

Comparación de dos métodos de cuantificación de la capacidad oxidativa de los neutrófilos

Comparison of two quantitation methods of the neutrophils oxidative capacity

Lic. Lourdes E. Palma-Salgado, DraC. Consuelo Macías-Abraham, Lic. Lázaro O del Valle-Pérez, Dra. Vianed Marsán-Suárez, Téc. Martha Ponce-Sandoval, Dra. Rosa María Lam-Díaz

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba

INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos tienen una función fundamental en los mecanismos de defensa contra los agentes microbianos.¹ Son las células que más rápidamente llegan al sitio de la infección en la respuesta inmune innata y tienen una actividad fundamental en la destrucción de los microorganismos.^{1,2} La destrucción de los patógenos por los neutrófilos es mediada por dos procesos fundamentales: la activación del sistema enzimático NADPH oxidasa que permite la producción de especies reactivas del oxígeno durante el fenómeno conocido como estallido respiratorio; y la formación del fagolisosoma con destrucción de los patógenos por acción de las enzimas lisosomales.^{1,2}

La actividad de la NADPH oxidasa fagocítica constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas del oxígeno en el organismo. Ella cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O₂ con la formación del radical superóxido (O₂[·]) y reacciones posteriores producen peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl) y otros productos microbicidas (OH, ¹O₂), ya sea en el

espacio extracelular o en la vacuola fagocítica, que son capaces de ejercer efectos tóxicos sobre los organismos ingeridos o microbios extracelulares.³

Se han identificado al menos 5 componentes de la oxidasa. Dos unidos a la membrana plasmática: gp91-*phox*(phagocyte oxidase) y p22-*phox*, que juntos forman el citocromo b558; y tres componentes citosólicos p47-*phox*, p67-*phox* y p40-*phox*.^{2,3-5}

La prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por fagocitos activados es el método universalmente aceptado para medir la capacidad oxidativa mediante la producción de anión superóxido.¹ La detección de defectos parciales requiere incluir métodos más sensibles, como la medición directa o por quimioluminiscencia de generación de esta especie reactiva del oxígeno.^{1,6} El método más actual y confiable es la cuantificación mediante la citometría de flujo previa estimulación de los neutrófilos con el **forbol 12 miristato 13 acetato** y el uso de la dihidrorodamina.^{1,6}

El NBT es una sal de tretrazolio soluble en agua, de color amarillo, con fórmula empírica CHNOCl y con peso molecular de 817,674 g/mol. El método se fundamenta en el hecho de que el NBT en presencia de O₂ es reducido a formazán, una sustancia de color azul-negro que se deposita como partículas insolubles dentro de las células. Este ensayo es una prueba indirecta utilizada para evaluar desórdenes de la fagocitosis y del sistema bactericida dependiente del oxígeno, y constituye la prueba esencial para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica, inmunodeficiencia congénita caracterizada por el defecto de la capacidad oxidativa.⁷

MÉTODOS

Características de la muestra

Se estudiaron 10 adultos supuestamente sanos (6 hombres y 4 mujeres) con un rango de edad entre 21 y 33 años, que acudieron como donantes al Departamento de Medicina Transfusional del Instituto de Hematología e Inmunología, y que no habían recibido medicamento en el mes anterior a la obtención de la muestra.

Aislamiento de los granulocitos neutrófilos (GN)

A partir de 10 mL de sangre heparinizada (15 UI/mL) se realizó la técnica descrita por Böyum⁸, que consiste básicamente en colocar la sangre diluida 1:1 en solución salina al 0,9 % sobre un gradiente de Ficoll-Paque Plus (densidad 1,077 g/mL) (GE Healthcare, Suecia), para obtener un concentrado de hematíes y de GN al que se le realizó hemólisis 2 veces con una solución isotónica de NH₄Cl a 4 °C. Los GN se resuspendieron en solución salina al 0,9 % y se ajustaron a 1x10⁷ células /mL.

