



Actividad Fagocítica de Leucocitos Polimorfonucleares de Mujeres Embarazadas

FERNANDO M. GUERRA-INFANTE,¹ IRMA ESTRADA-CARLOS² Y MARCELA LÓPEZ-HURTADO²

Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Prol. Carpio y Plan de Ayala Col. Santo Tomás, México, D. F., C. P. 11340, México. Teléfono: (5) 729 63 00 Ext. 62380 Fax: (5) 729 62 07.¹ Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales # 800 Col. Lomas de Virreyes, México. D. F. C. P. 11000, México. Teléfono: 520-99-00 Ext. 261 Fax : 520-00-34.²

* Autor para la correspondencia: E-mail: fguerrai@main.mailer.conacyt.mx

ABSTRACT. Cellular and humoral immunity are depressed during pregnancy, for this reason the non-specific immunity mediated by polymorphonuclear leukocytes plays an important role in the defense against bacterial infections. The objective of this study was evaluate the phagocytosis, phagocytic index (particles ingested average by cell) and nitroblue tetrazolium reduction (NBT) in three trimesters of pregnancy. The phagocytosis and rNBT assays were carried out by means of adherence on surface of the glass. The resulted showed that phagocytosis, phagocytic index and NBT were normal in two first trimesters of pregnancy compared with nonpregnant women group. However, phagocytosis and phagocytic index were significantly decrease ($p < 0.05$) in the third trimester pregnancy. This phagocytosis deficiency possibly explains the increase of respiratory infections, diarrhea disease and bacteriuria. Several factors could be responsible of this non-specific immunity depressed during pregnancy. Further studies are necessary to define the biological significance of this immunosuppression.

Key Words: Pregnancy, phagocytosis, NBT reduction, immune response, phagocytic index polymorphonuclear leukocytes.

RESUMEN. Durante el embarazo hay una disminución de la respuesta inmunológica celular y humoral, por esta razón la inmunidad inespecífica mediada por leucocitos polimorfonucleares juega un papel importante en la defensa contra infecciones bacterianas. El objetivo del estudio fue evaluar la fagocitosis, el índice fagocítico (número de partículas ingeridas en promedio por célula) y la reducción de nitro azul de tetrazolio (rNBT) en diferentes trimestres de la gestación. Las técnicas de fagocitosis y rNBT se realizaron mediante adherencia a vidrio. Los resultados mostraron que el valor promedio de fagocitosis, índice fagocítico y rNBT en los dos primeros trimestres de la gestación se encontraron en niveles normales en comparación con el grupo de mujeres no embarazadas. Sin embargo, en el tercer trimestre de gestación la fagocitosis y el índice fagocítico mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$). Esta deficiencia en la fagocitosis posiblemente explique en parte el aumento de infecciones intestinales, respiratorias y genitourinarias que ocurren durante este periodo. Varios factores pueden ser los responsables para una disminución en la respuesta inmunológica inespecífica durante el embarazo. Un mayor número de estudios se requieren para definir el significado biológico de esta inmunosupresión.

Palabras clave embarazo, fagocitosis, reducción de NBT, índice fagocítico, leucocitos, polimorfonucleares.

INTRODUCCION

Durante el embarazo ocurren cambios hormonales, nutricios e inmunológicos. En este periodo se ha descrito un aumento en infecciones genitourinarias, gastrointestinales y respiratorias,⁵ posiblemente por una deficiencia en la respuesta inmunológica celular. Esta deficiencia celular durante el embarazo^{17,19} posiblemente radique en que el tejido fetoplacentario espontáneamente secreta citocinas del tipo de células Th2 (interleucinas 4, 5 y 10), las cuales disminuyen la actividad de células T. Debido a la deficiencia en la respuesta inmune celular,^{5,17} los mecanismos inespecíficos de la respuesta inmunológica juegan un papel importante

en la protección contra diversos patógenos intracelulares y extracelulares. La fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (LPMN) es un mecanismo inespecífico de defensa que durante el embarazo se ha descrito que puede estar aumentada, disminuida o normal,^{3,4,8,12-14,18} por lo que aún existen controversias si esta actividad por parte de los LPMN se ve alterada durante el embarazo. Además se ha informado que algunos mecanismos como adherencia, ingesta y mecanismos bactericidas dependientes e independientes de oxígeno también se encuentran alterados durante esta etapa.^{8,9,15} El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad fagocítica, el índice fagocítico y la reducción de NBT de los LPMN en diferentes etapas de la gestación me-



