



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Evaluación de la fagocitosis *In Vitro* de  
polimorfonucleares de niños infectados con VIH/SIDA  
con diferentes esquemas de tratamiento antirretroviral**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**SERGIO ENRÍQUEZ FLORES**

**M. en C. Noris Marlene del Socorro Pavia Ruiz**

2004

**DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

---

---





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA II  
MEXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Evaluación de la fagocitosis In Vitro de polimorfonucleares de niños infectados con VIH/SIDA con diferentes esquemas de tratamiento antirretroviral. realizado por Sergio Enríquez Flores

con número de cuenta 8916651-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis *Mauricio M. Aguilar González*  
Propietario M. en C. Noris Marlene del Socorro Pavia Ruz

Propietario Dra. Gloria Bertha Vega Robledo *Gloria B Vega*

Propietario P. M. en C. José Luis Busto Sánchez

Suplente M. en C. Felipe Alcántara Sánchez

Suplente Dr. Saúl Cano Colin

*[Firmas manuscritas]*  
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

*[Firma manuscrita]*  
M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ



Dedicada a la memoria de

† **Ángela Flores Torres**

## AGRADECIMIENTOS

† Con profundo agradecimiento a la memoria de mi madre: **Ángela Flores Torres**. Por su sacrificio y constante empeño en que continuara con mis estudios y por el gran amor que me brindo incondicionalmente. Siempre estará tu recuerdo presente en mi.

† A mi padre Antonio Enríquez Aldaz, que aunque no estuvo mucho tiempo con nosotros siempre lo amamos.

A mis hermanos que siempre me han apoyado en todos los aspectos de mi vida y siempre han estado conmigo y yo con ellos.

A mis sobrinos que deseo de todo corazón que le echen ganas al estudio.

A mi tutora Noris Pavía por su grande labor y profesionalismo, además de realizar con mucha sensibilidad una acción humanitaria.

A los demás miembros del jurado: Dra. Gloria Vega, Dr. Saúl Cano, P. M. en C. José Luis Busto y a mi compañero y miembro del jurado M. en C. Felipe Sánchez.

A todas y todos mis compañeros del laboratorio, especialmente a Catalina por enseñarme con paciencia cuando se lo solicité.

A la Dra. Ingebor Bécquer y a José por ayudarme en la obtención de algunos datos y por enseñarme a manejar el luminómetro.

A todos mis amigos de la facultad que son muchos y no quisiera omitir a ninguno, pero muy especialmente a Mary que ha estado conmigo en tantas cosas buenas y en tantas cosas malas.

A mis amigos del laboratorio de Bioquímica Genética del INP.

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	5
Epidemiología .....	5
El SIDA en América Latina y el Caribe .....	5
Transmisión perinatal .....	6
Mecanismos de Transmisión del VIH .....	6
Patogénesis .....	8
VIH en pediatría .....	10
Pruebas diagnósticas .....	10
Manifestaciones clínicas .....	11
Infecciones bacterianas en niños con infección por el VIH .....	12
Células fagocíticas .....	14
Leucocitos Polimorfonucleares .....	14
Métodos de evaluación del estallido respiratorio .....	17
Quimioluminiscencia .....	17
Reducción cuantitativa del nitroazul de tetrazolio (NAT) .....	18
Capacidad microbicida .....	19
ANTECEDENTES .....	21
Infección por VIH y leucocitos polimorfonucleares .....	21
Antirretrovirales y función de PMN's .....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
HIPÓTESIS GENERAL .....	25

<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	25
Objetivos particulares .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
Universo de trabajo .....	26
Criterios de inclusión.....	26
Criterios de exclusión.....	27
Material Biológico .....	27
Crecimiento y cosecha .....	27
Opsonización.....	29
Separación de leucocitos polimorfonucleares .....	30
Recuento de PMN's, pureza y viabilidad .....	31
Ensayo del nitroazul de tetrazolio .....	31
Ensayo de quimioluminiscencia .....	32
Ensayo de capacidad bactericida .....	33
Análisis estadístico .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
NAT, Quimioluminiscencia y Capacidad Bactericida de PMN's de niños con IP sin IP y controles.....	39
<b>DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>CONCLUSIONES</b> .....	46
<b>REFERENCIAS</b> .....	48
<b>APENDICE</b> .....	53

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Absorbencia de <i>S. aureus</i> .....	28
Figura 2. UFC's de <i>S. aureus</i> .....	29
Figura 3. Actividad quimioluminiscente de PMN's.....	37
Figura 4. Actividad quimioluminiscente de PMN's de niños con VIH.....	41
Figura 5. Prueba de NAT cuantitativa de PMN's de niños con VIH .....	42
Figura 6. Capacidad bactericida de PMN's de niños con VIH, con sueros AB y Autologo .....	42

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Clínica para la Infección por VIH en Pediatría .....	11
Tabla 2. Sistemas antimicrobianos de leucocitos Polimorfonucleares.....	16
Tabla 3. Ensayos realizados en NAT.....	32
Tabla 4. Ensayos realizados de quimioluminiscencia.....	33
Tabla 5. Ensayos realizados de capacidad bactericida .....	34
Tabla 6. Características clínicas y demográficas de pacientes evaluados .....	36
Tabla 7. Estandarización de Nitroazul de tetrazolio.....	38
Tabla 8. Estallido respiratorio y capacidad bactericida*, grupo con IP y grupo sin tratamiento .....	39
Tabla 9. Estallido respiratorio y capacidad bactericida*, grupo sin IP y grupo sin tratamiento .....	40
Tabla 10. Estallido respiratorio y capacidad bactericida*, grupo sin IP y grupo con IP .....	40



## **INTRODUCCIÓN**

### **Epidemiología**

Para finales del 2003, el Programa de la Organización de las Naciones Unidas para la Prevención del SIDA (ONUSIDA), estimaba que en el mundo existían 45 millones de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), de los cuales 41.2 millones son adultos y 3.2 millones son menores de 15 años.

Aproximadamente, el 50% de las nuevas infecciones por VIH se producen en jóvenes de entre 10 y 24 años. Sólo durante el 2003, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causó 3 millones de muertes (2.5 millones en adultos y 500,000 en menores de 15 años).

Del total de personas con VIH, 95% vive en países en desarrollo. De acuerdo con el último reporte sobre salud mundial, elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el SIDA es responsable del 5.2% de las muertes que ocurren en todo el mundo, constituyendo la cuarta causa de defunción(ONUSIDA/OMS, 2003).

### **El SIDA en América Latina y el Caribe**

A pesar de que América Latina y el Caribe tienen una historia de epidemia más reciente, el número de infecciones por VIH ha superado los 2 millones de personas con infecciones en el 2003. Sin embargo, lo más preocupante es que el Caribe se ha convertido en la segunda región más afectada por la epidemia del SIDA, después de la África Subsahariana, con una preponderancia de 2.3% en la población adulta (ONUSIDA/OMS, 2003).

De acuerdo a estimaciones realizadas por el Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), en México existen aproximadamente 150 mil personas adultas infectadas por el VIH, de las cuales más de 100 mil corresponden a hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH), casi 40 mil a población heterosexual, más de 4,500 a reclusos, aproximadamente 3 mil a usuarios de drogas inyectables y poco más de 2,500 a trabajadores y trabajadoras del sexo comercial (CENSIDA, 2003).

Aunque evidencias anecdóticas sugieren que los primeros casos de infección por el VIH en México ocurrieron en 1981, los primeros casos de SIDA se documentaron en 1983 y desde entonces se reportan 71,526 casos acumulados de SIDA hasta el 1 de noviembre del 2003 y en menores de 15 años de edad 1,716 casos.

### **Transmisión perinatal**

En México, la transmisión perinatal constituye la principal causa de infección por el VIH/SIDA en menores de 15 años, con 70.3% de los casos de SIDA acumulados. Para tratar de enfrentar este problema se cuenta con una política nacional de tratamiento gratuito para prevenir este tipo de transmisión, cuyo resultado muestra que durante el año 2003 se presentaron 13 casos diagnosticados con transmisión perinatal, en forma acumulada hasta noviembre del 2003, en México se han reportado 1716 niños con SIDA (CENSIDA, 2003).

### **Mecanismos de transmisión del VIH**

Inicialmente la preponderancia del SIDA se consideraba restringida a los hombres que tenían sexo con hombres y pacientes con hemofilia. Posteriormente, se observó que la infección por VIH es principalmente una infección de transmisión sexual (ITS) y que no tiene preferencia por alguna orientación sexual.

También se puede transmitir a través del contacto con líquidos corporales infectados como son sangre, semen, secreciones vaginales y leche materna; los cuáles son más efectivos en transmitir el virus por tener células a diferencia de los que no las contienen como las lágrimas, la orina y la saliva. La transmisión también puede ocurrir a través de piel o mucosas no intactas, durante el acto sexual o por vía intravenosa como sería al compartir agujas infectadas (uso de drogas), exposición ocupacional o tratamiento con productos sanguíneos infectados. Dado que en muchos países la sangre obtenida por donación es rutinariamente examinada para detectar el VIH, esta vía de transmisión ha disminuido drásticamente.

Otro de los mecanismos de transmisión del VIH es por vía vertical de una madre infectada al producto lo cual puede ocurrir durante el embarazo o el trabajo de parto. La infección posterior al parto puede ocurrir cuando el niño ingiere leche materna infectada por el VIH (Nduati *et al.*, 1995). La OMS estima que hasta una tercera parte de los casos de transmisión perinatal podrían ocurrir a través de la leche materna, casos esporádicos de infección por el VIH han sido secundarios a abuso sexual por un individuo infectado.

A nivel mundial el principal mecanismo de transmisión del VIH en pediatría es perinatal cuyo riesgo de transmisión varía de 13 al 39% y en lo que se encuentran implicados diversos factores, siendo los más aceptados: la ruptura de membranas mayor de 4 horas, enfermedad avanzada del VIH en la madre, peso menor a 2,500gr del producto (Jonh-Stewart *et al.*, 2004). En México al igual que lo reportado en la literatura mundial en más del 90% de los casos de niños con VIH/SIDA el mecanismo de infección es perinatal.

## **PATOGENESIS**

La infección por el VIH se caracteriza por la disminución del número y función de linfocitos T CD4+ (un tipo celular que colabora en el reconocimiento de antígenos), en etapas finales de la infección el sistema inmune ya debilitado pierde el control de la proliferación viral con lo que aumenta la carga viral y se desarrolla el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Nduati, *et al.*, 1995).

Los conceptos previos de patogénesis proponían que una respuesta inmune efectiva del hospedero o la activación de ciertos genes del VIH conducían a un período en donde el virus no proliferaba (latencia viral); ahora se sabe que la proliferación viral se da lentamente a través del período latente y continúa así durante toda la evolución de la enfermedad (Piatak, *et al.*, 1993), además se conoce que el CCR5 es el principal co-receptor utilizado por el VIH-1 para entrar a las células en la infección primaria (Magierovska, *et al.*, 1998).

