



58  
Zej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**EFFECTO DE LA EDAD EN LOS NIVELES DE  
FAGOCITOSIS EN CERDOS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :  
**VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRON**

**DIRECTOR DE TESIS**

**MVZ. MSC. PhD. ANTONIO MORILLA GONZALEZ**

**ASESORES**

**QBP. MC. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO**

**QFB. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ**



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN  | 4  |
| I. INTRODUCCION  | 5  |
| II. ANTECEDENTES HISTORICOS  | 6  |
| III. ENDOCITOSIS   | 7  |
| IV. LAS CELULAS FAGOCITARIAS   | 10 |
| 1. MORFOLOGIA  | 11 |
| A. Neutrófilos   |    |
| B. Monocitos   |    |
| V. FUNCION DE LAS CELULAS FAGOCITARIAS   | 12 |
| 1. CASCADA DE EMIGRACION   |    |
| A. Marginación, adherencia, diapedesis, emigración aleatoria y dirigida e inmovilización |    |
| B. Quimiotaxis   |    |
| a) Aspectos humorales  |    |
| b) Aspectos celulares  |    |
| 2. CASCADA DE DESTRUCCION  | 16 |
| A. Reconocimiento  | 17 |
| a) Aspectos humorales  |    |
| b) Aspectos celulares  |    |
| B. Fagocitosis   | 23 |
| a) Papel de ligandos y receptores en la ingestión de partículas                          |    |
| b) Requerimientos para la fagocitosis  |    |
| C. Muerte y Digestión  | 28 |
| a) Gránulos y desgranulación   |    |
| b) Mecanismos independientes de oxígeno  |    |
| c) Mecanismos dependientes de oxígeno  |    |
| d) Mecanismos microbicidas de los fagocitos mononucleares                                |    |
| D. Exocitosis  | 39 |
| VI. EVALUACION CLINICA DE LA FAGOCITOSIS   | 40 |

|       |   |            |
|-------|---|------------|
| VII.  | DESORDENES DE LA FAGOCITOSIS              | 40         |
| VIII. | JUSTIFICACION                             | 50         |
| IX.   | HIPOTESIS DE TRABAJO                      |            |
| X.    | OBJETIVOS                                 | 51         |
| XI.   | MATERIAL Y METODOS                        | 52         |
|       | 1. <sup>a</sup> DISEÑO EXPERIMENTAL       |            |
|       | 2. <sup>a</sup> MATERIAL BIOLÓGICO        |            |
|       | 3. <sup>a</sup> LAVADO DE CUBREOBJETOS    |            |
|       | 4. <sup>a</sup> PREPARACIÓN DE LEVADURAS  |            |
|       | 5. <sup>a</sup> OPSONIZACIÓN DE LEVADURAS |            |
|       | 6. <sup>a</sup> ENSAYO DE FAGOCITOSIS     |            |
|       | 7. <sup>a</sup> CONTEO CELULAR            |            |
| XII.  | RESULTADOS                                | 57         |
| XIII. | DISCUSION                                 | 68         |
| XIV.  | CONCLUSIONES                              | 75         |
| XV.   | BIBLIOGRAFIA                              | 76         |
|       | FOTOGRAFIAS                               | 62, 64, 66 |

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| TABLA 1. | CONSTITUYENTES DE LOS GRANULOS AZUROFILOS Y ESPECIFICOS DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS | 29 |
| TABLA 2. | ETAPAS DEL PROCESO FAGOCITARIO Y LAS TECNICAS EMPLEADAS EN LA CLINICA PARA EVALUARLAS                | 41 |
| TABLA 3. | DESORDENES DE LA FAGOCITOSIS   | 42 |
| TABLA 4. | EFFECTO DE LA EDAD EN LOS NIVELES FAGOCITARIOS EN CERDOS   | 59 |
| TABLA 5. | ESTUDIO COMPARATIVO EN LOS NIVELES FAGOCITARIOS ENTRE HUMANOS Y CERDOS                               | 60 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1. | ESQUEMA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ENDOCITOSIS CELULAR   | 9  |
| FIGURA 2. | ESQUEMA DEL MECANISMO CREMALLERA DE LA FAGOCITOSIS   | 24 |
| FIGURA 3. | ESQUEMA DE LAS BASES BIOQUIMICAS DEL ACELERAMIENTO RESPIRATORIO  | 35 |
| FIGURA 4. | EFFECTO DE LA EDAD EN EL PORCENTAJE DE CELULAS FAGOCITICAS DE CERDO DE SANGRE PERIFERICA APTAS PARA FAGOCITAR                                    | 61 |
| FIGURA 5. | EFFECTO DE LA EDAD EN EL INDICE FAGOCITICO DE CELULAS FAGOCITICAS DE CERDO DE SANGRE PERIFERICA  | 63 |
| FIGURA 6. | EFFECTO DE LA EDAD EN EL PORCENTAJE DE CELULAS FAGOCITICAS DE CERDO DE SANGRE PERIFERICA CON CAPACIDAD DE PRODUCCION DE SUBSTANCIAS MICROBICIDAS | 65 |
| FIGURA 7. | ESTUDIO COMPARATIVO EN LOS NIVELES FAGOCITARIOS ENTRE HUMANOS Y CERDOS   | 67 |

### G L O S A R I O.

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| PMN                               | : Polimerfonuclear   |
| AMPc                              | : Monofosfato de adenosina ciclico                                     |
| GMPc                              | : Monofosfato de guanina ciclico                                       |
| ATP                               | : Trifosfato de adenosina  |
| DNA                               | : Acido desoxirribonucleico  |
| RNA                               | : Acido ribonucleico   |
| GSH                               | : Glutacion  |
| NBT                               | : Nitrozul de tetrazolio   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     | : Peroxido de hidrogeno  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>       | : Anion superoxido   |
| OH <sup>-</sup>                   | : Radical hidroxilo  |
| DL <sub>50</sub>                  | : Dosis letal que mata al 50% de un lote de animales                   |
| NAD <sup>+</sup> y NADH           | : Nicotinamida-adenin-dinucleotido (oxidado y reducido)                |
| NADP y NADPH                      | : Fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleotido (Oxidado y reducido)     |
| Gly-6-P                           | : Glucosa-6-fosfato  |
| CH <sup>2</sup> y CH <sup>3</sup> | : Segundo y tercer dominio de la cadena pesada en una inmunoglobulina. |

## R E S U M E N.

Con objeto de determinar los valores normales de fagocitosis se tomaron muestras de 10 adultos humanos jóvenes (23-26 años) y 80 cerdos de diferentes razas. Se utilizó una técnica semicuantitativa para evaluar los siguientes parámetros : a) Porcentaje de células aptas para fagocitar, b) Índice fagocítico y c) Metabolismo oxidativo en los humanos adultos y en los cerdos desde el nacimiento hasta las 10 semanas, 6 meses y 2 años de edad. La técnica se realizó utilizando fagocitos adheridos a cubreobjetos a partir de una pequeña cantidad de sangre total y como microorganismos de prueba se utilizaron levaduras. En los cerdos se observó que al nacimiento el porcentaje de células que fagocitan y el índice fagocítico son de 54% y 3.3 respectivamente. Ambos valores disminuyen en la primera semana (50% y 2.7) y comienzan a aumentar en la segunda (62% y 2.8), observándose una nueva tendencia a la baja entre la sexta y séptima semana (52% y 2.3), aumentan paulatinamente a partir de la octava; a las 10 semanas se alcanzan niveles equiparables a los de adultos (77% y 3.6). El metabolismo oxidativo es de 81% de células capaces de producir sustancias microbicidas al nacimiento, disminuyen ligeramente en la primera semana (77%) y a partir de la segunda se alcanzan totalmente los niveles de adultos (88%). Se concluye que a las 10 semanas se adquiere la madurez completa en los niveles fagocitarios ya que son semejantes a los de cerdos adultos. Estos valores son equiparables a los encontrados en humanos adultos en cuanto al porcentaje de células aptas para fagocitar y son mayores con respecto al índice fagocítico y al metabolismo oxidativo (  $P < 0.05$  ).

## 1. INTRODUCCION.

Ante la presencia de algún fenómeno biológico se pueden tomar varias actitudes analíticas; una es la diseccionar el fenómeno intentando cuantificar y estudiar sus componentes por separado. Otra es estudiar las interacciones de los componentes que intervienen en el fenómeno, su importancia individual, secuencia de actividades, etc. Por último, podemos pensar que un tercer enfoque sería el averiguar los antecedentes del fenómeno y que factores contribuyeron a que se presentara en determinado lugar y momento. En el presente trabajo de Tesis empezaremos abordando ésta última metodología.

La defensa del organismo contra lo "ajeno" se lleva a cabo mediante dos mecanismos generales: la fagocitosis de sustancias a las que identifica como ajenas y el desarrollo de una reacción inmunitaria en contra de dichas sustancias (antígenos). Los linfocitos y las células plasmáticas están relacionados con los procesos inmunitarios, por lo que a este sistema celular se le denomina "inmunitario". Los neutrófilos y los monocitos, son células que tienen la capacidad de realizar la fagocitosis y constituyen el sistema fagocitario. Ambos sistemas tienen una relación muy estrecha en sus funciones. Por ejemplo, cuando los monocitos procesan un antígeno inician una respuesta linfocitaria, lo que da como resultado la producción de anticuerpos. A su vez, los neutrófilos engloban mejor a las bacterias recubiertas de anticuerpos (opsonizadas), que aquellas que no lo están (8). Dentro de este contexto el presente trabajo experimental comprende el estudio de un aspecto del sistema fagocitario con respecto al efecto de la edad en los niveles fagocitarios durante las 10 primeras semanas de vida y en la etapa adulta, utilizando como modelo experimental al cerdo.

## II. ANTECEDENTES HISTORICOS.

La presencia de bacterias dentro de los leucocitos ya se observó en 1870, pero tal observación no se asociaba con la resistencia a la enfermedad. Como corolario de sus estudios sobre la digestión intracelular de la pulga de agua Daphnia, Metchnikoff parece que fue el primero en sospechar que la ingestión por los leucocitos desempeña cierto papel en la resistencia. Daphnia, por ser transparente, proporcionaba un excelente sujeto para el estudio de la digestión. Metchnikoff observó células ameboides dentro de Daphnia, que podían ingerir un número limitado de hongos. Sin embargo, cuando el número de hongos era muy elevado lesionaron las células ameboides y la pulga de agua moría. Metchnikoff supuso que éstas células constituían una defensa del animal contra la infección mortal ( 9 ).

Metchnikoff, en Viena, dió a conocer su teoría acerca de la inmunidad y en el laboratorio de su amigo, el profesor Claus, un zoólogo, le pidió que buscara un nombre científico para esas células errantes que comían microbios. El profesor Claus y sus colegas consultando diccionarios, finalmente dieron el nombre: Fagocito, que significa en griego " célula que come " ( 28 ).

Más tarde se observó la importancia de componentes hemáticos no celulares en la ingestión fagocítica. Denys y Leclaf, en 1895 y 1898, señalaron que el suero inmune estimulaba la fagocitosis activa mucho más que el suero normal. Metchnikoff aseguró que él indicaba la presencia en el suero inmune de una substancia, que él llamo estimulina, que aumentaba la actividad fagocítica de los leucocitos. La hipótesis de la estimulina se consideró equivocada cuando Wright y Douglas demostraron que el aumento de la fagocitosis, causado por el suero, resulta de la



acción de un componente de éste sobre las bacterias, más que sobre los leucocitos. Wright llamó a éste componente "opsonina", del griego "opsono", que quiere decir "preparar para comer" ( 9 ).

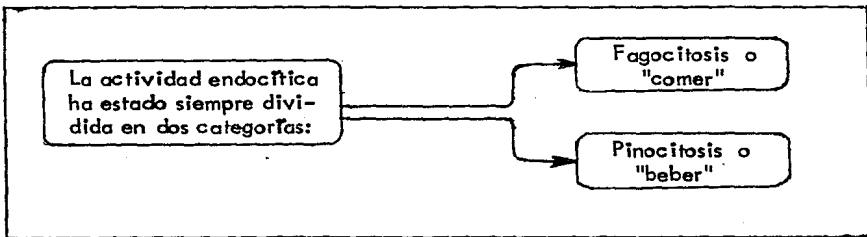
Una descripción clásica de la acción de las opsoninas fue dada por George Bernard Shaw en "The Doctor's Dilemma" :<sup>2</sup>"Los fagocitos no se comen a los microbios a menos que los microbios estén bonitamente mantequillados para ellos, bien, los pacientes manufacturan la mantequilla para ellos, bien, la mantequilla.....  
..... yo la llamo opsonina" ( 47 ).

Actualmente se conoce que la fagocitosis es estimulada por la presencia de anticuerpos específicos IgG y los componentes C3 y C5 activados, designados como C3b y C5b (fagocitosis inmunológica). La fagocitosis también ocurre en la ausencia de anticuerpos del suero, tal fagocitosis "no inmunológica" o "no específica" ha sido observada con bacterias, eritrocitos tratados con sialidasa y varias partículas tales como el zymosan (una preparación cruda de pared de levaduras), carbón y asbesto. Existe evidencia de que algunas interacciones lectinas-carbohidratos sirven como base para el reconocimiento en la fagocitosis "no inmune" ( 42 ).

### III. ENDOCITOSIS.

La endocitosis es una extensa función celular que regula la cantidad de ingestión de moléculas exógenas del entorno vía derivados de la membrana; vesículas y vacuolas. Tanto las sustancias solubles (Pinocitosis) y las partículas (Fagocitosis) pueden ser interiorizadas, destinadas tanto para los aparatos vacuolares y su digestión intracelular o el transporte a través del citoplasma y subsecuentemente su exo-

citosis. Sin embargo muchas células, si no todas, demuestran estas primitivas funciones, pero son particularmente prominentes en leucocitos, macrófagos, células del endotelio capilar y células epiteliales tiroideas e intestinales y pocitos. Ellas están envueltas en la defensa del hospedador, reacciones inmunológicas, transporte macromolecular, transformación de hormonas, regulación de caminos metabólicos y tal vez en la nutrición celular también ( 43 ).

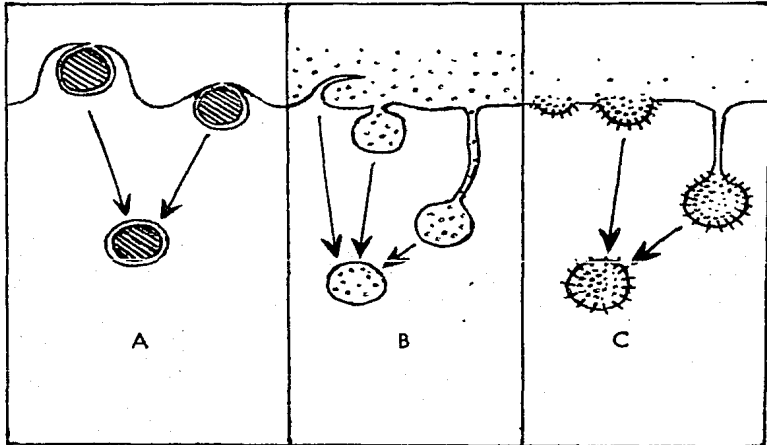


Muchos investigadores usan el término fagocitosis para describir la ingestión de grandes partículas, por ejemplo, aquellas visibles por microscopía de luz y posiblemente algunos virus ( 43 ).

Muchas células generan vesículas pinocíticas en constante, pero en diferentes proporciones, incluyendo fluidos y solutos en la concentración a la cual ellos se encuentran en el medio extracelular ( Pinocitosis fluida ). Existen solutos que se unen a la membrana plasmática y son interiorizados por pinocitosis adsorptiva en proporciones a menudo muchas miles de veces por arriba de la ingestión de reactantes en la fase fluida ( 43 ) ( Ver figura 1 ).

FIGURA 1

ESQUEMA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ENDOCITOSIS  
CELULAR.



En la fagocitosis ( A ) la superficie de la célula se aplica estrechamente a la partícula. Los aspectos citoplásmaticos de las vacuolas pinocíticas pueden ser lisos ( B ) en el caso de la pinocitosis fase fluida o cubiertos con receptores ( C ) para el caso de la pinocitosis adsortiva ( 43 ).

#### IV. LAS CELULAS FAGOCITARIAS.

En los mamíferos (como en los humanos y en los cerdos) existen células blancas sanguíneas que comen materiales particulados: los leucocitos polimorfonucleares y los fagocitos mononucleares. Rabinovitch ha llamado a éstas células "fagocitos profesionales", porque ellos tienen la ocupación de tiempo completo para comer ( 40 ). Sin embargo, los fagocitos profesionales no son las únicas células de los mamíferos que comen partículas, los fibroblastos, neuronas y una variedad de células endoteliales también ingieren partículas y se ha referido a éstas células como "fagocitos facultativos" o "no profesionales" ( 43 ).

El desarrollo de la terminología médica ( y la de los demás campos de la ciencia ) ha hecho que ésta sea tortuosa, confusa e inexacta. Este problema, en relación específica con la hematología, se hace evidente, en particular, en lo que respecta al sistema monocitos-macrófagos. Los macrófagos habrían sido históricamente considerados parte del sistema reticuloendotelial, definido operacionalmente como los sitios donde las partículas transportadas intravenosamente en cuestión salen de ésta para ser retenidas ( 47 ). Aschoff decía que el sistema reticuloendotelial consta de histiocitos fagocíticos, células linfáticas, células sinusoidales, fibroblastos, células reticulares, células dendríticas, como las células Langerhans de la piel y células endoteliales ( 44 ).

