas lo liberan. La vasodilatación provoca incremento en el Flujo sanguíneo al área, lo que da lugar al **enrojecimiento y calor**. Esto también resulta en incremento en el aporte de moléculas y células que pueden combatir al agente causante del desencadenamiento inicial.

Las mismas moléculas, aminas vasoactivas, prostaglandinas y quininas, aumentan la permeabilidad vascular, lo que permite al plasma y proteínas plásmicas atravesar el recubrimiento endotelial. Las proteínas plásmicas incluirán inmunoglobulinas y moléculas de las cascadas de coagulación y complemento. Este derrame de líquido provocará **hinchazón** (edema), que a su vez llevará a elevación en la tensión tisular y **dolor**. Algunas moléculas por sí mismas por ejemplo: prostaglandinas e histamina, estimulan directamente la respuesta de dolor. El exudado inflamatorio tiene varias funciones importantes. Las bacterias a menudo producen toxinas lesivas para tejidos que se diluirán en el exudado. Los factores de coagulación presentes resultan en el depósito de fibrina lo que ocasiona obstrucción física para la diseminación de las bacterias. El exudado se drena de manera continua por los vasos linfáticos y los antígenos tales como bacterias y toxinas, se acarrearán hacia el ganglio linfático de drenaje en el cual se pueden generar las respuestas inmunológicas. Los factores quimiotácticos producidos, incluso  $C5_a$ , Histamina, Leucotrienos y moléculas específicas para ciertos tipos celulares, atraerán las células fagocíticas al sitio. El incremento en la permeabilidad vascular permitirá un acceso más fácil de los neutrófilos y monocitos, y la vasodilatación significa que hay más células en la vecindad. Los neutrófilos arribarán e iniciarán la destrucción y eliminación del agente agresor. La mayor parte tendrá éxito y solo unos pocos morirán y liberarán su contenido nocivo en los tejidos, para aumentar el proceso inflamatorio. Los fagocitos mononucleares llegarán al sitio para terminar la eliminación de los restos y estimular la reparación tisular.

Cuando la hinchazón es grave puede haber pérdida de la función del área afectada. Si el agente lesivo se elimina con rapidez, el tejido pronto será reparado y regresará a su estado original. Los procesos inflamatorios continúan hasta que se resuelvan las condiciones causantes de su inicio. En

la mayor parte de las circunstancias, esto sucede con bastante rapidez con una reacción inflamatoria aguda que dura horas o días. Si el agente causante no se elimina rápido o se introduce continuamente entonces habrá inflamación crónica, con la posibilidad de destrucción tisular y pérdida total de la función<sup>(5)</sup>

### **Fiebre**

La temperatura es un factor importante en la determinación de la inmunidad natural de un animal a algunos agentes infecciosos y es probable que la piroxia (aumento de temperatura) que sigue a tantos tipos diferentes de infección pueda actuar como una respuesta protectora contra los microorganismos infectantes. La respuesta en muchos casos está controlada por una molécula producida como parte de la respuesta inmunológica. El pirógeno endógeno, que en la actualidad se sabe es el producto del macrófago IL-1, es causante del incremento de la temperatura. Se produce después de la infección y actúa directo o a través de la estimulación de síntesis de prostaglandinas en el centro regulador de temperatura del hipotálamo<sup>(5)</sup>

## **FACTORES QUÍMICOS**

### **Sebo**

Las glándulas sebáceas de la piel secretan una sustancia oleosa denominada sebo que evita que el pelo se seque y se rompa al tiempo que forma una capa protectora sobre la superficie de la piel. Uno de los componentes del sebo son los ácidos grasos no saturados, los cuales inhiben el crecimiento de ciertas bacterias y hongos patógenos<sup>(1)</sup>

### **pH ácido**

El pH ácido de la piel, entre 3 y 5, está causado en parte por la secreción de ácido graso y ácido láctico. La acidez de la piel probablemente desaliente el crecimiento de muchos otros microorganismos. Ciertas bacterias que se encuentran comúnmente en la piel metabolizan el sebo y este metabolismo, son ácidos grasos que hacen que la respuesta inflamatoria se asocie con el acné<sup>(1)</sup>.

### **Ácido hialurónico**

El ácido hialurónico localizado en el tejido conectivo laxo, toma su papel en la prevención de la diseminación de agentes nocivos en las infecciones localizadas<sup>(1)</sup>

### **Lisozima**

Las glándulas sudoríferas (sudor) de la piel producen transpiración lo cual ayuda a mantener la temperatura corporal, eliminar ciertos desechos y deshacer a los microorganismos de la superficie de la piel. La transpiración también contiene lisozima, una enzima capaz de degradar las paredes celulares de ciertas bacterias bajo determinadas condiciones. La lisozima también se encuentra en las lágrimas, la saliva, las secreciones nasales y los líquidos tisulares, en donde presenta su actividad antimicrobiana<sup>(1)</sup>

### **Jugo gástrico**

El jugo gástrico está producido por las glándulas del estómago. Es una mezcla de ácido clorhídrico, enzima y moco. La acidez muy alta del jugo gástrico (pH de 1.2 a 3.0) es suficiente para preservar la esterilidad como existe en el estómago. Esta acidez destruye a las bacterias y a la mayor parte de las toxinas bacterianas<sup>(1)</sup>

## **FACTORES CELULARES**

### **Células NK (células asesinas naturales)**

Estudios de la función han identificado poblaciones linfocitarias que sirven como **células asesinas naturales (NK)** y otras células asesinas que dependen de anticuerpo, que se ocupan de la vigilancia de ciertos tumores y de células infectadas por virus. La célula NK se define como un

efector que tiene capacidad citotóxica espontánea contra varias células blanco y no muestran restricciones MHC. Se desconocen los precursores de estas células efectoras pero carecen de las características fenotípicas, genotípicas y funcionales de células T, células B, monocitos y macrófagos. Las células NK, muchas de las cuales se observan como **linfocitos granulares grandes (LGL)**, tienen rasgos morfológicos únicos, y de manera típica sus núcleos son redondos o dentados con citoplasma pálido abundante que contienen gránulos azurófilos. Los LGL contienen gránulos unidos a la membrana que se tiñen con reactivos para hidrolasas ácidas, como fosfatasa ácida, alfa-naftilacetato esterasa y beta-glucuronidasa. Estos gránulos pueden relacionarse con su capacidad citolítica carecen de inmunoglobulinas de superficie, no son adherentes ni fagocíticos, con frecuencia forman rosetas con eritrocitos de carnero y expresan receptores Fc para IgG. Por lo tanto LGL exhibe propiedades morfológicas y membranales intermedias entre linfocitos y monocitos<sup>(6)</sup>

### **Fagocitosis**

**Fagocitos mononucleares:** El **sistema fagocítico mononuclear** constituye la segunda población celular principal del sistema inmunitario y consta de células de una estirpe común cuya función básica es la fagocitosis. A principios del siglo XX, los morfólogos observaron que ciertas células captaban los pigmentos que se administraban por vía intravenosa (llamados <<pigmentos vitales>>, ya que teñían células vivas). Aschoff identificó a estas células como macrófagos en el tejido conectivo, microglia en el sistema nervioso central, células endoteliales en los sinusoides vasculares, y células reticulares en los órganos linfoides, y sugirió que estos tipos celulares diferentes actuaban en la defensa del huésped fagocitando a invasores extraños como los microorganismos. Él los agrupó dentro del **sistema retículo endotelial (SRE)**. Ahora se sabe que la fagocitosis, las células endoteliales y reticulares son capaces de hacer, es en esencia diferente de la fagocitosis activa de los macrófagos. Es, por tanto, más apropiado clasificar a monocitos y macrófagos como miembros del sistema fagocítico mononuclear.

**Desarrollo:** Todas las células del sistema mononuclear se originan en la médula ósea y, tras su maduración y posterior activación pueden adquirir diferentes formas morfológicas. El primer tipo de célula que entra en la sangre periférica tras dejar la médula ósea no está completamente diferenciado y se llama **monocito**. Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15 µm, un núcleo en forma de pera y un citoplasma finamente granulado que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos. Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en **macrófagos**, que también se denominan <<histiocitos>>. Los macrófagos pueden activarse por diferentes estímulos y pueden adquirir formas diferentes. Algunas desarrollan abundante citoplasma y se llaman **células epitelioides** porque se parecen a las células epiteliales de la piel. Los macrófagos pueden fundirse entre sí y formar **células gigantes multinucleadas**. Los macrófagos se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos, y han recibido nombres especiales para designar localizaciones específicas. Por ejemplo, en el sistema nervioso central son la <<microglia>>, cuando ocupan las paredes vasculares de los sinusoides hepáticos, se llaman <<células de Kuffer>>, en la vía aérea pulmonar, son los <<macrófagos alveolares>>; y los fagocitos multinucleados del uso son los <<osteoclastos>>.

**Activación y función:** Los fagocitos mononucleares representan el ejemplo más claro de población celular crítica para la inmunidad natural, pero que se ha adaptado para desempeñar una función central en la inmunidad adquirida específica. Los macrófagos realizaban muchas de sus funciones en la defensa del huésped antes del desarrollo de la inmunidad específica; estas mismas funciones se hicieron más eficaces en los lugares de las respuestas inmunitarias. Las principales funciones de los fagocitos mononucleares en la inmunidad natural son las siguientes:

a - Los macrófagos fagocitan partículas extrañas como los microorganismos, macromoléculas, incluidos los antígenos, incluso los tejidos lesionados o muertos, como hematíes viejos. El reconocimiento de sustancias extrañas y de tejidos lesionados por parte del macrófago puede implicar a receptores para fosfolípidos y azúcares, pero no se conoce el mecanismo exacto. Las sustancias fagocitadas son degradadas dentro de los macrófagos por enzimas lisosomales. Los macrófagos actúan como las principales <<células basureras>> del cuerpo. Además, las células

secretan enzimas, especies de oxígeno reactivo, óxido nítrico y mediadores derivados lipídicos como las prostaglandinas, todos los cuales sirven para matar microorganismos y controlar la diseminación de las infecciones, y pueden incluso lesionar tejidos normales de la vecindad inmediata.

b - Los macrófagos producen citocinas que atraen a otras células inflamatorias, especialmente a neutrófilos, y son responsables de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación como la fiebre. Los macrófagos también producen factores para los fibroblastos y el endotelio endovascular que promueven la reparación de los tejidos lesionados.

*Los fagocitos mononucleares funcionan como células accesorias y efectoras en las respuestas inmunitarias. Desempeñan las siguientes funciones importantes en las fases de reconocimiento, activación y efectora de la inmunidad específica.*

a - Los macrófagos muestran antígenos extraños sobre su superficie de una forma que pueden ser reconocidos por linfocitos T específicos para el antígeno. Esta función de los macrófagos como **células presentadoras de antígeno** (APC, del inglés *antigen presenting cell*). Los macrófagos también expresan proteínas que promueven la activación de la célula T. De este modo, *los macrófagos actúan como células accesorias de la activación linfocitaria*

b.- En la fase efectora de ciertas respuestas inmunitarias mediadas por células, las células T estimuladas por el antígeno secretan citocinas que activan a los macrófagos. Tales macrófagos activados son más eficaces en la realización de sus funciones fagocíticas, degradativa y citolítica que los no estimulados, y por ello son capaces de destruir los antígenos fagocitados. De este modo, *los macrófagos se encuentran entre las principales células efectoras de la inmunidad mediada por células.*

c - En la fase efectora de las respuestas de inmunidad humoral, los antígenos extraños, tales como los microorganismos, se cubren u opsonizan, por anticuerpos y proteínas del complemento. Debido a que los macrófagos expresan receptores de superficie para los anticuerpos y para ciertas proteínas del complemento, se unen y fagocitan estas partículas opsonizadas con mucha mayor avidez. De este modo los macrófagos participan en la eliminación de anticuerpos extraños por las respuestas de inmunidad humoral<sup>(4)</sup>.

**Leucocitos polimorfonucleares:** Estas células, en ocasiones, se denominan granulocitos y son de vida corta (2 a 3 días) comparados con macrófagos que pueden sobrevivir durante meses o años. Comprenden del 60 al 70% de los leucocitos pero también migran hacia los tejidos en respuesta a la lesión o infección. Las formas maduras tienen núcleo multilobulado y muchos gránulos. Se clasifican como neutrófilos, eosinófilos y basófilos con base en su tinción histoquímica.

Los **neutrófilos** son los granulocitos circulantes más abundantes. Sus gránulos contienen numerosas moléculas microbicidas y cuando se produce un factor quimiotáctico en un sitio extravascular, como resultado de infección o lesión, penetran en los tejidos.

Los **eosinófilos** también son células fagocíticas aunque parecen ser menos eficientes que los neutrófilos. Están presentes en números escasos en el sujeto sano normal (1-2% de los leucocitos), pero sus cantidades se incrementan en ciertas enfermedades alérgicas.

El contenido de los gránulos puede liberarse mediante la señal adecuada y las moléculas citotóxicas pueden entonces matar parásitos que son demasiado grandes para fagocitarse.

Los **basófilos** se encuentran en números en extremo pequeños en la circulación (<0.2%) y tienen ciertas características en común con las **células cebadas** tisulares. Ambos tipos de células tienen receptores en su superficie para la porción Fc de la IgE y el entrecruzamiento de esta inmunoglobulina por el antígeno lleva a la liberación de diversos mediadores farmacológicos. Estas moléculas estimulan una respuesta inflamatoria. Hay dos tipos de células cebadas; una se encuentra en el tejido conjuntivo y la otra, relacionada a mucosas. Las células cebadas y los basófilos se derivan de la médula ósea, pero no está clara su relación en el desarrollo<sup>(4)</sup>.

**Resistencia específica a la infección (Inmunidad)** son mecanismos inducidos o estimulados por la exposición a sustancias extrañas, son exquisitamente específicos para distintas macromoléculas

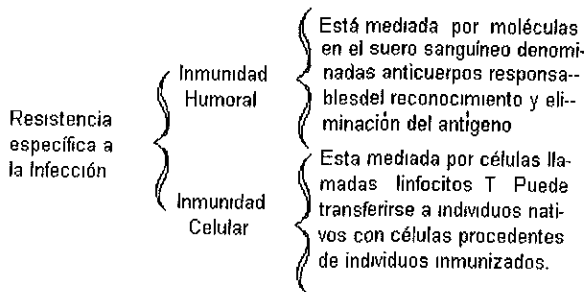
y aumentan en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a una macromolécula en particular. Estos mecanismos constituyen la inmunidad adquirida o específica.

**Características de la inmunidad específica:**

*Primera.* El sistema inmunitario específico <<recuerda>> cada encuentro con un microorganismo o antígeno extraño, de forma que encuentros posteriores estimulan mecanismos de defensa cada vez más eficaces. A esto se le llama memoria inmunitaria y es la base de la vacunación protectora frente a las enfermedades infecciosas

*Segundo:* La respuesta inmunitaria específica amplifica los mecanismos protectores de la inmunidad natural (resistencia no específica a la infección), dirige o centra estos mecanismos a los lugares de entrada del antígeno, y de esta forma los capacita mejor para eliminar los antígenos extraños.

Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos, en función de los componentes del sistema inmunitario que median las respuestas.



### Principales características de las respuestas inmunitarias

Las respuestas inmunitarias humoral y celular frente a todos los antígenos tienen varias propiedades fundamentales. El análisis experimental de la respuesta inmunitaria es, de hecho un intento de proporcionar explicaciones moleculares y mecánicas a estas características fundamentales de la inmunidad específica.

**Especificidad:** las respuestas inmunitarias son específicas para antígenos distintos. De hecho, las respuestas inmunitarias son específicas para diferentes componentes estructurales de proteínas complejas, polisacáridos y otros antígenos. Las porciones de dichos antígenos que son reconocidas de forma específica por linfocitos individuales se denominan **determinantes** o **epitopos**. Esta refinada especificidad existe porque los linfocitos B y T individuales que responden a antígenos extraños expresan receptores de membrana que distinguen diferencias sutiles entre antígenos diferentes. Los linfocitos específicos de antígeno se desarrollan sin estimulación antigénica, de forma que en los individuos no inmunizados existen clones de células con diferentes receptores de antígeno y especificidades para reconocer y responder a la exposición a antígenos extraños.

**Diversidad:** El número total de especificidades antigénicas de los linfocitos en un individuo, llamado **receptorio linfocítico**, es extremadamente elevado. Se calcula que el sistema inmunitario de los mamíferos puede distinguir al menos  $10^9$  determinantes antigénicos diferentes.

