

## **Función fagocítica en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de niños con infecciones recurrentes**

Por:

Lic. RENE A. RIVERO JIMENEZ\*, Téc. LOURDES E. PALMA SALGADO\*\*,  
Dr. BENITO BERNAL CARRERO\*\*\* y Dr. JOSE MANUEL BALLESTER SANTOVENIA\*\*\*\*

Rivero Jiménez, R. A. y otros: *Función fagocítica en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de niños con infecciones recurrentes*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

Se realizan estudios de la capacidad fagocítica frente a *Candida albicans*, de la reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT) y de la adherencia en los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de 80 niños con infecciones recurrentes. Se comparan los resultados con un grupo control y se aprecia que el porcentaje de PMN reductores del NBT ( $5,36 \pm 5,3\%$ ) en los pacientes posee una diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) al compararlo con el control ( $8,4 \pm 4,0\%$ ), mientras que para el resto de las pruebas no hay diferencias significativas. En cuanto a los resultados individuales de los pacientes, se encuentran valores patológicos que explicarían la frecuencia de algunas infecciones. Se sugiere la necesidad de evaluar la función fagocítica desde otros parámetros y se comenta el hallazgo de una actividad metabólica oxidativa menos activa en estos pacientes según el resultado de la reducción intracelular del NBT.

### INTRODUCCION

Los pacientes con infecciones recurrentes generalmente presentan algún defecto inmunológico. Los avances de la inmunología en los últimos años han permitido diagnosticar varias entidades clínicas que se clasifican como inmunodeficiencias primarias y secundarias, y, como se conoce, tanto la inmunidad humoral como la mediada por células pueden estar afectadas. Como parte de los mecanismos de defensa celulares, el hospedero posee una población heterogénea de células fagocíticas: los granulocitos neutró-

---

\* Licenciado en microbiología, Master en inmunología. Departamento de Inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología. Ciudad de La Habana.

\*\* Técnico en microbiología. Departamento de inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología, Ciudad de La Habana.

\*\*\* Médico especialista de I grado en pediatría, Jefe de la Sección de inmunoclínica, departamento de inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología, Ciudad de La Habana.

\*\*\*\* Médico especialista de I grado en hematología, profesor titular del ISCM, investigador titular, jefe del departamento de inmunología, Ciudad de La Habana.

filos (GN) o leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), los monocitos, y los macrófagos hísticos; cuya función principal es ingerir partículas extrañas o indeseables y liberar al organismo de agentes patógenos que pudieran penetrarlo o de células muertas que se acumulan en determinados sitios de nuestra economía.

Los granulocitos neutrófilos (GN) son células altamente diferenciadas y especializadas en la función fagocítica, y la prueba de esta afirmación radica en que una disminución cuantitativa o una alteración cualitativa convierten al individuo en blanco del ataque de muchos agentes patógenos.<sup>1</sup>

El GN desempeña su función fagocítica en tres fases sucesivas; el quimiotaxismo o desplazamiento activo hacia el foco inflamatorio, para lo cual necesita adherirse al endotelio vascular; la ingestión o fagocitosis propiamente dicha; y la provocación de la muerte con degradación bacteriana que viene dada por los mecanismos bactericidas intracelulares.

El estudio de los pacientes con infecciones recurrentes debe incluir, por lo tanto, la evaluación de la función fagocítica de estas células, además de los estudios de la inmunidad mediada por los linfocitos y de la inmunidad humoral; pues así podemos detectar defectos importantes que de otra manera escaparían al diagnóstico del laboratorio de inmunología.

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la actividad funcional de las células fagocíticas circulantes, en este caso de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de niños con infecciones a repetición, aplicando una serie de pruebas introducidas en nuestro laboratorio con este fin, que incluyen la determinación de la capacidad fagocítica de los PMN frente a *Candida albicans*, la reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT) y la adherencia granulocitaria evaluada mediante el porcentaje de granulocitos neutrófilos o PMN adherentes a la fibra de nylon.

#### MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 80 enfermos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 15 meses y los 12 años, afectados con infecciones recurrentes de diversa índole, de las cuales la más frecuente fue la bronconeumonía a repetición. El diagnóstico se efectuó en todos los casos teniendo en cuenta el examen clínico y la historia anterior del paciente, ya que en la mayoría de ellos no existieron estudios microbiológicos para identificar el o los agentes causales de las infecciones. La mayor parte de los enfermos tenían en el momento del estudio un número normal de PMN circulantes, y muy pocos presentaban la infección en el momento del estudio.

#### *Candida albicans*

Para los estudios fagocíticos se utilizó una cepa de *Candida albicans* aislada de un paciente. Ella mostró las características típicas de la *Candida albicans*,<sup>2,3</sup> incluyendo la formación de clamidosporas, la rápida filamentación en presencia de suero, la fermentación de la dextrosa y la maltosa con producción de ácido y gas, etc. Los cultivos "stock", se mantuvieron en

cuñas de agar de Sabouraud a temperatura ambiente y transferidos semanalmente.