Las primeras células infectadas *in vivo* en modelo de macaco son las células T CD4+ (activadas y en reposo) y las células dendríticas (CD), aunque es controversial el papel de las CD en la patogenia del VIH se acepta que las CD actúan como una especie de "caballo de Troya" para el transporte del VIH de la mucosa al sistema linfoide. Cuando la infección por VIH es establecida, una de las alteraciones principales en el sistema inmune es una temprana y progresiva pérdida de células CD4+.

Durante la fase inicial de la infección, el virus llega al tejido linfoide, donde continúa con su proliferación e infecta a los linfocitos CD4 (linfocitos cooperadores) al pasar a través de los nódulos linfáticos (Fauci, 1993). Debido a que una gran proporción del total de linfocitos del cuerpo residen en los órganos linfoides se comprende que la replicación viral persista a pesar de que no se detecta el virus en la sangre. Estudios de Hibridación *in situ* y análisis de nódulos linfáticos por microscopía electrónica muestran que cantidades importantes del

VIH pueden ser localizadas en el tejido linfóide durante la llamada fase "latente de infección" (Pantaleo, *et al.*, 1993). Los virus observados en este tejido se encuentran unidos extracelularmente a las células dendríticas foliculares en el centro germinal del nódulo linfático. Las células dendríticas actúan como una trampa, manteniendo células infectadas en el tejido linfóide y brindando un medio propicio en donde células inmunocompetentes no infectadas pueden interactuar con células infectadas. El virus puede ser eliminado por el sistema inmune del hospedero, aunque también este sistema provee un ambiente rico en células CD4+ en donde tienen lugar nuevos ciclos de infección.

Muchas de las teorías de citopatogenicidad del VIH y de alteraciones del sistema inmune deben ser confirmadas, pero algunos hallazgos sugieren los siguientes mecanismos: destrucción directa de las células por el VIH, fenómenos auto-inmunes, estimulación de linfocitos T por superantígenos, apoptosis, unión del receptor CD4+ a gp120 (es una proteína muy glicosilada que se localiza fuera de la partícula viral y se une con una afinidad muy alta a una proteína del tipo celular CD4).

Basándose en lo mencionado previamente se comprende porqué el VIH suprime profundamente la inmunidad mediada por células; sin embargo, las personas afectadas muestran además diversas alteraciones en otros componentes de su sistema inmune como son la alteración de la inmunidad humoral, hipergamaglobulinemia, neutropenia, así como defectos en la función de sus células fagocíticas (Tyor, *et al.*, 1995). Todas estas alteraciones condicionan una mayor susceptibilidad a infecciones agregadas, las cuales constituyen la causa principal de morbilidad y mortalidad en sujetos adultos infectados con VIH, en quienes son frecuentes las infecciones por virus, bacterias y hongos (*Pneumocistis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Citomegalovirus*, *Haemophylus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Cryptococcus neoformans*).

## **VIH EN PEDIATRÍA**

Datos proporcionados por la UNAIDS estiman a nivel mundial, que 3.2 millones de niños eran portadores del VIH hacia finales del 2003, adicionalmente en ese año murieron 500,000 mil niños, aunque el VIH ha alcanzado proporciones pandémicas, afecta principalmente a adultos (92.8%) (ONUSIDA/OMS, 2003).

Aunque la patogénesis de la infección por el VIH y los principios inmunológicos y virológicos generales son semejantes en adultos y niños, se deben de tener en cuenta ciertas diferencias en niños y adolescentes con VIH/SIDA: a) la adquisición de la infección es a través de la exposición perinatal para la mayoría de los niños (implicando una relativa y nueva infección, adquirida en el nacimiento dentro de los confines de un sistema inmune inmaduro); b) la exposición *in útero* a medicamentos antirretrovirales; c) diferencias en marcadores inmunológicos, carga viral; d) cambios en los parámetros fármaco-cinéticos con la edad y v) consideraciones relacionadas a la formulación de medicamentos.

## **PRUEBAS DIAGNÓSTICAS**

El diagnóstico de la infección pediátrica por VIH va a depender de la edad del paciente, si tiene menos de 18 meses de edad se recomienda PCR (técnica que permite amplificar un fragmento de ADN en forma específica), prueba para detectar niveles de Agp24 en 2 determinaciones (Campos, 1992), si es mayor de 18 meses se recomienda realizar ELISA (ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas) para VIH y posteriormente una prueba que confirme el resultado como puede ser la de Western blot (CDC, 2001). El motivo de no realizar ELISA como prueba diagnóstica de VIH en menores de 18 meses es por el paso de anticuerpos de la madre al producto lo que nos podría dar falsos positivos.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los niños infectados con VIH generalmente son asintomáticos durante los primeros meses de vida o aún hasta los 5 años de edad, dos categorías de infección basadas en el período de incubación del VIH y progresión de los síntomas se han reconocido: los progresores rápidos y los progresores lentos; los progresores rápidos fallecen antes de los 4 años de edad (10-15 %). Mientras que los progresores lentos la edad del fallecimiento es muy variable.

Por otro lado se han realizado consensos relacionados a VIH y de acuerdo a reportes internacionales y experiencia local se han elaborado clasificaciones como serían las del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Atlanta para niños menores de 13 años de edad, que son de importancia para el manejo y pronóstico del paciente las cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación Clínica para la Infección por VIH en Pediatría (menores de 13 años). Fuente: CDC, 1994.

Categoría	Criterio
Categoría N Asintomáticos	Niñas y niños sin signos o síntomas que se consideren secundarios a la infección por el VIH o que presenten únicamente una de las condiciones enunciadas en la categoría.
Categoría A Sintomatología Leve	Niñas y niños con dos o más de las siguientes condiciones, pero sin las consideradas en las categorías B y C: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Linfadenopatías (&gt;0.5 cm en más de 2 sitios).</li> <li>▪ Hepatomegalia.</li> <li>▪ Esplenomegalia.</li> <li>▪ Dermatitis.</li> <li>▪ Parotiditis.</li> <li>▪ Infección respiratoria superior persistente o recurrente (sinusitis u otitis media).</li> </ul>
Categoría B Sintomatología Moderada	Niñas o niños que cursan con sintomatología atribuible al VIH diferente a categoría A ó C, ejemplos de ésta categoría: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anemia (Hgb&lt;8mg/dL), neutropenia (&lt;1,000/ml) y/o trombocitopenia (&lt;100,000/ml) que persisten más de 30 días.</li> <li>▪ Un episodio de meningitis bacteriana, neumonía o candidiasis orofaríngea, mayores de 6 meses, persistencia &gt;2 meses.</li> <li>▪ Miocardiopatía.</li> <li>▪ Infección por CM (circuncisión masculina) que inicia &lt; 1 mes de edad.</li> <li>▪ Diarrea recurrente o crónica.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hepatitis.</li> <li>▪ Estomatitis recurrente por virus del herpes simplex (VHS), más de 2 episodios en un año.</li> <li>▪ Bronquitis, neumonitis o esofagitis por VHS de inicio antes primer mes de edad</li> <li>▪ Herpes zoster que incluye más de un dermatoma, o dos o más episodios.</li> <li>▪ Leiomiomas.</li> <li>▪ Neumonía intersticial linfocítica o complejo de hiperplasia linfocítica.</li> <li>▪ Nefropatía.</li> <li>▪ Nocardiosis.</li> <li>▪ Fiebre persistente (más de un mes).</li> <li>▪ Toxoplasmosis que inicia antes de un mes de edad,</li> <li>▪ Varicela complicada o diseminada.</li> </ul>
<p>Categoría C Sintomatología Grave</p>	<p>Infección bacteriana grave, múltiple o recurrente (al menos dos infecciones en un periodo de dos años):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Septicemia, neumonía, meningitis, osteomielitis y abscesos (excluir: en piel, otitis media, abscesos de mucosas e infecciones relacionadas con catéteres).</li> <li>▪ Candidiasis esofágica o pulmonar ( bronquio, tráquea, pulmones ).</li> <li>▪ Coccidioidomicosis diseminada ( en sitio diferente al pulmonar, cervical o nódulos linfáticos hiliares.</li> <li>▪ Criptococosis extrapulmonar.</li> <li>▪ Criptosporidiosis o isosporidiosis con diarrea que persista por más de un mes.</li> <li>▪ Enfermedad por citomegalovirus que inicia después del primer mes de vida, en un sitio diferente del bazo, hígado y ganglios linfáticos.</li> <li>▪ Encefalopatía.</li> <li>▪ Infección por VHS con úlceras mucocutáneas que persistan más de un mes, o bronquitis, neumonitis o esofagitis en niñas y niños mayores de un mes de edad.</li> <li>▪ Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar.</li> <li>▪ Sarcoma de Kaposi.</li> <li>▪ Linfoma primario en el cerebro.</li> <li>▪ Linfoma de Burkitt inmunoblástico de células grandes, de células B o de fenotipo inmunológico conocido.</li> <li>▪ Leucoencefalopatía multifocal progresiva.</li> <li>▪ Enfermedad diseminada o extrapulmonar por <i>Mycobacterium tuberculosis</i></li> <li>▪ Otras micobacteriosis diseminadas.</li> <li>▪ Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>.</li> <li>▪ Septicemia recurrente por especies diferentes de <i>Salmonella typhi</i>.</li> <li>▪ Toxoplasmosis cerebral en mayores de un mes de edad.</li> <li>▪ Síndrome de desgaste en ausencia de una enfermedad concurrente que sea diferente a la infección por el VIH.</li> </ul>

## INFECCIONES BACTERIANAS EN NIÑOS CON INFECCIÓN POR EL VIH

Los adultos presentan una mayor incidencia de infecciones oportunistas que los niños, mientras que éstos últimos presentan una mayor frecuencia de infecciones bacterianas tales como: bacteremias por gérmenes encapsulados,

meningitis, neumonía, infección de vías urinarias, infección de piel y tejidos blandos, otitis media y gastroenteritis. Los primeros 52 pacientes pediátricos diagnosticados con VIH en el Hospital de niños de New Jersey entre 1981 y 1983 tuvieron una incidencia de bacteremia del 45% (Siegal y Oleske, 1986). Otros autores han reportado que la incidencia de infecciones bacterianas serias en niños con infección sintomática por VIH abarcan el 38 y 57% (Bernstein *et al.*, 1985; Krasinski *et al.*, 1988).

En nuestra población (Clínica Para Niños Con Inmunodeficiencia Adquirida, H.G.M.) hemos observado un 83% de niños con infección sintomática por VIH presentaron en promedio 2.5 infecciones antes del inicio de antirretrovirales (Muñoz y Pavia; comunicación personal, 2003).