**Memoria:** La exposición del sistema inmunitario a un antígeno extraño aumenta su capacidad para responder de nuevo a ese antígeno. De este modo, la respuesta a una segunda y posteriores exposiciones al mismo antígeno, llamadas **respuestas inmunitarias secundarias**, suelen ser más

rápidas mayores y a menudo cualitativamente diferentes de la primera respuesta inmunitaria o primaria a ese antígeno. Esta propiedad de la inmunidad específica se llama **memoria inmunitaria**. Varias características de los linfocitos son responsables de la memoria:

a) Los linfocitos proliferan cuando son estimulados por antígenos, y la progenie de un linfocito sensible a un antígeno en particular tiene los mismos receptores antigénicos y, por lo tanto, la misma especificidad que la célula original. Por ello, cada exposición al antígeno expande el clon de los linfocitos específicos para ese antígeno

b) Las células memoria, que son linfocitos que han respondido previamente a una estimulación antigénica, sobreviven durante largos periodos incluso sin el antígeno. De este modo, las células memoria están preparadas para responder rápidamente a la provocación con el antígeno.

c) Las células B memoria responden a concentraciones antigénicas menores y producen anticuerpos que se unen al antígeno con mayor afinidad que lo hacían las células B previamente no estimuladas

**Autolimitación:** Todas las respuestas inmunitarias normales decaen con el tiempo tras la estimulación antigénica. Existen varias razones por las que las respuestas inmunitarias son autolimitadas

a) La primera y probablemente la más importante, es que las respuestas inmunitarias inducidas por antígenos actúan precisamente para eliminarlos. Esto suprime el estímulo de la activación linfocitaria

b) Tras la estimulación antigénica, los linfocitos ejercen sus funciones durante breves periodos después de lo cual quedan en reposo, evolucionando a células memoria, o se diferencian a células terminales con una hemivida corta.

c) Los antígenos y las respuestas inmunitarias frente a los mismos, estimulan diferentes mecanismos cuya principal función es la regulación retroactiva de la propia respuesta.

**Discriminación entre lo que es propio y lo que no lo es:** Una de las propiedades más señaladas del sistema inmunitario es su capacidad para distinguir entre antígenos extraños y antígenos propios. De esta forma, los linfocitos de cada individuo son capaces de reconocer y responder a muchos antígenos extraños, aunque normalmente no responden a las sustancias potencialmente antigénicas presentes en ese individuo. La autotolerancia es un proceso adquirido que debe ser aprendido por los linfocitos de cada individuo. Ello ocurre en parte porque los linfocitos pasan en su desarrollo por una fase donde el encuentro con el antígeno conduce a su muerte o inactivación

### **Fases de las respuestas inmunitarias**

Las respuestas inmunitarias específicas pueden dividirse en 1) la **fase de reconocimiento** 2) la **fase de activación**, y 3) la **fase efectora**.

**Fase de reconocimiento:** La fase de reconocimiento de las respuestas inmunitarias consiste en la unión de los antígenos extraños a los receptores específicos situados sobre los linfocitos maduros que existen antes de la estimulación antigénica. Los linfocitos B, las células de la inmunidad humoral, expresan anticuerpos en su superficie que pueden unirse a proteínas, polisacáridos o lípidos extraños en su forma soluble. Los linfocitos T, que son responsables de la inmunidad celular, expresan receptores que reconocen sólo secuencias peptídicas cortas en antígenos proteicos. Además, los linfocitos T tienen la propiedad única de reconocer y responder sólo a antígenos peptídicos presentes en la superficie de otras células.

**Fase de activación:** Todos los linfocitos sufren dos importantes cambios en respuesta a los antígenos. Primero proliferan, lo que lleva a la expansión de los clones de linfocitos específicos para el antígeno y a la amplificación de la respuesta protectora. Segundo, los linfocitos evolucionan desde células cuya función básica es de reconocimiento a células que actúan eliminando antígenos extraños. De este modo los linfocitos B reconocedores del antígeno se diferencian a células secretoras de anticuerpos, y los anticuerpos secretados se unen al antígeno soluble (extracelular) y activa los mecanismos que lo eliminan. Algunos linfocitos T se diferencian a



células que activan fagocitos que matan microorganismos intracelulares, y otros linfocitos T lisan directamente células que están produciendo antígenos extraños como proteínas virales. La capacidad de las células T de reconocer antígenos unidos a células, dirige eficazmente la inmunidad celular contra los microorganismos intracelulares. Una característica general de la activación de los linfocitos es que habitualmente precisa de dos tipos de señales: la primera viene dada por el antígeno y la segunda por otras células, que pueden ser <<células cooperadoras>> o <<células accesorias>>.

**Fase efectora** La fase efectora de las respuestas inmunitarias es el estadio en que los linfocitos que han sido activados de forma específica por los antígenos, realizan las funciones que llevan a su eliminación. Los linfocitos que actúan en la fase efectora de las respuestas inmunitarias se denominan **células efectoras**. Muchas funciones efectoras precisan la participación de otras células no linfoides (a las que a menudo también denominamos <<células efectoras>>) y de mecanismos de defensa que son también operativos en la inmunidad natural. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a los antígenos extraños y aumentan su fagocitosis por los neutrófilos y monocitos sanguíneos. Los anticuerpos también activan un sistema de proteínas plásmáticas llamado **complemento**, que participa en la lisis y fagocitosis de microorganismos. Otros anticuerpos estimulan la degranulación de los mastocitos y la liberación de mediadores que combaten las infecciones y son responsables del componente vascular de la inflamación aguda. Los linfocitos T activados secretan hormonas proteicas, llamadas **citocinas**, que aumentan las funciones de los fagocitos y estimulan las respuestas inflamatorias<sup>(4)</sup>

### El sistema del complemento

El complemento es un sistema de proteínas conectadas a nivel funcional que interactúan entre sí de forma muy controlada para proporcionar muchas de las funciones efectoras de la inmunidad humoral y de la inflamación

Las principales funciones biológicas del sistema del complemento son las siguientes:

- ~ Ciertos componentes del complemento activados median la citólisis polimerizándose sobre las superficies celulares y formando poros o roturas en la integridad de la doble capa de fosfolípidos de la membrana celular
- ~ La opsonización de microorganismos extraños, o partículas se produce por la unión de las proteínas del complemento a sus superficies. Estas proteínas del complemento se llaman opsoninas. Los leucocitos fagocíticos expresan receptores específicos para estas proteínas. De esta forma, las opsoninas facilitan la fagocitosis de partículas y microorganismos
- ~ La activación de la inflamación se produce en respuesta a la generación de ciertos fragmentos proteolíticos de proteínas del complemento. Estos péptidos derivados del complemento actúan sobre varias células. Activan a los mastocitos, produciendo reacciones que reproducen las de hipersensibilidad inmediata: en casos extremos, esta reacción puede imitar a una anafilaxia, por lo que a estos fragmentos péptidicos se les denomina anafilotoxinas. Otros objetivos de estos péptidos son el endotelio vascular y los leucocitos inflamatorios. Además otros fragmentos de las proteínas del complemento pueden aumentar la respuesta del linfocito B frente al antígeno
- ~ Los complejos inmunitarios que podrían dañar a los tejidos, se vuelven inocuos al unirse a las proteínas del complemento, lo que da lugar a la solubilización de los mismos, la limitación de su tamaño y su aclaramiento fagocítico de la circulación

El sistema del complemento tiene varias propiedades importantes que le capacitan para actuar de forma eficaz contra invasores extraños sin lesionar los tejidos normales

- ~ La cascada proteolítica permite una enorme amplificación, ya que cada molécula de enzima activada en un paso puede generar múltiples enzimas activadas o fragmentos activos en el siguiente paso.
- ~ El complemento actúa como un mecanismo efector importante de la inmunidad humoral específica, por medio de la activación iniciada por los complejos antígeno-anticuerpo a la que se le

denomina **vía clásica**. El complemento también participa en la inmunidad natural, con su activación en las superficies de los microorganismos sin anticuerpos a la que se le denomina **vía alternativa**. ~ El sistema del complemento esta muy bien regulado por varias proteínas solubles y asociadas a las membranas que inhiben la activación del complemento en múltiples pasos. Estos mecanismos reguladores tiene dos funciones principales. Primero, limitan o detienen la activación del complemento en respuesta a estímulos fisiológicos. Segundo, evitan la activación anormal o espontanea del complemento sin la presencia de microorganismos y de anticuerpos<sup>(4)</sup> La figura 3 presenta la acción análoga de las vías clásica y alternativa del complemento

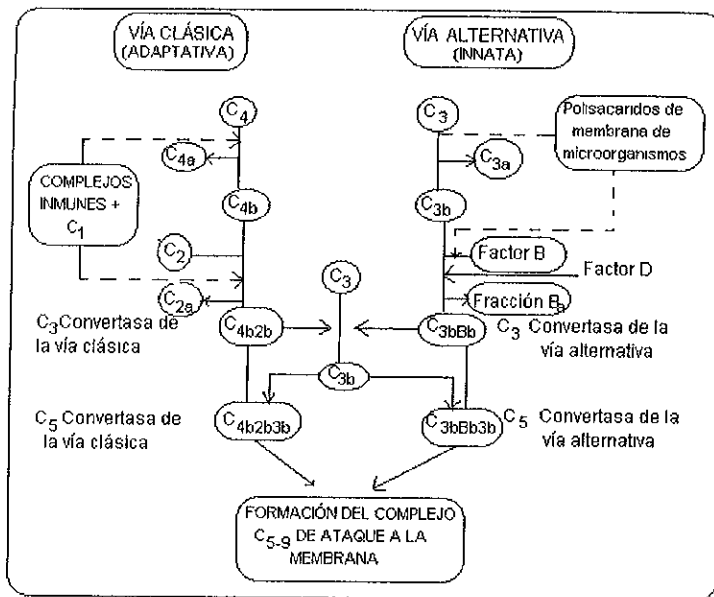


Figura 3 ... vías del complemento<sup>(7)</sup>

### Citocinas

Además de las células, muchas de las moléculas secretadas conocidas como **citocinas**, intervienen en la fase inductora y efectora de las respuestas inmunitarias. Muchas de estas citocinas se producen por fagocitos mononucleares y se denominan **monocinas** mientras que otras están producidas por los linfocitos y se les llama **linfocinas**.

Las citocinas de ordinario son glucoproteínas y comparten ciertas características:

- Una célula de ordinario sintetiza las citocinas en respuesta a estímulos y una vez que se producen, se secretan. No se almacenan preformadas dentro de las células.
- Diversos tipos celulares producen la misma citocina.
- Las citocinas individuales actúan en distintos tipos celulares, es decir, son **pleitrópicas** y pueden afectar varias células en diferentes maneras.
- Las diversas citocinas comparten muchas funciones similares, es decir, sus acciones son redundantes.
- Las citocinas a menudo influyen en las síntesis y afectan las acciones de otras citocinas. Pueden incrementar o inhibir ambos criterios.
- La acción de la citocina está mediada por la unión a receptores específicos sobre las células blanco, éstas tienden a ser muy poderosas.

## FUNDAMENTACIÓN

Existen muchos mecanismos de defensa del hospedero en su esfuerzo para evadir a los microorganismos que lo invaden. Uno de estos mecanismos inespecíficos de defensa, es la fagocitosis. Ésta se define como el fenómeno mediante el cual una célula engulle una partícula completa, por ejemplo: bacterias, parte de otras células, gránulos de polvo o de pigmentos, etc<sup>(3)</sup>.

La fagocitosis representa uno de los sistemas de defensa más primitivos en el hospedero<sup>(8)</sup>. La fagocitosis juega un papel importante en las infecciones bacterianas y, por lo tanto, es determinante en el resultado de estas infecciones. La actividad fagocítica primaria, en el curso de una infección bacteriana, puede limitar la dispersión de las bacterias y prevenir el avance de la infección, pero cuando la fagocitosis no es eficiente, se presenta una multiplicación bacteriana y por lo tanto, la infección<sup>(9)</sup>.

La virulencia de algunas bacterias, como los neumococos y *Klebsiella*, está relacionada con su cápsula antifagocítica que las ayuda a evadir la ingestión por los fagocitos; no obstante, cuando son ingeridas, mueren<sup>(10)</sup>. Otras bacterias como *Diphtheria* y *Brucella*, son fácilmente ingeridas, pero su virulencia está relacionada con su capacidad para resistir la muerte intracelular<sup>(10)</sup>. La virulencia de otro tipo de bacterias, incluidos los estafilococos, está relacionada en parte por su habilidad para resistir tanto la ingestión como la muerte intracelular de los fagocitos<sup>(11,12)</sup>.

Las células relacionadas de manera específica con el fenómeno de la fagocitosis son leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares (células de Kupffer, macrófagos alveolares, peritoneales, etc.)<sup>(8)</sup>

Los leucocitos PMN cumplen una función importante en infecciones agudas, pues su actividad fagocítica es más eficiente y sus sistemas bactericidas más potentes al compararse con los monocitos, sin embargo, los leucocitos PMN permanecen un promedio de 10 horas en circulación sobreviviendo después de la diapédesis sólo algunos días. Los monocitos circulan por un periodo de 12 a 102 horas; después pasan a los tejidos (evolucionando a macrófagos maduros) donde pueden sobrevivir un lapso prolongado, factor determinante en infecciones crónicas<sup>(8)</sup>.

Los macrófagos al entrar en contacto con agentes invasores o productos de microorganismos, linfocinas o ambos, son capaces de presentar cambios morfológicos y metabólicos, lo que se traduce de manera principal en una mayor actividad de las vías de producción de energía, incremento en número de lisosomas y en el de receptores de membrana así como elevación en migración, resultando de ello una mejor función de los mecanismos bactericidas. Cuando éstos cambios suceden se les da el nombre de macrófagos activados. Estos son capaces de efectuar la fagocitosis contra microorganismos resistentes a macrófagos normales. Otra característica de los macrófagos activados es que actúan no sólo contra el microorganismo que indujo su activación, sino sobre otros microorganismos<sup>(8)</sup>

El proceso fagocítico se puede dividir en 4 estadios diferentes: quimiotaxis, opsonización, ingestión y muerte intracelular. Todos los pasos están íntimamente relacionados, todos ocurren en una célula fagocítica determinada, y el fenómeno se efectúa por todas las células fagocíticas del foco inflamatorio

### QUIMIOTAXIS:

La quimiotaxis es el fenómeno mediante el cual moléculas secretadas por células en el foco infeccioso atraen a PMN, siendo ésta la primera fase del fenómeno inflamatorio, las cuales responden al estímulo llegando al foco inflamatorio por medio de *diapédesis* y *peripolexis*, siendo la quimiotaxis la migración de los PMN al foco inflamatorio en respuesta a las citocinas producidas<sup>(12)</sup>

Las bacterias pueden generar factores quimiotácticos en su interacción con el complemento sérico<sup>(13)</sup>. En presencia de anticuerpos específicos, la producción de factores quimiotácticos, son

consecuencia de la activación de la denominada vía clásica del complemento. Al activarse el primer componente  $C_1$ , activa los componentes  $C_4$  y  $C_2$  del complemento, los cuales tras una activación secuencial producen en la célula perforaciones que matan a la célula a la que se unió  $C_1$  o alguno de los complejos formados. En la activación se producen importantes mediadores humorales de la inflamación, como  $C_5a$  que es un potente factor quimiotáctico para neutrófilos, monocitos y eosinófilos. También estimula a éstas células a desgranularse, adherirse al endotelio y a liberar leukotrienos, los cuales por sí mismos son potentes mediadores de la inflamación<sup>(14)</sup>

### **OPSONIZACIÓN:**

Durante la opsonización, la bacteria se combina con ciertas proteínas del suero y son más susceptibles a la ingestión por fagocitos<sup>(15)</sup>. Asimismo, algunas proteínas del suero que ayudan a la ingestión, pueden ser llamadas opsoninas<sup>(16)</sup>. Para facilitar la ingestión de bacterias patógenas, las opsoninas son un eslabón importante entre las denominadas inmunidad celular y humoral.