Los microorganismos para la prueba se resuspendieron en 5 ml de solución amortiguada de fosfatos (PBS), y en estas condiciones las células de *Candida* se mostraron con un predominio de fase levaduriforme. Las células de *Candida albicans* se contaron en una cámara de Neubauer y se resuspendieron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a una concentración de  $10^7$  unidades formadoras de colonia (UFC) de *C. albicans*/ml.

#### *Aislamiento de los granulocitos neutrófilos (GN)*

Los GN de los pacientes y de los controles se han obtenido según el método de Weening y colaboradores<sup>4</sup> a partir de sangre periférica desfibrinada. La sangre se diluye 1:2 en PBS y se hace centrifugar sobre un gradiente de Ficoll-Telebrix (gravedad específica 1,077) para obtener un concentrado de hematíes y granulocitos, que se somete a hemólisis con una solución isotónica helada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en dos pasos, hasta la total destrucción de los hematíes contaminantes. A continuación se resuspenden en PBS-albúmina y se ajusta la concentración de GN a  $10^7$  células/ml. El porcentaje de GN ha sido siempre superior al 80% y las células contaminantes principalmente linfocitos. La viabilidad de los GN se determinó mediante el método de exclusión con azul tripano.<sup>5</sup> Esta suspensión leucocitaria se utiliza para la prueba de capacidad fagocítica frente a la *Candida albicans*.

#### *Determinación de la capacidad fagocítica*

La determinación de la capacidad fagocítica de los PMN frente a *C. Albicans* se realizó en presencia de una mezcla control de sueros del grupo AB, según una modificación de la técnica de Leijh y colaboradores:<sup>6</sup> la *C. albicans* se enfrenta a los PMN en un medio apropiado (HBSS-10% suero AB) durante un período de incubación a 37 grados C en baño de María a 60 minutos.

Como la *C. albicans* y los PMN no pueden separarse por centrifugación diferencial, se toman muestras a distintos intervalos (t-0', t-15' y t-60') y se realiza el conteo de todas las UFC de *Candida albicans* que se observan extracelularmente con respecto a los PMN, con el empleo de la cámara de Neubauer y el microscopio óptico. Los resultados se expresan en porcentaje de *C. albicans* extracelulares (no fagocitadas) contra tiempo de incubación, considerando el t-0' como el 100% de *C. albicans* extracelulares.

#### *Método citoquímico de evaluación de la reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT)*

La determinación de la reducción intracelular del NBT se realizó mediante una modificación del método citoquímico de Okamura y colaboradores,<sup>7</sup> después de incubar a 37 grados C en baño de María durante 15 minutos muestras de sangre periférica desfibrinada con una solución de glucosa al 0,2% y con una solución de NBT al 0,1% se hicieron extensiones de la mezcla y después de una contracoloración con Giemsa se determinó el por-

centaje de PMN reductores del NBT por presentar inclusiones de azul de formazán, según se aprecia el microscopio óptico.

#### *Determinación del porcentaje de PMN adherentes*

La evaluación del porcentaje de PMN adherentes se realizó mediante un método surgido de la modificación de las técnicas de Mac Gregor y colaboradores<sup>8</sup> y de Klempler y colaboradores,<sup>9</sup> pasando 1 ml de sangre periférica heparinizada (10 U/ml) a través de tres columnas que contienen 50 mg de fibra de nylon y calculando el total absoluto de PMN en la muestra original y en los filtrados (triplicados), para así calcular el porcentaje de PMN adheridos a la fibra de nylon.

#### *Cálculos estadísticos*

Los valores de capacidad fagocítica, reducción intracelular del NBT y porcentaje de PMN adherentes correspondientes a los pacientes y a los controles, se obtuvieron calculando la media aritmética y la desviación estándar. La comparación entre los resultados de ambos grupos para cada prueba de laboratorio se realizó aplicando el test de Student para series no apareadas, para un límite de confianza de  $p = 0,05$ . Los valores individuales de cada paciente se compararon con el rango normal establecido para el grupo control, que estaba constituido por donantes del banco de sangre, personal del laboratorio y niños sanos.

#### RESULTADOS

Como se aprecia en el cuadro, en los pacientes se encontró una media y una desviación estándar de  $52,87 \pm 21,8\%$  de UFC de *C. albicans* no fagocitadas a t-15' y de  $26 \pm 20,9\%$  a t-60' que al compararlos con los controles (para t-15':  $49,0 \pm 26,0\%$  y para t-60':  $21,0 \pm 16,0\%$ ) no arrojó diferencia estadísticamente significativa.