Principi y colaboradores llevaron a cabo en 1991 un estudio prospectivo de 27 niños con infección por el VIH dieron un seguimiento al avance de la enfermedad durante 5.4 meses. Estos autores encontraron que los niños en estadio avanzado de la infección por VIH tuvieron un número significativamente más alto de infecciones que los controles sanos, confirmando estudios previos. Los factores asociados a un mayor riesgo de infecciones bacterianas en niños con SIDA son: antecedente de infección oportunista, infección bacteriana por *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* con cuentas de CD4+ menores de 400 cel/mm<sup>3</sup>. La combinación de inmadurez y disfunción inmunológica condicionan a una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas de los niños con infección por el VIH. La susceptibilidad a infecciones por bacterias capsuladas en pacientes con infección por VIH se ha intentado explicar por alteración en la subclase de inmunoglobulinas. Así mismo, se han descrito defectos cualitativos en la respuesta humoral en adultos y niños con infección por el VIH y se han encontrado disminución de la respuesta a antígenos específicos *in vitro* e *in vivo* (McNamara, 1989). La respuesta de linfocitos a mitógenos es menor en niños con infección, comparada con la de niños sin antecedentes de infección, además de

las alteraciones antes mencionadas también se han reportado alteraciones cualitativas y cuantitativas en los neutrófilos de adultos y niños con VIH.

## **CÉLULAS FAGOCITICAS**

Las células fagocíticas se dividen en dos clases principales: los Fagocitos mononucleares (monocitos/macrófagos) y los granulocitos polimorfonucleares.

El sistema mononuclear se origina en la médula ósea y tras su maduración pueden adquirir diversas formas; el monocito es la primera célula que entra en la sangre periférica no estando completamente diferenciado, una vez que colonizan los tejidos estas células maduran y se convierten en macrófagos, estos se encuentran en todos los órganos y tejidos conjuntivos; los macrófagos realizan muchas de sus funciones en la defensa del hospedero antes del desarrollo de la inmunidad específica, fagocitando partículas extrañas (Abbas, 1995) las cuales son degradadas dentro de los macrófagos por enzimas lisosomales, también producen citocinas (proteínas de señalización extracelular o péptidos que actúan como un mediador local en la comunicación celular) que atraen a otras células inflamatorias, especialmente neutrófilos.

## **LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN's)**

Los PMN's comprenden aproximadamente el 60% de leucocitos circulantes en el cuerpo humano (Goldsby *et al.*, 2000), miden de 10-20 $\mu$ m de diámetro estimado en frotis, y 7-9 $\mu$ m de diámetro en cortes, tienen una vida media de 6-7 horas, su núcleo característico tiene 3 lóbulos unidos por filamentos, en su citoplasma se pueden visualizar principalmente dos tipos de gránulos: azurófilos o primarios, contienen enzimas hidrolíticas como hidrolasas ácidas y proteínas catiónicas con potente actividad bactericida y fungicida y los gránulos específicos o secundarios, que contienen sustancias bactericidas, lisozima, lactoferrina, etc. (Ham, 1983). Los PMN's derivan de las células hematopoyéticas pluripotenciales

localizadas en la medula ósea, la producción y diferenciación de estas células depende de factores estimuladores de colonias (Metcalf, 1986), que son en esencia moléculas glucoproteicas producidas por macrófagos y linfocitos T activados (Walker y Willemze, 1980). Estas glucoproteínas determinan la diferenciación del mieloblasto hacia las líneas monocítica y granulocítica. Cuando se realiza la diferenciación hacia la serie granulocítica, el desarrollo y maduración de los PMN's se presenta en dos etapas: mitótica y no mitótica con duración de una semana cada una de ellas. En la primera fase, la diferenciación es de mieloblasto a promielocito llegando hasta mielocito, en la última fase aparecen los gránulos citoplasmáticos de los PMN's. En la etapa no mitótica la diferenciación es de metamielocito a neutrófilos inmaduros o en banda y a neutrófilos maduros o segmentados.

Estas células realizan principalmente dos funciones fagocíticas: una es la remoción de microorganismos patógenos, la segunda es la eliminación de células viejas o dañadas de los tejidos.

Un microorganismo virulento puede ser fagocitado por un proceso no específico y que no requiere participación de anticuerpo o activación del complemento, sin embargo para algunos patógenos se requiere una mayor especificidad para una depuración eficiente, a la interacción de los anticuerpos con las bacterias para su fagocitosis se denomina opsonización, consistiendo en un mecanismo por el cuál hay modificación de las fuerzas físicas de la bacteria por un anticuerpo o complemento favoreciendo así la fagocitosis; emigran hacia estímulos (quimiotaxis) en presencia de numerosos factores quimiotácticos, incluyendo productos bacterianos, proteasas de los tejidos; cuando llega a zonas inflamatorias se fija e ingiere materiales apropiadamente opsonizados.

En los PMN's existen dos sistemas antimicrobianos : los que son dependientes del oxígeno y los que son independientes del oxígeno (Klebanoff, 1975) la siguiente tabla resume estos sistemas.

Tabla 2. Sistemas antimicrobianos de leucocitos Polimorfonucleares (Klebanoff, 1975).

<b>1. Dependientes de oxígeno</b>	<b>2. Independientes de oxígeno</b>
A. Mediado por mieloperoxidasa.	A. pH ácido
B. Independientes de mieloperoxidasa.	B. Lisozima
1. Peroxido de hidrógeno	C. Lactoferrina
2. Anión superóxido	D. Proteínas cationicas granulares
3. Singlete de oxígeno	

Los mecanismos microbianos dependientes de oxígeno se dividen en dos, los que están mediados por la mieloperoxidasa y los que no lo están.

Los mediados por la mieloperoxidasa (enzima que utiliza peróxido de hidrógeno como sustrato y cataliza la oxidación de un gran número de sustancias por medio de una reacción peroxidativa) oxidan iones haluro formando hipo-haluros que son poderosos oxidantes (Quie, 1986), los independientes de la mieloperoxidasa tienen que ver con el aumento en el consumo de oxígeno, provocado por la fagocitosis, a la vez hay aumento en el metabolismo de la glucosa, produciéndose NADPH, secundariamente se producen metabolitos oxidativos tóxicos durante el estallido respiratorio, esto es: superóxido  $O_2^-$ , que es altamente reactivo, pudiendo actuar como oxidante o reductor.

Los mecanismos independientes de oxígeno son:

- pH ácido. Durante la formación de la vacuola fagocítica, el pH desciende debido principalmente a la producción de lactato durante la glucólisis.
- Lisozima. Su acción es hidrolizar la pared celular de microorganismos.
- Lactoferrina. Proteína proveniente de los gránulos específicos con alta afinidad por el hierro; puede inhibir el desarrollo de los microorganismos al competir con ellos por el hierro del medio.

## **MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO**

Una vía metabólica muy importante del PMN, cuya función es producir un grupo de agentes microbicidas altamente reactivos por medio de la reducción parcial del oxígeno, es el estallido respiratorio, que puede ser evaluado por diferentes métodos. La determinación del anión superóxido se puede realizar mediante la reducción de ferrocitocromo C a su forma ferrosa, el peróxido de hidrógeno puede detectarse por su reacción con la peroxidasa o por la acción de donadores de hidrógeno (Metcalf, 1985). Otros métodos utilizados son quimioluminiscencia y reducción del colorante nitroazul de tetrazolio.

### **□ Quimioluminiscencia**

Allen y colaboradores reportaron en 1972 por primera vez la quimioluminiscencia en PMN's propusieron un método para evaluar la función del PMN *in vitro*: al ser incubado (el PMN) ya sea con una partícula o una bacteria, disparará todo un proceso metabólico que finalmente producirá la eliminación de la partícula en cuestión. Así, la acción microbicida es un proceso ligado metabólicamente, donde el potencial de reducción, conduce a los eventos de transferencia de electrones dependientes de O<sub>2</sub> que producen reactivos oxidantes y agentes oxigenados, tales como ácido hipocloroso y singletes moleculares de oxígeno(O<sup>1</sup><sub>2</sub>) (Root y Cohen, 1981).

Las reacciones de dioxigenación son muy exergónicas (liberan calor) pero tales reacciones no se dan espontáneamente. Una explicación es la de considerar que los PMN's generan oxidantes y las reacciones de oxigenación resultantes producen energía que es suficiente para generar productos electrónicamente excitados que al regresar a su estado basal emitirán fotones lo que se conoce como quimioluminiscencia. Sin embargo, ya que esta emisión de luz es muy baja, e incluso varía con el tipo de estímulo y condición de prueba, es necesaria la introducción al sistema de un compuesto capaz de amplificar esa respuesta.

Algunos compuestos utilizados son: lucigenina (10,10'-dimetil-9-9' dinitrato de biacridina), y el luminol (5-amino-2,3dihidro-1,4-ftalazenediona), ambos se utilizan para medir diferentes eventos metabólicos dentro del PMN (Easmon *et al.*, 1980).

La reacción del luminol es catalizada por la mieloperoxidasa (MPO) (Campbell, *et al.* 1994; LaRossa *et al.* 1998), cuando este sustrato se oxida, origina el anión aminofalato y como es inestable, pasará a un estado más estable o de menor energía, emitiendo con esto luz debido a la pérdida de energía, por lo que se amplificará la respuesta luminiscente.

En los primeros estudios a los PMN's se les adicionaba un estímulo y la molécula amplificadora de la quimioluminiscencia, dejándose por espacio de 1 hora mientras se leía en un contador de centelleo, se manejaban relativamente grandes cantidades tanto de células como de reactivos; en la actualidad se han desarrollado otros procedimientos en donde se utilizan pocas cantidades de estos componentes realizando el ensayo en microplacas de titulación que sustituyen a las cubetas convencionales (Blair, *et al.* 1988; Hiroko, *et al.* 1997). La adaptación del análisis de la quimioluminiscencia en microplacas de titulación hace posible comparar un gran número de muestras o condiciones experimentales de forma simultánea, usando pequeños volúmenes de muestras.

Esta metodología se ha usado extensivamente para la predicción de infecciones recurrentes, que son frecuentes en personas con el sistema inmunodeficiente.

#### □ **Reducción cuantitativa del nitroazul de tetrazolio (NAT)**

Desde hace ya varios años la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio se ha venido utilizando como una prueba diagnóstica contra infecciones severas (Bahener y Nathan, 1968), diferenciando las infecciones bacterianas y micóticas, de las virales (ya que estas últimas son negativas a la prueba); debido a su simplicidad y rapidez con la que se realiza tal prueba se ha convertido en una prueba de tipo rutinario en varios laboratorios de diagnóstico.

El NAT presenta un color amarillo, es soluble en un ambiente acuoso y es capaz de reducirse en presencia de un agente reductor, tornándose azul, convirtiéndose en un compuesto denominado formazan que es insoluble (en ambiente acuoso) este se puede medir espectrofotométricamente a 570nm.

Cuando se genera el estallido respiratorio en PMN's una variedad de metabolitos reactivos de oxígeno se liberan, siendo subsecuentemente convertidos a otras especies activas derivadas de oxígeno ya sea por reducción espontánea o mediadas por enzimas. *In vitro*, el estallido respiratorio puede ser disparado por agentes solubles como PMA (ver apéndice) y zimosan entre otros (Bahener y Nathan 1975). La reducción del NAT es uno de los ensayos más comúnmente usados para medir el anión superóxido producido durante el estallido respiratorio.

Esta reducción tiene lugar probablemente en las vacuolas fagocíticas (Levinsky *et al.*, 1983), el producto final puede ser visualizado como gránulos de formazan asociados a PMN's por medio de la microscopía de luz o bien espectrofotométricamente después de la solubilización del formazan con dimetilsulfoxido (DMSO) u otros solventes (Richardson *et al.*, 1998).