Posteriores clasificaciones recomendaron el uso del término "Sistema fagocítico mononuclear", dado que el de sistema reticuloendotelial es histológicamente impreciso y porque la endocitosis puede acontecer sólo parcialmente para limpiar de materiales particulados ( 47 ).

Así mismo, algunos autores agrupan a los monocitos junto con los linfocitos bajo el término de "células sanguíneas mononucleares" quizá para diferenciarlos de los polimorfonucleares. Posiblemente lo anterior ha originado la popularidad del "sistema ( o complejo ) fagocítico mononuclear" como un término que abarca a monocitos y macrófagos. Sin embargo, los macrófagos son de las pocas células normales que en realidad pueden ser multinucleares (poliploides) ya que se pueden fusionar unos con otros, dando lugar a la formación de células poliploides grandes. El ejemplo clásico es el de las células gigantes de Langerhans, las cuales se encuentran en los procesos inflamatorios granulomatosos, como el que se produce en la tuberculosis, pero los macrófagos poliploides también se pueden observar en ausencia de cualquier estímulo inflamatorio ( 8 ).

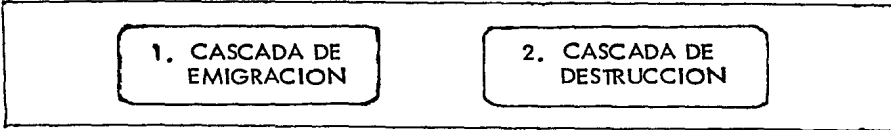
## I. MORFOLOGIA.

A. Neutrófilos. Los neutrófilos maduros ( polimorfonucleares, "segmentados" ) tienen un núcleo cuyos segmentos se encuentran unidos por un filamento. En promedio tienen 3 pero pueden encontrarse en la sangre normal células con 5 segmentos. Los neutrófilos en banda son semejantes a los maduros excepto porque les falta la segmentación filamentosa ya que son una forma un poco menos madura de neutrófilos, aunque funcionan casi tan bien como los segmentados.

B. Monocitos. Su identificación morfológica es más difícil debido a la enorme variación en su aspecto morfológico. La única característica en la que se puede confiar en forma universal para su identificación, es su cromatina nuclear, la cual es granular, pero los gránulos son de diámetro más pequeño y forma más elongada que en linfocitos y neutrófilos. La célula es redonda; el monocito típico tiene un núcleo redondo u ovalado sin depresiones y en ocasiones, inclusive segmentado ( 8 ).

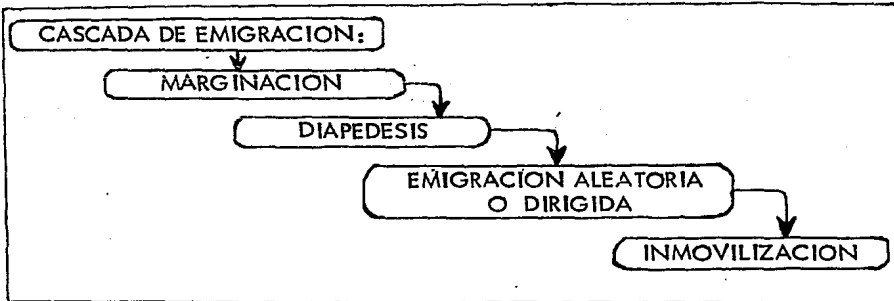
## V. FUNCION DE LAS CELULAS FAGOCITARIAS.

Para combatir en forma adecuada a un microorganismo invasor, los neutrófilos deben abandonar la circulación sanguínea, emigrar hacia el área donde se inicia la infección y luego reconocer y fagocitar para destruir y digerir al invasor. Se han dividido estos eventos en dos grandes categorías:



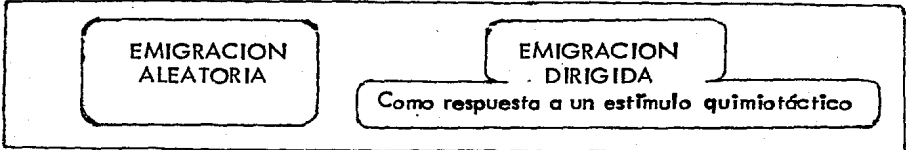
### 1. CASCADA DE EMIGRACION.

Esta cascada comprende una serie de reacciones íntimamente relacionadas, pero distintas ( en el sentido de que incluyen mecanismos relativamente diferentes; íntimamente relacionados porque un mismo estímulo puede provocar más de una reacción ).



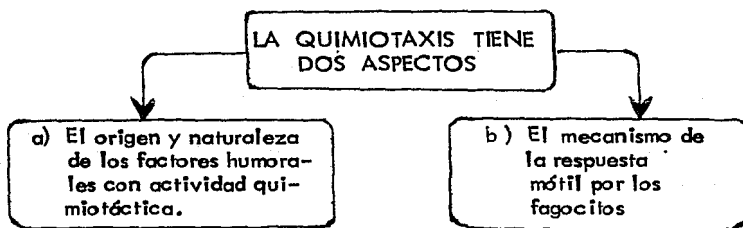
A. MARGINACION, ADHERENCIA, DIAPEDESIS, EMIGRACION ALEATORIA O DIRIGIDA E INMOVILIZACION. La cascada de emigración se inicia con la marginación de los neutrófilos de la circulación sanguínea; pero un neutrófilo se puede marginar sin que en realidad sufra adherencia ( y agregación ). Con el proceso de adherencia, el neutrófilo se fija al endotelio vascular y se extiende sobre su superficie. Por lo común la adherencia se acompaña de agregación, aunque és-

te último proceso puede ocurrir en la circulación, en tanto que la adherencia de los neutrófilos ocurre cuando éstos llegan al lecho capilar. El proceso de adherencia se puede subdividir con base a la fuerza de unión en: "adhesión", un proceso pasivo, fácilmente reversible; y "anclaje", un proceso dependiente del consumo de energía, que no es fácilmente reversible. En las áreas inflamadas, los neutrófilos adheridos pueden separarse, reingresar a la circulación sanguínea ( pero si no han abandonado los límites de la vasculatura ) o pueden llevar a cabo la diapedesis; este proceso se realiza mediante movimientos de los neutrófilos a través de las áreas de unión que se localizan entre las células endoteliales, abriéndose paso por la membrana basal, lo que quizá se facilite por la liberación de sustancias como la proteasa por el neutrófilo en emigración. Después el neutrófilo emigra hacia los tejidos o a las cavidades corporales en 2 formas fundamentales:



Una vez que el neutrófilo entra en un área en la que existe un proceso inflamatorio importante, puede trasladarse hacia otro sitio ( pero no volver a la sangre ), morir ( y ser fagocitado por macrófagos tisulares ) o ser inmovilizado, pero con sus funciones preservadas ( 8 ).

B. QUIMIOTAXIS. La vectorial respuesta de motilidad a la inflamación es la propiedad de quimiotaxis. En realidad mucho del tránsito normal de los fagocitos hacia los tejidos puede ser inducido quimiotácticamente, por ejemplo, el movimiento de los leucocitos hacia regiones, tales como el intestino, que normalmente contienen microbios ( 8 ).



a) Aspectos humorales de la quimiotaxis. La interacción entre los microorganismos y los tejidos del huésped permite la generación de factores quimiotácticos por algunos mecanismos ( 47 ). Las quimiotaxinas pueden ser sustancias naturales o sintéticas. Existe una amplia variedad de quimiotaxinas naturales que se liberan o se generan como parte de una reacción inflamatoria, entre éstas se encuentran:

i) Los fragmentos desdoblados que se generan por la activación del complemento, C5a y la C5a-desarginina.

ii) Productos de secreción de mastocitos, linfocitos ( linfocinas ), monocitos-macrófagos y de los mismos neutrófilos activados que tienen actividad quimiotáctica.

iii) Proteínas que se producen por la activación de factores de la coagulación, como el factor Hageman, que permite la generación de 2 agentes quimiotácticos, la calicreína y el activador del plasminógeno. Así como también el sistema de las cininas.

iv) Los productos de bacterias y de virus también tienen funciones quimiotácticas.

v) Los metabolitos de la lipooxigenación del ácido araquidónico son quimiotaxinas que tienen una gran potencia para los neutrófilos, en especial la denominada leucotrieno B ( 8 ).

Mientras que ciertos humores tienen la habilidad para atraer fagocitos, otras sustancias en el suero también inmovilizan neutrófilos, resultando ellos refractarios a la estimulación quimiotáctica, o de otros agentes quimiotácticos activos



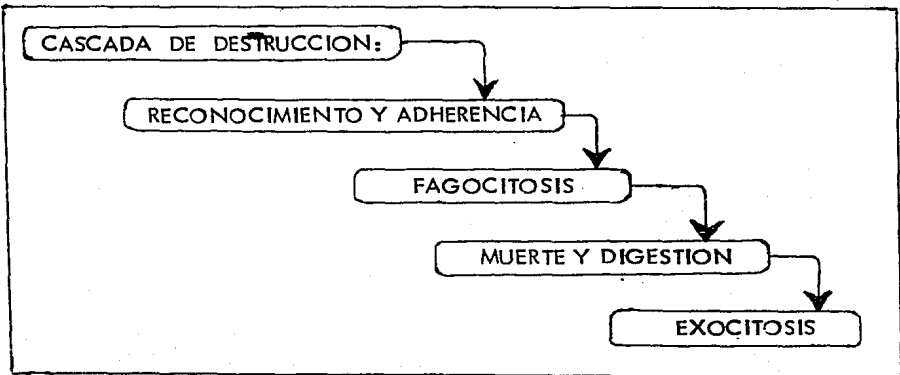
neutralizantes. Ambos tipos de inhibidores pueden tener importantes efectos, uno para controlar la expresión de factores quimiotóxicos generados y la otra para retener neutrófilos en los sitios en los cuales ellos han sido previamente atraídos ( 8 ).

b ) Aspectos celulares de la quimiotaxis. La unión de una quimiotaxina a su receptor en el fagocito inicia una serie de reacciones químicas muy complejas mal definidas, que dan como resultado una contracción polarizada de las células asociada con una reorganización de elementos citoesqueléticos como microfilamentos y microtúbulos. El primer cambio que se puede detectar después de la unión de una quimiotaxina con su receptor en la membrana es la hiperpolarización de la misma. Se acelera el flujo iónico, en especial el del calcio, el cual interactúa con proteínas reguladoras asociadas con moléculas de actina o miosina ( 8 ).

Se observan, además, otros cambios metabólicos, como alteraciones en la síntesis y el ciclo de los fosfolípidos metilados, cambios en el AMPc y GMPc, ya que sustancias que incrementan los niveles intracelulares de AMPc inhiben la motilidad, mientras que agentes que aumentan los niveles de GMPc la engrandecen, sugiriendo que una relación recíproca de éstos nucleótidos puede modular la movilidad celular, posiblemente por influenciar la estabilidad de los microtúbulos ( 47 ).

## 2. CASCADA DE DESTRUCCION.

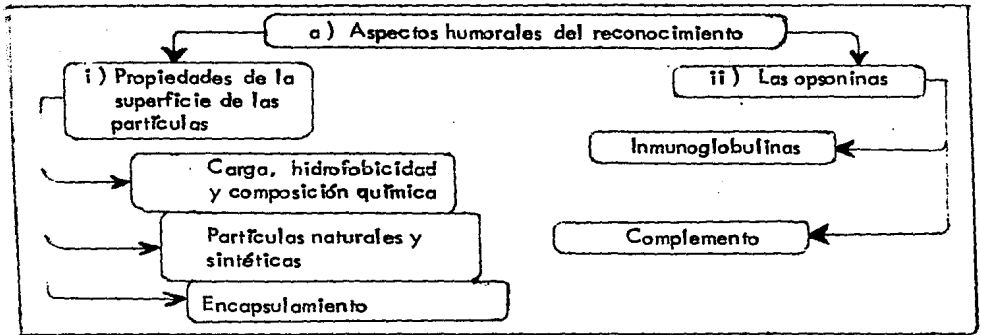
Una vez que fagocito entra en contacto con el microorganismo invasor por medio de la cascada de emigración, se inicia la cascada de destrucción:



En realidad, como sucede en la mayor parte de las funciones de los fagocitos, no existe una separación exacta de actividades. Por ejemplo, el estímulo quimio-táctico produce algunos de los efectos que inician las reacciones que se han enumerado en la cascada de destrucción, como la desgranulación. Durante la emigración, algunos gránulos secundarios se fusionan con los pseudópodos ondulantes y liberan sustancias como la colagenasa, que facilitan la movilización de la célula a través de los tejidos ( 8 ).

El proceso de destrucción se inicia en forma simultánea al de fagocitosis. Aunque con frecuencia se considera a la destrucción por fagocitosis como sinónimo de endocitosis, éste no siempre es el caso, ya que, por ejemplo, los fagocitos pueden atacar y destruir objetos grandes sin que ocurra una endocitosis completa. La cascada de destrucción se inicia con el reconocimiento del microorganismo invasor y adherencia del fagocito al mismo ( 8 ).

### A. RECONOCIMIENTO.



#### i) Propiedades de la superficie de la partícula

Carga, hidrofobicidad y composición química. Se mencionan por influenciar la ingestión de partículas sintéticas (gotas de parafina-aceite) y de partículas desnaturalizadas (células rojas de la sangre tratadas con aldehído) y de partículas naturales tales como las células rojas de la sangre normales y bacterias viables. Desafortunadamente, en el presente no hay una teoría capaz de predecir satisfactoriamente como las alteraciones de cualquiera de éstas propiedades de la superficie pueden afectar la interacción de una partícula con las membranas de los fagocitos profesionales o facultativos ( 43 ).

Partículas naturales y sintéticas. En general se sabe que partículas naturales cuyas superficies no han sido modificadas, y partículas sintéticas cubiertas con proteínas sin desnaturalizar, son pobremente fagocitadas, mientras que partículas las cuales las proteínas de la superficie han sido desnaturalizadas o químicamente modificadas son ingeridas más rápidamente ( 43 ).

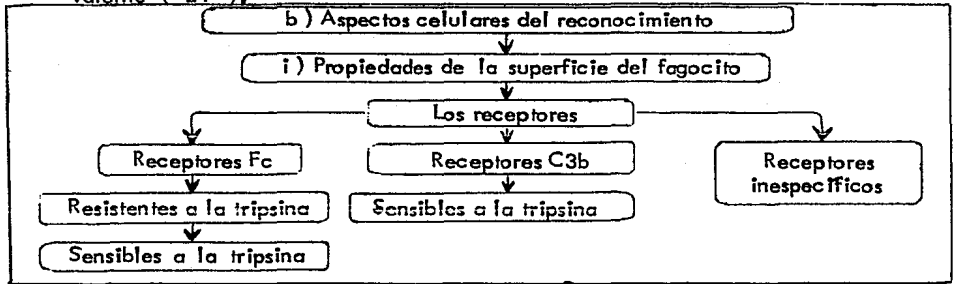
Encapsulamiento. La importancia de la química de la superficie de las partículas en gobernar la ingestión es enfatizada por estudios de la interacción de bacterias con leucocitos fagocíticos. Muchas bacterias patógenas tienen estructuras de superficie (cápsulas) que inhiben su unión e ingestión por los fagocitos. Cepas no patógenas de la misma bacteria (no encapsuladas) careciendo de estas superficies inhibidoras, son rápidamente ingeridas ( 43 ).

ii) Las opsoninas.

Inmunoglobulinas. De las diferentes clases de inmunoglobulinas, sólo la IgG, o anticuerpo  $\gamma$ , promueve directamente la fagocitosis y de ésta las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> son las especies que participan en la opsonización ( 47 ). La porción Fc de la IgG es la responsable de ésta actividad. Así de ésta forma funciona por interactuar con receptores sobre la superficie de la membrana de los leucocitos. Dado que el fragmento Fc es el ligando para estos receptores, ellos son conocidos como receptores Fc. Algunos investigadores han tratado de definir los subfragmentos o dominios dentro del fragmento Fc que actúa como ligando para los receptores Fc. Casi todas las investigaciones concuerdan que la tercera región constante ( C<sub>H</sub><sup>3</sup> ) es el ligando para éstos receptores Fc. Aunque otros trabajos han reportado que en algunas especies como cobayos y conejos el dominio C<sub>H</sub><sup>3</sup> es el ligando para los receptores Fc ( 43 ).

Complemento. El suero contiene un grupo de más de una veintena de proteínas, las cuales en su conjunto forman el camino del complemento. Entre éstas proteínas, el C3 o el tercer componente del complemento es la mayor molécula promotora de la fagocitosis. La vía clásica del complemento, así como el sistema de la properdina pueden actuar sobre C3 para promover la disposición de éste fragmento

activo opsonicamente, el cual es fijado en las partículas por un firme enlace covalente ( 24 ).



### i) Propiedades de la superficie del fagocito

Los receptores. Se conoce poco acerca de la química de los diferentes receptores que contienen las células fagocíticas. Ellos pueden ser una única molécula, grupos de moléculas, o dominios sobre la superficie de la célula. A pesar de la ignorancia acerca de su anatomía molecular existe poca duda de que éstos receptores son distintos estructural y funcionalmente unos de otros ( 47 ).

Receptores Fc. La presencia de dos distintos tipos de receptores Fc sobre la membrana de los fagocitos mononucleares ha sido reconocida sólo en los últimos años. Por ésta razón es difícil establecer con certeza cual de los dos tipos ha sido medido en muchos trabajos realizados y tal vez en base a sus diferencias en cuanto a su función y propiedades puedan explicarse algunas contradicciones reportadas.

