

A. Rodríguez-Archilla¹
J.M. Ferrer²
C. Citoler²
M. Urquía³

Fagocitosis de polimorfonucleares neutrófilos frente a especies *Candida* en la estomatitis por prótesis. Métodos de evaluación de la capacidad fagocítica

1 Profesor Asociado de Medicina Bucal.
2 Alumno Interno.
3 Profesor Titular de Medicina Bucal.
Medicina Bucal.
Facultad de Odontología
Universidad de Granada.

Correspondencia:

Dr. Alberto Rodríguez Archilla
Avenida de América nº 12 -Ed. Chile- 5º C
18006 Granada

RESUMEN

Este trabajo expone las bases teóricas de la fagocitosis llevada a cabo por polimorfonucleares neutrófilos (PMNn) frente a especies *Candida* en pacientes con estomatitis por prótesis. Se resalta la importancia que tiene esta primera línea de defensa del huésped en la patogenia de esta patología y en el hecho de que la *Candida*, presente en un alto porcentaje de la población general; en un momento determinado, se convierte en patógena provocando la aparición de lesiones. Asimismo se describen las técnicas que podemos utilizar para el estudio de la capacidad fagocítica de los PMNn y resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación.

PALABRAS CLAVE

Candida; Fagocitosis; Estomatitis por prótesis; Polimorfonuclear neutrófilo.

ABSTRACT

Theoretical basis of phagocytosis -carry out by polymorphonuclear neutrophils (PMNn)- against Candida species in patients with denture stomatitis is presented. The significance of this first host defense barrier in the pathogenesis of this disease is emphasized. Moreover, the fact that Candida spp., present in high percentage of normal population, in a concrete moment, converts to pathogenous state provoking lesions, is exposed. Also, techniques that we can use to study the phagocytic capability of PMNn and previous results obtained by our investigation group are presented.

KEY WORDS

Candida; Denture stomatitis; Phagocytosis; Polimorphonuclear neutrophil.

32 INTRODUCCIÓN

La estomatitis por prótesis (EP) constituye uno de los procesos más frecuentes, con porcentajes que oscilan entre el 11 y el 77% según los diferentes autores, entre lo sujetos portadores de prótesis⁽¹⁾. A pesar de su gran prevalencia, la etiopatogenia de esta entidad sigue siendo controvertida. La mayoría de los autores coinciden en señalar que la EP posee una etiopatogenia multifactorial. No obstante, dentro del espectro de factores involucrados en el origen de este cuadro, es ampliamente aceptado, que la principal causa de esta entidad es la acción patógena de la *Candida albicans* que, por acción de las manosas presentes en la pared celular⁽²⁾, puede regular ciertos aspectos de la respuesta inmune frente a este microorganismo, entre ellos, la capacidad fagocítica.

La respuesta del sistema inmune frente a la infección por *Candida* en la EP, se estructura en dos niveles:

- El primer nivel lo constituye, la respuesta inmune inespecífica. En ella incluimos las dos primeras líneas de defensa: los factores inespecíficos y las células fagocitarias.
- El segundo nivel está constituido por la respuesta específica o adquirida, tanto humoral como celular.

Las primeras células fagocitarias en abandonar el torrente circulatorio son los leucocitos polimorfonucleares, principalmente los polimorfonucleares neutrófilos (PMNn). Posteriormente, pasan a los tejidos otras células con capacidad fagocítica: los monocitos, que se convierten en macrófagos tisulares y grandes linfocitos granulares denominados células *natural killer* (células NK).

El objetivo de este trabajo es exponer las distintas maneras que tenemos para cuantificar la capacidad fagocítica de polimorfonucleares neutrófilos (PMNn) frente a *Candidas* en pacientes con EP, ya que la eficacia de estas células fagocitarias constituye el primer factor que nos va a determinar la patogenicidad de la *Candida*. Al mismo tiempo expondremos los resultados obtenidos por nuestro grupo en alguna de estas técnicas.