La técnica basada en microscopía de luz, proporciona solo datos cualitativos, mientras que el ensayo basado en espectrofotometría proporciona datos cuantitativos, pero solo mide la actividad media de un volumen celular, por tanto esta técnica permite una identificación precisa del mal funcionamiento del estallido respiratorio en un volumen determinado de células.

#### □ **Capacidad microbicida**

Los neutrófilos están adaptados para un propósito en particular, siendo estos la primera línea de defensa contra partículas extrañas al hospedero, una vez que localizan el sitio de infección se trasladan a este fagocitan y destruyen a las partículas extrañas, cuando las partículas unidas a la superficie de los neutrófilos

son fagocitadas se forma el fagosoma, posteriormente se desarrollan varios mecanismos que finalmente eliminan las partículas. Al fusionarse el fagosoma y los gránulos citoplasmáticos, descargan estos últimos su contenido.

Por otro lado en la generación de productos derivados de la reducción del oxígeno, muerte y digestión de la(s) partícula(s), alguno de estos pasos pueden fallar, aún cuando la partícula haya sido fagocitada y se genere el estallido respiratorio, el neutrófilo puede fallar al eliminar la partícula (Goldsby *et al.*, 2000).

## **ANTECEDENTES**

### **INFECCIÓN POR VIH Y LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES**

Los pacientes con VIH/SIDA tienen alteraciones en la inmunidad celular y humoral, la actividad de la función de PMN's es un elemento de gran importancia para la defensa del hospedero contra una gran variedad de enfermedades infecciosas, principalmente bacterianas y micóticas (Goldsby *et al.*, 2000).

En 1988 Murphy y colaboradores evaluaron la integridad funcional de los neutrófilos en adultos con SIDA observando disminución de la capacidad bactericida a *S. aureus* y un aumento de la producción de superóxido y concluyeron que estas alteraciones no podrían explicarse por defectos en la producción de sustancias antimicrobianas dependientes de oxígeno.

Alteraciones en la función de PMN's (quimiotaxis, actividad bactericida y fagocitosis) han sido descritas en pacientes con VIH/SIDA principalmente en enfermedad avanzada. En la literatura existen controversias con respecto a la actividad de los PMN's en pacientes con SIDA, nuestros resultados (de esta tesis) difieren de los obtenidos por otros autores quienes hallaron disminución o aumento de fagocitosis de PMN's en pacientes con VIH/SIDA, por ejemplo Bandres y colaboradores en 1993 observaron un incremento de la quimioluminiscencia de PMN's de pacientes con VIH/SIDA a diferencia de Martínez Aguilar (1997) quien detectó disminución de la quimioluminiscencia en niños con SIDA. Probablemente las diferencias encontradas sean secundarias a diferentes metodologías y a la heterogeneidad de la población estudiada entre otros factores.

## **ANTIRETROVIRALES Y FUNCION DE PMN's**

La zidovudina fue el primer antirretroviral (ARV) autorizado para ser utilizado en pacientes con VIH/SIDA y desde los estudios originales se observó que retrazaba la progresión de la enfermedad y prolongaba la vida de los pacientes, lo cuál también ocurrió con los demás antirretrovirales que estuvieron disponibles en el futuro.

La neutropenia (disminución del número de neutrófilos circulantes) es una condición relacionada a VIH y generalmente se ha observado que no mejora con ARV. En ciertas ocasiones parámetros hematológicos, incluyendo la cuenta de neutrófilos pueden verse incrementadas utilizando didanosina y se ha reportado también con el Inhibidor de proteasa indinavir. La respuesta inmune después de ARV es generalmente limitada al incremento de linfocitos CD4+.

El uso de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) se generalizó después de 1996, al surgir los inhibidores de proteasa. Actualmente se considera como el tratamiento común para la infección por el VIH. TARAA se define como el empleo de una combinación de antirretrovirales con la suficiente potencia para inducir supresión viral intensa, algunas combinaciones usadas son las que utilizan dos inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos y uno o dos inhibidores de proteasa, o un inhibidor de transcriptasa reversa no nucleósido. Esta terapia no sólo tiene efectos en la disminución de la carga viral, sino también en una menor incidencia de infecciones oportunistas y al mismo tiempo un menor número de ingresos al hospital de los pacientes debido a infecciones disminuyendo por tanto la probabilidad de muerte.

En pacientes que responden a TARAA, la reducción en la carga viral plasmática ha sido asociada con un considerable incremento en células CD4+, pero el grado por el cual las anomalías inmunológicas inducidas por el VIH son revertidas por TARAA aún no están completamente estudiadas.

Hasta 1999 no había reportes acerca del efecto de TARAA en la actividad funcional de neutrófilos y monocitos circulantes los cuáles representan 2 componentes críticos de la inmunidad innata antimicrobiana y ambos durante el curso de la infección por el VIH se encuentran alterados y podrían contribuir al incremento a la susceptibilidad a las infecciones oportunistas y probablemente bacterianas. En el año 2000 Mastroianni y colaboradores estudiaron 17 pacientes con VIH, en los cuales se observaban conteos de CD4+ menores a 350 por microlitro ( $\mu$ l) sin infección activa concomitante, a los que se administró un IP (inhibidor de proteasa) observando el incremento de la actividad quimiotáctica en 72% de los pacientes (neutrófilos) y 44% (monocitos) y la capacidad fungicida no se restauró a lo normal. También hubo un incremento de la quimioluminiscencia semejante al grupo control. Estos resultados no se habían observado en adultos utilizando combinaciones de antirretrovirales sin Inhibidores de proteasa.

Sin embargo, la utilización de nuevos medicamentos en niños es menor que en adultos, generalmente debido a la insuficiencia de datos relacionados con la farmacocinética, toxicidad y tolerabilidad sobre las formulaciones pediátricas disponibles de ensayos.

En pediatría, no hay reportes que correlacionen un tratamiento antirretroviral altamente activo y función de neutrófilos; estas células fagocíticas son una línea de defensa muy importante en contra de las infecciones bacterianas y micóticas, siendo el propósito del presente trabajo ampliar el conocimiento relacionado con antirretrovirales y leucocitos PMN's.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los niños infectados por el VIH/SIDA padecen alteraciones en el sistema inmune, por lo que tienen mayor posibilidad de contraer infecciones entre ellas las bacterianas.

Debido a la importancia que tienen los Polimorfonucleares como primera línea de defensa ante infecciones ocasionadas por partículas extrañas a un organismo dado, fagocitando y finalmente destruyendo a la partícula en cuestión; entonces es de suma importancia el que este tipo celular funcione con normalidad.

En los últimos años se han utilizado esquemas antirretrovirales que incluyen inhibidores de la proteasa como tratamiento contra el VIH y se ha observado una disminución de la morbilidad y mortalidad, reflejada en menor número de infecciones entre ellas bacterianas. Algunos autores han observado que la utilización del TARAA aumenta la función de los neutrófilos durante la infección por el VIH en adultos, en pediatría antecedentes reportados son muy escasos y dirigidos a tratamientos sin inhibidores de proteasa y dado que las infecciones bacterianas son más frecuentes en niños que en adultos infectados con el VIH consideramos de importancia estudiar la actividad fagocítica y microbicida de PMN's de niños infectados con VIH/SIDA utilizando diferentes esquemas antirretrovirales.

## **HIPÓTESIS GENERAL**

La actividad fagocítica y microbicida *in vitro* de polimorfonucleares de niños con SIDA utilizando un esquema antirretroviral sin IP es menor a la de polimorfonucleares de niños con SIDA utilizando IP, retados *in vitro* con *Staphylococcus aureus*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad fagocítica y microbicida *in vitro* de leucocitos Polimorfonucleares de niños infectados con SIDA utilizando diferentes esquemas de tratamiento antirretroviral.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA tratados con un esquema antirretroviral sin inhibidores de proteasa (IP) y de niños sanos retados *in vitro* con *S. aureus*.
- Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA tratados con un esquema antirretroviral con inhibidores de proteasa (IP) y de niños sanos retados *in vitro* con *S. aureus*.
- Comparar la actividad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA tratados con un esquema antirretroviral con inhibidores de proteasa (IP) y de niños con SIDA sin IP retados *in vitro* con *S. aureus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### UNIVERSO DE TRABAJO

En este estudio se realizó la evaluación *in vitro* de PMN's de niños con el diagnóstico de infección por el VIH/SIDA que asistían a la Clínica para niños con inmunodeficiencias de la UNAM-Hospital General de México en el periodo de 2000-2001 con edades entre 1-16 años de edad, de ambos sexos, previo consentimiento de los padres o tutores.

En todos los pacientes se cumplieron con los criterios del CDC para la definición de caso de SIDA en niños y la infección por el VIH se corroboró por ELISA y Western blot en mayores de 18 meses y en menores de ésta edad por medio de cultivo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ó identificación del antígeno p24 en 2 determinaciones.

#### a) Criterios de inclusión

1. Menores de 16 años.
2. Diagnóstico de VIH/SIDA (criterios del CDC, 1994).
3. Sin infección aguda concomitante en el momento de la toma de muestra o 14 días previos.
4. No estar recibiendo algún medicamento que se concentre en PMN's, como sería: rifampicina o clindamicina.
5. Estar recibiendo trimetropim sulfametoxasol como profilaxis para *P. carinii*
6. Que estén recibiendo terapia antirretroviral cuando menos 2 meses antes de incluirse en el estudio.
7. Autorización de los padres o tutores.

## **b) Criterios de exclusión**

1. Utilización de inmunomoduladores (interferón, factor estimulante de colonias, Inmunoglobulina IV).
2. Leucopenia (< 2,500).

Las muestras de sangre de los controles se obtuvieron de niños que acudían a la clínica para determinación de ELISA, VIH negativos, con edades entre 1 y 16 años de edad, de ambos sexos, sin infección aguda concomitante en el momento de la toma de muestra o 14 días antes y con la autorización del padre o tutor. Antes de la evaluación de los PMN's de los pacientes se realizaron ensayos preliminares con la sangre de adultos voluntarios sanos, con el propósito de estandarizar las técnicas, así como de familiarizarse con el equipo del laboratorio.

## **Material Biológico**

1) Se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923, conservada en glicerol al 10% a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### ❖ Crecimiento y cosecha

La bacteria que se conservaba a  $-70^{\circ}\text{C}$  se sembró en cajas de petri con agar LB (ver apéndice) mediante estría, dejándose una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se pico una colonia y se sembró en 2ml de caldo soya tripticasa (en condiciones de esterilidad) manteniéndose en agitación constante a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

Posteriormente se tomaron 250 $\mu\text{l}$  de éste cultivo que se añadieron a 100ml de caldo soya tripticasa dejándose en agitación constante a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para registrar el aumento en la absorbencia de esta última siembra se tomaron alícuotas de 100 $\mu\text{l}$  cada hora desde el inicio y por un total de 16hr la absorbencia se registró a 570nm de longitud de onda (Fig. 1) en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (100 $\mu\text{l}$  del cultivo mas 900 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O destilada, como blanco se utilizó 1000 $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O destilada).