Receptores Fc resistentes a la tripsina. Los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares de todas las especies expresan un receptor Fc resistente a las proteasas ( tripsina, quimi tripsina, pronasa ) que media la eficiente unión e ingestión de complejos antígeno-IgG y partículas cubiertas con IgG. Las partículas y complejos conteniendo IgG se unen a éstos receptores a 37°C en ausencia de cationes

divalentes y en presencia de inhibidores de la generación de ATP ( colchicina ), o de la función de los microfilamentos ( citocalasina B ) ( 47 ).

Receptores Fc sensibles a la tripsina. Los macrófagos contienen en su membrana plasmática un receptor Fc sensible a la tripsina que selectivamente se une a las subclases específicas de IgG en humanos ( IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> ), en cobayos ( IgG<sub>2</sub> ) y en ratones ( IgG<sub>2a</sub> ). Las inmunoglobulinas de estas subclases son llamadas anticuerpos citotóxicos porque ellos se unen con alta afinidad a los receptores Fc de los macrófagos en la ausencia de antígenos. Los receptores Fc sensibles a tripsina se encuentran como únicas moléculas de IgG sin estar unidas con antígenos. Estas inmunoglobulinas son fácilmente eluidas de éstos receptores por otras moléculas de IgG monoméricas. En comparación, los receptores Fc resistentes a tripsina se unen a las IgG que están agregadas o complejadas con el antígeno, de modo que existan 3 o más moléculas de IgG en un grupo; ya que, complejos inmunes conteniendo 3 o más IgG son rápidamente limpiados de la circulación in vivo y rápidamente fagocitados in vitro. Los anticuerpos citotóxicos y sus receptores sensibles a tripsina, meramente asisten al macrófago en uniones de partículas y antígenos extraños y una vez que éstos se encuentran cubiertos con éstos anticuerpos que se encuentran unidos a la superficie celular, los anticuerpos pueden reagruparse, disociándose de los receptores sensibles a tripsina y luego reasociarse con los receptores promotores de la fagocitosis, los resistentes a la tripsina ( 43 ).

Receptores C3b.

Sensibles a tripsina. La membrana plasmática de los PMN y fagocitos mononucleares contienen receptores para C3b sensibles a la tripsina. Algunos investigadores han reportado que los fagocitos mononucleares también expresan receptores para C5b y

C3d, aunque para éste último; sólo cuando las partículas son preparadas con componentes purificados del suero, sin embargo, si son preparadas con suero entero, como origen del complemento, no se unen ni son ingeridas, las razones para ésta discrepancia son desconocidas ( 47 ). Las funciones de los receptores C3b además varían con el estado fisiológico de los fagocitos mononucleares. Bajo condiciones basales, estos receptores sólo funcionan por unirse con partículas cubiertas con C3b a la superficie de la célula, mientras que en células estimuladas los receptores C3b median la ingestión de partículas cubiertas con C3b. Aunque los receptores Fc y C3b funcionan independientemente uno de otro en la unión e ingestión de partículas cubiertas por C3b, los dos receptores pueden actuar sinérgicamente. Partículas cubiertas con cantidades subóptimas de IgG y C3b son ingeridas ávidamente por los fagocitos profesionales, mientras que partículas cubiertas con la misma cantidad de sólo uno de estos ligandos no son fagocitadas ( 43 ).

#### Receptores inespecíficos.

Como ya mencionamos, la fagocitosis es estimulada por la presencia sobre las partículas blanco de anticuerpos específicos IgG y algunos componentes del complemento ( C3b, C5b y C3d ). Está establecido, que la fagocitosis también ocurre en la ausencia de anticuerpos del suero. Tal fagocitosis "no inmunológica" o "no específica", ha sido observada con bacterias, eritrocitos tratados con sialidasa y varias partículas tales como el zymosan, carbón y asbesto. A los factores de la superficie celular que median la ingestión de las partículas antes mencionadas se les denominaba de varias formas; receptores fagocíticos no específicos, receptores homofóricos, etc. ( 42 ).

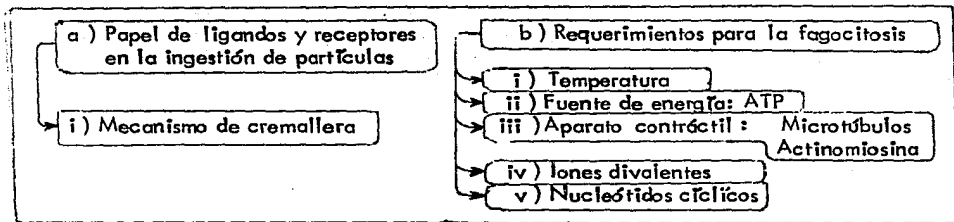
Especulaciones tempranas mencionan que tanto la carga neta de la superficie o la hidrofobicidad de una partícula, determinaban si ésta podría ser reconocida por las células fagocíticas, pero evidencia experimental en apoyo de éstas ideas ha sido difícil de obtener. Es posible que éstas propiedades "no específicas" de la superficie repercutan para el reconocimiento de algunas partículas (por ejemplo, partículas de latex o poliestireno) por las células fagocíticas. Sin embargo, más mecanismos específicos deberían de estar envueltos en el reconocimiento de partículas relevantes fisiológicamente. Actualmente se conoce que las interacciones entre lectinas-carbohidrato sirven como base para el reconocimiento en la fagocitosis "no inmune". Existen tres caminos en los cuales tales interacciones toman lugar:

- i) Entre azúcares sobre la superficie de los fagocitos y lectinas sobre la superficie de otras células.
- ii) Entre lectinas sobre la superficie de los fagocitos y azúcares en las otras células (o partículas).
- iii) Por lectinas extracelulares que forman puentes entre azúcares en ambos tipos de células.

Estas interacciones pueden proveer un mecanismo de defensa del hospedador inmediatamente después de una infección microbial y anterior al establecimiento de un estado inmune, o en tejidos donde la actividad opsonina normal es pobre. Estas interacciones pueden ser las responsables para la limpieza de eritrocitos viejos del sistema circulatorio y puede que también participen en otros tipos de interacciones, tales como la cooperación entre célula T-Célula B y entre linfocito-macrófago ( 42 ).



## B. FAGOCITISIS.

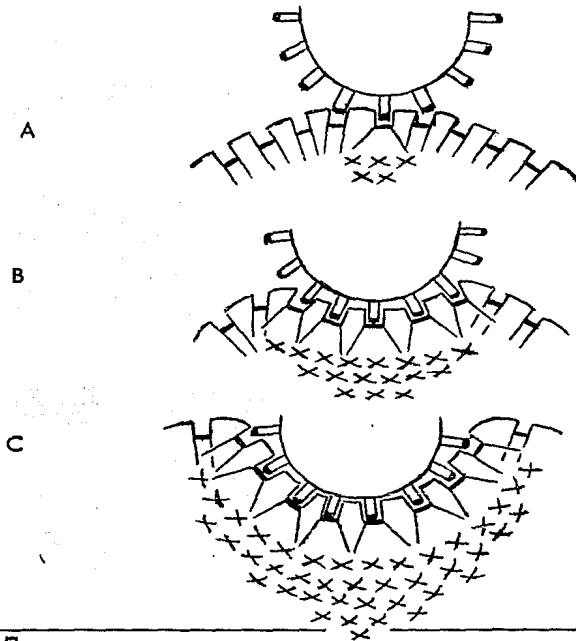


a) Papel de ligandos y receptores en la ingestión de partículas.

i) Mecanismo de cremallera. Griffin et al ( 43 ) basándose en la observación de Taylor et al ( 43 ) de que los anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulinas de la membrana de linfocitos se agrupan en una zona (casquete) y por el uso de estos linfocitos con ligandos IgG sobre un sólo hemisferio, ellos determinaron si la distribución de ligandos IgG sobre la superficie de una partícula ejerce alguna influencia sobre la ingestión de la misma. Encontraron que los fagocitos se unen a estos linfocitos vía el casquete, de modo que la membrana del fagocito sólo se extiende en esta zona casquetada del linfocito y sin embargo no son ingeridos. En comparación, linfocitos cubiertos extensamente con una cantidad similar de la preparación de anticuerpos son rápidamente ingeridos. Griffin et al concluyeron que la distribución de ligandos sobre la superficie de una partícula es un factor crítico para determinar si la partícula puede ser fagocitada o no. De este modo, la interacción inicial de los ligandos inmunes sobre la superficie de una partícula con receptores sobre la membrana de los fagocitos no es el disparador de la ingestión de la partícula. Esto meramente inicia un proceso que requiere del continuo posicionamiento de ligandos y receptores hasta que la partícula es completamente englobada dentro de una vacuola fagocítica. A esto se le denomina el mecanismo cremallera de la fagocitosis ( VER FIGURA 2 ).

FIGURA 2

ESQUEMA DEL MECANISMO CREMALLERA DE LA FAGOCITOSIS



Molécula de IgG u otro ligando



Receptor Fc u otro receptor en la membrana en un estado inactivo



Receptor Fc u otro receptor en la membrana en un estado activo



Proteínas contráctiles citoplásmicas

En este mecanismo se postula que el continuo posicionamiento de ligandos y receptores es lo que permite que una partícula sea completamente englobada dentro de una vacuola fagocítica ( 43 ).

b ) Requerimientos para la fagocitosis.

i ) Temperatura. Las partículas se unen a las superficies tanto de fagocitos profesionales como facultativos a  $4^{\circ}\text{C}$ , pero no son ingeridas a menos que la temperatura del medio de incubación exceda algún umbral crítico (  $18-21^{\circ}\text{C}$  ) ( 43 ).

Por otra parte, se sabe que las altas temperaturas estimulan la fagocitosis. Experimentalmente in vitro se encontró que existe una relación de incremento lineal directo entre los índices fagocíticos de los PMN y el aumento de la temperatura. Actualmente se considera a la hipertermia como un mecanismo que incrementa los medios de resistencia contra las infecciones. Por lo tanto, se le considera útil en tanto no sea muy elevada y llege a causar convulsiones ( 20 ).

ii ) Fuente de energía: ATP. La ingestión de partículas es un evento dependiente de energía. El involucramiento activa los procesos generantes de ATP, específicamente la Glucólisis en los neutrófilos y en los macrófagos y según el lugar donde se encuentren va a predominar la vía de obtención de energía, por ejemplo, en los macrófagos pulmonares el ATP requerido se deriva principalmente de la oxidación aeróbica de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos ( fosforilación oxidativa ); y en los macrófagos intestinales donde los niveles de oxígeno son bajos, predomina la glucólisis anaeróbica ( 43, 48 ).

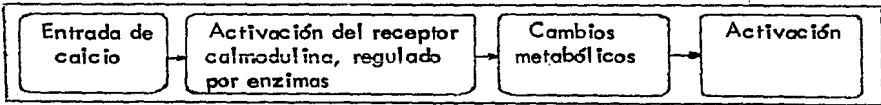
iii ) Aparato contráctil.

Microtúbulos. La proteína de la cual están constituidos es la tubulina. La colchicina, la cual entre otros efectos, afecta a los microtúbulos, puede deteriorar la ingestión, se ha observado que ellos están insertos dentro de la periferia celular en regiones de la célula en contacto con las partículas que están siendo internalizadas ( 48 ).

Actinmiosina. Los leucocitos fagocíticos contienen actina y miosina y existe poca duda de que estas proteínas juegan un papel crucial en los procesos fagocíticos. Estos microfilamentos han sido identificados en asociación con la membrana plasmática de amebas fagocitantes y macrófagos. La citocalasina B, un compuesto que deteriora la polimerización de la actina y la función de los microfilamentos, inhibe la fagocitosis, y actina aislada de un paciente con marcados defectos de motilidad y fagocitosis, exhibe una defectiva polimerización. Se ha purificado una proteína de alto peso molecular que se encuentra unida a la actina, la F-actina, que induce la polimerización de la actina de macrófagos y es liberada de la fracción de la membrana hacia el citoplasma durante la ingestión. Además se ha encontrado una proteína inestable (llamada "cofactor") que estimula a la Mg-ATPasa de la actinmiosina por arriba de 22 veces en presencia de  $Mg^{++}$  y ATP, también incrementa la proporción de contracción de geles conteniendo actina, miosina y F-actina. Se piensa que éstas 4 proteínas constituyen los mayores elementos contráctiles y regulatorios de los leucocitos fagocíticos ( 43 ).

iv) Iones divalentes. La manera en la cual la partícula es reconocida para ser ingerida es desconocida. Una pista puede ser el hecho de que los cationes divalentes, magnesio y calcio, tienen importantes efectos sobre la ingestión, como también sobre la motilidad y extendimiento ( 48 ). La entrada de calcio hacia los macrófagos es importante para la activación de estos y se ha usado el ionóforo de calcio A23187 en estudios in vitro para inducir elevaciones intracelulares de este ión. La calmodulina ( receptor proteico para la activación de calcio ) juega un papel importante en la activación, generalmente en las fases tardías de la fagocitosis ( 34, 21 ).

Se especula , cual de las varias enzimas que modulan al calcio puede intervenir en la estimulación, suponiendose que una proteína cinasa conectada con el camino metabólico de la glucosa y otras enzimas desconocidas, sean las responsables. Se ha propuesto el siguiente mecanismo:



v) Nucleótidos cíclicos. Muchos investigadores no han hallado cambios en los niveles de AMP cíclico (AMPc) en leucocitos PMN fagocitantes. Seyberth et al ( 48 ) han reportado un pequeño y transitorio incremento en los niveles de AMPc en macrófagos alveolares fagocitando e Ignarro et al ( 48 )han hallado incrementos substanciales en los niveles de GMPc durante la ingestión de partículas en leucocitos PMN . En el último caso, la omisión de calcio del medio previene el incremento estimulado en la fagocitosis en los niveles de GMPc, lo que hace poco probable que el proceso de ingestión sea regulado por cambios en los niveles de GMPc. Las drogas que incrementan los niveles de AMPc en los fagocitos inhiben la proporción de ingestión. Sin embargo, la ingestión de partículas no altera los niveles intracelulares de AMPc y esto no ha permitido el asignar un papel al AMPc como un mediador del proceso de ingestión o de si éste esta asociado a los cambios metabólicos (48). Muschil et al ( 43 ) han estudiado clones mutantes de macrófagos de ratón transformadas por el virus SV40, que se unen, pero no ingieren eritrocitos cubiertos con IgG . La adición de AMPc al medio estimuló la ingestión de estas células. Aunque el mecanismo para esta estimulación permanece desconocido, estas interesantes observaciones pueden presagiar un nuevo capítulo en definir las moléculas que regulan la fagocitosis.

### C. MUERTE Y DIGESTION.

a) Gránulos y desgranulación

b) Mecanismos independientes de oxígeno

c) Mecanismos dependientes de oxígeno

d) Mecanismos microbicidas de los fagocitos mononucleares

a) Gránulos y desgranulación. Los gránulos de los neutrófilos son de dos tipos: primarios o azurófilos (llamados así por teñirse de azul con el colorante Wright) y los secundarios o específicos (porque son únicos para cada célula particular, por ejemplo; eosinófilos, neutrófilos). Existen semejanzas y diferencias en cuanto al comportamiento y composición química de los dos tipos de gránulos (Ver Tabla 1). Por ejemplo, ambos intervienen en el proceso de fusión con el fagosoma, pero sólo los gránulos específicos intervienen en la exocitosis, en la que liberan su contenido mediante la fusión del gránulo con la membrana citoplásmica durante la cascada de emigración ( 3 ). El contacto entre un "blanco" y la membrana plasmática del fagocito desencadena una secuencia de eventos conocido como desgranulación. Los gránulos migran hacia la región de contacto y por medio de movimientos violentos en proximidad al fagosoma, se fusionan con la vacuola y desaparecen del citoplasma ( 18 ). La desgranulación ocurre en concierto con la ingestión y cesa cuando la última ha finalizado, sugiriendo que el mecanismo de disparo de ambos es similar o el mismo. Sin embargo, la desgranulación no es enteramente uniforme ni disociable de la ingestión. Los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos desgranulan en diferentes proporciones durante la ingestión y existen evidencias histoquímicas de que los gránulos secundarios se fusionan con el fagosoma primero, seguidos por los gránulos primarios, la importancia de éste hecho es todavía desconocida ( 48 ).

**TABLA 1**  
**CONSTITUYENTES DE LOS GRANULOS AZUROFILOS Y ESPECIFICOS**  
**DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS ( 3 ).**

| CLASE DE CONSTITUYENTE | GRANULOS AZUROFILOS   | GRANULOS ESPECIFICOS  |
|------------------------|---|---|
| Hidrolasas ácidas      | B-Glicerofosfatasa<br>N-Acetil-B-glucosaminidasa<br>B-Glucoronidasa<br>B-Manosidasa<br>Catepsina D<br>Catepsina B |   |
| Proteasas neutrales    | Elastasa<br>Catepsina G<br>Tercera proteinasa serina  | Colagenasa específica<br><br>Segunda colagenolítica<br>metaló-proteinasa  |
| Enzimas microbicidas   | Lisozima<br><br>Mieloperoxidasa   | Lisozima  |
| Otras                  |   | Lactoferrina<br><br>Proteína secuestradora<br>de vitamina B <sub>12</sub> |

Como en la migración, quimiotaxis e ingestión, los microtúbulos y microfilamentos del citoplasma celular parecen estar involucrados en el mecanismo de desgranulación. En el reposo celular, el ectoplasma hialino actúa como una barrera entre los gránulos citoplasmáticos y la membrana. Cuando el fagosoma se forma, los microfilamentos, normalmente estrechamente situados en la superficie de la membrana de la célula, desaparecen de la membrana, la cual es ahora parte del fagosoma, seguida de los gránulos por acercarse a ésta ( 48 ).

b ) Mecanismos independientes de oxígeno. Relativamente pocos trabajos han sido hechos sobre los sistemas empleados por los fagocitos para matar en la ausencia de oxígeno. Por ésta razón, los mecanismos de muerte anaeróbica son menos entendidos que sus contrapartes aeróbicas.