La opsonización puede efectuarse por anticuerpos específicos que pueden funcionar como opsoninas<sup>(17)</sup>. Los anticuerpos como la inmunoglobulina G o inmunoglobulina M, son capaces de actuar como opsoninas<sup>(18)</sup>, pero algunos como la inmunoglobulina A, no pueden hacerlo<sup>(19)</sup>. Otra forma de opsonización proviene de los fragmentos resultantes de la activación del complemento, por ejemplo  $C_{3b}$  se une a los receptores CR1 sobre los fagocitos;  $C_{3b}$  puede ser roto a  $C_{3bi}$  que se une al receptor CR3, de la molécula MAC-1. Junto con el anticuerpo, ésta promueve la ingestión del organismo. Esta es una función muy importante para la erradicación de la mayoría de las bacterias y hongos<sup>(14)</sup>

### **INGESTIÓN:**

Una vez que las bacterias patógenas son opsonizadas, son más susceptibles a la ingestión por las células fagocíticas

El proceso de la ingestión comienza con el arreglo de la bacteria a la superficie del fagocito (adherencia). Los receptores para la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina se unen a su ligando en el PMN, al igual que la molécula opsónica  $C_{3b}$ , de tal manera que en la superficie de la célula fagocítica se forman los pseudópodos que producen una vacuola rodeando a la bacteria opsonizada, encerrándola. **ESTO ES LO QUE SE DENOMINA FAGOCITOSIS.**

Posteriormente se formará la vacuola lisosomal y se fusionará con la fagocítica dando la vacuola fagolisosomal encargada de dar muerte a lo fagocitado<sup>(20)</sup>.

Los leucocitos PMN obtienen mucha de su energía metabólica para la ingestión, de la glicólisis, así como de la respiración, permitiéndoles ingerir la pared celular de las bacterias en forma completa en un ambiente anaeróbico que existe en tejidos infectados y debilitados en donde la circulación está poco oxigenada

### **MUERTE INTRACELULAR:**

Después de la ingestión de la partícula bacteriana por el fagocito y su encasillamiento dentro de la vacuola fagocítica, o fagosoma, gránulos citoplásmicos se fusionan con la vacuola. Cuando ocurre la degranulación, resulta la descarga explosiva de enzimas granulares y otras proteínas responsables de la muerte bacteriana, dentro de la vacuola fagocítica<sup>(21)</sup>. Después de la ingestión y degranulación, la muerte bacteriana ocurre de 5 a 10 minutos. Algunas bacterias son capaces de sobrevivir dentro de los leucocitos PMN, pero generalmente su muerte ocurre rápidamente

Algunos de los mecanismos de muerte intracelular para las bacterias son:

- 1 - Proteínas catiónicas (Fagocitina)
- 2 - Enzimas hidrolíticas (Lisozima)
- 3 - pH ácido
- 4.- Peróxido de hidrógeno.
- 5 - Mieloperoxidasa + Peróxido de hidrógeno + Haluro<sup>(12)</sup>

Para matar y digerir al microorganismo invasor los fagocitos cuentan con diferentes mecanismos: producción de metabolitos de oxígeno, como aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo u haluros con acción bactericida; productos independientes de oxígeno como ácido láctico, proteasas y lisozima, actuando esta última sobre el mucopéptido de la pared bacteriana; lactoferrina que es una proteína sintetizada por el fagocito que actúa fijando hierro, el cual es indispensable para la multiplicación de ciertas bacterias

Algunos gérmenes pueden evadir los sistemas de degradación bacteriana mediante producción de enzimas que neutralizan los diferentes productos con los que cuenta el fagocito. Así mismo, algunas bacterias son capaces de impedir la fusión de los lisosomas a la vacuola fagocítica, lo que les permite sobrevivir<sup>(8)</sup>.

### **VALORACIÓN DE TRASTORNOS DEL SISTEMA FAGOCÍTICO:**

Los trastornos del sistema fagocítico son raros y es posible que se presenten con diversas manifestaciones, dependiendo del defecto particular. Estas manifestaciones pueden incluir infecciones bacterianas y micóticas crónicas y recurrentes, formación de granulomas y abscesos profundos, enfermedad gingival y periodontal, neumonías cavitarias, osteomielitis y lesiones cutáneas necróticas con cicatrización deficiente, entre otras. Hay diversas pruebas para la valoración funcional de las células del sistema fagocítico. Aunque no se efectúan en la mayor parte de los laboratorios, porque no suele solicitarse y requieren cierto grado de pericia. Algunas de las pruebas de uso más frecuente como quimiotaxis, valoraciones para la destrucción intracelular y valoraciones para metabolismo oxidativo, se aplican a los defectos fagocíticos primarios que se encuentran con mayor frecuencia<sup>(22)</sup>.

Tiene importancia seguir ciertas precauciones en la manipulación y el procesamiento de las muestras obtenidas para valoración de defectos fagocíticos<sup>(22)</sup>. Los neutrófilos son células muy sensibles que deben estudiarse en el transcurso de algunas horas luego de la recolección. La única excepción a la regla es la prueba con nitroazul de tetrazolol (NBT), que puede efectuarse el día siguiente a la recolección. Sin embargo cualquier resultado anormal en estas circunstancias debe verificarse con muestras frescas<sup>(22)</sup>.

### **ESTUDIOS FUNCIONALES:**

Las características funcionales de las células fagocíticas pueden valorarse al analizar cada uno de los pasos que conducen a la fagocitosis:

#### **Quimiotaxis:**

La quimiotaxis puede valorarse in vivo o in vitro. La ventana cutánea de Rebeck es una de las primeras técnicas ideadas para valorar la movilidad y la respuesta in vivo de los leucocitos a la inflamación<sup>(23)</sup>. Se efectúa una abrasión superficial en una área pequeña de la piel, y se cubre con un cubreobjetos que se cambia a intervalos frecuentes durante 24 horas. A continuación se analiza el número y el tipo de células migratorias fijas al vidrio. Esta técnica no se utiliza con frecuencia en clínica, porque se dispone de otras pruebas in vitro bien estandarizadas para valorar la quimiotaxis y la movilidad

La valoración de la quimiotaxis con cámara de Boyden es in vitro y consta de dos cámaras que contienen células y quimioatrayente, separadas por un filtro milipore. Las células quedan atrapadas en el filtro conforme migran al quimioatrayente.

La valoración de la quimiotaxis bajo agarosa mide la migración de leucocitos desde un cuenco pequeño cortado en agarosa, hacia otros que contiene un quimioatrayente como FMLP (N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina). Se mide la migración de células hacia el cuenco que contiene el quimioatrayente (migración específica), y se compara con la migración hacia un cuenco sin quimioatrayente (migración aleatoria). A partir de estos dos valores se calcula un índice quimiotáctico (quimiotaxis/emigración espontánea) y se compara con estándares normales<sup>(22)</sup>.

## **Pruebas para valorar el metabolismo oxidativo:**

### ***Prueba con nitroazul tetrazolio***

La prueba con NBT se utiliza en su mayor parte para investigar la enfermedad granulomatosa crónica (CGD). Algunos otros padecimientos, como la deficiencia completa de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de leucocitos, o el uso concomitante de D-penicilamina, dan por resultado una *prueba anormal con NBT*. Esta prueba es relativamente fácil de realizar y refleja la generación de superóxido en **intensificación respiratoria** después de la fagocitosis.

El NBT es una solución hidrosoluble de color amarillo claro que forma azul formazán insoluble, con la reducción. Se efectúa una prueba simple en laminilla, en la cual las células se incuban con NBT después de estimulación con forbol miristato acetato (PMA), que actúa como un activador celular que pasa por alto el señalamiento mediado por receptores. Se tife una laminilla testigo sin estimulación con PMA, para comparación. Después de la comparación de 15 minutos, las células se contrañen con safranina, y se examinan al microscopio. Las células normales (positivas) tienen citoplasma azul, y las anormales, citoplasma incoloro. De otra manera, puede efectuarse una valoración cuantitativa en la cual el colorante reducido se extrae de las células con N,N-dimetilformamida o piridina caliente, después de incubación adecuada con NBT. En seguida se mide por espectrofotometría el colorante extraído<sup>(22)</sup>.

### ***Destrucción intracelular***

Cuando se valora la destrucción intracelular, es posible llevar a cabo una valoración bactericida o fungicida. La primera es la que se realiza con mayor frecuencia, por lo general con una cepa de *Staphylococcus aureus*. En esta valoración, se incuban bacterias opsonizadas, con la suspensión de granulocitos del enfermo para efectuar el estudio durante diversos intervalos (es decir 0, 30 min, 1 h, 2h). La reacción se suspende al final de cada incubación, y se agrega agua destilada para generar lisis de las células, o bien puede agregarse lisostafin, una mezcla de enzimas muralíticas específicas para *Staphylococcus aureus*, con el objeto de destruir bacterias extracelulares, o usar centrifugación diferencial para separar bacterias relacionadas con células, de las libres de estas últimas. Las muestras resultantes se cultivan en agar para calcular el número de bacterias sobrevivientes, medidas como unidades formadoras de colonias. La destrucción intracelular de *Staphylococcus aureus* por lo general ocurre con rapidez, y en granulocitos normales más de 90% de las bacterias quedan destruidas en el transcurso de 30 minutos de incubación<sup>(24)</sup>.

**Quimioluminiscencia.** Esta valoración mide la energía luminosa generada por células tras fagocitosis y el brote respiratorio. La respuesta se recibe en forma de luz, mediante un sistema de detección fluorométrica.

Esta prueba, que depende de la generación de  $^1\text{O}_2$ , proporciona una valoración precisa del metabolismo oxidativo. De modo similar a la prueba NBT, requiere que estén intactos todos los pasos previos a la destrucción de microorganismos. Aun así es más precisa que la valoración con NBT.

En la valoración de quimioluminiscencia, los neutrófilos se incuban en presencia de una partícula ingerible, opsonizada, como látex o zimosán, en un frasco de centelleo.

Se le agrega un compuesto fluorescente intermedio como luminol, que actúa como sustrato para el  $^1\text{O}_2$  con el objeto de intensificar la emisión de luz después de la fagocitosis e **intensificación respiratoria**. La respuesta luminiscente puede medirse en el contador de centelleo beta a diversos intervalos o en un quimioluminómetro especial<sup>(22)</sup>.

### ***Prueba radiactiva de la fagocitosis***

En este método se utiliza el precipitado de albumina antígeno-anticuerpo de suero bovino marcado con yodo-125 como partículas para su inclusión celular (Ward, 1973). Este método no puede usarse para probar la actividad ópsonizante del suero. El espectro técnico más importante que hay que monitorizar es la eficiencia de eliminar el precipitado extracelular inmune de las células que contienen el precipitado inmune ingerido. Simultáneamente se realizan dos controles para medir

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen diversas técnicas para valorar la funcionalidad de los polimorfonucleares, de ellas la más común por sencilla, es la reducción del NBT, la cual también tiene variantes, de estas variantes que se presentan para dicha técnica existen las cuantitativas y las semicuantitativas de lo cual no se sabe a ciencia cierta si al aplicar éstas los resultados que se obtienen son similares o no. En el presente estudio se analizarán y compararán dos de ellas, para evaluar la eficiencia y confiabilidad de la prueba semicuantitativa en placa, con la prueba cuantitativa espectrofotométrica de la reducción del NBT. Para lo cual se estudiará una población similar de donadores de sangre en el INPer y en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", se estandarizarán las variables en cada uno de los métodos y finalmente se valorará la eficiencia en los resultados de Índice fagocítico y de activación de vías metabólicas por reducción del NBT, de una con respecto a la otra, tomando como referencia a la técnica espectrofotométrica por poder manipular variables cuantitativas y se comparará con la semicuantitativa en placa, ponderando las variables de complejidad, tiempo, equipo, adiestramiento, etc

## OBJETIVOS

Objetivo general.

Comparar la eficiencia de dos técnicas diferentes para evaluar fagocitosis basadas en la reducción del cloruro de p-nitro azul de tetrazolio.

Objetivos específicos:

- 1.- Estandarización de la técnica de reducción del NBT en placa.
- 2.- Adaptación a microtécnica y estandarización de la técnica de reducción del NBT medido espectrofotométricamente.
- 3.- Establecer los valores de referencia para fagocitosis en adultos aparentemente sanos



## MATERIAL Y MÉTODOS

- 1 - Aguja para vacutainer
- 2 - Aplicadores de madera
- 3.- Asa bacteriológica
- 4 - Bulbo para pipeta Pasteur
- 5 - Cajas de Petri grandes y medianas
- 6 - Cámara de Neúbauer
- 7.- Camisa para vacutainer
- 8.- Espátula
- 9.- Filtros millipore 0.22 micras
- 10 - Frascos de vidrio diferentes capacidades
- 11.- Gasas
- 12 - Gradilla para tubos de ensaye
- 13 - Jeringas de 3 y 20 mL
- 14.- Ligadura
- 15.- Matraz aforado 10 mL
- 16 - Matraz aforado 25 mL
- 17 - Matraz aforado 50 mL
- 18 - Matraz aforado 100 mL
- 19 - Matraz aforado 250 mL
- 20.- Matraz aforado 500 mL
- 21 - Matraz aforado 1000 mL
- 22.- Mechero Bunsenn
- 23 - Micropipeta 5- 40  $\mu$ L
- 24 - Micropipeta 40- 200  $\mu$ L
- 25 - Micropipeta 200-1000  $\mu$ L
- 26.- Perlas de Vidrio
- 27 - Pinzas de disección
- 28 - Pipeta graduada 1 mL
- 29 - Pipeta graduada 5 mL
- 30 - Pipeta graduada 10 mL
- 31 - Pipeta Pasteur
- 32 - Pizeta
- 33 - Portafiltros
- 34 - Portaobjetos con marcas en forma de circulo de 1.5 cm de diámetro
- 35.- Puntas para micropipeta
- 36 - Tubos cónicos de plástico 15 mL
- 37 - Tubos con tapón de rosca 13 x 100
- 38 - Tubos ependorf 2.5 mL
- 39 - Tubos vacutainer con vaclo, tapón guinda
- 40 - Vaso de precipitados 100 mL
- 41 - Vaso de precipitados 500 mL
- 42 - Vaso de precipitados 1000 mL

## REACTIVOS

(Instituto Nacional de Perinatología)

Nombre	Peso Mol.	Pureza	Marca	Número
1 - Aceite mineral				Sigma
400-5				
2 - Ácido acético glacial	60 05	100.0%	Merck	20006B
3 - Ácido cítrico. H <sub>2</sub> O	210.14	99.5%	Merck	244
4 - Ácido clorhídrico	36 46	37.0%	Merck	317
5 - Agar dextrosa y papa			Bioxon	119-1
6 - Alcohol isopropílico	60 09	100.0%	JTBaker	9084
7 - Azul tripano		100 0%		Sigma
	468			
8 - Bicarbonato de sodio	84 00	100.0%	JTBaker	3506
9 - Cianuro de potasio	56 00	98.7%	JTBaker	3366
10 - Citrato trisódico 2H <sub>2</sub> O	294.10	99.5%	Merck	244
11.-Cloruro de calcio 2H <sub>2</sub> O	147.00	99.0%	Sigma	4064
12.-Cloruro de magnesio 6H <sub>2</sub> O	203 30	95.3%	Merck	5833
13.-Cloruro de potasio	74 56	99.5%	AlliedCH	2150
14 -Cloruro de p-nitro azul de tetrazolio	817 70	98.0%	Research	298839
15 -Cloruro de sodio	58 44	99.5%	Merck	6404
16.-Fosfato de potasio monobásico	136 09	100 0%	JTBaker	3246
17 -Fosfato de sodio bibásico	141.96	99 0%	Merck	6586
18.-Fosfato de sodio monobásico	137.99	99.5%	JTBaker	3818
19 -Gelatina bacteriológica		100.0%		Balti BL
158				
20 -Glucosa	180.16	100.0%	Merck	900294
21.-Medio mínimo esencial		100.0%		GibcoBRL
22.-Rojo de fenol		100 0%		Merck
7241				
23 -Safranina			S.S.A	
24 -Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O	246 48	99 5%	Merck	5886

## MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.- Cepa de *Caulobacter* *albicans* número 10231
- 2 - Zymosan-A (*Blastomyces dermatitidis*) Sigma número Z-4250
- 3 - Suero POOL humano (mezcla de sueros humanos)

## REACTIVOS

(Hospital Infantil de México "Federico Gómez")