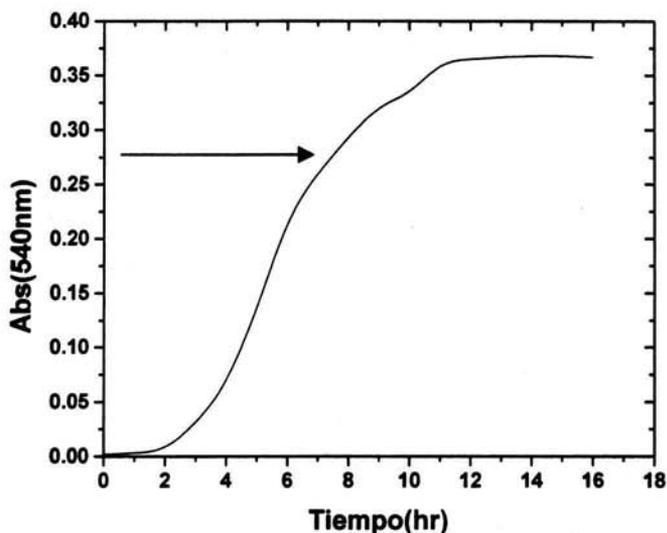


Fig.1 Registro del aumento de la absorbancia de *S. Aureus* en crecimiento.

Al mismo tiempo se realizaron siembras del cultivo en placas de agar LB para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que correspondían a cada absorbancia muestreada (100µl a diferentes diluciones [ $10^{-4}$   $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ] para poder contabilizar el número de colonias crecidas) y se incubaron a 37°C toda la noche (fig. 2)

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el número de UFC's:

$$\text{UFC} = \frac{\text{UFC} \times \text{factor de dilución}}{0.01}$$

Lo anterior expuesto fue con el propósito de asociar el número de UFC con su respectiva absorbancia (Meyer *et al.*, 1985), para utilizar el número de bacterias adecuadas en experimentos posteriores.

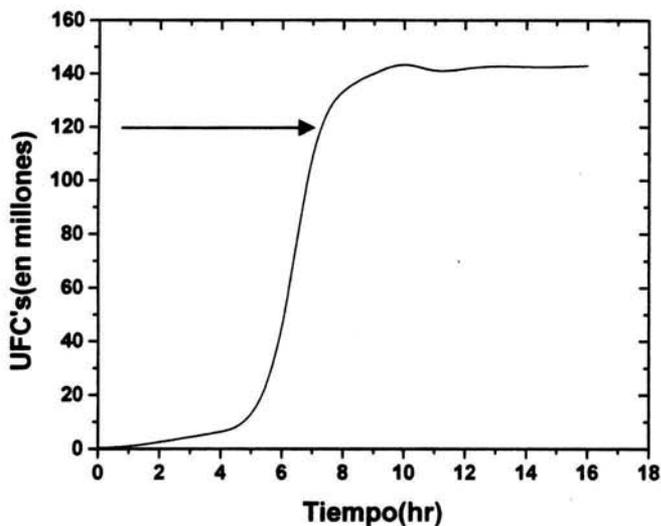


Fig.2 unidades formadoras de colonias (UFC's) de *S. Aureus*

En los experimentos se utilizó la bacteria a una concentración de  $1.2 \times 10^8$  bacterias/ml, (indicada con la flecha en la fig. 2) correspondiendo a una absorbancia de 0.261 (como lo muestra la flecha en la fig. 1), obteniéndose esta absorbancia a las 8hrs después de poner el cultivo.

#### ❖ Oponización

La oponización bacteriana se realizó con 2 tipos de sueros: Suero humano con tipo sanguíneo AB negativo (heterólogo) y Autólogo (del paciente), al 10% y desprovistos del complemento (se calentaron a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos).

**Nota:** La oponización se realizó ya que el suero contiene factores que potencian la fagocitosis.

## 2) Separación de leucocitos polimorfonucleares.

Los leucocitos PMN's fueron aislados de sangre venosa periférica de niños con VIH/SIDA, así como de niños sanos.

Se extrajeron por venopunción 4.5ml de sangre venosa periférica en jeringas desechables, 4ml de sangre se transfirieron a un tubo de poliestireno de 15ml con heparina (10u/ml de sangre), los 0.5 ml de sangre restantes se transfirieron a un Ependorff sin anticoagulante para la obtención del plasma.

La separación de PMN's se realizó de acuerdo a la técnica desarrollada por Boyüm en 1968 (con ligeras modificaciones que a continuación se mencionan), que permite la separación de los PMN's de células mononucleares mediante un gradiente de densidad y centrifugación y de los eritrocitos mediante lisis hipotónica.

Al tubo de poliestireno con los 4ml de sangre heparinizada se le añadieron en la base 4ml de Polymorphprep™ (Nycomed) (Hellen, 1998), esto se centrifugó a 1600rpm por 30 minutos a 18-20°C en una centrifuga (Sorvall RT7), posteriormente se separó gentilmente la banda de PMN's, que se localiza en la interfase, si la banda salía limpia se realizaba el conteo de PMN's pero si salían contaminados con eritrocitos se lisaban con el siguiente procedimiento:

Los PMN's se transferían a otro tubo de poliestireno de 15 ml, donde se le agregaban 4ml de solución salina hipotónica al 0.2% a 4°C, se resuspendían por 20 segundos gentilmente, en seguida se les añadían 4ml de solución salina hipertónica al 1.6% para restablecer la osmolaridad, de igual forma se mezclaban gentilmente, después se centrifugaban a 1600rpm por 10 minutos a 4°C.

Finalmente el botón resultante se resuspendía gentilmente en 1ml de HBSS con  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (ver apéndice), manteniéndose a 4°C hasta su posterior utilización.

### Recuento de PMN's, pureza y viabilidad.

Para conocer la viabilidad y el número total de células, se tomó de la suspensión celular una alícuota de 20µl, se adicionaron 80µl de azul tripano (tíñe células muertas) se colocaron 20µl de ésta mezcla en una cámara de Neubauer (ver apéndice) observándose al microscopio de luz.

Se contabilizó el número de células por cuadrante por el siguiente cálculo:

$$\text{No. células/ml} = \frac{\text{No. células por cuadrante}}{4} \times \text{factor de dilución} \times 1 \times 10^4.$$

La viabilidad celular fue siempre mayor al 98%; los PMN's se llevaron a una concentración de  $4 \times 10^6$ /ml para los ensayos.

Se tiñeron frotis con colorante de Wright, los cuáles se analizaron para controlar la pureza de la población celular, se requirió de una pureza mayor del 95%.

### Ensayo del nitroazul de tetrazolio.

Este ensayo se realizó siguiendo el procedimiento de medición cuantitativa de la reducción del NAT de acuerdo a Baehner y Nathan con modificaciones (Gutierrez *et al.*, 1997), en estudios preliminares se ha comprobado que el NAT es reducido por la presencia de  $O_2^-$  producido por los PMN's (Bahener y Boxer, 1976) tornándose de un color amarillo a un azul formazan.

De la suspensión celular de PMN's purificados ( $4 \times 10^6$ /ml) se tomaron 250µl (que correspondía a  $1 \times 10^6$  PMN's) llevándose a 1ml de HBSS con  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , los ensayos se llevaron a cabo según el siguiente esquema:

Tabla 3. Ensayos realizados en NAT

Experimental	Control de la prueba
1. 500µl de suspensión celular + 500µl de HBSS	1. 500µl de suspensión celular + 500µl de HBSS
2. 150µl PMA(concentración final 1.6µM)	2. 150µl de HBSS
3. 250µl de NAT al 0.1%	3. 250µl de NAT al 0.1%

La Tabla 3 enumera los volúmenes que se utilizaron de: 1. suspensión celular, 2. PMA y 3. NAT para cada experimento, se mezclaron en ese orden en un tubo de vidrio pirex de 12ml y se incubaron a 37°C durante 1hr, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%; al final a cada tubo se le añadieron 500µl de HCl 0.5 N para detener la reacción, los tubos se centrifugaron a 1500rpm, 10 minutos a 18°C, el botón resultante se resuspendió en 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar el precipitado (formazán) enseguida se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 570nm en cubetas de cuarzo de 1ml, se utilizó como blanco al DMSO. Se realizaron duplicados de cada experimento.

El rango de valores normales para células en reposo (que no han sido estimuladas) es de 0.07 a 0.1 de absorbancia y para células que han sido estimuladas con PMA es de 0.2 en adelante, dependiendo de la cantidad de células (Baehner y Nathan, 1968).

#### **Ensayo de quimioluminiscencia.**

El estallido respiratorio normal en PMN's está asociado con la generación de energía en forma de luz, conocida como quimioluminiscencia, la cuál depende de la producción de singletes de oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), siendo este un sensible indicador de la capacidad fagocítica y bactericida de PMN's (Jonas y Jonas, 1995).

Se utilizó el método de LaRossa (1998) con ligeras modificaciones que se mencionan, como amplificador de la respuesta quimioluminiscente se usó luminol

(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) y como partícula a fagocitar se utilizó PMA (ver apéndice).

De la suspensión celular de PMN's purificados ( $4 \times 10^6$ /ml) se tomaron 375 $\mu$ l (que corresponde a  $1.5 \times 10^5$  PMN's) esto se distribuyó en microplacas blancas con capacidad para 310 $\mu$ l como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Ensayos realizados de quimioluminiscencia.

Pozo	Suspensión (PMN's)	HBSS	Luminol	PMA*
1	95 $\mu$ l	25 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
2	95 $\mu$ l	125 $\mu$ l	100 $\mu$ l	---

\* Concentración final 1.6 $\mu$ M.

La microplaca se colocó en un luminómetro marca Labysistem Luminoskan, que contiene un fotomultiplicador el cuál convierte los fotones liberados en unidades de corriente eléctrica expresándolas en URLs (unidades relativas de luz), cada pozo contenía  $3.8 \times 10^5$  PMN's.

Después se tomaron las lecturas (en automático) durante 30 ciclos cada 40 segundos con un retardo de 0.1 segundos en cada pozo.

Los resultados se expresaron como URLs tomando el pico máximo de actividad y restándole el basal (control), se obtuvo un promedio de actividad, los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **Ensayo de capacidad bactericida.**

Normalmente, si se mezclan bacterias viables con PMN's en una solución salina, las células actuarán fagocitando las bacterias después de un cierto tiempo a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Si se toman alícuotas de esto al inicio y después de un

cierto tiempo, se puede evaluar la capacidad bactericida que tiene el PMN, en nuestros ensayos se utilizó la técnica descrita por Metcalf y colaboradores en 1985.

Para realizar esta parte del ensayo se tomaron 375µl de la suspensión celular de PMN's purificados que corresponden a  $1.5 \times 10^5$  llevándolos a 400µl con HBSS. En una microplaca de 96 pozos de fondo redondeado se siguió el procedimiento de la Tabla 5.

Tabla 5. Ensayos realizados de capacidad bactericida.