El porcentaje de GN fue siempre superior al 80 % y las células contaminantes fueron linfocitos. La viabilidad de los GN se determinó por el método de exclusión del tripán azul.

Obtención del suero

Se extrajeron 5 mL de sangre por punción venosa, que se dejó coagular a temperatura ambiente para su posterior centrifugación y obtención del suero.

*Preparación de la *Candida albicans**

Se empleó una cepa cultivada en medio de agar Saboureaud que fue lavada 2 veces y resuspendida en PBS; se contaron en cámara de Neubauer y se ajustaron a 1 x 10^7 cándidas/mL.

Medición de la opsonofagocitosis

La fagocitosis fue estudiada mediante una modificación del método de *Leijhi* y col⁹. Los GN ya aislados y ajustados se enfrentaron a las *Candidas albicans* previamente opsonizadas con el suero en una proporción de 0,5 mL GN + 0,5 mL de *Candidas albicans* + 0,5 mL de suero para el conteo de cándidas extracelulares no fagocitadas en los tiempos 0, 15 y 60 minutos. Las muestras fueron adicionadas a 0,3 mL de solución Turk's y contadas al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron en porcentaje de *Candidas albicansextracelulares* (no fagocitadas) para cada período de incubación. Se consideró el tiempo 0 como el valor equivalente al 100 % de *Candida albicans* no fagocitadas.

Preparación de la solución de NBT

La solución de NBT (NBT Sigma- Aldrich, Reino Unido) se ajustó a una concentración de 2×10^{-3} con bufferfosfato, a un pH de 7,2. Por ser una solución fotosensible, su preparación y utilización fue protegida de la luz. Los neutrófilos fueron ajustados a 5×10^6 /mL y las *Candidas albicans* a 4×10^6 /mL.

Método de NBT en láminas

A cada individuo se le extrajeron 4 mL de sangre heparinizada. Se incubaron en tubos independientes: 1 mL de solución de NBT al 0,1 % + 1 mL de glucosa al 0,2 %, a 37 °C durante 5 min. Al concluir este tiempo, en un tubo cónico se depositaron: 100 mL de la muestra anterior + 50 mL de la solución de NBT al 1×10^{-3} + 50 mL de solución de glucosa, que se incubó a igual temperatura por 15 min, con agitación a intervalos de 5 min. Posteriormente se tomó una gota de sangre y se montó una lámina portaobjeto, se fijó con etanol absoluto y se coloreó con Giemsa. Se contaron al microscopio 100 células sin inclusiones citoplasmáticas formazán positivas (inclusiones azul oscuro o negriscas) y con estas, y se determinó el porcentaje de reducción de NBT ¹⁰.

Método de NBT estimulado en cámara de Neubauer

Se incubaron previamente 50 mL de la suspensión de *Candidas albicans* con 20 mL de suero, como fuente de opsoninas, durante 5 min a 37°C y posteriormente se le añadió a la mezcla anterior, 100 mL del NBT que se mantuvo en iguales condiciones durante 30 min. Finalmente, se cuantificó el número de células formazán positivas (correspondiente a células con precipitados citoplasmáticas de color negrusco) por microscopía óptica ¹¹.

Análisis estadístico

A los niveles de la reducción de NBT obtenidos por ambos métodos en los 10 individuos sanos, se les calculó la mediana ($n = 10$) las que se compararon entre ambos grupos (NBT por método de lámina y estimulado) mediante la prueba no paramétrica U de Mann- Whitney con un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

Bioética

A los donantes se les explicó el objetivo del estudio, los posibles beneficios derivados de los resultados y la ausencia de riesgos asociados. Todos dieron su consentimiento informado para participar en el estudio.

RESULTADOS

Los niveles del índice opsonofagocítico en los donantes estudiados mostraron valores dentro del rango de referencia normal para los tiempos de 15 y 60 min. Se observó que en los 10 individuos estudiados la reducción del NBT por el método de lámina y estimulado fue normal. ([tabla](#)).