Fagocitosis de polimorfonucleares neutrófilos frente a especies *candida* en la estomatitis por prótesis. Métodos de evaluación de la capacidad fagocítica

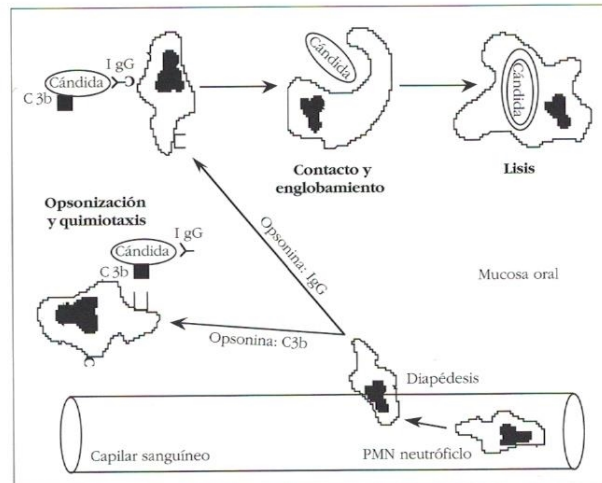


Figura 1. Esquema de las etapas de la fagocitosis.

De manera muy esquemática podemos distinguir en la fagocitosis cuatro etapas: opsonización, quimiotaxis, contacto y englobamiento y, lisis⁽³⁾ (Fig. 1).

OPSONIZACIÓN

Es una etapa imprescindible para el desarrollo de la fagocitosis. Hay una serie de sustancias denominadas opsoninas que transforman las propiedades superficiales del microorganismo contribuyendo a una fagocitosis óptima del mismo. Las principales opsoninas son inmunoglobulinas -sobre todo IgG- y componentes del Complemento -fundamentalmente las fracciones C3b, C3bi y C3d-. Los componentes de la pared celular de la *Candida*, provocan una activación del Complemento por su vía alternativa, dando origen a la generación de las subunidades de la fracción C3 anteriormente descritas (Fig. 2).

Estas opsoninas se unen a la pared de la *Candida albicans*, para ser reconocidas por las células fagocitarias e iniciar el proceso de fagocitosis. Además de las opsoninas, hay una serie de sustancias en el propio microorganismo que favorecen la fagocitosis, es el caso de los β -glucanos o lipopolisacáridos (LPS). Estudios realizados acerca del efecto de los LPS sobre

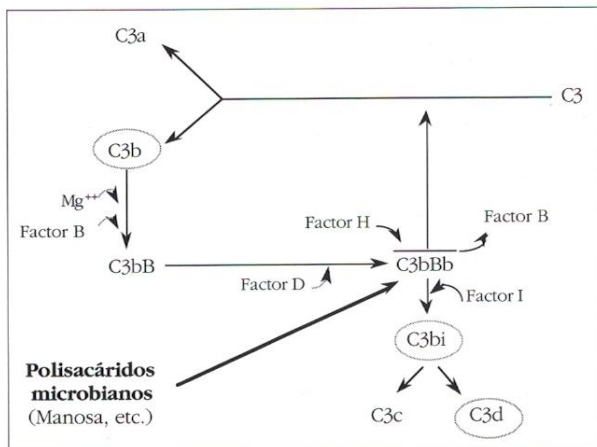


Figura 2. Activación de la vía alternativa del Complemento y generación de las subunidades de la fracción C3 que actúan como opsoninas.

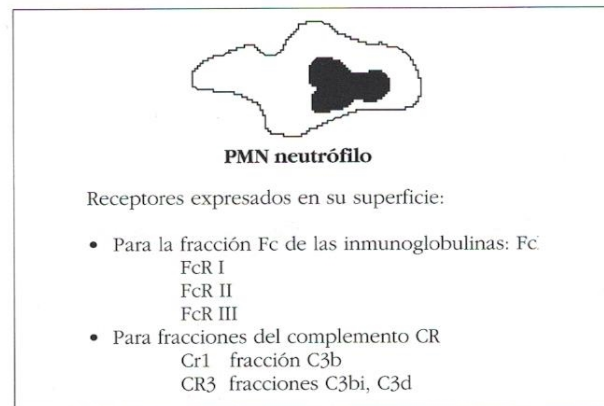


Figura 3. Receptores de superficie del PMN para las opsoninas.

los PMNn ponen de manifiesto una mayor inhibición del crecimiento de *Candida albicans*⁽⁴⁾.