Pozo	Bacteria	Opsonización	Suero (tipo)	PMN's
1	100µl	Si	Autólogo (100µl)	---
2	100µl	Si	AB (100µl)	---
3	100µl	Si	Autólogo (100µl)	100µl
4	100µl	Si	AB (100µl)	100µl
5	100µl	---	No	100µl

La relación final PMN:bacteria fue de 1:20, cada ensayo se realizó por duplicado. La bacteria opsonizada y los PMN's se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 1hr, al inicio del experimento (tiempo 0) se tomó una alícuota de 10µl realizándose diluciones del orden de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  que fueron sembradas en placas de agar LB e incubadas durante 18h a 37°C, al término de la hora la microplaca se centrifugó a 1200rpm por 2 minutos para que sedimentaran los PMN's y quedaran en el sobrenadante las bacterias extracelulares no fagocitadas, posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante y del sedimento se tomaron 10µl a los cuales también se les practicaron diluciones ( $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) que fueron sembradas en placas de agar LB e incubadas durante 18hrs a 37°C; al día siguiente se determinó el índice bactericida con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice bactericida (log}_{10}\text{)} = \frac{\text{UFC a los 0 minutos}}{\text{UFC a los 60 minutos}}$$

Los resultados se expresaron como índice de muerte bacteriana.

### **Análisis estadístico.**

Se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA), el cual sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa., se tomó como valor significativo una  $p$  menor que 0.05.

## RESULTADOS

Las características clínicas y demográficas de los pacientes se muestran en la Tabla 6. (datos proporcionados por la Clínica Para Niños con Inmunodeficiencia Adquirida del Hospital General de México).

Tabla 6. Características clínicas y demográficas de los pacientes evaluados

Pacientes con IP*	Edad (años)	CD4+ (porcentaje)	Clasificación** Clínica/inmunológica	Tiempo de recibir terapia (años)
1	5.6	7	A3	1.3
2	5.2	28.2	B1	2.1
3	5.7	30.7	B1	1.6
4	6.1	24.5	C1	1
5	9.8	20.9	C2	2.8
6	4.4	23.6	C2	2.4
7	12.9	27.4	C1	3
8	15***	21.9	B2	0.7
9	9.4	18.4	B2	0.7
10	10.8	22.5	B2	3.3
11	11.9	6.7	C3	2
12	10.3	20.9	C2	1.8
13	12	27.8	C1	2.4
14	10.5	23	C2	2.7
15	8.2	16.5	C2	1.4
<b>Promedio</b>	<b>9.1</b>	<b>21.3</b>	<b>—</b>	<b>1.8</b>
<b>Pacientes sin IP</b>				
1	5	18.2	B2	2.5
2	6	18.3	C2	2.3
3	4.1	30.3	A1	2.9
4	8.7	20.1	A2	3.7
5	3.2	30.2	A1	0.7
<b>Promedio</b>	<b>5.4</b>	<b>23.4</b>	<b>—</b>	<b>2.4</b>

\* Inhibidores de proteasa.

\*\* Clasificación según CDC 1994. Para menores de 13 años.

\*\*\* Se consideró dentro del mismo sistema de clasificación.

La edad promedio de los pacientes con terapia IP (inhibidores de proteasa) fue de 9.1 años (de 4.4 a 15 años) mientras que para los que no recibieron esta terapia (sin IP) fue de 5.4 años. En tanto el promedio de células CD4+ en ambos grupos fue menor al 25%, excepto en 5 de 15 pacientes con IP y 2 de 5 sin IP, que no

tenían evidencia de inmunosupresión (según criterios del CDC sobre Categorías Inmunológicas Basadas en CD4+). El tiempo de recibir terapia para IP fue de 0.7 a 2.3 años, mientras que para los pacientes sin IP fue de 0.7 a 3.7 años.

La clasificación clínica se basó de acuerdo al tipo de sintomatología presente en el paciente al momento de estudio, donde N significa asintomático, A es considerado con sintomatología leve, B es sintomatología moderada y C es ya una sintomatología grave (ver tabla 1).

En el grupo con IP, 9 de los 15 pacientes presentaban una clasificación de tipo C, mientras que el grupo sin IP solo 1 de 5 se determinó con sintomatología grave.

Por otro lado y debido a las características de la población de estudio, fue necesaria la estandarización de micro-métodos con sangre de gente adulta sana para utilizar la menor cantidad de sangre de la población infantil.

En la Figura 3 se puede observar el curso de actividad quimioluminiscente de células PMN's de adultos voluntarios.

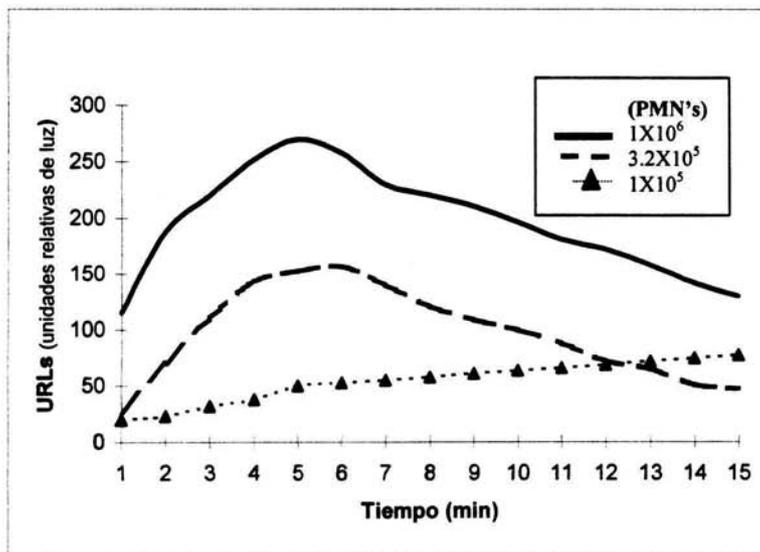


Figura 3. Respuesta de la actividad quimioluminiscente de PMN's en función de su concentración.

A medida que pasa el tiempo, utilizando cantidades iguales o superiores a  $3.2 \times 10^5$  células se puede obtener un pico máximo de actividad entre los 4 a 6 minutos de incubación, mientras que si se utilizan cantidades menores, el pico máximo no se observa en los primeros 15 minutos. Con base en los resultados anteriores se decidió realizar los ensayos con  $3.2 \times 10^5$  células.

Para establecer las condiciones optimas en la prueba de NAT (nitroazul de tetrazolio) se utilizaron distintas concentraciones de células y se varió el agente que provoca el estallido respiratorio: PMA (Phorbol Mirystate Acetate) estas pruebas se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Estandarización de la prueba de Nitroazul de tetrazolio.

Condiciones de los experimentos	Densidad óptica a 570 nm
1. $1 \times 10^6$ * + $250 \mu\text{l}$ ** + $250 \mu\text{l}$ ***	0.730 ( $\pm 0.06$ )
2. $1 \times 10^6$ * + $200 \mu\text{l}$ ** + $250 \mu\text{l}$ ***	0.650 ( $\pm 0.05$ )
3. $5 \times 10^5$ * + $200 \mu\text{l}$ ** + $250 \mu\text{l}$ ***	0.510 ( $\pm 0.07$ )
4. $5 \times 10^5$ * + $150 \mu\text{l}$ ** + $250 \mu\text{l}$ ***	0.320 ( $\pm 0.03$ )

\*PMN's

\*\*PMA (concentración final  $1.6 \mu\text{M}$ )

\*\*\*NAT al 0.1%

Esta tabla muestra que las absorbencias obtenidas estuvieron en el intervalo de 0.320 a 0.730, los valores reportados para células normales van desde 0.30 en adelante, se decidió trabajar con la condición 4 (Tabla 7).

La siguiente técnica en la que se evaluaron las condiciones optimas de trabajo, fue capacidad bactericida de los PMN's, en este caso se utilizaron los datos de las figuras 1 y 2, usando una relación final PMN/bacteria de 1:20.

### **NAT, Quimioluminiscencia y Capacidad Bactericida de PMN's de niños con IP sin IP y controles.**

Al comparar IP vs controles (Tabla 8) observamos que en las pruebas de NAT y quimioluminiscencia no hubo diferencia significativa (una p de 0.064 y 0.53 respectivamente), en cambio si hubo diferencias significativas en la capacidad bactericida tanto al usar suero AB como autologo, siendo mayor en controles (Figuras 4, 5 y 6).

Tabla 8. Estallido respiratorio y capacidad bactericida\*, grupo con IP y grupo sin tratamiento.

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>Estadístico(F)</b>	<b>Significancia (p)</b>
Nitroazul de tetrazolio	***1 ***24 ****25	3.8 1.03	3.749	0.064
Quimioluminiscencia	1 24 25	149.4 368.2	0.406	0.530
Capacidad bactericida Suero AB	1 24 25	3.07 0.269	11.41	0.002
Capacidad bactericida Suero Autologo	1 24 25	19.5 1.09	17.83	0.000

\*Análisis de varianza

\*\* Muestras

\*\*\* Error

\*\*\*\* Total

La Tabla 9 muestra la significancia obtenida del grupo sin IP vs controles, en la prueba de NAT no hubo significancia (p de 0.710), mientras que para resto de las pruebas si hubo una diferencia significativa (para quimioluminiscencia p = 0.000 y capacidad bactericida con suero AB y autologo fueron p = 0.000 y p = 0.002 respectivamente), la quimioluminiscencia se vio aumentada en el grupo sin IP; mientras que la capacidad bactericida con sueros AB y Autologo fue mayor en los controles que en el grupo sin IP (Figura 6).

Tabla 9. Estallido respiratorio y capacidad bactericida\*, grupo sin IP y grupo sin tratamiento.

	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico(F)	Significancia (p)
Nitroazul de tetrazolio	1 14 15	2.3 1.6	0.144	0.710
Quimioluminiscencia	1 14 15	11578.7 183.7	63.16	0.000
Capacidad bactericida Suero AB	1 14 15	3.36 0.154	21.89	0.000
Capacidad bactericida Suero Autologo	1 14 15	6.37 1.53	4.15	0.000

\*Análisis de varianza

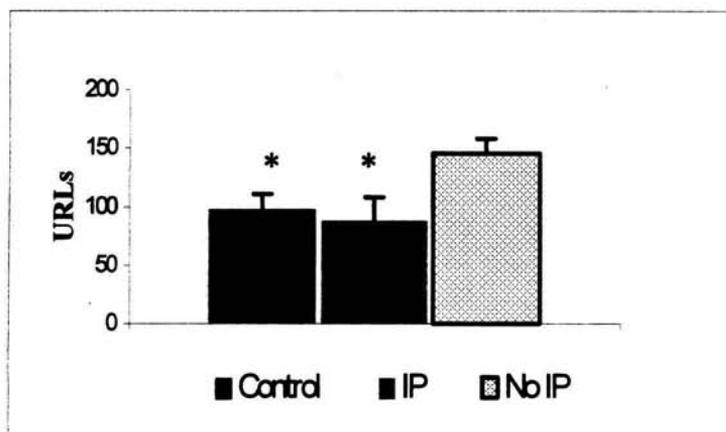
Al comparar la significancia de los grupos IP vs no IP solo en la quimioluminiscencia se detectó una diferencia significativa de  $p = 0.000$  (Tabla 10), como ya se mencionó el grupo de no IP tuvo una mejor respuesta quimioluminiscente.