Nombre	Peso Mol	Pureza	Marca	Número
1 - Aceite mineral			Sigma	400-5
2 - Ácido acético glacial	60 05	100 0%	JTBaker	9507
3.- Ácido cítrico	210 14	99 0%	JTBaker	118
4.- Ácido clorhídrico	36 46	36.5%	TechnicaQ	A13670
5 - Agar dextrosa y papa			Bioxon	119-1
6 - Azul tripano		100 0%	Sigma	
23850				
7.- Bicarbonato de sodio		99 5%	Laitz	
8.- Cianuro de potasio	56 00	98 7%	JTBaker	3386
9.- Citrato trisódico.2H <sub>2</sub> O	294.10	99 5%	Merck	51088R
10.- Cloruro de calcio 2H <sub>2</sub> O	147 10	99.0%	Sigma	4064
11.- Cloruro de magnesio.7H <sub>2</sub> O	246 45	99.5%	JTBaker	2500
12.- Cloruro de potasio	74.55	99 5%	JTBaker	3040
13.- Cloruro de p-nitro azul de tetrazolio	817.70	98.0%	JTBaker	298839
14.- Cloruro de sodio	58 44	99 0%	JTBaker	3624
15.- Dioxano	220.00	100.0%	Merck	908
16.- Fosfato de potasio monobásico	74.55	99.5%	JTBaker	3040
17 - Fosfato de sodio dibásico 12H <sub>2</sub> O	358 15	99.0%	JTBaker	3822
18 - Fosfato de sodio monobásico	137.99	99 5%	JTBaker	3818
19 - Gelatina bacteriológica		100 0%	Baltimore	158
20 - Glucosa	180.16	100 0%	Merck	900294
21 - Medio mínimo esencial			Microlab	
22 - Rojo de fenol		100 0%	Merck	7241
23 - Safranina		100 0%	Laitz	
24 - Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O	246.49	99 5%	JTBaker	2500

## APARATOS

- 1 - Autoclave
- 2.- Balanza analítica
- 3.- Vortex
- 4 - Campana de flujo laminar
- 5 - Centrifuga clínica
- 6 - Espectrofotómetro BECKMAN DU 640
- 7 - Incubadora
- 8.- Microcentrifuga para ependorf
- 9.- Microscopio simple
- 10.- Potenciómetro
- 11 - Refrigerador
- 12.- REVCO

## MÉTODOS

### Obtención de leucocitos PMN

Se obtienen de 2 a 3 mL de sangre venosa heparinizada, se transfieren a 3 mL de Alsever gelatina estéril. Incubar a 37°C por 45 minutos. Se separa la capa superior y se transfiere a un tubo 13 por 100 con tapón de rosca estéril, se centrifuga por 5 min a 2000 rpm. Agregar agua destilada estéril, se lavan dos veces con solución Alsever. Hacer una dilución 1:10 con azul tripano al 0.2%. En una cámara de Neübauer se determina la viabilidad de los PMN, se cuantifican los vivos y se ajustan a la concentración de 1.5-3 millones de PMN por mililitro<sup>(25)</sup>.

### Reducción del NBT en placa

Se colocan 50 microlitros de la suspensión de PMN en un portaobjetos para fluorometría previamente tratado, se incuba en cámara húmeda durante 20 minutos a 37°C. Se lava suavemente con 5 ml de PBS. Se colocan 50 microlitros de la suspensión de *Candida albicans* y se incuban a 37° C por 7 minutos. Se lava suavemente con 5 mL de PBS. Se tiñe con safranina durante 10 min, se lava suavemente con agua destilada, se deja secar y se leen al microscopio en 100X. Toda la técnica debe ser manejada en condiciones de esterilidad<sup>(25)</sup>.

### Reducción del NBT medida por espectrofotometría

Rotular los tubos como. F= fagocitando y R= reposo, la prueba se realiza por duplicado. Agregar a los tubos F=350 µL y R=400 µL de amortiguador Krebs Henseleit. Colocar a los tubos F=50 µL de zymosan-A activado. Colocar en ambos tubos 100 µL de cianuro de potasio. Preincubar a 37°C por 5 min. Adicionar 400 µL de NBT al 0.1% en S.S.N más 100 µL de la suspensión de PMN a una concentración de 20 millones por mililitro. Incubar a 37° C por 15 min. Detener la reacción con 2 mL de ácido clorhídrico 2.5 N. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 min. Tirar el sobrenadante y agregar al sedimento 4 mL de piridina o dioxano extraer por 20 min en baño maría. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 min. Colocar el sobrenadante en tubos limpios y leer a 515 nm, se usa un blanco del solvente <sup>(26)</sup>.

## RESULTADOS

Se estudiaron cada uno de los pasos que involucra la Técnica de Obtención y purificación de Leucocitos

Se modificó el anticoagulante en sangre completa para conocer el efecto que tienen sobre la adherencia de los PMN a la placa de vidrio Obteniéndose los resultados que se presentan en el cuadro 1

Cuadro 1...

NOMBRE DEL ANTICOAGULANTE	ADHERENCIA DE LOS PMN
Heparina (100 $\mu$ L de 5000 UI/ ml)	Negativa
EDTA (tubos vacutainer)	Negativa
Sangre sin anticoagulante	Positiva

Al modificar el anticoagulante con el gradiente Alsever-gelatina, para analizar el efecto que tiene sobre la viabilidad de los Leucocitos Obteniéndose los resultados que se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2...

NOMBRE DEL ANTICOAGULANTE	RELACIÓN CON LA VIABILIDAD DE LEUCOCITOS
Heparina (100 $\mu$ L de 5000 UI/ml)	87 - 89 %
EDTA (tubos vacutainer)	85 - 88 %
Sangre sin anticoagulante	89 - 93 %
Utilización de perla de vidrio	97 - 100 %

Se estudio la cantidad de Leucocitos presentes en diferentes volúmenes de sangre Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3 ..

VOLUMEN DE SANGRE	CUENTA DE LEUCOCITOS MILLONES / mL
3.0 mL	5.0 - 7.0
1.0 mL	2.5 - 4.0
0.5 mL	1.0 - 2.0

Se estudiaron algunos métodos para la lisis de los eritrocitos, el elegido debe ser adecuado para no dañar a los Leucocitos. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4:

Cuadro 4 ...

SOLUCIÓN USADA	LISIS TOTAL DE ERITROS	TIEMPO DE CONTACTO CON LOS LEUCOCITOS	MUERTE DE LEUCOCITOS
Agua destilada	negativa	1 minuto	positiva
Ácido acét 2%	positiva	1 minuto	positiva
Ácido acét 1%	positiva	1 minuto	positiva
Ácido acét 1%	positiva	10 segundos	negativa

Se estudiaron: cuenta total de Leucocitos, cantidad de Leucocitos resuspendidos en 1 mL de MEM. para evaluar la recuperación de Leucocitos con el gradiente Alsever-gelatina. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5 ...

NÚMERO DE MUESTRA	CUENTA TOTAL DE LEUCOS EN 500 $\mu$ L DE SANGRE	CUENTA PARCIAL DE LEUCOS EN 1 mL DE MEM	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN
1	2,200,000	1,425,000	64.7
2	3,750,000	1,475,000	39.2
3	2,550,000	1,175,000	46.0
4	3,300,000	1,237,500	37.5
5	3,250,000	1,437,500	44.2
6	3,200,000	1,562,500	48.8
7	3,500,000	1,912,500	54.6
8	3,800,000	2,200,000	61.0
9	4,550,000	2,137,500	46.9
10	3,200,000	1,187,000	37.0
11	3,500,000	1,775,500	50.0
12	3,150,000	1,312,500	41.6
13	2,400,000	1,037,500	43.2
14	3,600,000	1,462,500	40.6
15	3,400,000	1,762,500	51.8
16	5,525,000	1,712,500	32.6
17	3,950,000	1,625,000	41.1
18	3,200,000	1,037,500	32.4
19	3,850,000	1,337,500	34.7
20	3,350,000	1,325,000	39.5
21	3,950,000	2,000,000	50.6
22	4,050,000	2,087,000	51.5

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 5 se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6 .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CUENTA TOTAL DE LEUCOS EN 500 $\mu$ L DE SANGRE	CUENTA PARCIAL DE LEUCOS EN 1 mL DE MEM	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN
Media poblacional	3,460,000	1,555,700	44.9
Desviación estándar	0.66	0.35	8.6
Intervalo de confianza	(2,160,000-4,800,000)	(855,000-2,255,700)	(27.7-62.1)
Coefficiente de variación	19%	22.5%	19%

La mínima concentración de Leucocitos viables se ilustra en el cuadro 7:

Cuadro 7 ...

CONCENTRACIÓN DE LEUCOCITOS	CUENTA DE LEUCOCITOS MILLONES / mL
Mínima	$1.1750 \times 10^6$
Máxima	$2.2000 \times 10^6$
Promedio	$1.6875 \times 10^6$

Los resultados del porcentaje de viabilidad en los Leucocitos se presentan en el cuadro 8:

Cuadro 8 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE VIABILIDAD	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE VIABILIDAD
1	96.6	16	98.1
2	100.0	17	97.6
3	99.2	18	100.0
4	96.4	19	99.0
5	96.9	20	95.0
6	99.0	21	96.6
7	99.5	22	97.0
8	100.0	23	99.2
9	100.0	24	98.5
10	97.8	25	100.0
11	99.3	26	98.7
12	100.0	27	96.3
13	98.2	28	98.1
14	97.9	29	96.3
15	98.4	30	96.0

NOTA: estas viabilidades fueron tomadas usando solución de Hanks después de adicionar el ácido acético al 1%

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 8 se presentan en el cuadro 9:

**Cuadro 9 ...**

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	% DE VIABILIDAD
Media poblacional	96.2
Desviación estándar	1.4
Intervalo de confianza	(95.4 - 100.0)
Coefficiente de variación	1.5

**Técnica estandarizada resultante para la obtención y purificación de leucocitos:**

- 1.- Colocar 500 µL de sangre venosa sin anticoagulante en un tubo vacutainer que contenga 500 µL de Alsever-gelatina y una perla de vidrio
- 2.- Agitar suavemente durante 10 segundos, retirar el tapón del vacutainer, quitar el exceso de sangre del tapón y volverlo a colocar
- 3.- Incubar de 30 a 45 min a 37°C, hasta la sedimentación total de los eritrocitos
- 4.- Separar la parte clara superior que queda después de la sedimentación de los eritrocitos
- 5.- Centrifugar 10 min a 2000 rpm
- 6.- Colocar 60 µL de ácido acético al 1%
- 7.- Agitar por 10 seg
- 8.- Colocar 8 mL (en tubo 13 x 100 ) ó 10 mL (en tubo cónico de 15 mL) de MEM o solución de Hanks.
- 9.- Lavar dos veces con solución de Hanks
- 10.- Resuspender en 300 µL de solución de Hanks.
- 11.- Hacer una dilución 1:5 con azul tripano al 0.2%
- 12.- Contar en cámara de Neubauer y ver viabilidad (esta debe ser mayor a 95.4%), sacar la cuenta con la siguiente fórmula

Cuenta de leucos en la cámara x 2.5 x 1000 x dil = # de leucos / mL

- 13.- ajustar a  $2 \times 10^6$  de leucocitos por mililitro utilizando la siguiente fórmula:

$$(V_1) (C_1) = (V_2) (C_2) \quad \text{despejando:}$$

$$V_2 = (V_1) (C_1) / C_2 \quad \text{donde,}$$

$V_2$  = cantidad desconocida expresada en µL

$V_1$  = volumen constante de 300 µL

$C_1$  = concentración de leucos obtenida de la fórmula del punto 12 expresada en leucos por mL

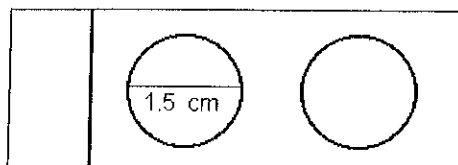
$C_2$  = concentración constante de  $2 \times 10^6$  leucos / mL

Nota. ver el apartado de propuestas y/o recomendaciones



Para lograr la estandarización de la técnica de reducción de NBT en placa se estudiaron los parámetros que ésta implica

Para tener una superficie delimitada con área conocida, se diseñaron los portaobjetos especiales para tal caso, el esquema de estos se muestra a continuación.



En el estudio del área se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 10:

Cuadro 10

	CÍRCULO DEL PORTAOBJETOS	CAMPO VISUAL DEL MICROSCOPIO
Diámetro	15 mm	0.2 mm
Área	176.7 mm <sup>2</sup>	0.0314 mm <sup>2</sup>

Con estos datos se calculó el número de campos visuales que contiene el área delimitada del portaobjetos obteniéndose un total de 5,627.38 campos en una área de 176.7 mm<sup>2</sup>.

Para conocer el número de células funcionales y adheridas a la placa se estudiaron 40 campos distribuidos en el área delimitada del portaobjetos. Los resultados se muestran en el cuadro 11:

Cuadro 11 ...

Cuenta de leucocitos en 1 mL de MEM	2,787,500
% de PMN en sangre (bibliografía)	65%
Cuenta de PMN real	1,811,875
PMN presentes en 100 μL (volumen de la muestra)	181,187
Promedio por campo N=40	12.9
Células adheridas Promedio x # de campos	72,593
Porcentaje de adherencia	40%

En el cuadro 12 se muestra el número de PMN por campo.

Cuadro 12 ...

NÚMERO DE CAMPO	PMN	NÚMERO DE CAMPO	PMN
1	5	21	9
2	9	22	10
3	7	23	8
4	10	24	9
5	12	25	11
6	14	26	10
7	11	27	11
8	19	28	6
9	14	29	16
10	14	30	8
11	18	31	13
12	18	32	19
13	21	33	7
14	15	34	18
15	9	35	24
16	11	36	10
17	12	37	23
18	17	38	13
19	7	39	20
20	11	40	20

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 12 se presentan en el cuadro 13:

Cuadro 13 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PMN
Media poblacional	12.9
Desviación estándar	4.9
Intervalo de confianza	(3-1-22-7)
Coefficiente de variación	38%

Se estudió el Tiempo de adhesión de PMN a la placa. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 14.

Cuadro 14 .

TIEMPO DE INCUBACIÓN EN MINUTOS	PROMEDIO DE CÉLULAS ADHERIDAS POR CAMPO	FORMACIÓN DE SINCITIOS (CUALITATIVO)
20	9.87	Negativo
25	14.51	Negativo
30	19.05	Positivo
60	23.65	Positivo
90	32.40	Positivo

En el estudio de la relación PMN/Levaduras se obtuvieron los resultados que se ilustran en el cuadro 15:

Cuadro 15 ..

RELACIÓN PMN/LEV	LEVADURAS LIBRES	SATURACIÓN DE PMN	RUPTURA DE PMN
1 10	++++	Positiva	Positiva
1:5	+++	Positiva	Negativa
1 2	+	Negativa	Negativa
1 1	--	Negativa	Negativa

Se realizó un estudio tanto de la Concentración del Cloruro de p-Nitro azul de tetrazolio tanto con el solvente como con la concentración del NBT para establecer las condiciones adecuadas y poder apreciar sin problemas la reducción. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 16

Cuadro 16 ...

CONCENTRACIÓN DEL NBT	SOLVENTE UTILIZADO	PORCENTAJE DE REDUCCIÓN
0 1%	Agua destilada	10-15%
0 1%	Sol salina normal	80-96%
0 2%	Sol salina normal	95-100%

### Técnica estandarizada obtenida para reducción de NBT en placa

- 1 - Colocar 100 µL de la suspensión de leucocitos  $2 \times 10^6$  PMN/mL en el área delimitada por el círculo del portaobjetos
  - 2 - Incubar por 20 min a 37°C en cámara húmeda
  - 3 - Lavar suavemente con 5 mL de PBS
  - 4.- Colocar 100 µL de la suspensión de *Candida albicans*  $4 \times 10^6$  Lev / mL. En el caso de usar Zyimosan-A colocar 100 µL de una suspensión con concentración de 1mg/mL.
  - 5 - Incubar 10 min a 37°C en cámara húmeda
  - 6 - Lavar suavemente con PBS
  - 7 - Teñir con safranina para tinción de Gram por 10 min
  - 8.- Lavar suavemente con agua destilada
  - 9 - Dejar secar
  - 10 - Leer 200 células en el microscopio a 100x
  - 11 - Sacar porcentaje de Reducción (%R), los PMN que contienen levaduras azules en su interior se consideran positivos a la reducción, los PMN que contienen levaduras rosas en su interior se consideran negativos a la reducción
- El % de reducción se saca con la siguiente fórmula:

$$\%R = \text{PMN con levaduras reducidas} / \text{Total de PMN que fagocitaron}$$

- 12 - Sacar por ciento de Fagocitosis (%F), Los PMN que contienen levaduras en su interior se consideran positivos a la Fagocitosis, los PMN que no contienen levaduras en su interior se consideran negativos a la Fagocitosis

El % de Fagocitosis se saca con la siguiente fórmula:

$$\%F = \text{PMN que fagocitaron} / \text{Total de PMN contados}$$

13.- Sacar Índice Fagocítico (IF), se cuentan las levaduras que se encuentran dentro de los PMN, y se saca con la siguiente fórmula:

$$\text{IF} = \text{Número de levaduras ingeridas} / \text{Total de PMN que fagocitaron}$$

Nota: ver el apartado de propuestas y/o recomendaciones.