Los PMNn poseen unos receptores específicos de superficie para estas opsoninas. Poseen receptores para la fracción Fc de la IgG (FcRs) y para la fracción C3 del Complemento (CRs).

Se han descrito tres FcRs distintos, denominados FcR-I, FcR-II y FcR-III y dos CRs, denominados CR1 y CR3 en la superficie de los PMNn. Los receptores CR1 reconocen partículas unidas a C3b, mientras que los CR3 reconocen las unidas a C3bi o C3d. Existe un tercer receptor para la fracción C3 del Complemento, denominado CR2 y expresado por los linfocitos B (Fig. 3).

El papel de estos receptores de superficie del PMNn es fundamental. Una alteración del receptor FcR de los PMNn, impide la opsonización y favorece la colonización de *Candida albicans*⁽⁵⁾. Por otro lado, algunos trabajos⁽⁶⁾ describen un efecto opsónico más efectivo por parte de las fracciones C3 del complemento que por las fracciones Fc de las Ig.

QUIMIOTAXIS

Tras esta optimización del microorganismo a fago-

citar, el siguiente paso, es la emigración de las células fagocitarias hacia el foco donde se encuentra el microorganismo, atraído por una serie de factores quimiotácticos. La quimiotaxis es la respuesta direccional del neutrófilo y otras células fagocitarias a favor o en contra de un gradiente de concentración de las sustancias quimiotácticas que los atraen. La quimiotaxis es positiva cuando los PMNn emigran de menor a mayor concentración. Es el caso de la masiva liberación de sustancias quimiotácticas en el foco infeccioso por parte de células dañadas, microorganismos y sus toxinas; esto, condiciona una gran concentración de las mismas y por consiguiente, el desplazamiento de los PMNn de menor a mayor concentración. Cuando el desplazamiento es de mayor a menor concentración, entonces hablamos de quimiotaxis negativa.

Debemos diferenciar entre «quimiotaxis» y «movilidad espontánea». Esta última es una propiedad inherente a todos los leucocitos y es un movimiento que acontece con igual probabilidad en todas las direcciones, sin estar sujeto a gradientes de concentración⁽⁷⁾.

Como acabamos de decir, la quimiotaxis es inducida por unos factores atrayentes o quimiotácticos que interactúan con los receptores de membrana de los PMNn y estimulan su movimiento hacia los tejidos. Estos factores quimiotácticos provienen del propio huésped y del microorganismo invasor.

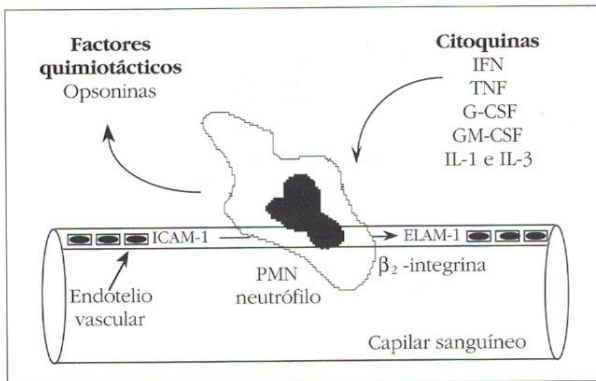


Figura 4. Mecanismos de adhesión de los PMN al endotelio vascular.

En este desplazamiento podemos distinguir dos etapas:

- la primera, donde el neutrófilo circulante se adhiere al endotelio vascular en el área inflamada,
- y la segunda, en la que el neutrófilo se extravasa hacia el tejido en respuesta a señales quimiotácticas generadas en el tejido dañado, mediante un proceso denominado diapédesis.

La adhesión de los PMN a las células endoteliales es facilitada por una serie de mecanismos (Fig. 4). Por un lado, un aumento en la expresión de moléculas adhesivas ICAM-1 y ELAM-1 que también favorecerán la posterior diapédesis. Por otro, la formación de factores quimiotácticos durante la inflamación produce un incremento en la expresión en la membrana de los PMN de ciertas moléculas de adhesión como la β_2 -integrina (CD18+)⁽⁸⁾.