Tabla 10. Estallido respiratorio y capacidad bactericida\*, grupo sin IP y grupo con IP.

	Grados de libertad	Cuadrados medios	Estadístico (F)	Significancia (p)
Nitroazul de tetrazolio	1 19 20	1.25 1.09	1.14	0.297
Quimioluminiscencia	1 19 20	16410.6 407.5	40.2	0.000
Capacidad bactericida Suero AB	1 19 20	0.294 0.267	1.1	0.305
Capacidad bactericida Suero Autologo	1 19 20	0.867 1.032	0.84	0.369

\*Análisis de varianza

Lo anterior descrito se puede ejemplificar con las siguientes figuras en donde se puede observar que la actividad quimioluminiscente fue mayor en el grupo sin IP que en los demás grupos. Mientras que el NAT fue semejante en todos los grupos estudiados; la capacidad bactericida fue mayor en el grupo control que los grupos que recibieron tratamiento antirretroviral.



\* Diferencias significativas

Figura 4. Quimioluminiscencia promedio de PMN's de niños con VIH y controles.

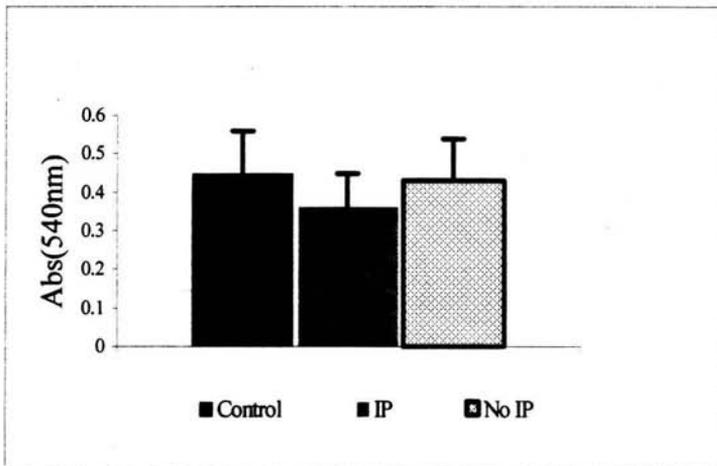
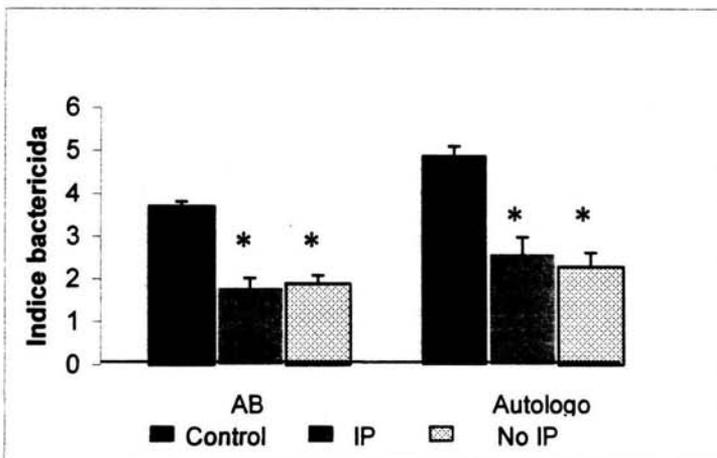


Figura 5. Absorbancia promedio registrada en NAT. Con PMN's de niños con VIH y controles.



\* Diferencias significativas.

Figura 6. Capacidad bactericida promedio de PMN's de niños con VIH y controles, al utilizar sueros AB y Autologo.

## DISCUSIÓN

La función de los leucocitos polimorfonucleares se ha reportado alterada durante la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), aun en estadios tempranos de la enfermedad, este defecto en actividad podría contribuir al desarrollo de infecciones secundarias en niños y adultos con VIH.

Dentro de las células fagocíticas los neutrófilos desempeñan un papel muy importante en la defensa del huésped contra una infección; desde la detección del agente extraño por medio de receptores de superficie hasta la migración al lugar de infección y la consecuente fagocitosis, con los eventos post-fagocíticos requeridos para completar un programa integral por parte de la célula fagocítica, todo esto con el fin de aniquilar en forma rápida y primaria un agente extraño; la alteración en cualquier parte de este complejo sistema traerá como consecuencia una fagocitosis y aniquilamiento deficientes.

Por otro lado la muerte de bacterias por neutrófilos *in vivo* es un proceso complejo el cual requiere migración al sitio de infección, ingestión así como elaboración de sustancias microbidas dependientes e independientes de oxígeno; también es bien conocido que la opsonización de la bacteria es requerida para una fagocitosis óptima (Grabert *et al*, 1989).

En el presente estudio se evaluaron los mecanismos oxidativos relacionados con la capacidad fagocítica de PMNs de niños con VIH en etapas avanzadas de la enfermedad por medio del ensayo de nitroazul de tetrazolio y quimioluminiscencia así como la capacidad bactericida para determinar la capacidad del PMN para aniquilar a la bacteria (*S. aureus*) utilizando una microplaca y reportando los resultados por medio del índice bactericida.

Con los resultados obtenidos observamos en el grupo de pacientes con tratamiento antirretroviral pero sin Inhibidores de proteasa (IP) un mayor pico de actividad en el ensayo de quimioluminiscencia sugiriendo por lo tanto una mayor producción del anión superóxido, lo cuál fue estadísticamente significativo con respecto al grupo al que se administró IP y al grupo sin tratamiento. Así mismo la capacidad bactericida estuvo disminuida en ambos grupos con tratamiento antirretroviral al compararlos con el grupo sin tratamiento, aunque incrementó el índice bactericida al opsonizar la bacteria con suero del paciente sin llegar a límites semejantes al control.

Existen escasos reportes acerca de la actividad funcional del neutrófilo con respecto a la terapia antirretroviral administrada, siendo este un tema controversial por ejemplo en un trabajo donde se evaluó la fagocitosis de PMN's utilizando *S. aureus*, Murphy y colaboradores en 1988, encontraron que estaba disminuida la fagocitosis en adultos con VIH/SIDA a pesar del tratamiento con Zidovudina (AZT). Al analizar el efecto de otro antirretroviral (Dideoxyinosine) sobre parámetros hematológicos en niños con VIH en 1991 Butler y colaboradores demostraron que mejoró la respuesta inmunológica en general (cuentas totales de linfocitos CD4+, CD8+ y neutrofilos).

Al comparar dos esquemas de terapias antirretrovirales (AZT y didanosina (ddl Vs. AZT) Collier y colaboradores en 1993 demostraron que la terapia con AZT y ddl tenían un mejor efecto sobre los parámetros hematológicos (aumento en su función) incluyendo PMN's que el AZT solo, además de que era mejor tolerado y tenía menores efectos secundarios que utilizando AZT como monoterapia.

En otro estudio en 1999 Mastroianni y colaboradores evaluaron la función del neutrófilo y otras células fagocíticas en 18 pacientes adultos con VIH que recibieron terapia con Inhibidores de proteasa, después del tratamiento antirretroviral se observó un incremento en la actividad quimiotáctica (migración al sitio de infección) en forma importante mientras que la actividad fungicida no se

incrementó en PMN's comparada con sujetos sanos, además cursaron con aumento en la quimioluminiscencia de PMN's. Sin embargo en ese estudio los resultados estuvieron dentro del límite de la significancia (0.05) para la mayoría de los experimentos que se realizó y hacen énfasis al aumento poco significativo al evaluar el metabolismo oxidativo en estas células, por lo que no es muy claro el efecto verdaderamente benéfico de esta terapia sobre la función fagocítica de los PMN's, el mismo autor señala que el metabolismo oxidativo se ha reportado, por parte de otros investigadores, deficiente, normal o aumentado durante el transcurso de la infección por VIH, menciona que las razones para estas discrepancias no han sido bien definidas, pero según el autor pueden deberse a las diferencias en las poblaciones o en los procedimientos utilizados para medir el estallido respiratorio. En el año 2000 el mismo autor publicó otro artículo donde evalúa el efecto que tienen los IP sobre la apoptosis del PMN *ex vivo*, ya que algunas personas infectadas con VIH estaban teniendo una tasa elevada de muerte por apoptosis en estas células, al término del estudio donde se les administró la terapia con IP hubo una mejora muy significativa en cuanto a la apoptosis. La terapia basada en los inhibidores de proteasa mejoró tanto las respuestas adquiridas inmunes como innatas, pero a pesar de esto, los autores reconocen que no hubo una respuesta en la disminución de la carga viral tan buena como la esperada, haciendo notar así la deficiencia parcial del inhibidor utilizado.

Tozzi y colaboradores en 1997 valoraron el efecto de indinavir sobre las plaquetas y cuenta de neutrófilos en una cohorte de 22 adultos con HIV en etapa avanzada y observaron que en 16 de los pacientes con neutropenia crónica incrementó la cuenta de neutrófilos en forma significativa, siendo el primer reporte que muestra el efecto positivo de un IP en la cuenta de neutrófilos y plaquetas.

Hasta el momento los datos con respecto al efecto del Tratamiento antirretroviral altamente efectivo (TARAA) en la actividad funcional de los neutrófilos son

escasos y contradictorios probablemente por las diferentes metodologías estudiadas.

En lo que coinciden la mayoría de los autores es que el tratamiento de los pacientes infectados con VIH ha tenido un cambio enorme en la última década, en 1996 se reporta por primera vez una disminución de muertes por SIDA en EUA lo que se ha explicado en parte por la utilización de antiretrovirales (ARV) más potentes como serían los IP en el esquema conocido como TARAA, aunque aún no hay una explicación precisa del mecanismo de los IP en éste campo.

Los resultados obtenidos aunque con ciertas limitantes son de importancia, dada la escasa información de TARAA y la función de PMNs en niños con VIH. En nuestro estudio observamos que los niños con VIH y que recibieron tratamiento con ARV tienen un metabolismo oxidativo de PMNs semejante a los controles o incrementado como el grupo sin IP, esta diferencia podría ser secundaria a que el grupo que recibió IP son niños que ya habían recibido esquemas previos con ARV y ésta podría ser una variable que afectara los resultados. En relación con la actividad bactericida se observó disminuida con respecto al control aunque no contamos con valores basales, los resultados obtenidos son semejantes a los reportados por Mastroianni en 1999 en adultos infectados con VIH.

Nuestros resultados, aunque con limitaciones, son de importancia dada la necesidad de ampliar el conocimiento en la interacción de antirretrovirales -Virus de la inmunodeficiencia Humana-sistema inmune, dado que hasta momento es la única alternativa con la que se ha observado disminución de la morbi-mortalidad de las personas infectadas con VIH y en un futuro en caso de delimitarse la acción en el sistema inmune podría tal vez desarrollarse alternativas de manejo que causaran menos efectos secundarios, efecto más duradero y más fácil de administrar.