dante la técnica de adherencia en vidrio. Debido a que durante el embarazo existen diversos factores que pueden afectar la respuesta inmune inespecífica, se decidió estudiar mujeres embarazadas que mostraran un buen estado nutricional y que además no presentaran infecciones durante la gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. Es un estudio de casos y controles que se realizó entre junio y diciembre de 1996. Durante este periodo se invitó a participar a todas aquellas mujeres embarazadas que ingresaron a la clínica de control prenatal del Instituto Nacional de Perinatología, México. Los criterios de no inclusión fueron: mujeres que no desearon participar en el estudio, mujeres con cardiopatías, con enfermedades de la colágena, mujeres que estuvieran recibiendo esteroides, inmunosupresores o inmunomoduladores, mujeres que presentaran enfermedades metabólicas, inmunológicas o infecciones severas, mujeres que mostraran niveles bajos de hemoglobina, hematocrito y albúmina o que recibieran suplementos alimenticios como sulfato ferroso o vitaminas.

Se consideraron como indicativos de un buen estado nutricional cuando los valores de hemoglobina, hematocrito y albúmina fueron de ≥ 12.5 mg/dl, $\geq 40\%$ y ≥ 4 g/dl respectivamente.² Por otro lado, las mujeres embarazadas se agruparon de acuerdo a su periodo gestacional en: 1º trimestre, cuando estas fueron de 8 a 12 semanas de gestación; 2º trimestre, cuando estas fueron mayor a la semana 12 y menor o igual a la semana 24 de gestación y por último, 3º trimestre, cuando fueron mayores de la semana 24 y menor o igual a la semana 36 de embarazo. Como grupo control fueron mujeres no embarazadas de edades entre 23 y 41 años de edad, trabajadoras y estudiantes de esta institución. **Obtención de la muestra.** Se obtuvieron tres mililitros de sangre periférica sin anticoagulante en ambos grupos, los cuales fueron usados para la técnica de fagocitosis y reducción de nitro azul de tetrazolio.

Técnica de fagocitosis y reducción de nitro azul de tetrazolio (rNBT). La técnica se realizó de acuerdo a un trabajo previo,⁷ pero con ciertas modificaciones. Tres mililitros de sangre fueron distribuidos en seis cubreobjetos previamente lavados y desengrasados. Los cubreobjetos con la muestra de sangre fueron incubados en una cámara húmeda durante una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, para permitir la adherencia de los leucocitos polimorfonucleares. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron exhaustivamente con 5 ml de solución salina amortiguadora para la eliminación del coágulo y de eritrocitos.

Los cubreobjetos fueron separados en dos grupos, a ambos grupos se les adicionó un ml de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de 1×10^7 UFC/ml y un mililitro de medio mínimo esencial (Sigma Co.) suplementado con suero fetal de ternera (GIBCO) al 5%. A un grupo de cubreobjetos se le adicionó un mililitro más de

medio mínimo esencial (técnica de fagocitosis), mientras que al otro grupo se le adicionó un mililitro del colorante de nitro azul de tetrazolio (Sigma Co) al 0.1% en solución salina 0.85% (rNBT). Los cubreobjetos fueron incubados durante una hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.⁷

Pasado el tiempo de incubación, los cubreobjetos fueron lavados tres veces con 5 ml de solución salina amortiguadora. Los cubreobjetos de la técnica de fagocitosis fueron teñidos con el colorante de Giemsa por 5 min, mientras que los cubreobjetos de rNBT se tñieron con safranina al 1% en agua durante 5 min.

La fagocitosis se evaluó como el número de células que ingerieron partículas en un recuento de 100 células. El índice fagocítico se determinó como el número promedio de partículas ingeridas por leucocito polimorfonuclear de un total de 100 células que endocitaron partículas. La rNBT se determinó como el número de células que redujeron el colorante de nitro azul de tetrazolio en un recuento de 100 células que endocitaron partículas. Cada muestra se analizó por duplicado.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se determinaron las medidas de tendencia central (media, mediana, desviación estándar y error estándar) y la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney.¹⁰

RESULTADOS

Actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares durante el embarazo. Setenta y dos mujeres participaron en el estudio, 15 no embarazadas (grupo control) y 57 embarazadas. La edad promedio de las mujeres no embarazadas fue de 32 ± 9 años y de las embarazadas fue de 28 ± 10 , a cada una de ellas se les determinó la fagocitosis, el índice fagocítico y la rNBT. Las medidas de tendencia central se muestran en la tabla 1. El análisis estadístico demostró que el valor promedio de la fagocitosis y de la rNBT fueron mayores en el grupo de mujeres no embarazadas (grupo control), sin embargo estos valores no fueron significativos en comparación con las mujeres embarazadas. En cuanto al valor promedio del índice fagocítico tanto de mujeres embarazadas como no embarazadas éste fue prácticamente idéntico (3.3 ± 1.0 y 3.2 ± 0.8 , respectivamente) por lo que no hubo diferencia en la estadística.

Actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares en diferentes trimestres de gestación. Las mujeres embarazadas (57) de este estudio se agruparon de acuerdo a sus semanas de gestación en 1º, 2º y 3º trimestre, a cada una de ellas se les determinó la fagocitosis, el índice fagocítico y la rNBT. La distribución de sus valores en los tres parámetros estudiados fueron normales. Las medidas de tendencia central se muestran en la tabla 2. El análisis estadístico mostró que el valor promedio de la fagocitosis disminuye conforme aumentan las semanas de gestación, siendo la disminución más importante en el 3º trimestre de embarazo ($p < 0.05$). Con respecto al índice fagocítico, los

Tabla 1. Medidas de tendencia central de la capacidad fagocítica de los LPMN de mujeres embarazadas y no embarazadas.

	No embarazadas			Embarazadas		
	FAGOCITOSIS ¹ (%)	I. F. ²	rNBT ³ (%)	FAGOCITOSIS (%)	I.F.	rNBT (%)
n	15	15	15	57	57	57
$\bar{X}$	56.7	3.2	95.4	48.5	3.3	92
d. e.	7.6	0.8	4.8	15.7	1.0	6.7
e. e.	2.0	0.2	1.2	2.0	0.1	0.9
mediana	57	3.9	97.5	47.5	3.3	94
mínimo	40	1.4	81	20	1.4	75
máximo	68	5.5	95	79	6.9	100

n, número de datos; $\bar{X}$ y d. e., media y desviación estándar respectivamente; e.e., error estándar.

* diferencia significativa $p < 0.05$, Prueba de U Mann-Whitney.

¹ Número de células que mostraron actividad fagocítica de un total de 100 células.

² Índice fagocítico, número promedio de partículas ingeridas por célula.

³ Número de células que mostraron la reducción de nitroazul de tetrazolio de un total de 100 células.

LPMN de mujeres del 3^{er} trimestre de gestación mostraron una menor ingestión de partículas la cual fue significativa ($p < 0.05$) en comparación con las mujeres del 1^o y 2^o trimestre de gestación. En cuanto a la rNBT, no se observó diferencia significativa en los tres trimestres de gestación estudiados (tabla 2), lo cual sugiere que los mecanismos oxidativos durante el embarazo no se encuentran afectados.

DISCUSION

Las mujeres embarazadas muestran una mayor susceptibilidad a infecciones genitourinarias, respiratorias e intestinales,⁵ lo que puede ser un reflejo de una respuesta inmunológica disminuida o deficiente. De hecho, el perfil inmunológico en la mujer embarazada es del tipo de células Th2,^{17,19} por lo que la respuesta inmunológica celular se encuentra inactiva o disminuida, debido a la presencia de IL-10. De esta manera la fagocitosis mediada por leucocitos polimorfonucleares juega un papel importante en la defensa contra diferentes infecciones, sin embargo, durante el embarazo ha sido descrito que la actividad fagocítica de estas células se encuentra aumentada, disminuida o normal^{13,4,8,12-14,18} sin concluir si ésta se ve afectada o no por el embarazo. En este estudio se demostró que la fagocitosis de las mujeres gestantes fue normal en comparación con la fagocitosis de mujeres no embarazadas, sin embargo, el análisis de este parámetro en los diferentes trimestres de la gestación, mostró que durante el 3^{er} trimestre hubo una disminución significativa ($p < 0.05$) en esta actividad.

Diversas investigaciones sugieren que la disminución en la fagocitosis se debe a la presencia de factores séricos

que pueden alterar la capacidad fagocítica de los LPMN.^{4,5} De manera similar, se ha descrito que la IL-10 producida durante el embarazo puede provocar que los macrófagos y LPMN tengan una menor producción de TNF- α y una menor actividad en el procesamiento de antígeno. Otras alteraciones de los LPMN que han sido descritos que ocurren durante el embarazo son: neutrofilia, incremento de los niveles de fosfatasa alcalina, incremento en la tinción granular y reducción en los niveles de mieloperoxidasa,^{4,5,8,9,15} aunque en este estudio no se evaluó alguno de estos factores para correlacionarlo con la actividad fagocítica es posible que la presencia de estos factores influya en la fagocitosis de los LPMN sobre todo entre las semanas 25 y 34 de embarazo las cuales se consideraron en este estudio como el grupo de mujeres en el 3^{er} trimestre de gestación.