Por otra parte, el porcentaje de PMN reductores del azul de nitrotetrazolio (NBT) promedió  $5,36 \pm 5,3\%$  en los pacientes por  $8,4 \pm 4,0\%$  en los controles, con una diferencia estadísticamente significativa para  $p \leq 0,05$ . En cuanto a la adherencia de los PMN, ambos grupos poseen las siguientes cifras: pacientes,  $81,7 \pm 14,2\%$  de PMN adherentes, y controles,  $89,0 \pm 5,0\%$ ; la diferencia no es significativa.

Al finalizar los casos individualmente, hemos encontrado que de los 80 niños con infecciones recurrentes estudiados en cuanto a su capacidad fagocítica frente a *C. albicans*, 7 poseían un defecto marcado en esta función, pues sus valores a t-15' y t-60' (ambos) estaban totalmente fuera del rango normal; de igual forma, otros 7 pacientes poseían un defecto cinético, ya que al concluir el periodo de incubación sus valores de *C. albicans* no fagocitadas estaban por encima del rango normal; el resto de los casos no tenía alteraciones en esta prueba.

En cuanto a la reducción intracelular del NBT, en realidad se estudiaron 117 pacientes y, de ellos, 53 presentaron valores subnormales, y, en parti-

## CUADRO

RESULTADOS DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA, LA REDUCCION INTRACELULAR DEL NBT Y LA ADHERENCIA GRANULOCITARIA EN PACIENTES Y CONTROLES

Grupo	t-0'	Capacidad fagocítica a la <i>Candida albicans</i> <sup>1</sup>		Reducción del NBT <sup>2</sup>	% de PMN Adherentes <sup>3</sup>
		t-15'	t-60'		
		$\bar{x} \pm DS$	$\bar{x} \pm DS$	$\bar{x} \pm DS$	$\bar{x} \pm DS$
Pacientes	100%	52,87 $\pm$ 21,8%	26,0 $\pm$ 20,9%	5,36 $\pm$ 5,3%	81,7 $\pm$ 14,2%
			n : 80	n : 117	n : 66
Controles	100%	49,0 $\pm$ 26,0%	21,0 $\pm$ 16,0%	8,4 $\pm$ 4,0%	89,0 $\pm$ 5,0%
			n : 110	n : 71	n : 51
		NS	NS	p $\leq$ 0,05	NS

<sup>1</sup> % de *C. albicans* extracelulares (no fagocitadas).

<sup>2</sup> % de PMN reductores del NBT.

<sup>3</sup> % de PMN adherentes.

cular, 11 con una cifra de PMN reductores igual a 0% en esta técnica (sin estimulación de la fagocitosis); estos casos, con aparente metabolismo oxidativo deficiente, han sido objeto de otros estudios para descartar la enfermedad granulomatosa crónica y 2 de ellos se han diagnosticado con esta enfermedad por presentar también granulomas hepáticos y un defecto en la actividad microbicida intracelular.<sup>10</sup> Al evaluar la adherencia en los PMN de los pacientes, encontramos que un total de 28 enfermos presentaban valores por debajo del rango normal, de un total de 66 evaluados en este aspecto.

### DISCUSION

El estudio de los pacientes con infecciones recurrentes representa una importante fuente de conocimientos para el laboratorio de inmunología, pues en la práctica, la infección recurrente se ve asociada a la inmunodeficiencia tanto primaria como secundaria, aunque muchos casos no cumplan estrictamente los parámetros para su clasificación en una entidad u otra.

La mayoría de los casos estudiados por nuestro laboratorio han presentado como diagnóstico fundamental un defecto celular o humoral, pero como apreciamos en los resultados de este trabajo, también se han diagnosticado defectos en la función fagocítica del leucocito PMN.

Por presentarse una disminución significativa en la capacidad reductora del azul de nitrotetrazolio (NBT) en el grupo de pacientes con res-

pecto a los controles, podemos considerar que existe en el grupo un factor predisponente a las infecciones, sobre todo del tipo bacterianas y micóticas. El azul de nitrotetrazolio (NBT) es una sustancia *redox* que se utiliza como marcador intracelular de la actividad metabólica de los PMN, ya que en su forma reducida (NBT 2H) posee la propiedad liofílica de adosarse a las membranas de los fagocitos y teñirlas de azul de formazán, como consecuencia de una reacción *redox* donde intervienen las enzimas oxidadas dependientes del NADH y del NADPH.<sup>11</sup> Así, un metabolismo intracelular inactivo implicará una reducción subnormal del NBT, como se observa en este grupo de pacientes.

Este trabajo sugiere que es necesario profundizar en el estudio de los defectos funcionales en las células fagocíticas, por lo que nos planteamos incrementar la diversidad de pruebas que miden esta función y tratar de precisar de esta forma un diagnóstico certero, lo que permitiría los beneficios de un tratamiento más racional de estos casos.