## CONCLUSIONES

- Los PMN's de niños con VIH/SIDA que reciben terapia antirretroviral tienen una menor capacidad bactericida contra *S. aureus* comparada con PMN's de niños sin VIH *in vitro*.
  
- Los PMNs de niños con VIH/SIDA que reciben el esquema antirretroviral sin IP tienen una mejor respuesta quimioluminiscente que los PMN's de niños con IP y niños sanos.

## REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S: Inmunología celular y molecular. 1995. Interamericana Mc graw-hill. Mex. Pp517.
- Allen R., C., Stjernholm R., L., Steele RH. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 47(4): 679-84.
- Baehner L., R., Nathan G., D. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.*1968;278:971-976.
- Bahener L., R., Boxer S. The biochemical basis of NBT reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear.1976;48:309-13.
- Bahener R., L. Subcellular distribution of nitro blue tetrazolium reductase (NBT -R) in human polymorphonuclears leukocytes (PMN). *J Lab Clin Med.* 1975; 86:785-792.
- Bandres J., C., Trial J., Musher D., M. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage I immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1993; 168:75-83.
- Bernstein L., J., Krieger B., Z., Novick B., Sicklick M., J., Rubinstein A. Bacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome of children. *Pediatr Infect Dis.* 1985; 4(5): 472-5.
- Blair A., L., Cree I., A., Beck J., S., Hastings M., J. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtitre plate format. *J Immunol Methods.* 1988; 112(2): 163-8.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest. Suppl.* 1968; 97: 77-89.
- Butler K., M., Husson R., N., Balis F., M., Brouwers P., Eddy J., el-Amin D., Gress J., Hawkins M., Jarosinski P., Moss H. Dideoxyinosine in children with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1991; 324(3): 137-44.

- Campbell AK. Bioluminescence and chemiluminescence. Jonh Wiley & sons. New York.1994:179-186.
- Campos J., M. Laboratory methods for early detection of human immunodeficiency virus type I in new borns infants. Clin Microbiol Rev. 1992;5:238.
- CDC. 2001. Revised Guidelines for HIV Counseling, Testing, and Referral. MMWR;50(RR19):1-58.
- Collier A., C., Coombs R., W., Fischl M., A., Skolnik P., R., Northfelt D., Boutin P., Hooper C., J., Kaplan L., D., Volberding P., A., Davis L., G. Combination therapy with zidovudine and didanosine compared with zidovudine alone in HIV-1 infection. Ann Intern Med. 1993; 119(8): 786-93.
- Easmon C., S., Cole P., J., Williams A., J., Hastings M. The measurement of opsonic and phagocytic function by Luminol-dependent chemiluminescence. Immunology. 1980; 41(1): 67-74.
- Fauci A., S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease:implications fortherapy. Science. 1993;262(5136):1011-8.
- Garbett N., D., Matharu G., S., Cole P., J. Defective opsonization of *Haemophilus influenzae* by sera of edery patients. Clin Exp Immunol. 1989; 76:73-75.
- Goldsby R., A., , Thomas J., Kindt and Barbara A. Osborne. 2000. Immunology.W.H Freeman and company. New York. pp. 670.
- Gutierrez A., M. y Masjuan M. Reducción del Nitroazul de tetrazolio por leucocitos PMN's del recién nacido. Rev Cub Ped.1997;69:84-94.
- Ham A., S. tratado de histología. 7°. edición, 1983. ed. interamericana. México. pp 312-318.
- Hellen F., G., Coomansingh D., Webster N., R., Brunt P., W. Nitric oxide sinthase activity is increased in relation to the severity of liver dysfunction. Clin Sci.1998;95:355-59.
- Hiroko H., Katsuhiko S., Shigeyuki N., Kazuo S. Analysis and assesment of the capacity of neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. J Immunol Methods. 1997;210:1-10.

- John-Stewart G., Mbori-Ngacha D., Ekpini R., Janoff E., N., Nkengasong J., Read J., S., Van de Perre P., Newell M., L. Breast-feeding and Transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004; 35(2):196-202
- Jonas E., Dwenger A., Jonas M. Chemiluminescence response and adherence of neutrophils to cultured endothelial cells influence of immunoglobulin G. *J Biolumin Chemilumin.* 1995;10(3):169-73.
- Klebanoff S., J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Seminars in Hematol.* 1975;12:117-142.
- Krasinski K., Borkowsky W., Bonk S., Lawrence R., Chandwani S. Bacterial infections in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J.* 1988; 7(5): 323-8.
- LaRossa AR. Bioluminescence. methods and protocols.1998. Humana press Totowa NY.179-187.
- Levinsky R., J., Harvey B., A., Rodeck CH, Soothill JF. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol.* 1983; 54(2): 595-8.
- McNamara J., G. Immunologic abnormalities in infants infected with human immunodeficiency virus. *Semin Perinatol.* 1989; 13(1): 35-43. Review.
- Magierovska M., Lepage V., Boubnora C., Carcassi C. 1998. Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion. *Immunogenetics*; 48:417-19.
- Martínez Aguilar Gerardo. Capacidad fagocítica y microbicida de polimorfonucleares de niños con SIDA retados con *H. Influenzae* tipo b. Tesis de maestría. UNAM. 1997. 58pp.
- Mastroianni C., M., Lichtner M., Mengoni F., D'Agostino C., Forcina G., d'Ettorre G., Santopadre P., Vullo V. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS.* 1999; 13(8): 883-90.
- Mastroianni C., M., Mengoni F., Lichtner M., D'Agostino C., d'Ettorre G., Forcina G., Marzi M., Russo G., Massetti A., P., Vullo V. *Ex vivo* and *in vitro* effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil apoptosis. *J Infect Dis.* 2000; 182(5): 1536-9.

- Metcalfe D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*. 1986;67(2):257-67. Review.
- Metcalfe J., A, Gallin J., I, Nauseef W., M., Root R., K. Functions related to microbial activity. In *laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press Ltd. New York. 1985.:87-142.
- Meyer H., P., O., Kappeli, A., Fiechter. Growth control in microbial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 1985; 39: 299-319.
- Murphy P., M., Lane H., C., Fauci A., S., Gallin J. Impairment of neutrophil bactericidal capacity in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1988; 158(3): 627-30.
- Nduati R., W., John G., C., Richardson B., A. Human immunodeficiency virus type 1-infected cells in breast milk from HIV-1 infected women: Association with immunosuppression and vitamin A deficiency. *J Infect Dis.* 1995;172:1461-1468.
- ONUSIDA/OMS. 2003. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) (versión española, diciembre de 2003).
- Pantaleo G., Graziosi C., Demarest J., F., Butini L., Montroni M., Fox C., H., Orenstein J., M., Kotler D., P., Fauci A., S. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362(6418):355-8.
- Piatk M., Saag M., S., Yang L., C. High levels of HIV in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993;259:1749-54.
- Principi N., Marchisio P., Tornaghi R., Massironi E., Onorato J., Picco P., Libretti C. Occurrence of infections in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J.* 1991; 10(3): 190-3.
- Quie P. G. Phagocytic cell dysfunction. *J Aller. Clin. Immunol.* 1986;77:387-398.
- Richardson M., P., Ayliffe M., J., Helbert M., Davies E., G., Richardson. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods.* 1998; 219(1-2): 187-93.
- Root R., K., Cohen M., S., The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis.* 1981; 3(3): 565-98. Review.
- Secretaría de salud, Centro Nacional para la Prevención y control del VIH/SIDA. CENSIDA. Epidemiología del VIH/SIDA en México en el año 2003, pp 7.

- Siegal F., P., Oleske J. Management of the acquired immune deficiency syndrome: is there a role for immune globulins? In clinical use of intravenous immunoglobulins. London Academia Press, 1986:373-383.
- Tozzi V., Narcisco P., Sebastiani G., Frigiotti D., D'Amato C. Effects of indinavir treatment on platelet and neutrophil counts in patients with advanced HIV disease. AIDS. 1997; 11(8): 1067-8.
- Tyor W., R., Steyen L., Wesselingh, Griffin J., W. Unifying hypothesis for the pathogenesis of HIV-associated dementia complex, vacuolar myelopathy, and sensory neuropathy. J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995;9(4):379-88. Review.
- Walker R., I., Willemze R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. Rev Infect Dis. 1980;2(2):282-92.

## APENDICE

### Reactivos utilizados

- Solución Balanceada de Hanks (HBSS)
  - glucosa 1.0gr
  - cloruro de sodio 8.0gr
  - cloruro de potasio 0.4gr
  - cloruro de calcio 0.14gr
  - sulfato de magnesio 0.1gr
  - cloruro de magnesio 0.1gr
  - bicarbonato de sodio 0.35gr
  - fosfato monopotásico 0.06gr
  - fosfato disodico 0.06gr
  - agua bidestilada 1lt

Disolver los reactivos de acuerdo al orden en que se encuentran. Ajustar el PH a 7.2 y esterilizar por filtración en membrana de 0.22 $\mu$ m.

- Solución salina isotónica al 0.85%
  - cloruro de sodio 0.85gr
  - agua bidestilada 100ml
- Solución salina hipotónica al 0.2%
  - cloruro de sodio 0.2gr
  - agua bidestilada 100ml
- Solución salina hipertónica al 1.6%
  - cloruro de sodio 1.6gr
  - agua bidestilada 100ml

Esterilizar en autoclave a 15lbs/15min.

- Agar LB
  - triptona 10gr
  - extracto de levadura 5gr
  - cloruro de sodio 10gr
  - agar-bacto-agar 15gr
  - agua bidestilada 1lt

Mezclar todo y calentar hasta disolver; después esterilizar en autoclave, vaciar 15ml en cada caja de petri.

- Caldo LB
  - triptona 10gr
  - extracto de levadura 5gr
  - cloruro de sodio 10gr
  - agua bidestilada 1lt

Mezclar todo y calentar hasta disolver; después esterilizar en autoclave.

- Caldo Soya Tripticasa (TSA)
  - TSA 3gr
  - agua bidestilada 100ml

Mezclar todo y calentar hasta disolver; después esterilizar en autoclave.

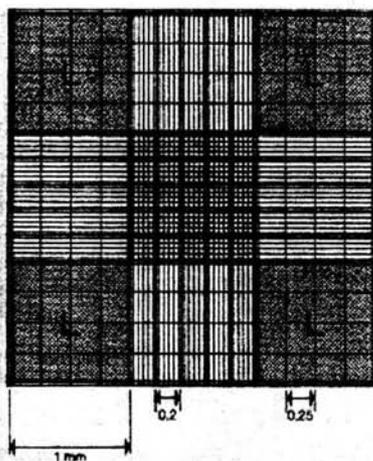
- HCl 0.5N
  - HCl 43.7ml

Aforar a 1lt con H<sub>2</sub>O bidestilada

- Nitro Azul de Tetrazolio (NAT) al 0.1%
  - NAT 0.1gr
  - HBSS 100ml
  
- PMA (sigma) solución stock (5 $\mu$ M)

### Conteo celular

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se observa una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.



Si contamos las cuatro áreas sombreada (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será :  
concentración en la suspensión (células / mL) = 10000 (x/4).