Acidificación. Las vesículas fagocíticas son rápidamente acidificadas, el pH dentro de la vesícula disminuye detectablemente en menos de 10 minutos. El como la acidificación toma lugar no es conocido, pero se piensa en varias cosas. Que una ATPasa transportadora de protones sea la responsable, dado que tales enzimas ocurren en otros tejidos en los cuales gradientes de pH son generados ( 18 ). La acidificación del fagosoma puede ser secundaria a la acumulación de lactato producida por la aumentada actividad glucolítica de la ingestión o puede igualmente envolver la producción de ácido carbónico mediado por la anhidrasa carbonica a partir del dióxido de carbono ( 48 ). La caída en el pH potencializa la destrucción de blancos, dado que muchas de las enzimas contenidas en los gránulos envueltas en la destrucción y digestión operan en un pH menor de 4-5. La acidificación puede ser considerada como un mecanismo auxiliar, dado que por sí misma, la acidificación tiene poco poder antimicrobial ( 18 ).



Hidrolasas. Aunque muchas de las hidrolasas de los fagocitos actúan sólo después de que el "blanco" es muerto, unas pocas aparecen por jugar un papel directo en los procesos de muerte. Ellas son la lisozima, arginasa y las glicosidasas. La lisozima hallada en los gránulos de todas las clases de fagocitos es una enzima que cataliza la hidrólisis del peptidoglican, el cual envuelve la membrana plasmática de las bacterias y protege al organismo contra la lisis osmótica. La lisozima actúa para destruirlo y priva al organismo de ésta protección contra el estrés osmótico, y debido a que este peptidoglican se encuentra ampliamente distribuido en bacterias y hongos, la lisozima puede matar un amplio espectro de organismos. Aunque muchas bacterias son resistentes a la lisozima, como es el caso de las Gram negativas, porque el acceso de ésta al peptidoglican es prevenido por el lipopolisacárido. Las glicosidasas son enzimas que rompen polisacáridos. Ellas son importantes para la degradación de residuos de carbohidratos en materiales ingeridos por los fagocitos. Los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas son principalmente carbohidratos, y como tales pueden ser degradados por estas enzimas. La pérdida de parte del lipopolisacárido no es fatal probablemente a la bacteria porque organismos mutantes careciendo de porciones del lipopolisacárido crecen bien invitro. Tal vez, una pérdida pueda, sin embargo, sensibilizar a un organismo para ciertas proteínas microbicias presentes en el fagocito (lisozima). De este modo las glicosidasas pueden tener un papel importante auxiliar en la acción letal del fagocito. La arginasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de arginina a ornitina y urea, es secretada en grandes cantidades por macrófagos estimulados. La muerte de los microorganismos resulta de la necesidad de arginina, debido a la destrucción de éste (para ellos) esencial aminoácido por la arginasa ( 18 ).

Los gránulos específicos de los neutrófilos contienen lactoferrina y una proteína secuestradora de cobalamina o vitamina B<sub>12</sub>. La lactoferrina es una proteína con una excelente afinidad por el hierro. Se piensa que ayuda en la muerte por privación del hierro esencial a los microorganismos. Sólo unos pocos microorganismos son muertos por la carencia de hierro (neumococos), pero muchos sobreviven, aunque su crecimiento es retardado y su virulencia disminuida. La lactoferrina de éste modo potencia la muerte microbial, pero la mayor parte de las veces, no es por sí misma microbicida. La proteína secuestradora de cobalamina es una molécula capaz de tomar una amplia variedad de cobamidas y transportarlas al hígado para su excreción. Esta proteína ha sido postulada por participar en el desalojo de cobamidas bacteriales, un heterogéneo grupo de compuestos, los cuales si no son eliminados, pueden actuar como antimetabolitos de cobalamina en los tejidos de los mamíferos ( 18 ).

**Proteínas catiónicas.** Estas son proteínas que están cargadas positivamente a un pH fisiológico. Muchas están presentes en los fagocitos, su carga les permite el interactuar efectivamente con las superficies cargadas negativamente de las partículas ingeridas. La fraccionación revela una mezcla heterogénea, cuyas especificidades antimicrobiales varían de componente a componente. Algunos componentes de ésta mezcla son proteasas, pero su actividad proteolítica es independiente de su acción antimicrobial ( 18 ). Estas proteínas son más catiónicas que la lisozima y son menores de 10 000 daltons. Recientemente se ha encontrado que algunas proteínas catiónicas interactúan inicialmente con las bacterias vía interacciones iónicas. Estas interacciones pueden ser disrumpidas con cationes divalentes ( magnesio y calcio ) o tripsina. Se ha pensado que esta actividad antimicrobial puede darse

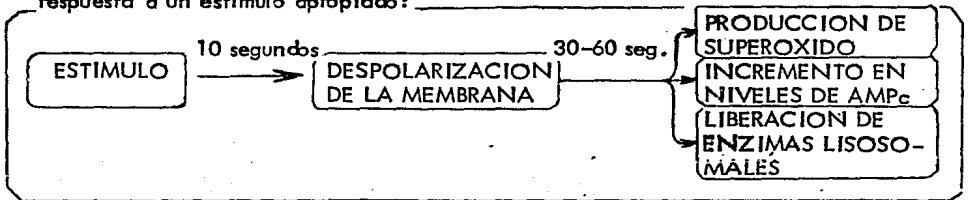
en dos pasos. El primero requiere de la unión de las proteínas a la superficie celular. Esta interacción se encontró que es independiente de la temperatura. El segundo paso fue dependiente de la temperatura y se piensa que envuelve la inserción de las proteínas antimicrobiales a través de la membrana externa. Otros estudios hablan de un paso postunión similar al anterior, el cual envuelve interacciones hidrofóbicas, bajo condiciones de reducida hidrofobicidad de la membrana externa y que presumiblemente la inserción hidrofóbica dispare la muerte de la bacteria por alterar la integridad de la membrana ( 45 ).

c ) Mecanismos dependientes de oxígeno. Los fagocitos son capaces de generar agentes con poder oxidante por la parcial reducción del oxígeno en un evento metabólico conocido como el "aceleramiento respiratorio". Estos potentes oxidantes son empleados por la célula para matar a los "blancos" .

Aceleramiento respiratorio. Este es un cambio en el metabolismo del oxígeno que ocurre cuando los fagocitos están expuestos al estímulo apropiado. El consumo basal de oxígeno por fagocitos no estimulados varía con el tipo de célula y, en el caso de macrófagos, con las condiciones locales del tejido de residencia. Por ejemplo, neutrófilos no estimulados consumen poco oxígeno, mientras que macrófagos alveolares no estimulados consumen considerables cantidades de oxígeno vía el metabolismo mitocondrial. Todas las células fagocíticas, sin embargo, presentan grandes incrementos sobre sus proporciones basales de consumo del oxígeno después de la exposición a partículas fagocitables u otros estímulos apropiados. Este incremento en el consumo de oxígeno es insensitivo al ión cianuro, por lo que no tiene relación con la producción de energía mitocondrial. También se produce un marcado incremento en la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y

de un doble a un triple incremento en la oxidación de la glucosa vía la actividad de la hexosamonofosfato ( 18,43,48 ) ( Ver Figura 3 ).

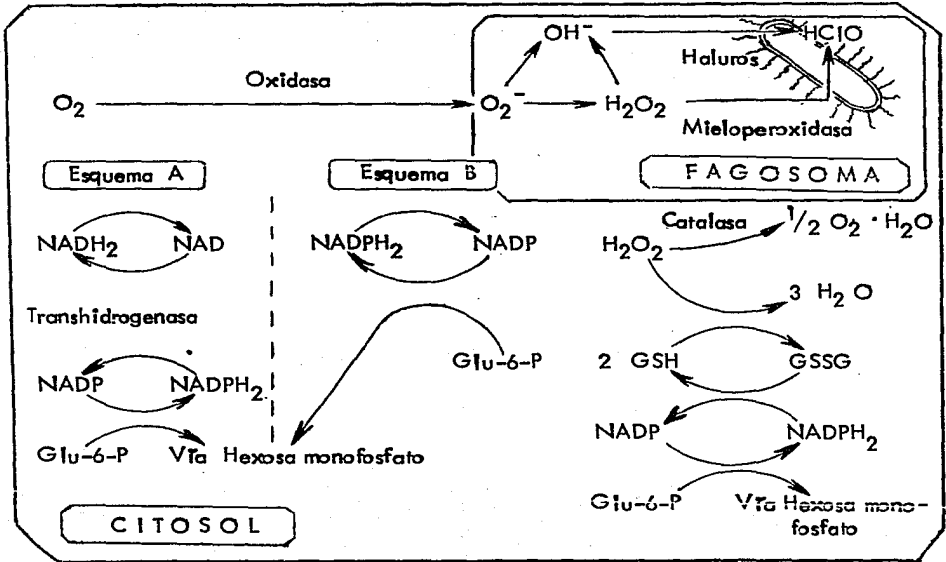
Activación del aceleramiento respiratorio. Envuelve una compleja serie de eventos que siguen a la interacción del estímulo con la membrana plasmática del fagocito. La activación puede ser realizada por muchos agentes, tanto particulados como solubles ( 1, 13, 14, 52 ) y no requiere ni de fagocitosis ni de desgranulación para llevarse a cabo. Energía es necesaria para la activación. Bajo algunas circunstancias la activación es reversible. Aunque las bases moleculares de la activación son poco entendidas, la siguiente secuencia de eventos ocurre en respuesta a un estímulo apropiado:



La despolarización de la membrana precede a la embestida de la generación de superóxido, el cual se produce simultáneamente con la desgranulación y con cambios en los niveles de AMPc, lo que sugiere que ninguno de los dos últimos eventos están involucrados en la producción de superóxido mediante la generación de enzimas. Recientes estudios sugieren que las proteasas pueden estar involucradas en los caminos bioquímicos primariamente a la activación del arranque respiratorio, cuando menos en ciertas instancias. Algunos inhibidores de proteasas naturales y sintéticas son hallados por deprimir la generación de superóxido cuando los agentes concanavalina A y citocalasina E son usados como estímulo ( 18 ).

FIGURA 3

ESQUEMA DE LAS BASES BIOQUIMICAS DEL ACELERAMIENTO RESPIRATORIO



El oxígeno es reducido a superóxido ( $O_2^-$ ) por una oxidasa. Algunos investigadores creen que el NADH, regenerado del NADPH por una transhidrogenasa o por otros mecanismos, es el donador de hidrógenos para esta oxidasa (Esquema A), mientras que otros favorecen la reducción directa del oxígeno por el NADPH (Esquema B). El NADPH es regenerado del NADP por el camino de la hexosa monofosfato (HMP). El superóxido es posteriormente reducido a peróxido de hidrógeno, el cual puede reaccionar con superóxido para formar radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) o generar aldehídos bactericidas por oxidación de constituyentes bacteriales en la presencia de iones halógenos y mieloperoxidasa, liberados estos al fagosoma por desgranulación. El  $H_2O_2$  que se escapa fuera del fagosoma es destruido por la catalasa o reducido con glutatión en el citosol y este es regenerado vía la hexosamonofosfato (48).

Algunos mecanismos de muerte dependientes son postulados por ocurrir en los fagocitos bajo un sólido camino experimental; el mecanismo peróxido-haluro-mieloperoxidasa, y un mecanismo empleando radicales oxidantes altamente reactivos. Otros mecanismos han sido propuestos, pero tienen poco apoyo experimental como los primeramente mencionados.

La mieloperoxidasa es una hemo-enzima presente en altas concentraciones en los gránulos azúrofilos. Esta es un constituyente de un sistema microbicida cuyos otros componentes son el peróxido de hidrógeno y los iones halogénos. Estos sirven como substrato para la peroxidasa, la cual cataliza su conversión a HOCl y H<sub>2</sub>O. El HOCl es el principal agente microbicida en este sistema. La existencia de este sistema microbicida y su presencia en los neutrófilos fue demostrada por Klebanoff, quien presentó que los aniones yoduro vienen covalentemente fijados a las proteínas de partículas ingeridas. La mieloperoxidasa es descargada al sitio de operación, el fagosoma por desgranulación. Los iones halógeno probablemente entran por difusión y como se menciona antes, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es sintetizado o concentrado en el fagosoma. Tanto el cloruro o yoduro intracelulares pueden servir como un cofactor para actividades bactericidas de este sistema y el yoduro puede igualmente ser despojado de las hormonas tiroideas por los fagocitos y subsecuentemente fijado a la bacteria ( 18, 48 ). Los hallazgos de que este sistema puede clorar bacterias intactas y puede mediar la oxidación de grupos amino y sulfhidrilo de proteínas, sugieren indirectamente que la muerte puede resultar a través de la alteración de macromoléculas esenciales ( 18 ).

Los fagocitos han sido presentados por producir radicales oxidantes altamente reactivos, incluyendo los radicales hidroxilo y posiblemente otros. Estos radicales originados por la reacción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (conocida como la reacción de Haber-Weiss) requieren hierro como catalizador. Los radicales oxidantes reactivos pueden matar bacterias tanto en sistemas artificiales como en los mismos neutrófilos. Los radicales oxidantes probablemente representan los efectores próximos en los sistemas microbicidas independientes de mieloperoxidasa que requieren oxígeno en los neutrófilos. Tampoco es conocido como ellos matan a las bacterias, pensando en su habilidad para dañar al DNA, sugiriendo que ellos pueden actuar por destrucción del genoma. Otros agentes que han sido postulados como efectores en la muerte aeróbica, son el  $H_2O_2$ , el  $O_2^-$  por sí mismo, y el singlete de oxígeno. El  $H_2O_2$  sólo es débilmente microbicida y puede actuar con esta capacidad en neutrófilos, particularmente en combinación con ácido ascórbico. El  $O_2^-$  es sorprendentemente inocuo y no parece jugar un papel en la muerte bacteriana por los neutrófilos, excepto como un precursor de más potentes oxidantes. El singlete de oxígeno, una forma excitada electrónicamente del oxígeno, ha sido postulado como un agente microbicida primario sobre las bases experimentales con reactivos secuestrantes del singlete de oxígeno y estudios de quimioluminiscencia, en neutrófilos. Sin embargo, la evidencia es ambigua, porque ni la emisión de luz, ni los reactivos secuestrantes son específicos para el singlete de oxígeno. Además consideraciones teóricas que el singlete de oxígeno, si es formado, es improbable que pueda sobrevivir mucho tiempo como para hacer daño. Por lo que se considera, que el singlete de oxígeno tiene poca o acaso ninguna función en la muerte microbiana por los neutrófilos ( 18, 48 ).

d ) Mecanismos microbicidas de los fagocitos mononucleares. El armamento microbicida de los fagocitos mononucleares es similar al de neutrófilos, pero difiere en algunos aspectos. Como en los neutrófilos la lisozima y el  $H_2O_2$  son importantes agentes bactericidas. Pero los fagocitos mononucleares no tienen muchas de las proteínas catiónicas de los neutrófilos, ni tampoco contienen lactoferrina. Además, los monocitos y algunos macrófagos tienen menos mieloperoxidasa que los neutrófilos, y los macrófagos alveolares no han sido vistos por presentar mieloperoxidasa en sus gránulos. Los macrófagos alveolares tienen actividad catalasa y alguna de esta actividad reside en las partículas citoplásmicas que desgranulan, causando esta catalasa por entrar al fagosoma. La catalasa puede actuar como una peroxidasa, por ejemplo, catalizando la oxidación de sustratos en la presencia de  $H_2O_2$ , y tiene actividad antimicrobial a un pH ácido en la presencia de iones halogénos y  $H_2O_2$ . La peroxidación de lípidos, la cual ocurre en macrófagos alveolares y en monocitos humanos, puede ser otro mecanismo por el cual, estos macrófagos potencian la acción microbicida del  $H_2O_2$ , porque el malonildialdehído, un catabolito de lípidos peroxidados, tiene actividad antibacterial ( 48 ). Los macrófagos estimulados o expuestos a adyuvantes inmunológicos o cultivados en la presencia de proteínas digestibles o linfocinas, tienen más actividad bactericida ( 1, 13, 14, 52, ) que las de las células sin estimular, por un número de razones:

- i ) Los macrófagos estimulados en relación a las células no estimuladas pueden ingerir partículas más rápidamente.
- ii ) Tienen un contenido mucho mayor de enzimas hidrolíticas.
- iii) Descargan más de esta actividad enzimática dentro de los fagosomas.



iv) Hay evidencia de una gran actividad oxidativa, sugiriendo que ellos tienen incrementada la formación de peróxido de hidrógeno.

La degradación de los microorganismos, a pesar de la eficiente muerte es incompleta. La persistencia de material ingerido en los macrófagos es morfológicamente evidente en los lisosomas secundarios de éstas células, las cuales contienen ruinas de microorganismos degradados parcialmente. La ausencia de tales estructuras en los neutrófilos es un reflejo de la corta extensión de vida de éstas células. La falla de los fagocitos para degradar a los microbios completamente es una consecuencia del material tan estable de la pared celular que previene el acceso de enzimas digestivas a las macromoléculas susceptibles de los microorganismos. Que los fagocitos de otro modo serían capaces de digerir tales moléculas es evidente por la demostrada habilidad de los macrófagos para degradar proteínas solubles que ellos han fagocitado ( 48 ).