Estudio de 30 muestras de adultos aparentemente sanos. De estas muestras se determinó de manera semicuantitativa, el Porcentaje de Reducción del NBT, el Porcentaje de Fagocitosis y el Índice Fagocítico.

Los resultados del Porcentaje de Reducción por 200 PMN, se muestran en el cuadro 17:

Cuadro 17 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN (%R)	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN (%R)
1	95.7	16	100.0
2	90.0	17	100.0
3	99.5	18	99.2
4	97.5	19	98.5
5	98.0	20	99.0
6	97.5	21	96.3
7	98.0	22	100.0
8	98.5	23	98.4
9	99.0	24	99.1
10	100.0	25	98.6
11	100.0	26	99.5
12	100.0	27	100.0
13	94.8	28	97.5
14	95.6	29	98.0
15	100.0	30	99.0

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 17 se presentan en el cuadro 18:

Cuadro 18 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
Media poblacional	98.2
Desviación estándar	2.1
Intervalo de confianza	(94.0 - 100.0)
Coefficiente de variación	2.1

Los resultados del Porcentaje de Reducción con respecto a la media poblacional del cuadro 18, se muestran en el cuadro 19:

Cuadro 19 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
1	97.45	16	100.00
2	91.64	17	100.00
3	100.00	18	100.00
4	99.28	19	100.00
5	99.79	20	100.00
6	99.28	21	98.06
7	99.79	22	100.00
8	100.00	23	100.00
9	100.00	24	100.00
10	100.00	25	100.00
11	100.00	26	100.00
12	100.00	27	100.00
13	96.53	28	99.28
14	97.35	29	99.79
15	100.00	30	100.00

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 19 se presentan en el cuadro 20:

Cuadro 20 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
Media poblacional	99.27
Desviación estándar	1.71
Intervalo de confianza	(95.85 - 100.00)
Coefficiente de variación	1.72

Los resultados del porcentaje de Fagocitosis por 200 PMN, se muestran en el cuadro 21

Cuadro 21 .

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	94.0	16	95.5
2	95.5	17	96.5
3	95.0	18	94.0
4	94.5	19	94.5
5	94.5	20	96.0
6	96.0	21	94.5
7	94.0	22	98.0
8	94.5	23	96.3
9	96.5	24	94.5
10	96.0	25	97.0
11	97.0	26	96.8
12	96.5	27	95.5
13	96.5	28	96.5
14	94.0	29	96.3
15	96.5	30	97.0

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 21 se presentan en el cuadro 22:

cuadro 22 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	95.7
Desviación estándar	1.1
Intervalo de confianza	(93.5 - 97.9)
Coefficiente de variación	1.1

Los resultados del Porcentaje de Fagocitosis con respecto a la media poblacional del cuadro 22, se muestran en el cuadro 23:

Cuadro 23 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	98.22	16	99.79
2	99.79	17	100.00
3	99.26	18	98.22
4	98.74	19	98.74
5	98.74	20	100.00
6	100.00	21	98.74
7	98.22	22	100.00
8	98.74	23	100.00
9	100.00	24	98.74
10	100.00	25	100.00
11	100.00	26	100.00
12	100.00	27	99.79
13	100.00	28	100.00
14	98.22	29	100.00
15	100.00	30	100.00

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 23 se presentan en el cuadro 24.

Cuadro 24 .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	99.65
Desviación estándar	0.70
Intervalo de confianza	(98.25 - 100.00)
Coefficiente de variación	0.70

Los resultados del Índice Fagocítico por 200 PMN, se muestran en el cuadro 25

Cuadro 25 ...

NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO	NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO
1	3.04	16	2.30
2	2.60	17	2.37
3	2.73	18	2.36
4	2.36	19	2.39
5	2.39	20	2.14
6	2.38	21	2.38
7	2.14	22	2.30
8	2.21	23	2.21
9	2.62	24	2.83
10	2.22	25	2.30
11	2.34	26	2.40
12	2.41	27	2.20
13	2.64	28	2.00
14	2.70	29	2.70
15	2.20	30	2.60

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 25 se presentan en el cuadro 26

Cuadro 26 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ÍNDICE FAGOCÍTICO
Media poblacional	2.42
Desviación estándar	0.24
Intervalo de confianza	(1.94 - 2.90)
Coefficiente de variación	9.90

Estudio de 20 muestras pareadas con la técnica espectrofotométrica utilizando *Cándida albicans* y Zymosan-A

Los resultados del Porcentaje de Fagocitosis de *Cándida albicans* por 200 PMN se presentan en el cuadro 27



Cuadro 27 .

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	96 0	11	94 0
2	94 0	12	95 5
3	97 0	13	96 0
4	96 0	14	96 0
5	96 0	15	96 0
6	96 5	16	97 0
7	96 0	17	98 0
8	96 5	18	96 0
9	96 0	19	96 0
10	94 0	20	94 0

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 27 se presentan en el cuadro 28

Cuadro 28 . .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	95 62
Desviación estándar	1 07
Intervalo de confianza	(93 68-97 96)
Coefficiente de variación	1 10

Los resultados para Porcentaje de Fagocitosis con *Canabata albicans* con respecto a la media poblacional del cuadro 28 se muestran en el cuadro 29:

Cuadro 29 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100 0	11	98 1
2	98 1	12	99 6
3	100 0	13	100 0
4	100 0	14	100 0
5	100 0	15	100 0
6	100 0	16	100 0
7	100 0	17	100 0
8	100 0	18	100 0
9	100 0	19	100 0
10	98 1	20	98 1

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 29 se presentan en el cuadro 30.

Cuadro 30 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	99.60
Desviación estándar	0.77
Intervalo de confianza	(98.6-100.0)
Coefficiente de variación	0.70

Los resultados del Índice Fagocítico con respecto a 200 PMN, se muestran en el cuadro 31.

Cuadro 31 ...

NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO	NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO
1	2.62	11	2.44
2	2.87	12	2.77
3	2.69	13	2.91
4	2.60	14	3.14
5	3.18	15	3.12
6	3.02	16	3.13
7	2.91	17	2.71
8	2.89	18	2.97
9	2.90	19	2.89
10	2.83	20	2.91

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 31 se presentan en el cuadro 32.

Cuadro 32 .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ÍNDICE FAGOCÍTICO
Media poblacional	2.87
Desviación estándar	0.19
Intervalo de confianza	(2.49-3.25)
Coefficiente de variación	6.60

Los resultados del Porciento de Fagocitosis de Zyosan-A por 200 PMN se presentan en el cuadro 33

Cuadro 33

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	98 0	11	98 0
2	97 0	12	97 0
3	98 0	13	97 0
4	99 0	14	98 0
5	98 0	15	98 0
6	99 0	16	97 0
7	97 0	17	98 0
8	98 0	18	97 0
9	99 0	19	98 0
10	97 0	20	97 0

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 33 se presentan en el cuadro 34

Cuadro 34 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	97 75
Desviación estándar	0 71
Intervalo de confianza	(96 33 - 99 17)
Coefficiente de varación	0 70

Los resultados para Porciento de Fagocitosis con Zyosan-A con respecto a la media poblacional del cuadro 34 se muestran en el cuadro 35

Cuadro 35

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100 00	11	100 00
2	99 48	12	99 48
3	100 00	13	99 48
4	100 00	14	100 00
5	100 00	15	100 00
6	100 00	16	99 48
7	99 48	17	100 00
8	100 00	18	99 48
9	100 00	19	100 00
10	99 48	20	99 48

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 35 se presentan en el cuadro 36:

Cuadro 36 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	99.79
Desviación estándar	0.26
Intervalo de confianza	(99.27 - 100.00)
Coefficiente de variación	0.26

Estudio de 6 muestras pareadas con la técnica espectrofotométrica usando cianuro de potasio:

Los resultados de Porcentaje de Reducción de *Candida albicans* por 200 PMN se presentan en el cuadro 37

Cuadro 37 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
1	100.0
2	98.0
3	99.0
4	100.0
5	99.0
6	98.0

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 37 se presentan en el cuadro 38:

Cuadro 38 .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
Media poblacional	99.00
Desviación estándar	0.89
Intervalo de Confianza	(97.22 - 100.00)
Coefficiente de variación	0.89

Los resultados del Porcentaje de Fagocitosis de *Candida albicans* por 200 PMN se presentan en el cuadro 39

Cuadro 39 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	95.0
2	94.6
3	94.0
4	95.0
5	94.0
6	94.5

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 39 se presentan en el cuadro 40

Cuadro 40 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	94.51
Desviación estándar	0.44
Intervalo de confianza	(93.63 - 95.39)
Coefficiente de variación	0.40

Los resultados para Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* con respecto a la media poblacional del cuadro 40 se muestran en el cuadro 41.

Cuadro 41 ..

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100.00
2	100.00
3	99.46
4	100.00
5	99.46
6	99.98

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 41 se presentan en el cuadro 42:

Cuadro 42 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	99.61
Desviación estándar	0.27
Intervalo de confianza	( 99.27 - 100.00 )
Coefficiente de variación	0.27

Los resultados del Índice Fagocítico por 200 PMN, se muestran en el cuadro 43.

Cuadro 43 ...

NÚMERO DE MUESTRA	INDICE FAGOCÍTICO
1	2.40
2	2.02
3	2.78
4	2.50
5	2.36
6	2.82

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 43 se presentan en el cuadro 44:

Cuadro 44

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	INDICE FAGOCÍTICO
Media poblacional	2.48
Desviación estándar	0.29
Intervalo de confianza	( 1.9 - 3.06 )
Coefficiente de variación	11.69

Los resultados del Porciento de Fagocitosis de Zymosan-A con respecto a la cuenta de 200 PMN se presentan en el cuadro 45

Cuadro 45 ..

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	97 0
2	98 0
3	98 0
4	96 0
5	98 0
6	98 0
7	97 0
8	98 0

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 45 se presentan en el cuadro 46.

Cuadro 46

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	97 50
Desviación estándar	0 75
Intervalo de confianza	(96 00 - 99 00)
Coefficiente de variación	0 70

Los resultados para Porciento de Fagocitosis con Zymosan-A con respecto a la media poblacional del cuadro 46 se muestran en el cuadro 47.

Cuadro 47..

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	99 48
2	100 00
3	100 00
4	98 46
5	100 00
6	100 00
7	99 48
8	100 00

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 47 se presentan en el cuadro 48:

Cuadro 48 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	99.67
Desviación estándar	0.54
Intervalo de confianza	(98.59 - 100.00)
Coefficiente de variación	0.54

Resultados globales para Fagocitosis de *Candida albicans*. Los Parámetros estadísticos de los resultados globales para Porcentaje de Reducción se presentan en el cuadro 49:

Cuadro 49 ..

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
Media poblacional	98.36
Desviación estándar	1.90
Intervalo de Confianza	(94.56 - 100.00)
Coefficiente de variación	1.93

En el cuadro 50 se muestran los resultados finales para Porcentaje de Reducción:

Cuadro 50 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE REDUCCIÓN
1	97.29	19	100.00
2	91.50*	20	100.00
3	100.00	21	97.90
4	99.12	22	100.00
5	99.63	23	100.00
6	99.12	24	100.00
7	99.63	25	100.00
8	100.00	26	100.00
9	100.00	27	100.00
10	100.00	28	99.12
11	100.00	29	99.63
12	100.00	30	100.00
13	96.38	31	100.00
14	97.19	32	99.63
15	100.00	33	100.00
16	100.00	34	100.00
17	100.00	35	100.00
18	100.00	36	99.63

Nota: los valores que presentan el símbolo \* salen del intervalo de confianza



**Los valores normales para Porcentaje de Reducción son los siguientes:  
de 96.10 % a 100.00 %.**

Los Parámetros estadísticos de los resultados globales para Porcentaje de Fagocitosis se presentan en el cuadro 51:

Cuadro 51 .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	95.59
Desviación estandar	1.11
Intervalo de confianza	(93.37 - 97.81)
Coefficiente de variación	1.16

En el cuadro 52 se muestran los resultados finales para porcentaje de Fagocitosis

Cuadro 52 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	98.33	20	100.00	39	100.00
2	99.90	21	98.85	40	98.33
3	99.38	22	100.00	41	98.33
4	98.85	23	100.00	42	99.90
5	98.85	24	98.85	43	100.00
6	100.00	25	100.00	44	100.00
7	98.33	26	100.00	45	100.00
8	98.85	27	99.90	46	100.00
9	100.00	28	100.00	47	100.00
10	100.00	29	100.00	48	100.00
11	100.00	30	100.00	49	100.00
12	100.00	31	100.00	50	98.33
13	100.00	32	98.33	51	99.38
14	98.33	33	100.00	52	98.96
15	100.00	34	100.00	53	98.33
16	99.90	35	100.00	54	99.38
17	100.00	36	100.00	55	98.33
18	98.33	37	100.00	56	98.85
19	98.85	38	100.00		

**Los valores normales para Porcentaje de Fagocitosis son los siguientes:  
de 98.15 % a 100.00 %.**

En el cuadro 53 se muestran los resultados finales para Índice Fagocítico:

Cuadro 53 ..

NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO	NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO	NÚMERO DE MUESTRA	ÍNDICE FAGOCÍTICO
1	3.04	20	2.14	39	2.90
2	2.60	21	2.38	40	2.83
3	2.73	22	2.30	41	2.44
4	2.36	23	2.21	42	2.77
5	2.39	24	2.83	43	2.91
6	2.38	25	2.30	44	3.14
7	2.14	26	2.40	45	3.12
8	2.21	27	2.20	46	3.13
9	2.82	28	2.00	47	2.71
10	2.22	29	2.70	48	2.97
11	2.34	30	2.60	49	2.89
12	2.41	31	2.62	50	2.91
13	2.64	32	2.87	51	2.40
14	2.70	33	2.69	52	2.02
15	2.20	34	2.60	53	2.78
16	2.30	35	3.18	54	2.50
17	2.37	36	3.02	55	2.36
18	2.36	37	2.91	56	2.82
19	2.39	38	2.89		

**Los valores normales para Índice Fagocítico son los siguientes:  
de 1.97 a 3.21**

Resultados globales para fagocitosis de Zymosan-A.

Los Parámetros estadísticos de los resultados globales para Porcentaje de Fagocitosis se presentan en el cuadro 54:

Cuadro 54 .

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	97.67
Desviación estándar	0.72
Intervalo de confianza	(96.23 - 99.11).
Coefficiente de variación	0.73

En el cuadro 55 se muestran los resultados finales para porcentaje de Fagocitosis:

Cuadro 55 ..

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100 00	15	100 00
2	99 31	16	99 31
3	100 00	17	100 00
4	100 00	18	99 31
5	100 00	19	100 00
6	100 00	20	100 00
7	99 31	21	99 31
8	100 00	22	100 00
9	100 00	23	100 00
10	99 31	24	98 39
11	100 00	25	100 00
12	99 31	26	100 00
13	99 31	27	99 31
14	100 00	28	100 00

**Los valores normales para Porcentaje de Fagocitosis son los siguientes:  
de 98.85 % a 100.00 %.**

Para adaptar a microtécnica la técnica de Reducción de NBT espectrofotométrica los volúmenes originales de reactivos se disminuyeron a la décima parte quedando como se muestra en el cuadro 56:

Cuadro 56 ...

SOLUCIÓN EMPLEADA	VOLUMEN PARA REPOSO	VOLUMEN PARA FAGOCITANDO
Amortiguador	90 $\mu$ L	40 $\mu$ L
Zymosan -A o <i>C. albicans</i>	00 $\mu$ L	50 $\mu$ L
KCN	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
NBT 0 1%	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Suspensión de Leucos	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
HCl	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
Pindina	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L

Por la disminución de los volúmenes no se pudieron utilizar tubos de vidrio ya que el volumen total era muy pequeño y después de centrifugar se pierde el sedimento. Se utilizó una microplaca de 96 pozos para ELISA, los problemas para su uso fueron los siguientes:

- a) El volumen después de agregar el HCL queda al ras y no es tan fácil agitar
- b) Después de la centrifugación para obtener el formazan si no se tiene la técnica adecuada para decantar, o no se decanta en el tiempo correcto se corre el riesgo de perder el sedimento.
- c) Al agregarle el solvente y agitar frecuentemente se pierde volumen y esto afecta el resultado final.