Por otro lado, esta disminución de la fagocitosis durante el 3^{er} trimestre de gestación concuerda con los datos epidemiológicos de varias publicaciones que describen que el mayor número de infecciones ocurre durante esta etapa posiblemente como un reflejo de una respuesta inmunológica celular disminuida y por una menor capacidad fagocítica de los LPMN, o por un aumento de factores supresores como la IL-10. Otra observación en este estudio es que las mujeres embarazadas del 3^{er} trimestre además de tener una fagocitosis deficiente mostraron un menor número de partículas ingeridas (índice fagocítico) por parte de los LPMN ($p < 0.05$), lo que sugiere una afectación importante de estas células durante esta etapa de gestación.

Otro factor que puede alterar la respuesta inmune específica e inespecífica es el estado nutricional, ya que diversos estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado una relación entre la desnutrición, infección y respuesta inmu-



Tabla 2. Medidas de tendencia central de la capacidad fagocítica de los LPMN en tres trimestres de embarazo.

	16 SEMANAS			24 SEMANAS			34 SEMANAS		
	Fagocitosis ¹ (%)	IF ²	rNBT ³ (%)	Fagocitosis (%)	IF	rNBT (%)	Fagocitosis (%)	IF	RNBT (%)
n	19	19	19	25	24	24	14	14	14
X	53.9	3.6	91.3	49.2	3.5	91.7	41.6*	2.4*	93.8
d. e.	15.3	1.1	4.6	16	0.6	7.2	11.3	0.6	8.4
e. e.	3.5	0.3	1.1	3.2	0.12	1.4	3.0	0.2	2.3
mediana	56.0	3.9	91.0	47	3.5	95.0	44.5	2.7	97.5
mínimo	25	1.4	80	24	2.4	76.5	23	1.0	75
máximo	79	5.5	99	77	4.7	99.0	58	3.3	100

n, número de datos; X y d. e., media y desviación estándar respectivamente; e. e., error estándar.

* diferencia significativa $p < 0.05$, Prueba de U Mann-Whitney.

¹ Número de células que mostraron actividad fagocítica de un total de 100 células.

² Índice fagocítico, número promedio de partículas ingeridas por célula.

nológica^{1,11} por ejemplo, durante el embarazo hay una deficiencia de hierro, por lo que las mujeres gestantes tienen que ser suplementadas de manera artificial con este mineral. La deficiencia de hierro condiciona a alteraciones en la síntesis de DNA, proliferación tisular y función enzimática de las células, provocando de esta manera un déficit de la fagocitosis y de los mecanismos de muerte intracelular por parte de los LPMN.^{1,11}

La enzima que se ve afectada en los LPMN por la deficiencia de hierro es la mieloperoxidasa, la cual participa en los mecanismos oxidativos y en la generación de hipocloritos, sustancias con actividad bactericida.¹ Un indicador de la producción de estas sustancias oxidativas es la reducción de azul de tetrazolio (NBT), el cual al reducirse forma un precipitado color azul que es fácilmente observable en el microscopio de luz visible. En este estudio se evaluó el estado nutricional de las mujeres embarazadas de acuerdo a los datos de hemoglobina, hematocrito y albúmina, ninguna de ellas mostró deficiencia nutricional (datos no mostrados). Además los valores de reducción de NBT (rNBT) no se vieron alterados durante las diferentes semanas de gestación, lo que refleja que el embarazo *per se* no provoca una disminución en la rNBT y que posiblemente la disminución en los mecanismos oxidativos durante el embarazo se pueda explicar por el estado nutricional de la mujer embarazada, quizás por una deficiencia en hierro.^{6,16}

En conclusión, la fagocitosis y el índice fagocítico se ven disminuidos en el tercer trimestre de la gestación, posiblemente por el aumento de algunos factores como la IL-4 y/o IL-10, lo que explicaría el aumento de las infecciones

durante este periodo de embarazo.

