

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Fagocitosis de levaduras por los polimorfonucleares neutrófilos en niños con giardiasis

Por:

Lic. ANA MARIA VAZQUEZ*, Dr. CARLOS ALBERTO GARCIA**,
Dra. URSULA UANICKA***, Dr. ANTONIO DE ARMAS****
y Dra. XIOMARA RODRIGUEZ*****

Vázquez, A. M. y otros. *Fagocitosis de levaduras por los polimorfonucleares neutrófilos en niños con giardiasis*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

En la giardiasis se han estudiado los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del huésped contra el parásito. Dentro de los mecanismos de defensa inespecíficos está la fagocitosis, la cual consta de cuatro fases interrelacionadas, que son: la quimiotaxis, opsonificación, ingestión y muerte. Se estudió la fagocitosis de los polimorfonucleares neutrófilos mediante la prueba de la ingestión de levaduras opsonificadas, en 39 niños con giardiasis y 17 niños sanos. En los niños con giardiasis el índice fagocítico fue de 1,87 y el porcentaje de fagocitosis fue de 68,4%. En los niños sanos el índice fagocítico fue de 1,65 y el porcentaje de fagocitosis fue de 70,4%. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Se sugiere que los estudios de los mecanismos de defensa que tiene el organismo contra la *Giardia* deben ser abordados localmente a nivel del intestino.

INTRODUCCION

La *Giardia lamblia* es un protozoario flagelado que invade de las partes altas del intestino delgado de los humanos y se ha comprobado que es un agente patógeno potencial importante para el hombre.¹ Las manifestaciones clínicas de la infección con *Giardia* pueden variar desde la ausencia de síntomas hasta una severa malabsorción.²

Para conocer las alteraciones que puede provocar la infestación de estos parásitos sobre el sistema inmune del huésped, algunos autores han encaminado sus investigaciones hacia el estudio de la respuesta inmune humo-

* Licenciada en ciencias biológicas. Laboratorio de Inmunología. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

** Especialista de I grado en inmunología.

*** Doctor en Ciencias.

**** Profesor auxiliar. Especialista de I grado en pediatría.

***** Especialista de I grado en pediatría.

ral³⁻⁷ y celular^{8,9-10} en la giardiasis, al igual que de los mecanismos de defensa inespecíficos del organismo.³

Dentro de los mecanismos de defensa no específicos se encuentra la fagocitosis, donde desempeñan una función importante los leucocitos polimorfonucleares como células fagocíticas que cooperan en la defensa del huésped las infecciones y ejercen sus efectos antimicrobianos a través de una interacción con los anticuerpos, sistema de complemento y factores quimiotácticos.¹¹ El fenómeno de la fagocitosis en los polimorfonucleares neutrófilos está compuesto de cuatro fases interrelacionadas, que son: quimiotaxis, opsonificación, ingestión y muerte.¹²

El objetivo de nuestro trabajo fue el estudio de la fagocitosis mediante la prueba de la ingestión de levaduras por los polimorfonucleares neutrófilos, de un grupo de niños con giardiasis, y compararlos con un grupo de niños sanos con el propósito de valorar las posibles alteraciones en los mecanismos de defensa inespecíficos de los individuos con esta enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 39 niños diagnosticados con giardiasis, por el examen directo de heces fecales o por intubación duodenal, del hospital "Pedro Borrás" y 17 niños sanos eutróficos del hospital "Fructuoso Rodríguez", cuyos exámenes de heces fecales fueron negativos.

A cada niño se le extrajo 5 ml de sangre venosa, la cual se depositó en tubos heparinizados

Obtención de los leucocitos polimorfonucleares:

Cada muestra de sangre se centrifugó en un gradiente de urografín (metilglucamina del ácido diacetilaminotriyodo benzoico) de densidad específica 1,077 a 800 x g durante 20 minutos.¹³ Para la obtención de los leucocitos polimorfonucleares se extrajo con una pipeta la capa de células blancas depositadas sobre el empaquetamiento de eritrocitos en el fondo del tubo. Las células se lavaron tres veces a 200 x g durante 5 minutos con solución balanceada de Hanks (SSBH) pH 7,2. Se ajustó la concentración celular a 4×10^6 células/ml.

Preparación de la suspensión de levaduras Saccharomyces cerevisiae

Esta especie de levadura se escogió como partícula fagocitable para este estudio, ya que crece como unidades individuales y es muy fácil su conteo dentro del citoplasma de la célula fagocítica.¹⁴

Las levaduras se calentaron a 100°C durante 30 minutos y se ajustó su concentración a aproximadamente 40×10^6 levaduras/ml en solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%), con el objetivo de obtener 10 levaduras por polimorfonuclear. Esta solución de levaduras se repartió en alcuotas y se conservó a -20°C hasta su utilización ya que en estas condiciones no hay reproducción de las mismas.¹⁴

Opsonificación de las levaduras

Las levaduras fueron opsonificadas antes del paso de la ingestión con suero de curiel fresco como fuente de complemento, siguiendo el procedimiento informado por otros autores.¹⁵

Se tomó 0,2 ml de la suspensión de levaduras y se le adicionó 0,2 ml de complemento de curiel. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se conservó a 4°C hasta su utilización.