Para utilizar la placa para ELISA se cambió la piridina ya que ésta la daña, se cambió por alcohol isopropílico acidificado (0.04M con ácido clorhídrico), pero este no fue funcional ya que no disuelve completamente el formazan obtenido después de la reacción de reducción. Posteriormente se utilizaron tubos ependorf con capacidad de 2.5 mL para el montaje de la técnica pero tampoco pudo utilizarse piridina porque a éstos también los disuelve, otro disolvente que se cita en bibliografía es el dioxano, que por último fue el de elección ya que disuelve el formazan y no le causa daño a los tubos

Se estudiaron cuatro concentraciones diferentes de leucocitos, apreciando la cantidad del formazan cualitativamente juzgandola por cruces después de haber agregado el solvente, poniendo un signo negativo en el pozo donde no se observaron las partículas sedimentadas, la cantidad de formazan obtenido esta con respecto a una incubación de 10 minutos con los leucocitos vivos. Estas observaciones son relativas ya que se estaba utilizando alcohol isopropílico como solvente, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 57:

Cuadro 57 .

CONCENTRACION DE LEUCÓCITOS	CANTIDAD CUALITATIVA DE FORMAZAN
800,000	+++++
400,000	+++
200,000	+
100,000	-

El cianuro de potasio se usa como un estabilizador, ya que obliga la vía anaeróbica, para la respuesta fagocítica, cuando se emplea éste se observan lecturas más uniformes, y con un coeficiente de variación más pequeño. También se hicieron pruebas sin el cianuro de potasio estos valores son más inestables y tienen un coeficiente de variación más grande pero reflejan la realidad del proceso fagocítico.

Se utilizaron tres equipos para la medición de las lecturas, así como también diferentes condiciones las cuales se mencionan a continuación:

a) Lector para ELISA computarizado BIOMEK de Organon Technica. Este lector tiene solo dos diferentes longitudes de onda las cuales son . 1.- 490 nm con filtro de referencia de 600 nm, 2 - 600 nm sin filtro de referencia.

b) Lector de ELISA, Reader 100 los problemas que se presentaron para la lectura en este lector fueron

- En el programa para eliminar la absorbancia del blanco las lecturas que se obtienen son negativas en ocasiones, o muy inestables en otras.

- En el programa de lectura rápida se debe leer el blanco por separado y luego restar esta absorbancia a los problemas, pero éste método no es tan eficaz, y por otra parte el solvente utilizado no era el apropiado

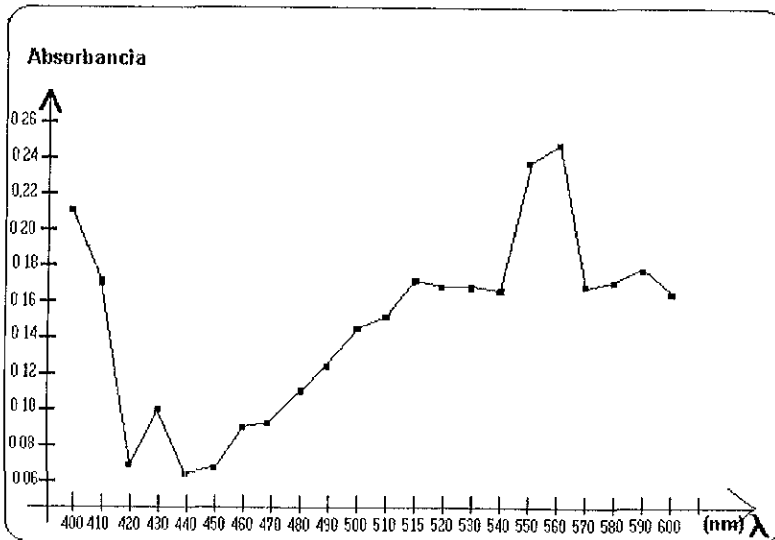
c) Espectrofotómetro Beckman DU-600, con capacidad de 100  $\mu\text{L}$ , en él se midió perfectamente el volumen adecuado, con el solvente adecuado que es el Dioxano, las lecturas que se obtienen se hacen a la longitud de onda adecuada y son más estables.

Al emplear el solvente adecuado ya no queda sedimento por lo tanto todo el formazan se disuelve en 250  $\mu\text{L}$ . La técnica original reporta que la lectura debe hacerse a 515 nm pero para éste caso se determinó la longitud de onda a la cual hay más absorvancia obteniendose los resultados que se muestran el cuadro 58 y la grafica 1:

Cuadro 58 ..

LONGITUD DE ONDA $\lambda$ nm	ABSORVANCIA	LONGITUD DE ONDA $\lambda$ nm	ABSORVANCIA
400	0 2170	510	0 1585
410	0 1766	515	0 1796
420	0 0753	520	0 1720
430	0 1014	530	0 1734
440	0 0862	540	0 1725
450	0 0669	550	0 2399
460	0 0925	560	0 2460
470	0 0993	570	0 1701
480	0 1114	580	0 1728
490	0 1267	590	0 1790
500	0 1451	600	0 1681

Grafica 1 .



## Técnica obtenida y estandarizada para Reducción de NBT espectrofotométrica

- 1.- Rotular los tubos como R (reposo) y F (fagocitando) En el caso de usar más de un antígeno para fagocitar especificar que es lo que se esta fagocitando, por ejemplo FCa (fagocitando *Candida albicans*) y FZ (fagocitando Zymosan-A). Las pruebas se hacen por duplicado.
- 2 - A los tubos en reposo agregar

Amortiguador Krebs Henseleit		90 µL
NBT al 0.1%	50 µL	
Susp. Levaduras C= $8 \times 10^6$	00 µL	
o		
Susp de Zymosan-A 1mg/ml	00 µL	
Susp Leucositos C= $2 \times 10^6$	100 µL	
- 3 - A los tubos fagocitando agregar .

Amortiguador Krebs Henseleit		40 µL
NBT al 0.1%	50 µL	
Susp. Levaduras C= $8 \times 10^6$	50 µL	
o		
Susp. de Zymosan-A 1mg/ml		50 µL
Susp Leucositos C= $2 \times 10^6$	100 µL	
- 4 - Incubar por 30 min a 37°C
- 5 - Parar la reacción con 300 µL de ácido clorhídrico 2.5 N
- 6 - Centrifugar a 3000 rpm por 15 min
- 7 - Desechar el sobrenadante
- 8.- Agregar al sedimento 250 µL de dioxano
- 9 - Agitar en vortex hasta disolución total
- 10.- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min
- 11 - Pasar el sobrenadante a un tubo limpio
- 12 - Leer en un espectrofotómetro a 560 nm
- 13.- Realizar el cálculo de la siguiente manera:

Absorvancia del tubo fagocitando - Absorvancia del tubo en reposo

- 14 - Para sacar el porciento de Fagocitosis se saca la media poblacional y se emplea la siguiente ecuación

$$\frac{\text{Absorvancia del problema}}{\text{Media poblacional}} \times 100$$

Estudio de 8 muestras empleando Cianuro de Potasio. La lectura se hizo a 515 nm como lo indica la referencia bibliografica Se empleo para fagocitar Zymosan-A y *Candida albicans*.

Las absorvancias obtenidas en la Fagocitosis de *Candida albicans* se muestran en el cuadro 59

Cuadro 59 ..

NÚMERO DE MUESTRA	ABSORVANCIA
1	0 0823
2	0 0654
3	0 0632
4	0 0589
5	0 0582
6	0 0455
7	0 0406
8	0 0414

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 59 se presentan en el cuadro 60.

Cuadro 60 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABSORVANCIA
Media poblacional	0 0569
Desviación estándar	0 0141
Intervalo de confianza	(0 0287 - 0 0851)
Coefficiente de variación	24 78

Los resultados obtenidos para porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* tomando en cuenta la media poblacional del cuadro 60 se muestran en el cuadro 61:

Cuadro 61 ..

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100 00
2	100 00
3	100 00
4	100 00
5	100 00
6	79 96
7	71 36
8	72 75

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 61 se presentan en el cuadro 62

Cuadro 62 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	90.50
Desviación estándar	13.33
Intervalo de confianza	(63.84 - 100.00)
Coefficiente de variación	14.72

Las absorbancias obtenidas en la Fagocitosis de Zymosan-A se muestran en el cuadro 63

Cuadro 63 .

NÚMERO DE MUESTRA	ABSORVANCIA
1	0.1060
2	0.0760
3	0.0853
4	0.0939
5	0.1026
6	0.0682
7	0.0562
8	0.0560

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 63 se presentan en el cuadro 64

Cuadro 64

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABSORVANCIA
Media poblacional	0.0775
Desviación estándar	0.0221
Intervalo de confianza	(0.0333 - 0.1217)
Coefficiente de variación	28.56



Los resultados obtenidos para por ciento de Fagocitosis con Zymosan-A tomando en cuenta la media poblacional del cuadro 64 se muestran en el cuadro 65:

Cuadro 65 ...

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100.00
2	100.00
3	100.00
4	100.00
5	100.00
6	88.00
7	72.51
8	72.25

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 65 se presentan en el cuadro 66:

Cuadro 66 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
Media poblacional	91.59
Desviación estándar	12.56
Intervalo de confianza	(56.47 - 100.00)
Coefficiente de variación	13.71

Estudio de 31 muestras del banco de sangre del Hospital Infantil de Mexico "Federico Gómez". Este estudio se realizó sin cianuro de potasio, la lectura se realizó a 560 nm en la longitud de onda de mayor absorción que dio en el barrido espectrofotométrico. Se empleo para fagocitar Zymosan-A y *Candida albicans*.

Las absorbancias obtenidas en la Fagocitosis de *Candida albicans* se muestran en el cuadro 67.

Cuadro 67 ...

NÚMERO DE MUESTRA	ABSORVANCIA	NÚMERO DE MUESTRA	ABSORVANCIA
1	0.0217	16	0 0179
2	0.0173	17	0 0138
3	0 0130	18	0 0118
4	0 0166	19	0 0116
5	0.0225	20	0.0283
6	0 0202	21	0 0118
7	0 0220	22	0 0215
8	0 0141	23	0 0180
9	0 0152	24	0 0279
10	0 0171	25	0.0248
11	0 0193	26	0 0169
12	0 0160	27	0 0148
13	0 0145	28	0 0154
14	0 0234	29	0 0105
15	0 0117	30	0 0189
		31	0 0256

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 67 se presentan en el cuadro 68

Cuadro 68 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABSORVANCIA
Media poblacional	0 0178
Desviación estándar	0 0049
Intervalo de confianza	(0.0080 - 0 0276)
Coefficiente de variación	27 52

Los resultados obtenidos para porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* tomando en cuenta la media poblacional del cuadro 68 se muestran en el cuadro 69:

Cuadro 69.

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100.00	16	100.00
2	97.19	17	77.52
3	73.03	18	66.29
4	93.25	19	65.16
5	100.00	20	100.00
6	100.00	21	66.21
7	100.00	22	100.00
8	79.21	23	100.00
9	85.39	24	100.00
10	96.06	25	100.00
11	100.00	26	94.94
12	89.88	27	83.14
13	81.46	28	86.51
14	100.00	29	58.98*
15	65.73	30	100.00
		31	100.00

Los valores normales para Porcentaje de fagocitosis con *Candida albicans* son los siguientes:  
61.95 % a 100.00%.

Las absorbancias obtenidas en la Fagocitosis de Zymosan-A se muestran en el cuadro 70

Cuadro 70 ...

NÚMERO DE MUESTRA	ABSORVANCIA	NÚMERO DE MUESTRA	ABSORVANCIA
1	0.0684	16	0.0523
2	0.0668	17	0.0636
3	0.0552	18	0.0710
4	0.0703	19	0.0719
5	0.0619	20	0.0520
6	0.0716	21	0.0679
7	0.0556	22	0.0593
8	0.0732	23	0.0506
9	0.0748	24	0.0644
10	0.0764	25	0.0573
11	0.0549	26	0.0612
12	0.0755	27	0.0650
13	0.0567	28	0.0731
14	0.0560	29	0.0489
15	0.0730	30	0.0647
		31	0.0511

Los parámetros estadísticos básicos del cuadro 70 se presentan en el cuadro 71:

Cuadro 71 ...

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ABSORVANCIA
Media poblacional	0.0630
Desviación estándar	0.0085
Intervalo de confianza	(0.0460 - 0.0800)
Coefficiente de variación	13.49

Los resultados obtenidos para porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A tomando en cuenta la media poblacional del cuadro 71 se muestran en el cuadro 72:

Cuadro 72 ..

NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS	NÚMERO DE MUESTRA	PORCIENTO DE FAGOCITOSIS
1	100.00	16	83.01
2	90.15	17	100.00
3	87.60	18	100.00
4	100.00	19	100.00
5	96.25	20	82.53
6	100.00	21	100.00
7	88.25	22	94.12
8	100.00	23	80.31
9	100.00	24	100.00
10	100.00	25	90.95
11	87.14	26	97.14
12	100.00	27	100.00
13	90.00	28	100.00
14	88.00	29	77.61*
15	100.00	30	100.00
		31	81.11

Los valores normales que se obtuvieron para Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A son: 79.13% a 100.00%.

### Estudio estadístico para cada grupo de muestras.

El estudio estadístico se realizó para los grupos de muestras pareadas, por el método estadístico de la  $t$  de Student para muestras pareadas

Los resultados se muestran a continuación

1 - Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* en placa (cuadro 29), contra Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A en placa (Cuadro 35)

$t$  de tablas(0.001)=3.883 y  $t$  experimental = 0.412, siendo  $H_0$  verdadera

2 - Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* espectrofotométrica (cuadro 67), contra Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A espectrofotométrica (Cuadro 72)

$t$  de tablas(0.001)= 3.646 y  $t$  experimental = 1.66, siendo  $H_0$  verdadera.

3 - Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* en placa (cuadro 29), contra Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* espectrofotométrica (Cuadro 67, hasta número 20).

$t$  de tablas(0.001)= 3.883 y  $t$  experimental = 3.77, siendo  $H_0$  verdadera.

4 - Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A en placa (cuadro 35), contra Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A espectrofotométrica (Cuadro 72)

$t$  de tablas(0.001)= 3.883 y  $t$  experimental = 2.10, siendo  $H_0$  verdadera.

5 - Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* en placa (cuadro 39), contra Porcentaje de Fagocitosis con *Candida albicans* espectrofotométrica con Cianuro de Potasio (Cuadro 59)

$t$  de tablas(0.001)= 6.859 y  $t$  experimental = 0.3919, siendo  $H_0$  verdadera.

6.- Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A en placa (cuadro 47), contra Porcentaje de Fagocitosis con Zymosan-A espectrofotométrica con Cianuro de Potasio (Cuadro 65)

$t$  de tablas(0.001)= 6.859 y  $t$  experimental = 0.5630, siendo  $H_0$  verdadera

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Primeramente en la técnica de Obtención de Leucocitos se estandarizó analizando cada uno de los pasos, fue muy importante el tipo de reactivos que se utilizaron así como la cantidad y el tiempo que se empleó en cada paso

Se pudo observar por medio de la utilización de diferentes anticoagulantes (heparina y EDTA) que tienen una fuerte influencia sobre los leucocitos modificándoles su actividad natural como la adherencia a la placa de vidrio o la fragilidad que presentan al manipularlos en los lavados. Posteriormente se utilizó una perla de vidrio para desfibrinar la sangre cuando se incorpora con el Alsever-gelatina al 3%, solo que al emplearla se presentan algunos inconvenientes como los siguientes. a) si no se agita suavemente podemos romper algunos leucocitos, b) si no se agita el tiempo apropiado se forman coágulos que secuestran a los leucocitos disminuyendo su número, c) debe emplearse un número adecuado de perlas de vidrio para obtener una buena desfibrinación (una perla por cada 0.5 mL de sangre), sin embargo es el mejor anticoagulante para el objetivo que perseguimos.

Al estudiar la cantidad de leucocitos presentes en cada uno de los volúmenes establecidos (3.0, 1.0 y 0.5 mL), se quiso conocer cual era el volumen mínimo permisible para montar la técnica ya que la meta que se persigue es aplicarla a neonato

De los métodos para lisar eritrocitos se analizaron algunos de ellos (agua destilada, solución de ácido acético al 2% y solución de ácido acético al 1%), combinándolos con el tiempo de contacto, esto es importante para no dañar a los Leucocitos.