Finalmente, cabe señalar que aunque una menor actividad fagocítica de los LPMN puede ser benéfica para el feto (ya que se disminuye la respuesta inflamatoria y previene el rechazo de injerto fetal, por una menor producción de citocinas como IL-1 y TNF, las cuales pueden activar a linfocitos Th1), una menor actividad fagocítica provoca el aumento de infecciones bacterianas que pueden estimular a la respuesta inmunológica mediada por células Th1, lo que llevaría a cabo la producción de citocinas como la IL-2, IFN- γ y TNF- α .^{5,17} y por lo tanto la inducción de abortos y/o ruptura prematura de membranas. Por todo esto, se requiere de un mayor número de estudios que permitan demostrar que factores son los responsables en el daño de la respuesta inmunológica inespecífica y el significado biológico que tiene esta disminución de la fagocitosis durante el embarazo.

REFERENCIAS

- Arredondo, J. L., and L. Santos. 1984. Infección y nutrición. *Infectología*. 11:304-316.
- Autores Varios. 1996. Resistencia no específica. Fagocitosis. p 29-32. En M. E. Castro (Ed) *Manual de Laboratorio de Inmunología*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, D. F. México.
- Barriga, C., A. B. Rodríguez and E. Ortega. 1994. Increased phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes during pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 57:43-46.

4. Björkstén, B., T. Söderström, M. G. Damber, B. Von Schoultz and T. Stigbrand. 1978. Polymorphonuclear leukocyte function during pregnancy. *Scand. J. Immunol.* 8:257-262.
5. Brabin, B. J. 1985. Epidemiology of infection in pregnancy. *Rev. Infect. Dis.* 7:579-603.
6. Casanueva, E., R. Valdés, R. Peña, F. Guerra-Infante and E. Gómez. 1994. Variaciones en la respuesta inmune y el estado nutricional en un grupo de mujeres embarazadas sanas. *Perinatol. Reprod. Hum.* 8:33-39.
7. Dawson-Saunders B. and R. G. Trapp. 1997. Estimación y Comparación de medidas. p 119-147. En B. Dawson-Saunders and R. G. Trapp (Ed). *Bioestadística Médica. Manual Moderno*, D. F. México.
8. El-Maallen, H. E. and J. Fletcher. 1980. Impaired neutrophils function and myeloperoxidase deficiency in pregnancy. *Br. J. Haematol.* 44:375-381
9. Guerci A. A. 1988. Examen físico de la sangre. p 106-119. En A. A. Guerci (Ed) *Laboratorio, Métodos de Análisis Clínicos y su Interpretación*. El Ateneo, Pedro García, República de Argentina.
10. Ishida, K., K. Tsukimori, T. Koyanagi, K. Akasawa, and H. Nakano. 1995. Is there a critical gestational age in neutrophils superoxide production activity?. *Blood.* 85:1331-1333.
11. McLaren, D. S. 1981. Nutritional interrelations. p 252-270. En D. S. McLaren (Ed) *Nutrition and its disorders*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
12. Mitchells, G. W. and A. J. Sbarra. 1965. The role of phagocyte in host-parasite interactions. II The phagocyte capabilities of leukocyte in pregnancy women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 91:755-762.
13. Mitchells, G. W., R. J. Ripley, R. J. Selvaraj and A. J. Sbarra. 1966. The role of phagocyte in host-parasite interactions. IV The phagocyte activity of leukocyte in pregnancy and its relationship to urinary tract infections. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 96:687-697.
14. Mitchells, G. W., A. A. Jacobs, V. Haddad, B. B. Paul, R. R. Strauss, and A. J. Sbarra. 1970. The role of phagocyte in host-parasite interactions. XXV Metabolic and bactericidal activities of leukocyte from pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 108:805-813
15. Okamura, K., Y. Yonemoto, Y. Mamazaki, H. Higashi-iwai, and A. Yajima. 1988. Nitroblue tetrazolium reduction by leukocytes in the cervix of pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159:417-420.
16. Peña, R., E. Casanueva, R. Valdés-Ramos, F. Guerra-Infante, E. Gómez and V. Ortiz. 1994. Valor predictivo de la deficiencia de hierro sobre la fagocitosis de mujeres embarazadas. *Perinatol. Reprod. Hum.* 8:29-32.
17. Raghupathy, R. 1997. Th1-type is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 18:478-482.
18. Shmagel K. V. 1994. Increase of nonspecific resistance of the body in normal pregnancy. *Akush. Ginekol. Mosk.* 6:18-21.
19. Wegmann, T. G., H. Lin, L. Guilbert and Mosmann T. R. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?. *Immunol. Today* 14:353-356.