Prueba de la ingestión

A 0,2 ml de la suspensión celular se le adicionó 0,2 ml de la suspensión de levaduras opsonificadas. Se incubó a 37°C durante 30 minutos agitando de forma suave constantemente.¹⁶ Se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante casi en su totalidad y con las células resuspendidas suavemente se prepararon extendidos muy finos en portaobjetos, se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa.

Se contaron 100 neutrófilos con objetivo 100 X y se cuantificó la cantidad de levaduras que se encontraban dentro del citoplasma de cada polimorfonuclear neutrófilo (figuras 1 y 2). El índice fagocítico (IF) de cada muestra se calculó como la media del número de levaduras ingeridas por neutrófilo.¹⁷

Los valores de los IF siguieron una distribución logaritmo normal y por esto los datos se transformaron en logaritmos neperianos para su análisis estadístico y los porcentajes de fagocitosis se transformaron a la expresión



Figura 1



Figura 2

2 arcoseno \sqrt{p} . La comparación de los resultados se realizó mediante el estadígrafo de la t de Student.

RESULTADOS

Los resultados de la comparación de las medias de los IF y los porcentajes de fagocitosis del grupo de niños con giardiasis con respecto al grupo control, se muestran en los cuadros I y II.

No se observaron diferencias significativas al comparar la media de los IF de los niños con giardiasis, con la de los niños sanos.

Tampoco se observó diferencia significativa al comparar los porcentajes de fagocitosis de levaduras por los polimorfonucleares neutrófilos de los

CUADRO I

COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS INDICES FAGOCITICOS

	Controles	Niños con giardiasis	Significación
\bar{x}^a	1,65	1,87	no significativo
$\bar{x} + 2E\bar{x}^b$	2,20	2,16	
$\bar{x} - 2E\bar{x}$	1,24	1,63	

^a media.

^b error de la media.

CUADRO II

COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS PORCENTAJES DE FAGOCITOSIS

	Controles	Niños con giardiasis	Significación
\bar{x}^a	70,4%	68,4%	no significativo
$\bar{x} + 2E\bar{x}^b$	82,6%	74,2%	
$\bar{x} - 2E\bar{x}$	56,5%	62,2%	

^a media.

^b error de la media.

niños con giardiasis al compararlos con los obtenidos en el grupo de niños sanos.

DISCUSION

El uso del método de ingestión, aunque tiene algunas desventajas, provee de un medio sencillo de medir el proceso de fagocitosis en su totalidad, ya que los eventos intracelulares de la fagocitosis, como la desgranulación y muerte dependen del fenómeno de la ingestión;¹¹ es por esto que los resultados obtenidos en nuestra experiencia en el estudio de esta etapa de la fagocitosis, nos informa que el comportamiento de este mecanismo a nivel de sangre periférica en estos niños con giardiasis, es normal.

El proceso de la fagocitosis ha sido poco estudiado en la giardiasis, no obstante, nuestros resultados coinciden con los informados por *Naik y colaboradores*,³ que estudiaron la fase de la muerte intracelular de la fagocitosis en pacientes adultos con giardiasis. Al parecer, no existen fallos en ninguna de las etapas del proceso de fagocitosis de los polimorfonucleares de sangre periférica en la giardiasis.

En los estudios realizados a nivel del intestino se ha detectado la continua presencia de polimorfonucleares eosinófilos en el exudado inflamatorio de pacientes con giardiasis, reacción que ha sido relacionada con la posible existencia de sustancias nocivas durante la infestación intestinal por *Giardias*.¹⁸ Reacciones similares se han informado en la infestación intestinal por nemátodos.¹⁹ Estas observaciones señalan que existe una respuesta en el intestino del huésped contra el parásito; por estas razones consideramos que los estudios de los mecanismos de defensa que tiene el organismo contra la *Giardia* deben ser abordados localmente a nivel del intestino.

Agradecimientos

Quisiéramos agradecer la magnífica colaboración brindada a este trabajo por las compañeras técnicas Isabel Cristina Pérez y Mirta Zayas. También quisiéramos agradecer

la gran ayuda brindada por las enfermeras y secretarias de las salas de gastroenterología del hospital "Pedro Borrás" y de la sala de niños del hospital "Fructuoso Rodríguez".