Al eliminar a los eritrocitos de la suspensión de Leucocitos es sumamente importante no dañar a estos últimos, para no disminuir su porcentaje de viabilidad, por lo cual se adiciona rápidamente ya sea solución de Hanks o MEM, por los resultados obtenidos se recomienda usar el MEM ya que amortigua más el medio ácido en el que se encuentran y tenemos una mayor viabilidad.

Para lograr la estandarización de la técnica de Reducción de NBT en placa se diseñaron los portaobjetos especiales con dos círculos de 1.5 cm de diámetro, de esta manera se tiene una *superficie delimitada y un mayor control sobre las células adheridas, la cuenta debe hacerse hacia el centro del círculo que es la superficie donde se concentran los Leucocitos*, se cuantificaron las células que realmente se están muestreando tomando en cuenta la cantidad de PMN presentes en la alcuota depositada en el círculo realizando un ajuste con el porcentaje de PMN reportados en la bibliografía ya que la cuenta es de leucocitos totales. El tiempo de incubación para la adhesión es importante ya que si se sobrepasa forman sincicios que dificultan la observación de las células individuales. Así como también la concentración de la suspensión de levaduras si su número supera en más del 5% de la concentración de los Leucocitos éstos se indigestan y se rompen. La reducción del NBT se lleva a cabo en un medio isotónico, por lo que es comprensible que al utilizar agua como solvente sea mínima, sin embargo, para observar una buena reducción se empleó una concentración de NBT al 0.2%

La adaptación y estandarización de la técnica de Reducción de NBT espectrofotométrica requirió de la disminución de los volúmenes a una décima parte del volumen en la técnica original. Para utilizar la placa de 96 pozos (placa para ELISA) se modificó el solvente, en lugar de utilizar pirdina (que disuelve la placa) se usó alcohol isopropílico pero sin un buen resultado ya que la disolución del formazan no es completa. Se estudiaron varias concentraciones de Leucocitos las cuales se mencionan en la sección de resultados, se empleó la de 200,000 Leucocitos en 100  $\mu$ L para tener las mismas condiciones que el la técnica de placa. La técnica original emplea cianuro de potasio éste actúa sobre la cadena respiratoria obligando la vía anaeróbica, se optó por no utilizarlo para incluir en la respuesta fagocítica el estallido respiratorio, sin embargo en los resultados finales dada la pequeña cantidad de células no hay diferencia estadística significativa entre el uso del cianuro de potasio y el no usarlo

Para la lectura del color final de la reacción se intentó usar los lectores para ELISA pero no fueron apropiados para la lectura ya que se emplean solventes que dañan a la placa y las lecturas no son confiables. La lectura se hizo en un espectrofotómetro con capacidad de 100  $\mu$ L. La técnica original marca que la lectura debe hacerse a 515 nm, y se realizó un barrido espectrofotométrico en el cual obtuvimos, que en las condiciones en las que se trabajó la longitud de onda de mayor absorción es en 560 nm. En ambas técnicas se utiliza para fagocitar *Candida albicans* muerta y ópsonizada o Zymosan-A, en la espectrofotométrica no se identifica ninguna diferencia, sin embargo en la de placa al utilizar Zymosan-A las células se ven como manchones y cuando están muy juntas no se distingue cuantas células hay, tampoco puede sacarse el valor del índice fagocítico.

En la comparación de las técnicas estandarizadas se cotejan los reactivos, el tiempo de realización y el equipo necesario

La cantidad de soluciones utilizadas en la técnica de placa es menor que la empleada en la técnica espectrofotométrica.

El tiempo que se emplea en procesar 1 muestra por el método de placa, incluyendo el que se requiere para la obtención de Leucocitos es de aproximadamente 4 horas, y para el método espectrofotométrico es de 7 horas

El equipo requerido para la técnica en placa que no se utiliza en la técnica espectrofotométrica es una cámara húmeda, un microscopio y un contador para células. El que se emplea en la espectrofotométrica es: microcentrifuga, vortex, espectrofotómetro con celdas para 100  $\mu$ L el equipo utilizado en ésta es más costoso

Al realizar el estudio estadístico a los resultados que se obtuvieron en la aplicación de las dos técnicas no se encontró diferencia significativa entre éstas, sugiriéndose la similitud en la precisión de los resultados para ambas técnicas cotejándolas con los resultados obtenidos de la población estudiada (adultos)

## CONCLUSIONES

- 1.- La técnica de Reducción de NBT en placa evalúa la funcionalidad de aproximadamente 80,000 PMN a partir de 500  $\mu$ L de sangre, lo que equivale al  $4.92 \times 10^{-4}\%$  real de PMN estudiados considerando 5 L de sangre.
- 2 - Se requiere de 0.5 mL de sangre venosa para realizar cada una de las técnicas
- 3.- Los Portaobjetos diseñados para realizar la Fagocitosis en placa si resultaron útiles debido a que se pudo establecer cuantitativamente el número de células estudiadas.
- 4 - Las técnicas de Reducción de NBT en placa y espectrofotométrica se adaptaron a microtécnica obteniéndose resultados similares en ambas.
- 5 - Puede emplearse indistintamente cualquiera de las dos técnicas que evalúan la fagocitosis con la seguridad de obtener un resultado confiable
- 6 - Es igualmente activador de la fagocitosis el Zymosan-A que *Candida albicans* muerta y ópsonizada, por lo que se puede utilizar cualquiera de los dos
- 7 - No hay diferencia en la respuesta fagocítica al utilizar Cianuro de Potasio, o al no utilizarlo.
- 8 - La técnica de Reducción de NBT en placa es rápida, cuantitativa funcionalmente, barata y confiable
- 9 - Ambas técnicas son ideales para recién nacidos, por la cantidad de sangre que se utiliza para su realización
- 10 - La técnica espectrofotométrica tiene la ventaja de ser más fidedigna en relación con el NBT al estallido respiratorio que la de placa



## PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

1 - Cuando se preparen las soluciones debe tomarse en cuenta la pureza y/o las aguas de hidratación que contenga el reactivo a utilizar.

2 - Para preparar la solución amortiguadora de fosfatos con un pH de 7.2, colocar el volumen de la solución B (alcalina) y agregar a manera de titulación potenciométrica el volumen de la solución A (ácida) hasta obtener un pH de 7.2. Con esto evitamos usar bicarbonato de sodio en solución para ajustar el pH.

3.- La sangre para las pruebas puede ser tomada con vacutainer directamente al tubo, o con jeringa en tal caso la sangre debe ser colocada en el Alsever-gelatina a la mayor brevedad posible.

4 - Es muy importante quitar el exceso de sangre del tapón del vacutainer después de la agitación ya que de no ser así al quitarlo después de la incubación ocasiona que haya un gran número de eritrocitos en la capa de los leucocitos.

5.- Si se utiliza el tubo cónico para la separación y purificación de los leucocitos antes de colocar el ácido acético al 1% se deben resuspender en el remanente que le queda al tubo, para facilitar la agitación con el ácido acético al 1% en los 10 seg.

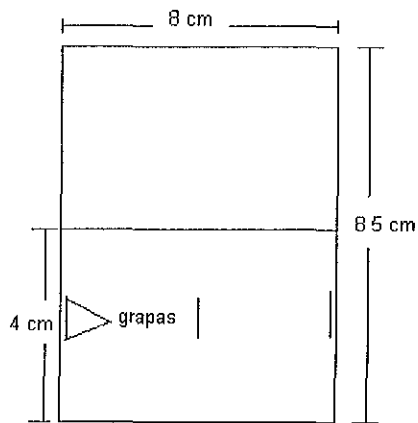
6.- Si se utiliza MEM después de agregar el ácido acético al 1% la viabilidad de los leucocitos es del 100%, si se utiliza sol. de Hanks la viabilidad de los leucocitos puede disminuir hasta el 95%.

7 - Cuando se lava la placa con el PBS se debe deslizar sobre el portaobjetos, ya que si se deja caer de golpe daña a los leucocitos.

8.- Entre el proceso del lavado y la colocación de la suspensión de *Condalia albumin* **no se debe dejar secar**, de lo contrario los leucocitos se fijan y ya no presentan actividad fagocítica.

9 - Después de leer al microscopio con el aceite de inmersión dejar la placa en posición vertical sobre un papel absorbente y dejar escurrir completamente el aceite, posteriormente limpiar cuidadosamente el borde del portaobjetos **Nunca** quitar el exceso de aceite de los orificios del portaobjetos con papel ya que puede remover a los leucocitos.

10.- Para guardar las placas puede confeccionar carteras de cartulina de doble compartimento, esto permite su fácil manejo y las protege de un eventual tallado que pueda destruir la muestra. A continuación se muestra el esquema de la cartera.



11 - En la técnica espectrofotométrica se usan los tubos ependorf de 2 ml de capacidad, para facilitar su manejo es aconsejable cortar la tapita.

12 - Después de centrifugar para eliminar el ácido clorhídrico, voltear los ependorf sobre un papel absorbente. Queda un pequeño remanente que no se debe quitar ya que se puede perder la muestra.

13 - La técnica por espectrofotometría es muy larga por sus tiempos de incubación, esta puede suspenderse en el punto donde se le agrega el ácido clorhídrico, guardándola en refrigeración de preferencia en el REVCO.

14 - Después de agregar el solvente mantener los ependorf tapados, para evitar la evaporación del mismo.

## APENDICE : A

### ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APC	Célula Presentadora de antígeno
C	Concentración
°C	<i>Grado centigrado</i>
C <sub>1</sub>	Fracción del complemento 1
C <sub>2</sub>	Fracción del complemento 2
C <sub>3b</sub>	Fracción del complemento 3-b
C <sub>3bi</sub>	Fracción del complemento 3-b inactivo
C <sub>4</sub>	Fracción del complemento 4
C <sub>5a</sub>	Fracción del complemento 5-a
CLA	Antígeno de Linfocito cutáneo
cbp	Cuanto baste para
cm	Centímetros
CSF	Factor de estimulación de colonias
dil	Dilución
EDTA	Edefeato de sodio
Fc	Fracción del complemento
g	Gramos
IF	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
INPer	Instituto Nacional de perinatología

KD	Kilo daltón
Lev	Levaduras
lb	Libras
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
N	Normal
nm	Nanometros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial hidrógeno
PMN	Polimorfonuclear
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
sol	Solución
Susp	Suspensión
TNF	Factor de necrosis tumoral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
#	Número
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$	Media poblacional
$\pi$	Pi = 3 1416
$\sigma$	Desviación estándar de la población

## APENDICE : B

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### 1.- ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL AL 1%.

Ácido acético glacial 1 mL  
Agua destilada (cbp) 100mL  
Se esteriliza con filtro, se guarda en el refrigerador

#### 2.-ÁCIDO CLORHÍDRICO 2.5 N

Realizar cálculos con pureza y densidad para su preparación.

#### 3.- AGAR PAPA DEXTROSA.

Suspender 39 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Esterilizado enfriar a unos 40-45 °C y vaciar en cajas de petri estériles Guardar en refrigeración

#### 4.- ALSEVER GELATINA AL 3%.

Glucosa 20.50 g  
Citrato trisódico 2-hidrato 08.00 g  
Ácido cítrico 00 55 g  
Cloruro de sodio 04 20 g  
Agua destilada (cbp) 1000 mL  
Gelatina bacteriológica 3%

Añadir gelatina bacteriológica al 3%, calentar suavemente hasta dilución total Se esteriliza en autoclave a 10 Lb durante 20 min, guardar en refrigeración

#### 5.- AMORTIGUADOR KREBS-HENSELEIT.

Reactivo	Molaridad	Partes	Masa/Volumen
Cloruro de sodio	0 154	0 154	100 8.9998 / Litro
Cloruro de potasio	0 154	004	0 5745 / 50mL
Cloruro de calcio	0.110	003	0 6103 / 50mL
Fosfato de potasio	0 154	001	0 5238 /25mL
Sulfato de Mg-7H <sub>2</sub> O	0 154	001	0 9485/ 25mL
Bicarbonato de sodio	-----	021	3 2450 /250mL

Glucosa Se le agregan 260 mg a cada 130 mL de la preparación anterior

El bicarbonato de sodio se agrega aproximadamente 10 mL para llevar a un pH entre 7.2-7.4 y las demás partes aproximadamente 11mL se burbujan con CO<sub>2</sub> antes de adicionarse

Se esteriliza por filtración, se guarda en refrigeración

#### 6.- AZUL TRIPANO AL 0.2 %.

Azul tripano 0 2 g  
Solución salina al 0 85% (cbp) 100 mL

Se esteriliza por filtración, se guarda a temperatura ambiente.

### 7.- CIANURO DE POTASIO 0.01M.

Cianuro de potasio                    0 0650g  
Agua destilada (cbp)                100 mL  
No necesita esterilizarse, guardar en refrigeración

### 8.- CLORURO DE p-NITRO AZUL DE TETRAZOLIO (NBT) AL 0.1%.

Cloruro de p-nitro azul de tetrazolio            0.01g  
Solución salina 0 085% (cbp)                    100mL  
Se esteriliza por filtración, se fracciona en viales estériles con 1 mL. Se guarda en congelación en el REVCO, hasta el momento de su uso.

### 9.- CLORURO DE p-NITRO AZUL DE TETRAZOLIO (NBT) AL 0.2%.

Cloruro de p-nitro azul de tetrazolio            0 02g  
Solución salina 0 85% (cbp)                    100 mL  
Se esteriliza por filtración, y se fracciona en viales estériles con 110 microlitros Se guarda en congelación en el REVCO, hasta el momento de su uso.

### 10.- DIOXANO

No requiere de preparación.

### 11.- MEDIO MÍNIMO ESENCIAL (MEM).

Comercialmente existen dos presentaciones.

- Líquido: se encuentra listo para usarse

- Sólido: trae las indicaciones del volumen en el que se disuelve la cantidad contenida en el frasco. Al disolverla el pH queda ácido, antes de aforar ajustar el pH a 7.0 con una solución de bicarbonato de sodio al 7%, posteriormente aforar con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se guarda en refrigeración.

### 12.- SAFRANINA PARA TINCIÓN DE GRAM.

Safranina                    5.0g  
Fenol                        25 g  
Alcohol de 95%            50mL  
Agua destilada            500 mL

Se disuelve la safranina en fenol con un poco de agua en baño de agua hirviendo, se añade el alcohol y se mezcla, se añade el resto del agua y se filtra antes de usarse Se guarda a temperatura ambiente.

También puede usarse la safranina preparada comercialmente para la tinción de Gram.

### 13.- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH 7.2.

Solución A:

Fosfato de sodio monobásico                    4.14 g  
Cloruro de sodio                                    7.00 g  
Agua destilada (cbp)                            1000 mL

*Solución B*

Fosfato de sodio dibásico 4.26 g  
Cloruro de sodio 7.00 g

Agua destilada (cbp) 1000 mL

Mezclar 12.5 mL de solución A más 37.5 mL de solución B. Esterilizar en autoclave a 20 Lb y 15 minutos

**14.- SOLUCIÓN DE HANKS.**

Glucosa 1.00 g

Cloruro de sodio 8.00 g

Cloruro de potasio 0.40 g

Cloruro de calcio 0.14 g

Cloruro de magnesio 0.10 g

Sulfato de magnesio 0.10 g

Fosfato de sodio dibásico 0.06 g

Fosfato de potasio monobásico 0.06 g

Bicarbonato de sodio 0.35 g

Rojo de fenol 0.02 g

Agua destilada (cbp) 1000 mL

Se esteriliza con filtro, se guarda en el refrigerador.

**15.- SOLUCIÓN SALINA 0.85%.**

Cloruro de sodio 0.85 g

Agua destilada (cbp) 100 mL

Se esteriliza en autoclave a 20 Lb y 15 min, guardar en refrigeración

**Nota.** antes de la preparación de las soluciones consultar el apartado de propuestas y/o recomendaciones.

## APÉNDICE: C

### PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

#### 1.- Suero POOL humano (mezcla de sueros humanos)

Suero homólogo preparado a partir de la recolección de suero sobrante de las pruebas para donadores realizadas para el banco de sangre del INPer, el suero ópsonizante es igual para todas las pruebas. Los sueros seleccionados para formar el POOL deben ser negativos para las siguientes pruebas: Ac contra VIH, Ag de superficie de hepatitis B, Hudlesson (Ac. contra Brucela abortus), detección de reagina sífilítica.