#### SUMMARY

Rivero Jiménez, R. A. et al. *Phagocytic function on polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PNL) of children with recurrent infections.* Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

Studies are carried out on the phagocytic capacity in front *Candida albicans*, intracellular blue nitrotetrazolium (BNT) reduction and adherence at polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PNL) in 80 children with recurrent infections. Results are compared with a control group and it is appreciated that percentage of PNL reductors of BNT ( $5,36 \pm 5,3\%$ ) in patients has a significant statistically difference ( $p \leq 0,05$ ) when compared with the control group ( $8,4 \pm 4,0\%$ ) while for the rest of the tests there are not significant differences. Regarding individual results of patients, pathological values that should explain frequency of some infections are found. Need for assessing the phagocytic function from other parameters is suggested, and the finding of a less active oxidative metabolic activity in these patients according to result of BNT intracellular reduction is commented.

#### RÉSUMÉ

Rivero Jiménez, R. A. et al. *Fonction phagocytaire dans les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) chez des enfants présentant des infections récurrentes.* Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

Les auteurs font des études à propos de la capacité phagocytaire face à *Candida albicans*, de la réduction intracellulaire du bleu de nitrotétrazollum (NBT) et de l'adhérence dans les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) chez 80 enfants présentant des infections récurrentes. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus chez un groupe de contrôle et il est constaté que le pourcentage de PMN réducteurs du NBT ( $5,36 \pm 5,3\%$ ) chez les patients possède une différence statistique significative ( $p \leq 0,05$ ) lors de le comparer avec le groupe témoin ( $8,4 \pm 4,0\%$ ), alors que pour les autres épreuves il n'y a pas de différence significative. En ce qui concerne les résultats individuels des patients, il est rencontré des valeurs pathologiques qui pourraient expliquer la fréquence de certaines infections. Les auteurs suggèrent le besoin d'évaluer la fonction phagocytaire à partir d'autres paramètres et ils commentent la trouvaille d'une activité métabolique oxydative moins active chez ces patients d'après le résultat de la réduction intracellulaire du NBT.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rozman, C.; E. Feliú; E. Matutes; F. Cardellach; L. Berga; R. Fontarnau; J. L. Vives Carrons: Aspectos ultraestructurales del granulocito neutrófilo en relación a su función. *Sangre* 24: 538-655, 1979.
2. Ajello, L.; L. K. Georg; W. Kaplan; L. Kaufman: Laboratory Manual for Medical Mycology, Section E Pp. 1-24. Public Health Service Publication, No. 994. U. S. Government Printing Office. Washington, D. C., USA, 1966.
3. Mackenzie, D. W. R.: Laboratory investigations of Candida infections p. 26-43. En: H. I. Winner and R. Hurley (Ed.) Symposium on Candida infections E. G. S. Livingstone, Ltd., London, England, 1966.
4. Weening, R. S.; D. Roos; R. A. Loos: Oxygen consumption of phagocytizing cells in human leukocyte and granulocyte preparation: a comparative study. *J Lab Clin Med* 83: 570-576, 1974.
5. Van Furth, R.; T. L. Van Zwet: In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. Chap. 36, p. 36.4. En: D. M. Weir (Ed): Handbook of Experimental Immunology. 2nd. Ed., Blackwell Scientific Publications, London England, 1973.
6. Leijh, P. C. I.; M. T. Van den Barselear; R. Van Furth: Kinetics of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. *Infect Immunol* 17: 313-318, 1977.
7. Okamura, K. et al: An improved nitroblue-tetrazolium test and its correlation with toxic neutrophils. *Am J Clin Pathol* 32: 27-31, 1974.
8. Mac Gregor, R. R. Ph. J. Spagnuolo; A. I. Lentnek: Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone, and aspirin, measured with an assay system. *N Engl J Med* 291: 642-645, 1974.
9. Klempner, M. S.; I. Gallin: Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations. *Blood* 51, 659-669, 1978.
10. García Pérez, W.; M. N. Santos; R. Villaescusa; C. Cruz; R. Rivero; B. Bernal: Granulomatosis hepática secundaria a enfermedad granulomatosa crónica. Presentación de dos casos. Resúmenes III Jornada Interna, Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, 1981. P. 28.
11. Javier Manchón, G.: Exploración de los cambios metabólicos de los granulocitos durante la fagocitosis. *Sangre* 24; 751-758, 1979.

Recibido: 2 de septiembre de 1982.

Aprobado: 7 de octubre de 1982.

Lic. René A. Rivero Jiménez  
Instituto de Hematología e Inmunología  
Apartado 8070, Ciudad de La Habana 8  
Cuba.