#### D. EXOCITOSIS.

Después de destruido el microorganismo y digerido, el fagosoma puede experimentar exocitosis, lo que limpia a la célula de todos los desechos. En realidad, en el caso de los neutrófilos, digestión y exocitosis no parecen tener mucha importancia ( aunque sí la tiene para los monocitos-macrófagos ). Parece ser que casi todos los neutrófilos mueren después de permanecer en los exudados por un corto período de tiempo y a su vez son fagocitados y digeridos por los macrófagos ( 8 ).

## VI. EVALUACION CLINICA DE LA FAGOCITOSIS.

Existen diferentes pruebas de laboratorio empleadas en la clínica para evaluar la función fagocitaria en pacientes con diversas enfermedades, tanto en humanos ( 10, 32, 49, 50 ), como en animales ( 22, 41, 51 ). Todas éstas pruebas pretenden en su conjunto, evaluar las etapas principales del proceso fagocítico, aunque una más precisa y correcta evaluación de éstas funciones es medirlas por separado ( Ver Tabla 2 ).

## VII. DESORDENES DE LA FAGOCITOSIS.

Existe una numerosa y creciente lista de enfermedades congénitas y adquiridas, la mayoría de ellas de reciente descripción que se asocian con anomalías de la función de los neutrófilos y del sistema monocitos-macrófagos. Estas pueden ser debidas a defectos que radican en los fagocitos o a mediadores de su función ( Ver Tabla 3 ).

Otros factores que provocan desordenes en la fagocitosis, que no están asociados a los anteriores son una inadecuada nutrición ( 51 ) y la inmadurez de las células fagocitarias en los animales neonatos ( 32, 38, 49 ). Es de resaltar que esta inadecuada función fagocitaria resultante de la inmadurez de las mismas células, se presenta no sólo en este mecanismo inespecífico de defensa, si no en otros muchos niveles del sistema inmune. Ha sido reportado que los animales neonatales de casi todas las especies son relativamente inmunodeficientes a pesar de las amplias diferencias en su madurez fisiológica y en el desarrollo tímico al nacimiento. Varios mecanismos han sido postulados en el hombre y en algunas especies animales por contribuir a esta inmunodeficiencia neonatal; como una ca-

T A B L A 2

ETAPAS DEL PROCESO FAGOCITARIO Y LAS TECNICAS  
EMPLEADAS EN LA CLINICA PARA EVALUARLAS ( 44 ).

| ETAPAS                   | PRUEBAS  |
|--------------------------|--|
| 1. Movilidad aleatoria   | Método del tubo capilar  |
| 2. Quimiotaxia           | Método de la cámara de Boyden<br>Emigración radial de los leucocitos   |
| 3. Reconocimiento        | Pruebas de rosetas para determinar la presencia de receptores para C3b e IgG<br>Cuenta directa mediante microscopía ordinaria  |
| 4. Ingestión             | Estimación de la radiactividad fijada a la célula después de la ingestión de una partícula marcada con radiactividad<br>Medición de algún lípido fácilmente sensible |
| 5. Desgranulación        | Prueba de la fagocitosis frustrada   |
| 6. Metabolismo oxidativo | Prueba de la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio<br>Quimioluminiscencia  |
| 7. Muerte intracelular   | Cuenta del número de unidades formadoras de colonias   |

TABLA 3  
DESORDENES DE LA FAGOCITOSIS

| FUNCION AFECTADA            | FAGOCITOS AFECTADOS   |   |
|-----------------------------|---|---|
|                             | NEUTROFILOS   | NEUTROFILOS Y FAGOCITOS MONONUCLEARES   |
| Producción de los fagocitos | Neutropenias congénitas y tóxicas   | Depleción en la médula (Leucecemias, aplasia, fibrosis)                                   |
| Locomoción y Quimiotaxis    | 'Neutrófilos inmaduros o tóxicos en algunos pacientes sépticos                    | 'Síndrome Chediak-Higashi<br>''Deficiencia de C3<br>''Deteriorada activación de C3        |
| Ingestión                   | Hipomotilidad de neutrófilos asociada con una deficiente polimerización de actina | ''Deficiencia de anticuerpos<br>''Complejos inmunes                                       |
| Desgranulación              | Deficiencia de gránulos en los neutrófilos  | Deficiencia de mieloperoxidasa<br>'Síndrome Chediak-Higashi                               |
| Producción de peróxidos     |   | Enfermedad granulomatosa crónica<br>Deficiencia total de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa |

' Anormalidad celular

'' Anormalidad humoral

rencia de IgM y una inadecuada producción de IgG; el limitado almacén de reserva de leucocitos ( 7 ); bajo número de leucocitos circulantes y altas incidencias de linfocitos inmaduros ( 33 ); bajos niveles en algunos componentes del complemento ( 16 ); la deficiencia endógena de fibronectina plasmática ( que es una opsonina inespecífica ) y la inhabilidad para su síntesis por parte de los monocitos-macrófagos ( 4, 26 ); una disminuida capacidad en la función reticuloendotelial del bazo ( 17, 35 ); y una deficiente actividad microbicida de los fagocitos neonatales ( 22, 31, 51 ).

En humanos se ha reportado que los PMN neonatales son relativamente deficientes en su habilidad para moverse hacia un definido estímulo quimiotáctico. todos los estudios concuerdan, tanto utilizando el método de la cámara de Boyden ( 29, 31, 39 ), como con una técnica denominada elastometría ( aspiración celular ), donde Miller ( 31 ), halló que los PMN neonatales humanos son células altamente rígidas que requieren grandes cantidades de presión negativa para la aspiración hacia una pipeta. Existen datos controversiales entre los PMN y los mononucleares en cuanto al movimiento, ya que algunos autores han encontrado una disminución en el movimiento de los PMN neonatales y Kretschmer y cols. ( 27 ) encuentran que la capacidad locomotiva intrínseca de los monocitos de cordón umbilical es comparable a la de monocitos adultos, como es evidenciado por su normal movilidad al azar. Kretschmer, además, encontró que los monocitos de cordón umbilical tienen un movimiento normal cuando son estimulados por linfocinas derivadas de linfocitos de adulto, pero no cuando son estimulados por linfocinas provenientes de linfocitos de cordón umbilical de neonato, lo cual contrasta con la casi normal respuesta quimiotáctica de los monocitos de

adulto a tales linfocinas. Lo que sugiere que la deficiente respuesta de los monocitos de sangre de cordón umbilical puede derivar de un inhibidor de la quimiotaxis de los linfocitos neonatales dirigido contra un receptor sólo hallado sobre los monocitos neonatales ( 27 ). Pahwa y cols. ( 31 ) hallan de normal a incrementada el movimiento de los mononucleares neonatales, con la misma técnica anterior, lo que sugiere una dicotomía en la respuesta de los PMN y mononucleares de recién nacido. Estudios no publicados por Miller apoyan lo anterior y estudios preliminares de deformabilidad de monocitos han rendido resultados normales. En cobayos, se ha reportado que la actividad quimiotáctica se incrementa aproximadamente 6 veces en adultos cuando son comparados con animales de una semana de edad, siendo el 75% de las células ensayadas macrófagos peritoneales ( 51 ).

En cuanto al metabolismo oxidativo, en bovinos se ha reportado que la reducción del nitroazul de tetrazolio ( NBT ), y la reacción de yodonización, la cual evalúa la actividad del sistema antimicrobial mieloperoxidasa-haluro-peróxido de hidrógeno, en los neutrófilos están disminuidas en animales jóvenes de 4 a 5 semanas y persiste la deficiencia hasta la onceava semana en el caso de la segunda prueba ( 22 ). En humanos también se ha explorado mucho la posibilidad de un defecto en el metabolismo oxidativo y se ha encontrado que la reducción del NBT es de normal a aumentada en los PMN del neonato, en comparación de los de adulto. La actividad de la vía de hexosa monofosfato ( HMP ) en los PMN de recién nacido en reposo y estimulados es más alta que en los PMN de adulto control. Aunque la proporción de fagocitosis asociada a la actividad de la vía de HMP en reposo es más baja en infantes recién nacidos, sugiriendo un posible

defecto ( 24 ). La quimioluminiscencia, la cual es iniciada por el aceleramiento respiratorio, también ha sido reportado por estar disminuida en algunos neonatos humanos ( 2, 31 ). Estudios hechos por Ambruso y cols. ( 2 ) demuestran en contraste a la normal o incrementada producción de anión superóxido, un significativo defecto en la producción de radicales hidroxilo en los PMN neonatales. La razón para esta discrepancia no es clara. Pero como con la producción de otros importantes metabolitos, es probable que la generación de radicales hidroxilo es una reacción regulada por la célula, esto es, que el proceso puede requerir una o más enzimas, las cuales pueden estar deficientes en el neonato. En macrófagos alveolares de conejo se ha encontrado que la actividad antimicrobial no se encuentra bien desarrollada hasta después de la primera semana postnatal y han sido hechas mediciones de proteína, DNA, RNA y concentraciones de fosfolípidos, revelando altos niveles de todos estos componentes en el temprano período postnatal y disminuyen durante el primer mes de vida. Además se han encontrado elevadas cantidades de enzimas al nacimiento, como por ejemplo; la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, presentando disminuciones durante el primer mes, siendo más prominentes éstas, en la primera semana. De más interés, es la misma tendencia en las concentraciones de enzimas lisosomales como fosfatasa ácida, DNAasa, catepsina D y la lisozima ( 6 ).

En resumen, en los neutrófilos neonatales humanos se ha encontrado que responden con los normales desafíos bacteriales in vitro tan eficientemente como los neutrófilos de adulto, sin embargo, éstas células tienen una disminuida capacidad para la locomoción, una disminuida deformabilidad, una deficiente fagocitosis

en bajas concentraciones de suero, y una disminuida quimioluminiscencia. Estos sutiles defectos en la función pueden ser amplificados por un exagerado desafío que puede estar relacionado a una alta incidencia de sepsis durante el período postnatal ( 38 ).

El sistema de monocitos-macrófagos de neonatos, ha sido presentado por contribuir en otras inmunodeficiencias aparte de la ya estudiada en la fagocitosis. Utilizando a la rata como modelo experimental, se ha demostrado que los monocitos y macrófagos presentan un defecto en la actividad cooperadora hacia células inmunocompetentes T o B, que se traduce en una incapacidad para producir anticuerpos en respuesta a antígenos timo-dependientes hasta la 4-6a. semana de vida. Además las ratas neonatales son altamente susceptibles a Lysteria monocytogenes, ya que sólo es requerida una  $DL_{50}$  de 1/1000 de la que es necesaria para matar ratas juveniles. También ha sido establecido el alto grado de inducción a la tolerancia inmunológica específica en ratas recién nacidas. Es de interés remarcar que todas estas inmunodeficiencias se corrigen cuando son transplantados macrófagos de adulto a los animales neonatos. Lo que sugiere que los defectos en la producción de anticuerpos, la tolerancia inmunológica y susceptibilidad a ciertos microorganismos, son debidos a la incapacidad de los macrófagos para proveer una adecuada actividad cooperadora, más que a una deficiencia intrínseca en los linfocitos T y B ( 7 ). Se ha encontrado que una inhibición en la función de los macrófagos neonatales es debida, al menos en el caso del bloqueo de la respuesta de las células T dependiente de macrófagos contra el derivado proteico purificado ( PPD ), a los anticuerpos maternos dirigidos contra antígenos de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. El bloqueo de la



función de los macrófagos de neonatos por tales anticuerpos puede resultar en una tolerancia transitoria o una "no respuesta" a antígenos exógenos ( 19 ).

En lo que respecta a cerdos, Upcott et al ( 25 ) hallaron que sólo 2 de 13 muestras tomadas de cerdos en la etapa fetal de 35 días y una de 5 muestras tomadas a los 40 días tienen algún leucocito. De los 45 días en adelante, tanto células linfoides y mieloides son observadas en muchos especímenes. El conteo de células blancas se incrementa de 0.46 a los 35 días a  $4.32 \times 10^9/l$  a los 114 días de gestación. Durante el período fetal, los linfocitos predominan excepto entre los días 45 y 60 y otra vez al término e inmediatamente después del nacimiento, cuando una neutrofilia usualmente acontece. Brooks y Davis ( 25 ), hallaron una predominancia de linfocitos a los 98 días de gestación ( 87.5% ), disminuyendo a 48.5% al nacimiento, con un correspondiente incremento de neutrófilos. Waddill et al ( 25 ), encontraron cerca de 60% de neutrófilos al nacimiento. El cuadro de leucocitos en los cerdos recién nacidos, antes de la ingestión de calostro, semeja mucho al del último período fetal. En una muestra de sangre tomada enseguida, pero dentro de las primeras 12 horas posteriores al nacimiento, los neutrófilos, invariablemente, exceden en número a los linfocitos, promediando alrededor de  $6.0 \times 10^9/l$ , pero con un amplio rango (  $3.0 - 15.0 \times 10^9/l$  ). El número absoluto de linfocitos se incrementa y el de neutrófilos decrece, las curvas se entrecruzan durante la primera semana o 10 días de vida, resultando en un cuadro de linfocitos predominante, el cual, permanece como característica del cerdo sano por el resto de su vida ( 25 ). McClellan et al atrajeron la atención a un pico de linfocitos ocurrido a los 3 meses de edad en cerdos miniatura, pero esto a escapado a la observación de otros investigadores, los cuales se han enfocado ha-

cia los porcentajes relativos, más que a los números absolutos de linfocitos y neutrófilos. Observaciones de Imlah et al ( 25 ) indican que dentro de las 12 horas del nacimiento los linfocitos usualmente en número de  $2.0$  a  $5.0 \times 10^9/l$ , se incrementan paulatinamente hasta las semanas 9 y 15, donde son significativamente más altos que en los períodos precedentes y subsecuentes. Durante el período de alto conteo, muchos cerdos presentan uno, o algunas veces dos distintos picos de linfocitos, que en promedio son de  $15.0$  a  $20.0 \times 10^9/l$ , pero pueden elevarse hasta  $30.0 \times 10^9/l$  y representar más del 80% de la cuenta total de leucocitos. Durante estos picos, quizá 20% de los linfocitos serán células muy pequeñas, con un núcleo esférico teñido densamente con poco o no visible citoplasma. Tales picos son transitorios y declinan rápidamente, de modo que pueden fácilmente escapar a la observación. McClellan et al ( 25 ), hallaron un pico de neutrófilos en cerdos miniatura, el cual coincide con el pico de linfocitos. El conteo de rosetas de neutrófilos de menos de  $4.0 \times 10^9/l$  al momento del destete, a arriba de  $6.0 \times 10^9/l$  a los 3-6 meses, y declina a un nivel de adulto de cerca de  $4.0 \times 10^9/l$ . Imlah y Mc Taggart ( 25 ) no han hallado tales picos de neutrófilos en cerdos Large White, excepto en respuesta a algunos cambios en enfermedades. Es posible que los altos conteos de neutrófilos encontrados inmediatamente después del nacimiento tengan una etiología similar, de modo que conteos de neutrófilos que exceden alrededor de  $5.0 \times 10^9/l$ , pueden ser indicativos de algún cambio.

En otros trabajos donde se ha estudiado el proceso de maduración del sistema inmune del lechón lactante, los resultados muestran que en las primeras semanas de vida los leucocitos totales están en bajas concentraciones; esto se debe a que hay pocos linfocitos, monocitos, neutrófilos segmentados; en banda y eosinófilos.

Sin embargo, a medida que avanza la edad, las diferentes poblaciones leucocitarias van aumentando y a la octava semana comienzan a tener valores de animales adultos. Así mismo en los valores de las subpoblaciones de linfocitos se observó que la concentración de linfocitos T espontáneos o totales y T de alta afinidad o maduras, al nacimiento la concentración es baja y aumenta con la edad; lo opuesto ocurre con los linfocitos T autólogos o inmaduros indicando que hay maduración de las células conforme aumenta la edad. En lo que respecta a los linfocitos B, que expresan receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas y para C3b del complemento, se encontró que sus valores son bajos al nacimiento y se incrementan con la edad. Estos resultados van de acuerdo con la literatura en que la aparición de estos receptores es indicativo de maduración celular. En los linfocitos "Null" se determinó que con el tiempo hubo una ligera disminución lo que podría ser indicativo de que hay maduración de células que pasarían a ser linfocitos T o B ( 11 ).

Estos resultados indican que los cerdos durante las primeras semanas de vida tienen su sistema inmune inmaduro, pues la concentración de los diferentes tipos de células es menor que en los animales adultos y lo opuesto con las células indicadoras de inmadurez, altas incidencias en la temprana vida postnatal y luego disminuyen en número al paso del tiempo.

## VIII. JUSTIFICACION.

Los avances tecnológicos en la industria porcina que han ocurrido en México en los últimos años nos han colocado en uno de los primeros lugares dentro de la producción de carne de cerdo en Latinoamérica. La porcicultura al inicio de la presente década, ocupó el Primer Lugar en el abasto nacional de carne, posición que cada día reafirma a pesar de la reducción de inventario de esta especie, originada por una disminución en el consumo, baja rentabilidad, problemas a los que se suma el sanitario, en las regiones de mayor producción, donde una serie de complicaciones en torno al "Cólera", "Rinitis atófica" y "Hemofilos" ( 33 ) están diezmando las explotaciones porcinas. La gravedad del problema sanitario ha originado la necesidad de conocer el proceso de maduración del sistema encargado de la defensa del animal contra las infecciones, es decir, su sistema inmune. Se está estudiando este proceso de maduración en el lechón lactante y como parte de este trabajo se evaluaron los niveles fagocitarios de los cerdos desde el nacimiento y durante las 10 primeras semanas de vida y se compararon con los de animales adultos.