#### 2.- *Candida albicans* Ópsonizada

La cepa de *Candida albicans* se siembra en agar papa dextrosa (PDA) 24 horas antes de ser cosechada. Las colonias se cosechan en solución de fosfatos amortiguada (PBS), para inactivarlas se meten en el autoclave durante 15 minutos a 120° C y 15 libras de presión, posteriormente se lavan tres veces con PBS

Para ópsonizarlas se le agrega un volumen igual al que se tiene de suero POOL humano, se incuba a 37°C por 30 minutos, se lavan tres veces con PBS.

Posteriormente se hace una dilución 1.100 con PBS y se cuentan las levaduras en una cámara de Neubauer para determinar la concentración que se tiene, esta es nuestra suspensión concentrada.

La suspensión de *Candida albicans* debe ser conservada en refrigeración a 4°C, y todo el proceso de preparación debe realizarse en condiciones de esterilidad.

#### - Preparación para técnica Reducción de NBT en placa:

A partir de la suspensión concentrada se hace una dilución para obtener una suspensión a una concentración de  $4 \times 10^6$  levaduras por mililitro. Se lava 1 vez con PBS y se resuspenden en 900 microlitros de solución de Hanks y se le agregan 100 microlitros de una solución de NBT al 0.2%

#### - Preparación para técnica Reducción de NBT espectrofotométrica:

A partir de la suspensión concentrada se hace una dilución para obtener una suspensión a una concentración de  $8 \times 10^6$  levaduras por mililitro. Se lava 1 vez con PBS y se resuspenden en 1 mililitro de solución de Hanks

#### 3.- Zymosan-A

##### - Preparación para su uso en la técnica reducción de NBT en placa.

Lavar el zymosan-A dos veces con solución de Hanks (1mg/mL), resuspender en 900 µL de solución de Hanks y 100 µL de una solución de NBT al 0.2%

##### - Preparación para su uso en la técnica reducción de NBT espectrofotométrica

Lavar el zymosan-A dos veces con solución de Hanks, y resuspender en la cantidad necesaria de solución de Hanks para dejarlo a 1mg/ml.

#### 4.- Preparación de los tubos vacutainer para la toma de muestra

Se destapan los tubos vacutainer (estos pueden ser de dos tipos, los que contienen solo vacío y los que tienen EDTA para estos deben lavarse perfectamente bien y esterilizar por separado los tubos y los tapones) dentro de una campana de flujo laminar (en caso de que no se tenga una campana de este tipo puede utilizarse un par de mecheros de Bunsen) cuidadosamente para evitar que se contaminen, se colocan las perlas de vidrio previamente esterilizadas, 0.5 ml de alsever gelatina (si la muestra se va a trabajar por las dos técnicas deberá colocarse 1 ml de alsever gelatina), colocando el tapón cuidadosamente para no perder la esterilidad

Si fuera necesario (en caso de que la toma de muestra sea con vacutainer), para crear el vacío se le saca 1 ml de aire con una jeringa (o 2 ml si se requiere 1 ml de muestra).



## APÉNDICE : D

### MÉTODOS ESTADÍSTICOS

**Media poblacional:**

El cálculo de la media poblacional simple se obtiene con la ecuación 1<sup>(27)</sup>

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Ecuación 1 .....

Donde:

$\bar{X}$  = Valor de la media muestral

$\sum X_i$  = Sumatoria de todos los valores obtenidos

i = Todos y cada uno de los valores obtenidos

n = Número de eventos o pruebas que componen la muestra

**Varianza y desviación estándar:**

Para el cálculo de la varianza y de la desviación estándar se utilizaron fórmulas que implican una corrección para valores muestrales n-1 en el denominador, esto se debe esencialmente a que si se usaran n en vez de n-1 se estaría subestimando la varianza poblacional

El cálculo de la varianza se hace por medio de la ecuación 2<sup>(27)</sup>.

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$$

Ecuación 2 .....

Donde:

$S^2$  = Valor de la varianza muestral

$\sum$  = Sumatoria de los valores indicados

n = Número de eventos o pruebas que componen la muestra

$X_i$  = Todos los valores obtenidos

$\bar{X}$  = Valor de la media muestral

El cálculo de la desviación estándar se obtiene con la ecuación 3<sup>(27)</sup>

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

Ecuación 3 .....

Donde

$S$  = Desviación estándar para la población de la muestra

$\Sigma$  = Sumatoria de los valores indicados

$n$  = Número de eventos o pruebas que componen la muestra

$X_i$  = Todos los valores obtenidos

$\bar{X}$  = Valor de la media muestral

**Intervalo de confianza:**

El intervalo de confianza son los valores máximo y mínimo permisibles de la media muestral, los valores que caen fuera de este rango deben ser eliminados. Se calcula con la ecuación 4<sup>(27)</sup>.

$$IC = (\bar{X} - 2S \text{ a } \bar{X} + 2S)$$

Ecuación 4 .....

Donde,

IC = Intervalo de confianza

$\bar{X}$  = Valor de la media muestral

2S = Dos veces la desviación estándar

Coefficiente de variación:

El coeficiente de variación se calcula con la ecuación 5<sup>(28)</sup>

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Ecuación 5 .....

Donde:

%CV = Porcentaje del coeficiente de variación

S = Desviación estándar

$\bar{X}$  = Valor de la media muestral

Para muestras pequeñas se realiza una corrección basada en el tamaño de la muestra como se observa en la ecuación 6<sup>(27)</sup>

$$\% CV = \left( 1 + \frac{1}{(4n)} \right) \% CV$$

Ecuación 6 .....

Donde:

%CV\* = Porcentaje del coeficiente de variación corregido

$n$  = Número de eventos o pruebas que componen la muestra

%CV = Porcentaje del coeficiente de variación

### Docimasia de hipótesis:

En la investigación biológica a menudo necesitamos tomar decisiones respecto a diferencias y, para hacerlo, nos servimos de un método importante denominado *docimasia de hipótesis*

Se debe tener primeramente un planteamiento del problema, ¿Qué es lo que queremos saber? generalmente es una comparación con algo conocido o determinado. En la mayoría de los casos no se conocen ni se conocerán nunca los valores reales de  $\mu$  y  $\sigma$ . Sin embargo en los casos que tienen que ver con ciertos valores clínicos, a veces podemos suponer que contamos por lo menos con una buena aproximación bastante buena de  $\mu$  y  $\sigma$  a partir de registros de mediciones obtenidas de millones de individuos

Al efectuar docimasias estadísticas de significación, siempre se debe plantear una hipótesis. Una *hipótesis nula* es simplemente un planteamiento de <<ninguna diferencia>>. Simbólicamente, expresaremos nuestra *hipótesis nula* como:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

que dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la media poblacional general ( $\mu_0$ ) y la media de la población especial ( $\mu$ ) de la cual se toma la muestra.

El empleo de la hipótesis nula está bien fundado en la lógica porque uno no puede <<probar>> una hipótesis. No importa cuánta evidencia confirme una hipótesis específica, uno no puede estar seguro de que el mismo cuerpo de evidencia no confirme igualmente bien muchísimas otras hipótesis alternativas desconocidas. Por otra parte, es lógicamente posible *rechazar* una hipótesis porque esto puede hacerse si se encuentra una evidencia mínima que la contradiga.

La *hipótesis alternativa* puede plantearse como <<alguna diferencia >>. Simbólicamente, expresaremos nuestra hipótesis nula como:

$$H_a: \mu > \mu_0 \quad \text{ó} \quad H_a: \mu < \mu_0$$

El rechazo de la hipótesis nula, nos permite establecer que nuestros resultados estadísticos y experimentales confirman nuestra opinión de que la hipótesis alternativa era cierta.

En los métodos formales de docimasia de hipótesis, deberíamos establecer, *antes* de realizar la docimasia, la probabilidad *máxima* de una diferencia <<solamente aleatoria>> tal que la hipótesis nula será rechazada. Al hacerlo también estamos estableciendo la probabilidad máxima aceptable de que nos equivoquemos al rechazar la hipótesis.

Las posibilidades máximas, o *niveles de significación* que han sido establecidas más o menos arbitrariamente como puntos de rechazo aceptables son 0.05 y 0.01<sup>(29)</sup>

### La *t* de Student:

Aunque los detalles pueden cambiar según los diferentes problemas y situaciones, la docimasia de hipótesis implica básicamente. 1) localizar la estadística muestral en una distribución muestral apropiada, y 2) determinar la distancia relativa de la estadística a la media de dicha distribución. La significación estadística está, por tanto, determinada por la interpretación de los resultados de la relación general

Estadística muestral - Distribución de la media  
Error estándar

En este momento debe recordarse que el error estándar de la media se calcula por:

$$\sigma_{\bar{X}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 7 . . . . .

Siendo  $\sigma$  la desviación estándar poblacional. Puesto que en la mayor parte de las situaciones experimentales prácticas no conocemos el valor de  $\sigma$ , debemos utilizar nuestra desviación estándar muestral (S) como una estimación de  $\sigma$ .

La desviación estándar muestral parece ser una estimación confiable de  $\sigma$  cuando  $n = 100$ .

Debemos considerar ahora que el valor del error estándar determina dónde ubicamos nuestra estadística muestral en la distribución muestral, y está es la base sobre la cual decidiremos rechazar o no la hipótesis nula<sup>(29)</sup>.

Para establecer la veracidad de una u otra hipótesis se aplica la siguiente fórmula basada en las correcciones hechas para muestras pequeñas, siempre y cuando la muestra presente características de una distribución normal y las varianzas sean iguales<sup>(28)</sup>:

$$t = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{\sqrt{\frac{(N_A - 1)S_A^2 + (N_B - 1)S_B^2}{N_A + N_B - 2} \left( \frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B} \right)}}$$

Ecuación 8 . . . . .

Se obtiene el valor de t experimental donde :

$N_A$  = Número de valores de la serie A

$S_A^2$  = Varianza de la serie A

$\bar{X}_A$  = Media de la serie A

$N_B$  = Número de valores de la serie B

$S_B^2$  = Varianza de la serie B

$\bar{X}_B$  = Media de la serie B

Este valor experimental se confronta con valores de t en tablas de una curva de t de Student con el mismo número de eventos y bajo la probabilidad escogida para el estudio. Existen dos posibilidades

Si t experimental  $\leq$  t tablas entonces  $H_0$  es verdadera  $\bar{X}_A = \bar{X}_B$

Si t experimental  $\geq$  t tablas entonces  $H_a$  es verdadera  $\bar{X}_A \neq \bar{X}_B$

**Análisis de diseños de grupos pareados: Observaciones pareadas.**

Ciertas variables independientes pueden ser controladas mejor utilizando el mismo sujeto para ambas pruebas a lo que llamamos muestras pareadas. Posteriormente se ordenan los datos como se muestra en la siguiente tabla<sup>(29)</sup>

# de muestra	Respuesta A	Respuesta B	Diferencia (D - $\bar{D}$ )		$(D - \bar{D})^2$
1	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>
2	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	x <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>
3	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	x <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>
			$\bar{D} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$		$\frac{\sum (D - \bar{D})^2}{n}$

Continuamos entonces con el análisis de la manera siguiente:

1 - Nuestro primer paso consiste en encontrar la diferencia D entre las mediciones tomadas en cada duplicación, debe tomarse en cuenta el signo de la diferencia de A<sub>1</sub>-B<sub>1</sub>, ya sea + ó - .

2.- A continuación determinamos la diferencia medía

3.- Ya que necesitamos calcular S<sub>D</sub>, la desviación estándar de las diferencias, obtenemos la desviación de la media de D de cada diferencia y procedemos a elevar al cuadrado cada desviación y se obtiene la sumatoria de esta. La desviación estándar de las diferencias puede calcularse ahora mediante la aplicación de una fórmula conocida, con los símbolos cambiados

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum (D - \bar{D})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 9 . . . . .

4.- Calculamos ahora el error estándar de la diferencia medía, desviación estándar de D, empleando.

$$S_{\bar{D}} = \frac{S_D}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 10 . . . . .

5 - Ahora que tenemos el error estándar de la distribución muestral, podemos localizar nuestra estadística muestral, media de D, en esta distribución calculamos el valor de t. Esto se hace de la forma

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - Tortora GJ, Anagnostakos NP Principios de anatomía y fisiología. Sexta edición Editorial Harla México DF 1993
- 2.- Tood Sanford Diagnostico y tratamiento clinicos por el laboratorio. 8ª edición. Editorial Salvat México D F 1991
- 3 - Lynch M Métodos de laboratorio, segunda edición, Editorial Interamericana México DF 1977
- 4.- Abul KA, Andrew HL. Inmunología celular y molecular. Segunda edición Editorial Interamericana Madrid España 1995
- 5.- Donald WM, Stewart J Inmunología. Segunda edición Editorial Manual moderno México DF 1995.
- 6 - Sites PD, Terr IA. Inmunología humana y básica Editorial Manual moderno. México D F 1994
- 7 - Gomez GMVR. Adaptación y estandarización de microtécnicas muerte intracelular y fagocitosis para su aplicación en neonatos a término Ciudad Universitaria México D.F 1990.
- 8 - Lara SJ *Papel de los fagocitos en infecciones Infectologia 1988, 8.325*
- 9 - Milles AA, Milles EM. The value and duration of defense reaction of the skin to the primary lodgement of bacteria. Brit J Exper 1957, 38 79
- 10 - Wood WB Jr *Studies on the cellular immunology of acute bacterial infections. Havrey Lect 1951;17 72*
- 11.-Davis BD, Dulbecco In microbiology New York, Hoeber 1967 p 735.
- 12 -Jerry AW, Robert HD *Fagocitosis, el proceso normal y sus anormalidades clinicamente significativas The pediatric Clinics of North America 1974, 21 551*
- 13 -Alper CA, Blok KJ. Inactivator of the third component of complement as an anhibitor in the propedin pathway Proc Natl Acad. Sci USA, 1972, 69.2910
- 14 - Remigton JS, Kelein JO *Infectious diseases of the fetus y newborn infant. 4 edición Editorial WB Saunders Compani USA 1995*
- 15.- Bokish VA Muller HJ *Isolation of fragment chemotactic actvyv and description of an anaphylatoxina inactivator in human serum J Exper med 1969;129 1109*
- 16 -Wright AE. An experimental investgation of the role of the blood fluids in connection wht phagocytosis Proc Roy Soc Ser B Biol Sci 1903, 72 357
- 17 - Boyden SV, North RJ *Complement and the activity of phagocytes Ciba Fundation Symposium on Complement, 1965 p 190*

- 18.-Robbin JB, Kennedy K. The isolation and biological activities of rabbit gamma M and gamma G anti Salmonella typhimurium antibodies J Exper Med 1968;128 553
- 19.- Smith JW, Barnet JA. Comparison of the opsonic activity of gamma G and gamma M anti-proteus globulins. J Immunol 1967;98.336
- 20 - Johnston RB, Klemperer MR The enhancement of bacterial phagocytosis by serum The role of complement components and two cofactors J Exper Med 1969;129 1275.
- 21 -Zucker FD, Hirsch JG. Electron microscope studies on the degranulation of rabbit peritoneal leukocytes during phagocytosis. J Exper Med 1964,120.569.
- 22 - Susan EP, William TS. Aspectos del laboratorio de inmunología. Vol inmunología. Clinical pediatrics of Norteamerica 1994,4.661
- 23 - Coates TD, Beyer LL. Laboratory evaluation of neutropenia and neutrophil dysfunction. In Rose NR, Manual of Clinical laboratory immunology, ed 4 Washington DC American Society for Microbiology 1992 p 408
- 24.- Rebuck JW, Crowley JH. A method of studying leukocytic functions in vivo Ann NY Acad Sci 1955,59.757
- 25.- Del Rey-PinedaG, Gómez-González MV, Solorzano-Santos F, Arredondo-García JL. Assessment of the functional Capacity for Intracellular Death and Phagocytosis of Polymorphonuclear Cells in Healthy Neonates Arch Med Res 1997;28.401
- 26 - Dawson RMC, Elliott DC Data for Biochemical Research. Segunda edición . Editorial Oxford university press. USA 1969
- 27 - Sakal RR, Rohif FJ. Biometry, Segunda edición Editorial WH Freeman and Company. San Francisco California 1981
- 28 .- Barnett RN Clinical laboratory Statistics, Segunda edición Editorial Little Brow and Company Boston 1979.
- 29.- Scheffler WC Biostatística. Segunda edición. Editorial Fondo Educativo Interamericano México DF 1981