Los valores de la capacidad oxidativa de los neutrófilos por el método estimulado fueron mayores que los obtenidos por el método convencional en lámina, y se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$) ([tabla](#)).

DISCUSIÓN

Los valores normales del índice opsonofagocítico a los 15 y 60 min permiten corroborar la presencia de niveles adecuados de opsoninas séricas que favorecen los niveles alcanzados en la reducción del NBT y la interpretación de los resultados.

La estimulación previa de los neutrófilos con la cándida extracelular opsonizada por la presencia de inmunoglobulinas y componentes del complemento presentes en el suero autólogo, favorece el proceso de ingestión y destrucción de microorganismos¹². La estimulación del fagocito por unión de microorganismos opsonizados a receptores de la superficie celular facilita el ensamblaje del complejo enzimático activo y la inducción del estallido respiratorio en los neutrófilos.³ El aumento de los niveles de la capacidad oxidativa de estas células cuantificado mediante la técnica del NBT estimulado, en relación con el método convencional, corrobora la acción estimuladora de los microorganismos opsonizados en la activación del metabolismo oxidativo y la función de la *Candida albicans* como agente inductor de la fagocitosis en similares condiciones experimentales.³

En el método en lámina (convencional), el neutrófilo se encuentra en reposo y los componentes de la NADPH oxidasa se encuentran en diferentes compartimentos de la célula, lo que evita o no favorece su activación,³ por lo que la introducción de este método con estimulación celular previa en laboratorios donde aun no se encuentra disponible la aplicación de la citometría de flujo, resulta de mayor confiabilidad para el estudio del estallido respiratorio o capacidad oxidativa en enfermos con sospecha de

inmunodeficiencias primarias por trastornos primarios de la función fagocítica y en el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica.⁷

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cornejo M, López JA, Navarro S, García D, Patiño PJ. Caracterización clínico - molecular de la enfermedad granulomatosa crónica autosómica recesiva causada por déficit de p47-phox. Rev Med Chile. [revista en la Internet]. 2000 Mayo [citado 2011 Dic 26] ; 128(5): 490-8. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-9887200000500006&lng=es. doi: 10.4067/S0034-9887200000500006
2. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med. 2000 Jul;109(1):33-44.
3. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. Arch Biochem Biophys. 2002 Jan; 397(2): 342-4.
4. Leusen J, Verhoeven A, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. J Lab Clin Med. 1996 Nov;128(5): 461-76.
5. Clark R. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. J Infect Dis. 1999 Mar; 179 (Suppl 2): 309-17.
6. Qin Y, Lu M, Gong X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. Cell Biol International. 2008 Feb 32 (2): 224-8.
7. Cascales M. Estallido respiratorio de los fagocitos. Real Acad Nac Farm. 2005; 71(2): 378-9.
8. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation monuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation al 1g. Scand J Clin Lab Invest. 1968 (suppl 97);10:77-89.
9. Leijh PC, Van der B, Van Furth R. Kinetic of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. Infect Immunol. 1977 Aug; 17(2):316-7.
10. Rivero RA, Palma LE, Ballester JM. Valores normales para la técnica de reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT) en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos humanos. Rev Cubana Med 1983 Ene-Feb; 22(1):24-32.
11. Stelzner A. Phagozytose. Em Friemel. Immunologische Arbeit methoden 3ed. Jena: Veb Gustav Fischer.1984.p.252-81.

12. Expósito G, García C, Valdés del Pozo Z. Estudio de la reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los leucocitos polimorfonucleares de pacientes con cáncer de mama. Rev Cubana Invest Biomed. 1989 Ene-Ago;8(1-2): 32-45.

Recibido: Mayo 23, 2012

Aceptado: Diciembre 27, 2012

Lic. Lourdes E Palma-Salgado.

Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334.

Email: rchematologia@infomed.sld.cu Website: www.sld.cu/sitios/ihi