## IX. HIPOTESIS DE TRABAJO.

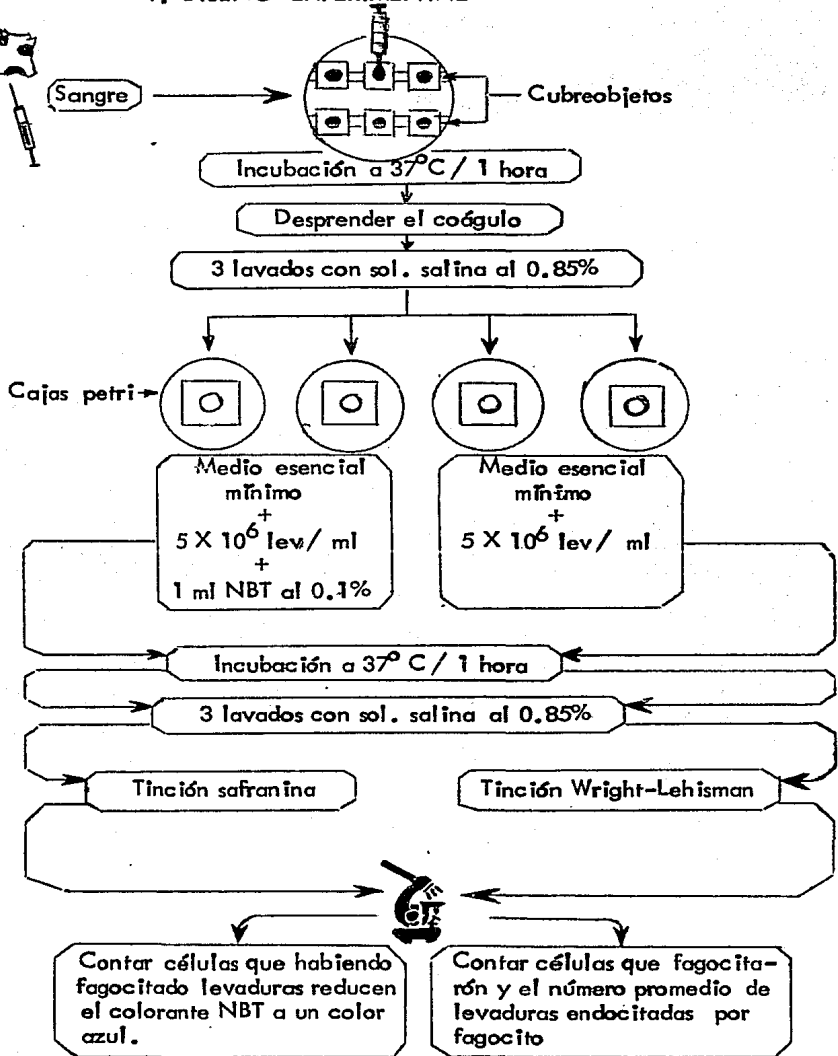
Determinar si los cerdos presentan inmadurez en un mecanismo inespecífico de defensa, tal como es la fagocitosis, que pudiera contribuir a las altas incidencias de morbilidad y mortalidad presentes en la lactancia, debidas principalmente a infecciones de tipo respiratorio y digestivo, donde la función fagocítica es fundamental en la resistencia del hospedero para mantenerse libre de microorganismos patógenos.

## X. OBJETIVOS.

1. Determinar el porcentaje de células de sangre periférica aptas para fagocitar, el número promedio de levaduras que ingiere cada fagocito y la capacidad de producción de sustancias microbidas de los cerdos desde el nacimiento, hasta las 10 semanas, 6 meses y 2 años de edad.
2. Establecer a que edad los cerdos alcanzan la madurez en los niveles fagocitarios y comparar estos valores con los de humanos adultos ( 23 - 26 años ).

# XI. MATERIAL Y METODOS.

## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 2. MATERIAL BIOLÓGICO.

En el estudio del efecto de la edad en los niveles fagocitarios se utilizaron 80 cerdos de diferentes razas desde el nacimiento hasta las 10 semanas de vida, 6 meses y 2 años de edad, pertenecientes a la granja experimental porcina "Zapotitlán" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

En el caso del estudio comparativo de los niveles fagocitarios entre humanos y cerdos, los primeros son 10 adultos jóvenes ( 23 - 26 años ) y los segundos son 8 cerdos de 6 meses de edad y 2 cerdos de dos años.

## 3. LAVADO DE CUBREOBJETOS.

Se lava cada cubreobjetos con una solución detergente ( Inalimpia ) frotándolo con los dedos y enjuagando con agua corriente. Se introducen en ácido sulfúrico concentrado y calentado ligeramente durante 1 hora. Se toman los cubreobjetos con pinzas de extremos planos y se enjuagan en una serie de vasos que contengan agua corriente, destilada y bidestilada sucesivamente. Se colocan los cubreobjetos en posición vertical sobre papel absorbente, se dejan secar y se guardan en cajas petri para su esterilización por calor seco.

## 4. PREPARACION DE LEVADURAS.

Se pesan 10 gramos de levaduras de pan (Saccharomyces cerevisiae) disgregándolas en 250 ml de solución salina al 0.85%. Se hacen 3 lavados con la misma solución, centrifugando a 2500 rpm/ 10 minutos. Se resuspende el sedimento en 50 ml de solución salina y se cuenta el número de levaduras en cámara de Neubauer tññiendo con cristal violeta. Se ajusta la suspensión a una concentración de  $5 \times 10^6$  levaduras/ ml, mediante las diluciones necesarias. Se envasa la suspensión en frascos ampula de 50 ml, se sellan y esterilizan a 15 lb. de

presión durante 15 minutos, quedando listas para su uso o conservación a 4° C.

#### 5. OPSONIZACION DE LEVADURAS.

Al momento de usarse las levaduras, se les adiciona suero fresco que debe ser de una especie homóloga ( en el caso de humanos el suero proviene de la misma persona que donó la sangre y para los cerdos se obtuvo de 2 animales adultos ) a razón de 1 ml de suero por cada 10 ml de la suspensión de levaduras. Se incuba a 37° C durante 30 minutos y posteriormente se hacen 3 lavados con solución salina al 0.85% y finalmente se resuspenden al volumen original.

#### 6. ENSAYO DE FAGOCITOSIS.

Se obtiene sangre venosa sin anticoagulante y directamente de la jeringa se depositan 3 gotas de sangre sobre cada una de los cubreobjetos contenidos en una cámara húmeda; se incuba a 37° C durante 1 hora, para permitir la sedimentación y adherencia de los PMN y monocitos al vidrio. Luego se desprende el coágulo lavando el cubreobjetos con sol. salina al 0.85% calentada a 37° C a fin de retirar las células no adheridas al vidrio. Inmediatamente y sin dejar secar las preparaciones se colocan los cubreobjetos en cajas petri de 60 X 15 mm. y se cubren las células con medio esencial mínimo ( GIBCO, Grand Island, N.Y. U.S.A. ) diluido 1:10 en solución salina amortiguada y se les adiciona 1 ml de la suspensión de levaduras ( Saccharomyces cerevisiae ) ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  levaduras / ml. A la mitad de los cubreobjetos, además de las levaduras se les añade 1 ml del colorante Nitroazul de tetrazolio ( Sigama Chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A. ) al 0.1% diluido en solución salina al 0.85%, homogenizando bien con agitación moderada e incubando nuevamente 1 hora a 37° C, lavando 3 veces con la misma solución salina a 37 °C para retirar las levaduras no fagocitadas.



A los cubreobjetos que se les agrega el colorante NBT se les tinte con Safranina ( Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A. ) al 0.5%, cubriendo las células durante 15 minutos y lavándolas con agua destilada. A los que sólo se les agregaron levaduras se tifican con el colorante Wright ( Merck Sharp and Dohme, Rahway, N. J. U.S.A. ) mezclado en una proporción de 3:1 con Lehisman ( Merck Sharp and Dohme, Rahway, N. J. U.S.A. ) depositando el colorante a tensión superficial, sin permitir que se seque durante 8 minutos, agregando agua y homogenizando bien, manteniendo el agua y el colorante 3 minutos más y lavando el cubreobjetos con agua destilada. Los cubreobjetos se dejan escurrir sobre papel absorbente y una vez secos se fijan con resina ( Bálsamo de Canadá ). Después de permitir que se seque la resina, las preparaciones quedan listas para su observación y cuantificación de los fagocitos con objetivo de inmersión ( 100 X ) por microscopía de luz.

## 7. CONTEO CELULAR.

En las preparaciones que se tifican con Wright-Lehisman se cuentan 500 células que fagocitan levaduras. Así mismo, se cuenta el número de levaduras promedio que ingiere cada fagocito, determinado en 500 células, expresado como índice fagocítico ( IF ). En las preparaciones en las que además de las levaduras se agrega el colorante NBT se cuentan también 500 células y se cuantifica la proporción de fagocitos que reducen el colorante precipitando éste a un compuesto llamado formazán; observándose las levaduras endocitadas de color azul, en comparación a los fagocitos con levaduras endocitadas de color naranja ( Tificadas de este color por el colorante Safranina ) que no lo reducen, como una medida di-

recta de la producción de iones superóxido y del metabolismo oxidativo de los fagocitos.

La razón por la cual se eligió esta prueba es por los bajos volúmenes de sangre que requiere, lo que la hace adecuada para el estudio en animales y humanos neonatos y jóvenes. Es de importancia el resaltar que ésta técnica es semicuantitativa, debido a que no se tiene un control estricto en la cantidad de células fagocíticas que se utilizan y que para llevar a cabo el conteo celular, éste debe ser realizado por personal familiarizado con la diferenciación de las células leucocitarias, originado porque no todas las células que se observan son fagocitos. La duración de la prueba es de aproximadamente un día, pero si el número de muestras con las que se trabaja es grande, puede requerir de varios días en realizar el conteo celular en el microscopio.

La técnica es una modificación hecha en el laboratorio de Inmunología Molecular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (E.N.C.B.) perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (I.P.N.) y el laboratorio de investigación de Infectología del Instituto Nacional de Pediatría ( 10 ).

## XII. RESULTADOS.

### PORCENTAJE DE CELULAS APTAS PARA FAGOCITAR.

El porcentaje que se encuentra de células aptas para realizar su función es bajo al nacimiento en los cerdos ( 54% ) y existen diferencias estadísticas significativas (  $P < 0.001$  ) con respecto a cerdos de 10 semanas ( 77% ), 6 meses y 2 años de edad ( 78% ). Se registra una disminución en este porcentaje en la primera semana ( 50% ) y ocurre una elevación significativa (  $P < 0.02$  ) en la segunda ( 67% ). A partir de la tercera semana se encuentra una ligera tendencia decreciente ( 59% ), que se hace más prominente entre las semanas sexta y séptima ( 52% ), existiendo diferencias estadísticas (  $P < 0.02$  ) en comparación con animales de ocho semanas ( 66% ). En los cerdos de 10 semanas de edad ( 77% ), se alcanzan los niveles de adulto, como en animales de 6 meses y 2 años de edad ( 78% ) ( Ver Tabla 4. y Figura 4 ).

### INDICE FAGOCITICO.

El número promedio de levaduras endocitadas por fagocito, expresado como índice fagocítico, es ligeramente menor al nacimiento ( 3.3 ), pero no existen diferencias significativas con respecto a los cerdos de 10 semanas ( 3.6 ), 6 meses ( 3.7 ) o de 2 años de edad ( 3.8 ). Sin embargo, a la primera semana se registra una disminución estadísticamente significativa (  $P < 0.02$  ) en relación a los animales recién nacidos y adultos y a continuación y hasta la quinta semana se mantienen los valores ( 3.1 ). Entre las semanas sexta y séptima detectamos una marcada disminución en la funcionalidad de las células fagocíticas, 2.1 y 2.2 respectivamente, existiendo diferencias estadísticas (  $P < 0.02$  ) comparadas con cerdos de 5 semanas ( 3.1 ) y de ocho ( 3.3 ). A partir de la décima sema-

na se alcanzan los niveles de adulto ( 3.6 ) ( Ver Tabla 4 y Figura 5 ).

#### EVALUACION DEL METABOLISMO OXIDATIVO.

El porcentaje de células con capacidad de producción de sustancias microbidas, evaluadas por la reducción del colorante Nitroazul de tetrazolio es ligeramente menor en cerdos de 24 horas de nacidos ( 81% ), comparados con cerdos de 10 semanas ( 87% ), 6 meses ( 87% ) y de 2 años de edad ( 88% ), existiendo diferencias estadísticamente significativas (  $P < 0.01$  ). Aquí también se registra una ligera disminución en estos niveles en la primera semana ( 77% ) y aumentan significativamente en la segunda ( 92% ); existiendo diferencias significativas (  $P < 0.05$  ). A partir de la tercera semana disminuyen ligeramente los valores ( 87% ), permaneciendo invariablemente constantes, con niveles semejantes a los de cerdos adultos durante el resto del crecimiento ( Ver Tabla 4 y Figura 6 ).

#### ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES FAGOCITARIOS ENTRE HUMANOS Y CERDOS.

Se demostró en este estudio que los cerdos a las 10 semanas de vida alcanzan completamente los niveles fagocitarios de adultos ( cerdos de 6 meses y de 2 años ) y que existen diferencias estadísticamente significativas (  $P < 0.05$  ) con los valores encontrados en humanos adultos en lo que respecta al metabolismo oxidativo e índice fagocítico, no así en el porcentaje de células aptas para fagocitar ( Ver Tabla 5 y Figura 7 ).

TABLA 4

EFFECTO DE LA EDAD EN LOS NIVELES FAGOCITARIOS EN CERDOS

| EDAD        | (n) | PORCENTAJE DE CELULAS FAGOCITARIAS | INDICE FAGOCITICO | METABOLISMO OXIDATIVO |
|-------------|-----|------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 24 horas    | 7   | 54 ± 3.2                           | 3.3 ± 0.1         | 81 ± 1.0              |
| 1a. Semana  | 7   | 50 ± 5.0                           | 2.7 ± 0.2         | 77 ± 2.8              |
| 2a. Semana  | 7   | 67 ± 3.9                           | 2.9 ± 0.2         | 92 ± 1.2              |
| 3a. Semana  | 7   | 59 ± 3.6                           | 2.8 ± 0.1         | 87 ± 1.1              |
| 4a. Semana  | 7   | 61 ± 2.5                           | 3.0 ± 0.2         | 86 ± 0.8              |
| 5a. Semana  | 7   | 57 ± 4.0                           | 3.1 ± 0.3         | 86 ± 2.0              |
| 6a. Semana  | 7   | 52 ± 2.6                           | 2.1 ± 0.1         | 84 ± 2.0              |
| 7a. Semana  | 7   | 52 ± 3.9                           | 2.2 ± 0.1         | 84 ± 1.7              |
| 8a. Semana  | 7   | 66 ± 2.5                           | 3.3 ± 0.2         | 87 ± 1.9              |
| 9a. Semana  | 7   | 67 ± 4.0                           | 3.1 ± 0.3         | 81 ± 1.0              |
| 10a. Semana | 7   | 77 ± 1.0                           | 3.6 ± 0.2         | 87 ± 1.1              |
| 6 Meses     | 8   | 78 ± 2.3                           | 3.6 ± 0.2         | 87 ± 1.2              |
| 2 Años      | 2   | 78 ± 2.1                           | 3.7 ± 0.2         | 88 ± 1.1              |

(n) = Expresa el número de animales utilizados en cada experimento; siendo cerdos diferentes los utilizados en cada semana. En cada animal el ensayo se hizo por duplicado, empleando como medida de dispersión el error estándar.

TABLA 5

ESTUDIO COMPARATIVO EN LOS NIVELES  
FAGOCITARIOS ENTRE HUMANOS Y CERDOS

|  | CERDOS                |                    |                   | HUMANOS                |
|--|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
|  | 10 Semanas<br>(n = 7) | 6 Meses<br>(n = 8) | 2 Años<br>(n = 2) | 23-26 Años<br>(n = 10) |
| PORCENTAJE DE<br>CELULAS APTAS<br>PARA FAGOCITAR | 77 ± 1.0              | 78 ± 2.3           | 78 ± 2.1          | 77 ± 2.3               |
| INDICE<br>FAGOCITICO                             | 3.6 ± 0.2             | 3.6 ± 0.2          | 3.7 ± 0.2         | 2.3 ± 0.06             |
| METABOLISMO<br>OXIDATIVO                         | 87 ± 1.1              | 87 ± 1.2           | 88 ± 1.1          | 80 ± 2.1               |

El número de unidades experimentales utilizados aparece en cada columna expresado como (n), cada ensayo se hizo por duplicado, empleando como medida de dispersión el error estándar.