SUMMARY

Vázquez, A. M. et al. *Yeast phagocytosis by polymorphonuclear neutrophil leukocytes in children with giardiasis*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

In giardiasis, specific and non specific defence mechanisms of the host against parasite have been studied. Within non specific defence mechanisms is phagocytosis, which comprises four interrelated phases: chemotaxis, opsonification, ingestion, and death. Phagocytosis of polymorphonuclear neutrophil leukocytes was studied by opsonified yeast ingestion test in 39 children with giardiasis and 17 healthy children. In children with giardiasis, phagocytic index was 1,87 and phagocytosis percentage was 68,4%. In healthy children, phagocytic index was 1,65 and phagocytosis percentage, 70,4%. There was not significant difference between both groups. It is suggested that studies of defence mechanisms possessed by organism against *Giardia* must be locally approached at gut level.

RÉSUMÉ

Vázquez, A. M. et al. *Phagocytose de levures par les polymorphonucléaires neutrophiles chez des enfants atteints de giardiase*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

Il a été étudié les mécanismes de défense spécifiques et non spécifiques de l'hôte contre le parasite dans la giardiase. Parmi les mécanismes de défense non spécifiques se trouve la phagocytose, qui comprend quatre phases qui sont en rapport: la chimiotaxie, l'opsonification, l'ingestion et la mort. Il est étudié la phagocytose des polymorphonucléaires neutrophiles au moyen de l'épreuve d'ingestion de levures opsonifiées, chez 39 enfants porteurs de giardiase et chez 17 enfants sains. Chez les enfants avec giardiase l'indice phagocytaire a été de 1,87 et le pourcentage de phagocytose de 68,4%. Chez les enfants sains l'indice phagocytaire a été de 1,65 et le pourcentage de phagocytose de 70,4%. Il n'y a pas eu de différence significative entre les deux groupes. L'on suggère que les études des mécanismes de défense que possède l'organisme contre *Giardia* doivent être envisagées localement au niveau de l'intestin.

BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, E. A.; E. L. Jarroll: Reviews and Commentary. Giardiasis. Am J Epidemiol, 1980.
2. Craun, G. F.: Proceedings of a Symposium. Waterborne Transmission of Giardiasis. EPA, Ohio, 1979. P. 127.
3. Nalk, S. R. et al.: Immunological studies in giardiasis. Ann Trop Med Parasitol 73: 291, 1979.
4. Ament, M. E.; C. E. Rubin: Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterology 62: 216, 1972.
5. Thompson, A.: Immunoglobulin bearing cells in giardiasis. J Clin Pathol 38: 292, 1977.
6. Gupta, J. P. et al.: Giardiasis in adults. Studies on jejunum and immunoglobulins. Acta Gastroenterol Belg XLII: 142, 1979.
7. Ridley, M. J.; D. S. Ridley. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. J Clin Pathol 29: 30, 1976.

8. *Roberts-Thompson, I. C.; G. F. Mitchell:* Giardiasis in mice. I. Prolonged infections in certain strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterology* 75: 42, 1978.
9. *Stevens, D. P.:* Proceedings of a Symposium. Waterborne Transmission of Giardiasis. EPA, Ohio, 1979. P. 82.
10. *McDonald, T. T.; A. Ferguson:* Small intestinal epithelial cell kinetics and protozoal infection in mice. *Gastroenterology* 74: 496, 1978.
11. *Stites, D. P.:* Basic and Clinical Immunology. 2nd. ed. LANGE Medical Publications, California, 1978. P. 375.
12. *Drutz, D. J.; J. Mills:* Basic and Clinical Immunology. 2nd. ed., LANGE Medical Publications, California, 1978. P. 217.
13. *García, C. A.; C. Silva:* Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con verografín. Reporte preliminar. *Rev CNIC* 10: 1, 1979.
14. *Rivero, I. et al.:* Fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* en el hombre, técnicas y características. *Rev Clin Esp* 148: 267, 1978.
15. *Stossel, T. P.; M. Taylor:* Manual of Clinical Immunology. Am Soc Microbiol, Washington, 1976. P. 148.
16. *Van Furth, R.; T. L. Van Zwent:* Handbook of Experimental Immunology. vol. 2, 2nd. ed. Blackwell Scientif. Publ., Oxford, 1973. P. 36.1
17. *Rossof, A. H.; C. A. Coltman:* The effect of lithium carbonate on the granulocyte phagocytic index. *Experientia* 32: 238, 1976.
18. *Takano, J.; J. H. Yardley:* Jejunal lesion in patients with giardiasis and malabsorption. An electron microscopic study. *Bull Johns Hopkins Hosp* 116: 413, 1965.
19. *Owen, R. et al.:* Proceedings of a Symposium. Waterborne Transmission of Giardiasis (Discussion). EPA, Ohio, 1979. P. 264.

Recibido: 5 de abril de 1982.

Aprobado: 26 de abril de 1982

Dra. *Ana Ma. Vázquez*
 Laboratorio de inmunología
 Instituto de Oncología
 29 y E, Vedado
 Ciudad de La Habana.