### PORCENTAJE DE CELULAS FAGOCITARIAS

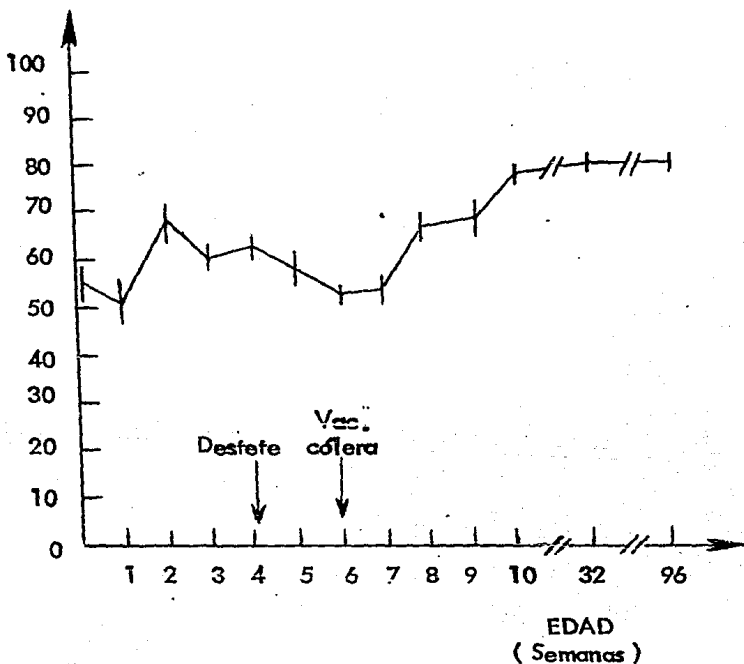
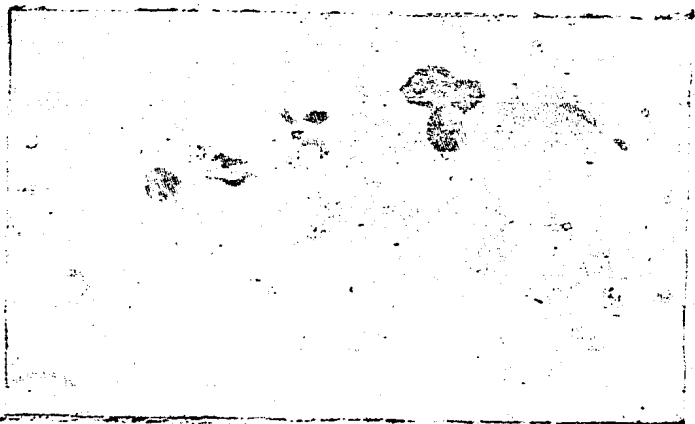


FIGURA 4. EFECTO DE LA EDAD EN EL PORCENTAJE DE CELULAS FAGOCITICAS DE CERDO DE SANGRE PERIFERICA APTAS PARA FAGOCITAR. Cada punto representa el valor promedio de 7 diferentes cerdos. En cada animal se hizo el ensayo por duplicado, empleando como medida de dispersión el error estándar.



**Fotografía 1.** Utilizando la tinción Wright-Lehman se cuentan 500 células y se obtiene la proporción de fagocitos que endocitaron levaduras.



**Fotografía 2.** Utilizando la tinción Wright-Lehman se cuentan 500 células y se obtiene el número promedio de levaduras que ingiere cada fagocito.



### No. DE LEVADURAS ENDOCITADAS POR FAGOCITO

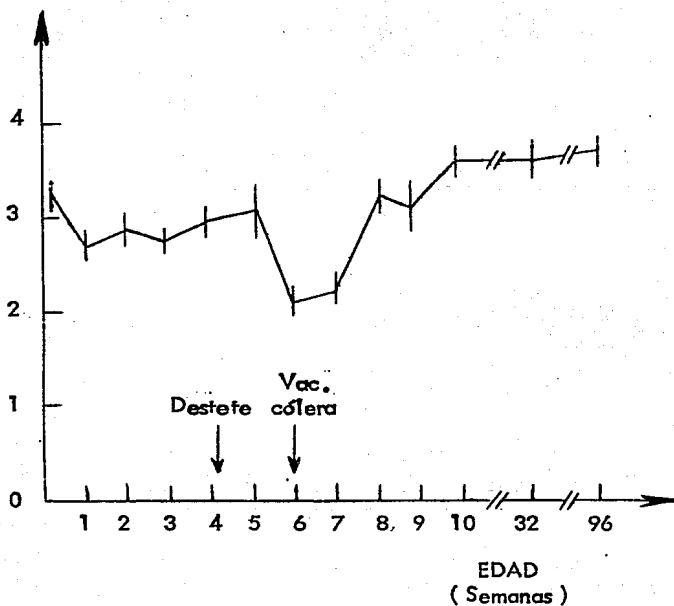
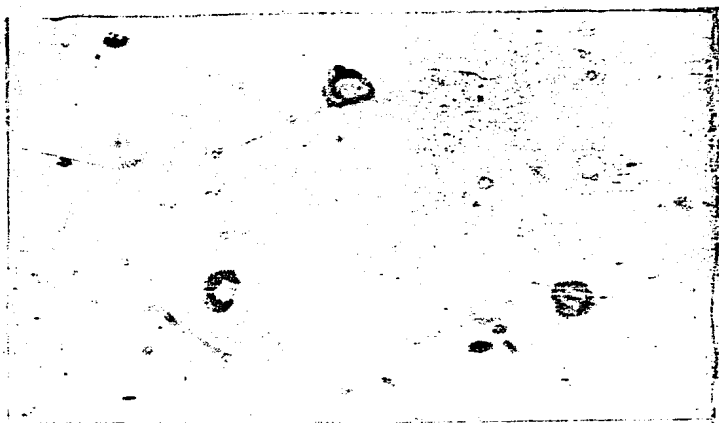


FIGURA 5. EFECTO DE LA EDAD EN EL INDICE FAGOCITICO DE CELULAS FAGOCITICAS DE CERDO DE SANGRE PERIFERICA. Cada punto representa el valor promedio de 7 diferentes cerdos. En cada animal se hizo el ensayo por duplicado, empleando como medida de dispersión el error estándar.



Fotografía 3. Cuando se utiliza la tinción Wright-Leishman los núcleos de las células fagocíticas se tiñen de azul, pero el citoplasma no es visible. Las levaduras se observan de color gris.



Fotografía 4. Cuando se utiliza la tinción de Safranina, el núcleo de los fagocitos, pero también las levaduras, se tiñen de naranja. El citoplasma granular resalta por la reducción del colorante NBT que ocurre en los lisosomas, observándose de color azul.

### PORCENTAJE DE CELULAS CON CAPACIDAD DE PRODUCCION DE SUSTANCIAS MICROBICIDAS

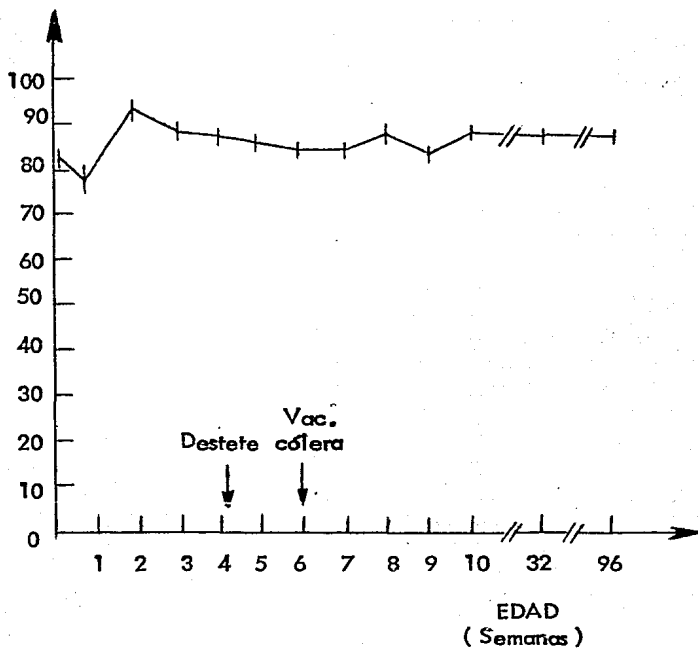
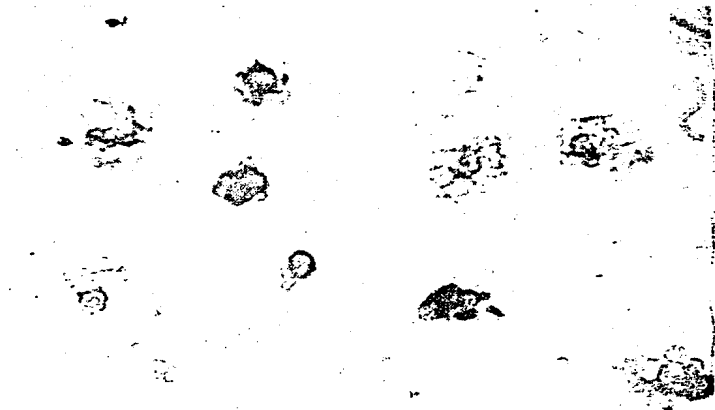


FIGURA 6. EFECTO DE LA EDAD EN EL PORCENTAJE DE CELULAS FAGOCITICAS DE CERDO DE SANGRE PERIFERICA CON CAPACIDAD DE PRODUCCION DE SUSTANCIAS MICROBICIDAS. Cada punto representa el valor promedio de 7 diferentes cerdos. En cada animal se hizo el ensayo por duplicado, empleando como medida de dispersión el error estándar.



Fotografía 5. Utilizando la tinción de Safranina se observan fagocitos que habiendo endocitado levaduras y al mismo tiempo captado el NBT pueden tener la capacidad para reducirlo, observándose las levaduras de color azul, o conservar su color naranja si la célula fagocitaria no tiene ésta capacidad.



Fotografía 6. Utilizando la tinción de Safranina se cuentan 500 células que han fagocitado levaduras para obtener la proporción de las que poseen la capacidad para reducir el NBT.

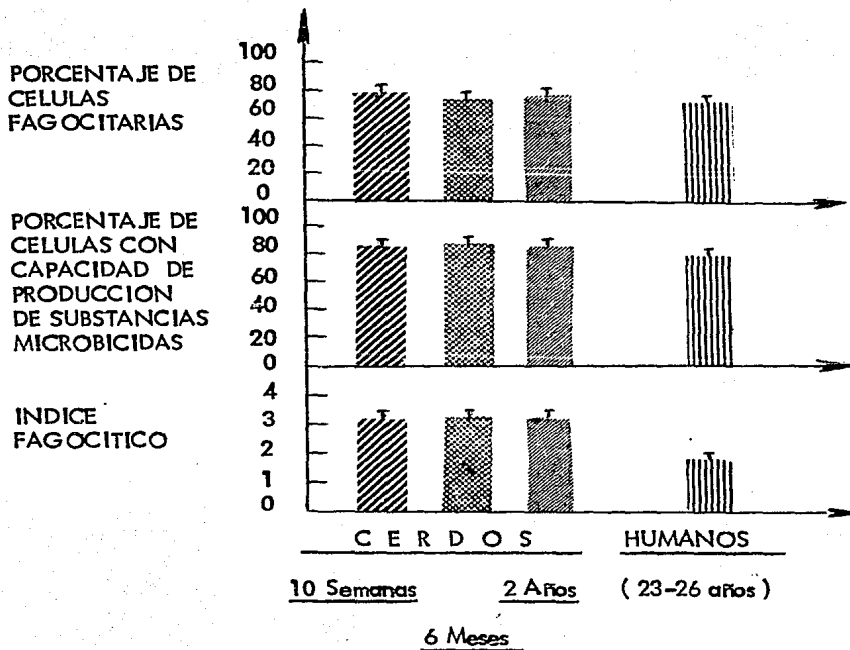


FIGURA 7. ESTUDIO COMPARATIVO EN LOS NIVELES FAGOCITARIOS ENTRE HUMANOS Y CERDOS. Cada barra representa el valor promedio de 10 humanos y 7 cerdos. En cada caso se hizo el ensayo por duplicado, empleando como medida de dispersión el error estándar.

### XIII. DISCUSION.

Los aniamles neonatales de casi todas las especies son relativamente inmuno-deficientes a pesar de las amplias diferencias que existen en cuanto a su madurez fisiológica y en el desarrollo tímico al momento del nacimiento. Esta inmunodeficiencia se traduce en una alta incidencia de enfermedades de tipo infeccioso en las primeras etapas de la vida y origina una susceptibilidad a ciertos microorganismos que normalmente en el individuo adulto no se presenta. Tal es el caso de bacterias como Lysteria monocytogenes ( 5 ) y Streptococcus B del tipo III ( 26 ), de Candida albicans en el caso de hongos ( 2, 15, 31 ) y posiblemente, algunos virus asociados con enfermedades de tipo respiratorio y digestivo.

Tomando en consideración que la porcicultura al inicio de la presente década ocupó el Primer Lugar en el abasto nacional de carne y según datos reportados en investigaciones hechas hasta el año de 1985, las enfermedades del cerdo decrecen la productividad de un 15% a un 40% ( 33 ) y el origen de la morbilidad y mortalidad son principalmente enfermedades de tipo infeccioso. Lo anterior ha originado la necesidad de estudiar el perfil inmunológico del cerdo desde el nacimiento hasta las 10 primeras de vida para iratar de conocer como es que se va estableciendo el proceso de madurez en el sistema inmune y actualmente han sido evaluados parámetros de concentración de leucocitos totales; así como de sus diferentes tipos. También se ha realizado la purificación de linfocitos para hacer pruebas de rosetas y establecer los valores normales de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y B y se ha estudiado también la cinética de absorción de las proteínas del calostro por los lechones recién nacidos ( 33 ). Como parte de éste trabajo de investigación se evaluaron los niveles fagocitarios de los cer-

dos desde el nacimiento y durante las 10 primeras semanas de vida, con el fin de comparar estos valores con los de animales adultos ( 6 meses y 2 años ) y estudiar si los cerdos presentan inmadurez en un mecanismo inespecifico de defensa, tal como es la fagocitosis, que pudiera contribuir a las altas incidencias de morbilidad y mortalidad presentes en la lactancia ( 33 ), debidas principalmente a infecciones de tipo respiratorio y digestivo, donde la función fagocítica es fundamental en la resistencia del hospedero para mantenerse libre de microorganismos patógenos ( 6, 23 ).

Se encontró que el porcentaje de células aptas para fagocitar es menor en cerdos neonatos, mostrando diferencias significativas con los valores encontrados con cerdos adultos ( $P < 0.001$ ). El número promedio de levaduras que ingiere cada fagocítico es ligeramente menor pero no muestra diferencias estadísticas, lo que es indicativo que los fagocitos de cerdos neonatos funcionan casi tan bien como los de adulto, aunque existe un número menor de células de sangre periférica lo suficientemente aptas para realizar su función. En bovinos se ha reportado que la capacidad para ingerir microorganismos ( en este caso St. aureus. ) no se encuentra disminuida, sino que incluso es mayor que en los animales adultos ( 22 ). En cobayos se han encontrado defectos en el número de levaduras ingeridas en macrófagos peritoneales y ésta función se va incrementando progresivamente con la edad, reportandose un incremento aproximado de 3 veces en el índice fagocítico de adultos, cuando son comparados con animales de una semana de edad ( 51 ). En humanos, donde se ha estudiado más éste fenómeno, los datos se encaminan hacia dos grupos: en uno se ha encontrado que los neutrófilos neonatales responden in vitro a los desafíos bacteriales tan eficientemente como los neutrófilos de adulto

en la presencia de una concentración normal o aproximadamente normal de plasma o suero como fuente opsonica. El segundo grupo ha sido llevado a cabo bajo condiciones de "tensión" in vitro o in vivo y sugiere que los PMN de neonatos están deficientes en su habilidad fagocítica cuando son comparados con los PMN de adultos. Esta aparente dicotomía debe de explicarse con base al análisis de la diversidad de sistemas in vitro ensayados y a la variabilidad de las condiciones empleadas, que incluyen variables tan importantes como la concentración celular, la concentración opsonica, el tipo de partícula que está siendo ingerida y a la proporción Partícula:Fagocito. Ya que se ha encontrado que la fagocitosis de levaduras por los PMN de neonatos utilizando un exceso de suero de 10% ésta es tan eficiente como en los de adulto; y en bajas concentraciones de suero ( 2.5% ) se observan las deficiencias, aunque éste último dato puede ser de una limitada significancia clínica, dado que concentraciones de 2.5% son raramente aproximadas en el hombre. En nuestro estudio empleamos 1 ml de suero para opsonizar 10 ml de levaduras a una concentración de cinco millones de levaduras por ml, pero debido a las diferencias de método empleado no podemos hacer una comparación equivalente para determinar si nuestra concentración de suero es normal o deficiente. En otros estudios de fagocitosis de neonatos humanos a término y enfermos, 6 de cada 9 neonatos, con condiciones tales como diarrea, acidosis, o neumonía son deficientes en su actividad fagocítica en relación a neonatos sanos y estos estudios utilizan concentraciones de suero en exceso de 10%, haciendo éstos datos más significativos, ya que sugiere la posibilidad de que los procesos infecciosos pueden acarrear deficiencias en la actividad fagocítica, pero es de resaltar que sólo en los neonatos, ya que en adultos éstas mismas enfermeda-



des no la inducen ( 31 ). Por otra parte, comparando la actividad bactericida de neutrófilos con 2 especies de bacterias ( St. aureus y E. coli ) a una proporción de bacterias : neutrófilos de 1 : 1 se encontró una muerte comparable en recién nacidos y adultos. Sin embargo, a una proporción de 100 : 1 una marcada deficiencia en la capacidad bactericida fue hallada en los PMN de recién nacido ( 39 ).

En los cerdos, se encuentra que todos los parámetros evaluados disminuyen en la primera semana, siendo el más significativo el del índice fagocítico (  $P < 0.02$  ) con respecto al nacimiento y se presenta un importante repunte en la segunda semana en el porcentaje de células fagocitarias y en el metabolismo oxidativo con diferencias estadísticas significativas en relación con la primera semana e incluso con la tercera, en el caso del metabolismo oxidativo (  $P < 0.05$  ). Esta disminución en la funcionalidad de los fagocitos en la primera semana y el repunte observado en la segunda, concuerdan con los altos niveles de neutrófilos en banda ( células inmaduras ) y concentraciones menores de neutrófilos segmentados ( células maduras ) reportados en la primera semana y con la tendencia opuesta en la segunda semana, disminución de los neutrófilos en banda y una mayor cantidad de neutrófilos segmentados; proporción que no vuelve a alcanzarse en ninguna etapa en la vida del cerdo ( 11 ). Todo esto refleja los profundos cambios que ocurren en el lechón en la lactancia, en el preciso momento cuando la inmunidad de la cerda al lechón por medio de la transferencia pasiva de inmunoglobulinas del calostro va disminuyendo, donde la máxima concentración de inmunoglobulinas plasmáticas se alcanza a las 24 horas después del nacimiento y decrece progresivamente en los subsecuentes días ( 33 ). Los estudios hechos en macrófagos alveolares de conejo sobre las bajas concentraciones enzimáticas que ocurren en la primera semana de vida y duran-

te el primer mes en general pudieran explicar estos cambios, si se encontrara la misma tendencia en los fagocitos de los cerdos de sangre periférica, ya que explicaría los relativamente altos niveles fagocitarios al nacimiento, donde por una parte, enzimas que participan en la vía de la hexosa monofosfato y en la muerte y degradación microbial están elevadas al nacimiento y disminuyen dramáticamente en la primera semana, en donde encontramos los niveles fagocitarios más bajos. Además enzimas destoxicantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, fundamentales para mantener la integridad de la célula y por ende una adecuada función fagocítica, presentan el mismo cuadro ( 6 ). Aunque lo anterior no explicaría porque en la segunda semana aumentan significativamente los niveles fagocitarios y los niveles enzimáticos no aumentan en la misma proporción, donde es de resaltar que es aquí que el metabolismo oxidativo alcanza su mayor nivel, superior incluso que el de fagocitos de adulto ( $P < 0.05$ ).

Prosiguiendo el análisis, encontramos que el porcentaje de células con capacidad fagocitaria y el índice fagocítico conservan bajos niveles durante las 7 primeras semanas de vida, presentando una disminución notoria entre la sexta y séptima semana con respecto a los valores encontrados en la octava e incluso con la quinta semana, en el caso del índice fagocítico ( $P < 0.02$ ). Esta baja en la funcionalidad puede ser atribuible al estrés que provoca el destete, donde altos niveles de hormonas corticosteroides han sido reportados en algunos trabajos ( 53 ), aunque en otros sólo es evidente un leve incremento ( 30 ). Hasta el momento no existe un conocimiento muy amplio para explicar en general los efectos inmunosupresores de los corticosteroides. El Dr. Cuarón ( 33 ) menciona, que uno de los principales efectos de estas hormonas es el de desencadenar la gluconeogénesis,

con la finalidad de generar energía fácilmente utilizable ( glucosa ) para permitir la respuesta inmediata provocada por el estrés; donde desafortunadamente la desaminación de los aminoácidos es la primera reacción gluconeogénica, siendo acompañada de una inhibición del metabolismo en general y esto genera un efecto secundario que provoca la disminución en la tasa de síntesis e incluso en la destrucción de proteínas ( incluyendo inmunoglobulinas ), o grupos celulares ( como los leucocitos ), que pueden ser conducentes a inmunodepresión. Por otra parte, debido a que los cerdos con que se trabaja son rutinariamente vacunados contra el cólera porcino, esto introduce una nueva variable al experimento. Este virus se conoce que se replica dentro de los linfocitos ( 12 ) y posiblemente en las células fagocitarias, por las dramáticas neutropenias y monocitopenias que usualmente ocurren ( 12, 46 ) y aunque es un virus vacunal, la vacuna es de virus vivo (aunque atenuado ) y por lo tanto replica dentro de las células, con la consiguiente ocupación de la maquinaria biosintética de la misma, lo que puede ocasionar una disminución en la actividad fagocítica, pero esto necesita ser demostrado experimentalmente y crea nuevas interrogantes en cuanto a la problemática del cólera postvacunal.

A partir de la octava semana, los porcentajes de células fagocitarias y el índice fagocítico logran niveles cercanos a los de adulto, el metabolismo oxidativo lo hace desde la segunda semana. A la décima semana de vida se adquiere una madurez completa en todos los niveles fagocitarios, como el observado en cerdos de 6 meses y de 2 años. En cobayos, se ha encontrado que en el tercer mes de vida, se alcanza la madurez plena en el porcentaje de fagocitosis, pero hasta el año en lo que respecta a su respuesta quimiotáctica ( 51 ). En bovinos, la ma-

durez plena en el metabolismo oxidativo y la citotoxicidad mediada por células se establece en animales de 12-14 meses, pero la capacidad para ingerir al St. aureus es mayor en los animales más jóvenes ( 22 ). En el humano, no se determinó la edad exacta en la que se alcanza el pleno desarrollo fagocitario.

Como corolario podemos mencionar que los cerdos, así como muchas especies animales y el hombre, presentan deficiencias en su sistema fagocitario, así como en otros niveles del sistema inmune, al momento de nacer. Con el tiempo van organizando y perfeccionando sus mecanismos de defensa hasta llegar a una edad en que ocurre una regresión en éstas funciones, acompañadas por una baja en el metabolismo en general. En ratones, donde se ha estudiado éste fenómeno en la senectud, se han comprobado algunas deficiencias intrínsecas, como un incremento cuantitativo en células derivadas del timo y un decremento en la frecuencia de células derivadas de médula ósea, en donde ambos tipos de células son menos capaces de crecer y proliferar que las respectivas poblaciones celulares más jóvenes. La eficiencia en el procesamiento del antígeno se encuentra reducida alrededor de 10 veces, como fue juzgado por las mínimas cantidades de antígeno necesarias para una estimulación máxima del sistema inmune en ratones jóvenes y viejos ( 36 ). En lo concerniente a deficiencias extrínsecas, como las del entorno, son estudiadas por transferencia de células inmunocompetentes tanto hacia ratones jóvenes y viejos, donde los factores del entorno no celulares de los ratones viejos funcionan en detrimento de la proporción de crecimiento de las poblaciones celulares formadoras de anticuerpos y para la completa expresión del potencial de las células jóvenes inmunocompetentes ( 37 ).

#### XIV. CONCLUSIONES.

Los cerdos al nacimiento presentan bajos niveles fagocitarios con respecto a los de animales adultos. Durante las siete primeras semanas el porcentaje de células aptas para fagocitar y el índice fagocítico son bajos. El metabolismo oxidativo a partir de la segunda semana es equiparable al de adultos.

A las 10 semanas de edad se alcanzan completamente los niveles fagocitarios de cerdos de 6 meses y de 2 años, siendo muy semejantes a los valores encontrados en humanos adultos ( 23-26 años ), en cuanto al porcentaje de células fagocitarias y son mayores con respecto al índice fagocítico y metabolismo oxidativo.

Esta disminución en la función fagocitaria en las primeras semanas de vida, contribuye junto con otras inmunodeficiencias a crear una susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, que se traduce en un alto índice de morbilidad y mortalidad en el lechón lactante.

XV. BIBLIOGRAFIA.

1. Adams, O.D., and Hamilton, A.T., 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2 : 283-318.
2. Ambruso, R.D., Altenburger, M.K., and Johnston, B.R., 1979. Defective oxidative metabolism in newborn neutrophils: discrepancy between superoxide anion and hydroxyl radical generation. *Pediatrics.*, 64 (suppl) : 722-725.
3. Baggiolini, M., Bretz, U., Dewald, B., and Feigenson, E.M. 1978. The polymorphonuclear leukocyte. *Agents and Actions.*, 8, (1-2) : 3-10.
4. Barnard, R.D., and Maureen, A.M., 1983. Fibronectin ( cold insoluble globulin ) in the neonate. *J. Pediat.*, 102 ( 3 ) : 453-455.
5. Bast, C.R., Cleveland, P.R., Littman, H.B., Zbar, B., and Rapp, J.H., 1974. Acquired cellular immunity : extracellular killing of Listeria monocytogenes by a product of immunologically activated macrophages. *Cell Immunol.*, 10 : 248-259.
6. Bellanti, A. J., Nerurkar, S.L. and Zeligs, J.B., 1979. Host defenses in the fetus and neonate : studies of the alveolar macrophage during maturation. *Pediatrics.*, 64 ( suppl ) : 726-739 .
7. Blaese, M.R., Poplack, G.P., and Muchmore, V.A., 1979. The mononuclear Phagocyte system : role in expression of immunocompetence in neonatal and adult life. *Pediatrics.*, 64 ( suppl ) : 829-833.
8. Boggs, R.D., Las células fagocitarias. En, "El leucocito". Editado por Wilkenstein A., El Manual Moderno, S.A. de C.V. Méx. D.F., pp: 34-65. 1983.
9. Carpenter, L.P., Fagocitosis. En, *Inmunología y Serología*. Editado por la Prensa Médica Mexicana, Méx. D.F., la. reimpression., pp: 226-239, 1972.

10. Celaya, B.G., Santos, A.L., Sánchez, T.M. y Arredondo, L.J., Estandarización de una técnica para evaluar la función fagocítica en infantes. Resúmenes. XVI Congreso Nacional de Microbiología, Durango, Dgo., pp : 27 , 1985.
11. Cisneros, M.I., 1985. Valores normales de las subpoblaciones de linfocitos en cerdos de 1,2,3, y 10 semanas de edad. Tesis de licenciatura de MVZ, Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán", Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., pp : 16-26.
12. Cisneros, M.I., Martínez, S.A., Zendejas, B.V., y Morilla, G.A., Alteraciones en la biometría hemática y subpoblaciones de linfocitos en cerdos inoculados con virus de cólera porcino patógeno. Memorias. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1986. México D.F., pp : 150.
13. Dahinden, C., Galanos, C., and Fehr, J., 1983. Granulocyte activation by endotoxin. I. Correlation between adherence and other functions, and role of endotoxin structure on biologic activity. *J. Immunol.*, 130. ( 2 ) : 857-862.
14. Dahinden, C., and Fehr, J., 1983. Granulocyte activation by endotoxin. II. Role of granulocyte adherence, aggregation, and effect of cytochalasin B, and comparison with formylated chemotactic peptide-induced stimulation. *J. Immunol.*, 130 ( 2 ) : 863-868.
15. Diamond, D.R., 1983. Inhibition of monocyte-mediated damage to fungal hyphae by steroid hormones. *J. Infect. Dis.* 147 ( 1 ) ; 160.
16. Egwang, G.T., and Batus, D.M., 1984. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunol.*, 51 : 207-223.
17. Fredman, M.R., Johnston, D., Mahoney, J.M., and Pearson, A.M., 1980. Development of splenic reticuloendothelial function in neonates. *J. Pediat.*, 96 ( 3 ) : 466-468.

18. Gabig, G.T., and Babior, M.B., 1981. The killing of pathogens by phagocytes. *Ann. Rev. Med.*, 32 : 313-326.
19. Gatti, A.R., Kempner, H.D. and Leibold, W., 1979. The role of the MHC antigens in the mature and immature host. *Pediatrics.*, 64 (suppl) : 803-813.
20. Gómez, E.H., Ramos, D.M. Vázquez, E.C., 1980. Actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares humanos a diferentes temperaturas. *Arch. Invest. Méd.*, 11 (1) : 65-71.
21. Hallet, B.M., Campbell, K.A., 1983. Direct measurement of intracellular free  $Ca^{2+}$  in rat peritoneal macrophages: correlation with oxygen-radical production. *Immunol.*, 50 : 487-495.
22. Hauser, A.M., Koob, D.M., and Roth, J.A., 1986. Variation of neutrophil function with age in calves. *Am. J. Vet. Res.* 47 (1) : 152-153.
23. Hoidal, R.J., Scmeling, D., and Peterson, K.P., 1981. Phagocytosis, bacterial killing, and metabolism by purified human lung phagocytes. *J. Infect. Dis.*, 144 (1) : 61-71.
24. Hostetter, K.H., Krueger, A.R., and Scmeling, J.D., 1984. The biochemistry of opsonization: central role of the reactive thiolester of the third component of complement. *J. Infect. Dis.*, 150 (5) : 653-661.
25. Imlah, P., and McTaggart, H.S. *En, Haematology of the pig. Comparative Clinical Haematology.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1977. pp: 271-303.
26. Jacobs, F.R., Kiel, P.D., Sanders, L.M., and Steele, W.R., 1985. Phagocytosis of the type III group B Streptococci by neonatal monocyte: enhancement by fibronectin and gammaglobulin. *J. Infect. Dis.*, 152 (4) : 695-700.



27. Kretschmer, R.R., Stewarson, B.P., Papireniak, K.C., and Gotoff, D.S. 1976. Chemotactic and bactericidal capacities of human newborn monocytes. *J. Immunol.*, 117 ( 4 ) : 1303-1307.
28. Kruff, P.D., Elias Metchnikoff ( Los diligentes fagocitos ). En, Los cazadores de microbios. Editorial Epoca, S.A.; Méx. D.F., Séptima edición. pp: 211-237, 1985.
29. Laurenti, F., Ferro, R., Marxetti, G., Rossini, M.B., and Bucci, G., 1981. Neutrophil chemotaxis infants with infections. *J. Pediat.*, 96 ( 3 ) : 468-470.
30. McCauley, I., and Hartmann, E.P., 1984. Changes in piglet leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Res. Vet. Sci.*, 37 : 234-241.
31. Miller, E.M., 1979. Phagocyte function in the neonate: selected aspects. *Pediatrics.*, 64 ( suppl ) : 709-712.
32. Mills, L.E., Quie, G.P., 1980. Congenital disorders of the functions of polymorphonuclear neutrophils. *Rev. Infect. Dis.*, 2 ( 3 ) : 505-517.
33. Morilla, A., Correa, P., y Stephano, C., Inmunidad. En, Avances en enfermedades del cerdo. Ediciones de la AMVEC. Méx. D.F., pp:11-63. 1985.
34. Onozaki, K., Takenawa, T., Homma, Y., and Hoshimoto, T., 1983. The mechanism of macrophage activation induced by  $Ca^{2+}$  ionophore. *Cell. Immunol.*, 75 : 242-254.
35. Ozsoylu, S., Hosain, F., and McIntyre, A.P., 1977. Functional development of phagocyte activity of the spleen. *J. Pediat.*, 90 ( 4 ) : 560-566.
36. Price, B.G., and Makinodan, T., 1972. Immunologic deficiencies in senescence. I. Characterization of intrinsic deficiencies. *J. Immunol.*, 108 ( 2 ) : 403-412.

37. Price, B.G., and Makinodan., 1972. Immunologic deficiencies in senescence. II. Characterization of extrinsic deficiencies. *J. Immunol.*, 108 ( 2 ): 413-417.
38. Quie, G.P., 1983. Perturbation of the normal mechanisms of intraleucocytic killing of bacteria. *J. Infect. Dis.*, 148 ( 2 ) : 189-193.
39. Quie, G.P., and Mills, L.E., 1979. Bactericidal and metabolic function of polymorphonuclear leukocytes. *Pediatrics.*, 64 ( suppl ) : 719-721.
40. Rabinovitch, M., 1968. Phagocytosis . *Semin. Hematol.*, 5 : 134-155.
41. Roth, J.A., and Kaeblerle, M.L., 1981. Evaluation of bovine polymorphonuclear leucocyte function. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 2 : 157-174.
42. Sharon, S.N., 1984. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunology Today.*, 5 ( 5 ) : 143-147.
43. Silverstein, C.S., Steinman, M.R., and Cohn, A.Z., 1977. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.*, 46 : 669-722.
44. Smith, J., Fagocitosis. En, *Inmunología Clínica y Básica*. Editado por D.P. Srites, El Manual Moderno, México, D.F., pp: 358-378 , 1985.
45. Spitznagel, K.J., and Shaffer, M.W., 1985. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: a historical summary. *Rev. Infect. Dis.*, 7 ( 3 ) : 398-403.

46. Sreeramon, K.P., Rao, R.P., Pillai, J.K., Reddy, R.M., Sreeramamurth, A., and Sastry, A.G., 1979. Cytochemical studies on the peripheral blood leukocytes of swine-before and after hog cholera vaccination. Indian. Vet. J., 56 : 825-830.
47. Stossel, P.T., 1974. Phagocytosis ( First of the three parts ). N. Engl. J. Med., 290 ( 13 ) : 717-722.
48. Stossel, P.T., 1974. Phagocytosis ( Second of the three parts ). N. Engl. J. Med., 290 ( 14 ) : 774-780.
49. Stossel, P.T., 1974. Phagocytosis ( Third of the three parts ). N. Eng. J. Med., 290 ( 15 ) : 833-839.
50. Strauss, G.R., 1980. Neutrophil assays as modified for infants. J. Clin. Immunol., 3 : 133-135.
51. Weeks, A.B., 1979. Effects of age and nutrition on macrophage function. J. Retic. Soc., 26 ( 4 ) : 459-462.
52. Wiernik, A., Jarstrand, C., and Julander, I., 1983. The effect of intralipid on mononuclear and polymorphonuclear phagocytes. Am. J. Clin. Nutr., 37 : 256-261.
53. Worsaae, H., and Schmidt, M., 1980. Phagocytosis. Act. Vet. Scand., 21 : 640-657.