La diapédesis es facilitada por las propias células endoteliales que generan factor activador plaquetario (PAF) e interleukina-8 (IL-8) y por los factores quimiotácticos que aumentan la concentración y promocionan la quimiotaxis.

El verdadero papel desempeñado por estas citocinas en la fagocitosis de *Candida albicans* en la EP no es bien conocido⁽⁹⁾. No obstante, la influencia de algunas de ellas, como el interferón (IFN), Factor de necrosis tumoral (TNF), Factores estimuladores de colonias de la serie granulocítica y/o monocítica (G-

CSF y GM-CSF) y las interleukinas, sobre todo IL-1 e IL-3, en la fagocitosis de *Candida albicans* en pacientes con candidiasis orales ha sido objeto de especial estudio por algunos autores, intentando determinar el grado de implicación real y la influencia de estas citocinas sobre la fagocitosis en la EP. La mayoría de los trabajos coinciden en señalar un incremento de la fagocitosis por la acción de estas citocinas: IL-1, TNF, INF⁽¹⁰⁻¹²⁾; G-CSF, GM-CSF⁽¹³⁻¹⁵⁾; IL-3⁽¹⁶⁾.

CONTACTO Y ENGLOBAMIENTO

Una vez producido el paso de la célula fagocítica al tejido, se produce el contacto entre ésta y el microorganismo opsonizado. Los PMN emiten pseudópodos que intentan envolver al microorganismo. Se produce una contracción de los microfilamentos de actina y miosina, y de los microtúbulos celulares. Estos pseudópodos se unen unos a otros para formar una vacuola limitada por una membrana, que engloba toda la partícula dentro del neutrófilo. Es la denominada «vacuola fagocítica» o «fagosoma».

Este proceso de formación del fagosoma es influido por una serie de factores como: las características superficiales intrínsecas del microorganismo, su carga superficial, el hecho de estar opsonizado y la presencia en el medio extracelular de ciertos iones como el Ca^{2+} , que favorece la formación de puentes de unión⁽¹⁷⁾. En cambio, la presencia de otros iones, por ejemplo metálicos (Pb, Zn Cd) parece tener un efecto inhibitorio de la capacidad fagocítica de los PMN⁽¹⁸⁾.

LISIS

Tras la formación del fagosoma, se inicia la destrucción del microorganismo ingerido gracias a la puesta en marcha de una serie de procesos y reacciones bioquímicas oxígeno-dependientes y oxígeno-independientes y a la liberación del contenido de los gránulos citoplasmáticos del neutrófilo.

La secreción de estos productos se realiza al interior del fagosoma, aunque el proceso se inicia antes del cierre total del mismo, por lo que algunos de estos productos son vertidos al espacio extracelular, pudiendo ejercer un efecto amplificador de la fagocitosis.

Los PMNn poseen dos tipos principales de gránulos citoplasmáticos: gránulos azurófilos y gránulos específicos; aunque algunos autores han descrito un tercer tipo denominado «gránulos terciarios»⁽¹⁹⁾.

Los gránulos primarios o azurófilos contienen diversas enzimas entre las que destacan las hidrolasas ácidas, proteasas neutras y la mieloperoxidasa. Por su parte, los gránulos secundarios o específicos contienen lactoferrina, colagenasa, β -glucuronidasa y otras enzimas. La lisozima se encuentra presente en ambos tipos de gránulos.

En los gránulos terciarios encontramos gelatinasa, aunque otros investigadores la sitúan en los gránulos específicos.

Como hemos dicho anteriormente, los PMNn disponen de dos mecanismos diferentes de destrucción: uno, mediado por reacciones bioquímicas oxígeno-independientes y el otro, por reacciones oxígeno-dependientes.

Mecanismos oxígeno-independientes

Al no depender del oxígeno, estos mecanismos pueden actuar en condiciones anaeróbicas. La destrucción es llevada a cabo por una batería de sustancias con diversos efectos microstáticos y/o microbicidas. Así, la lisozima disgrega los mucopéptidos de la pared celular de la *Candida albicans*; la lactoferrina que se une al hierro e impide su captación por parte del microorganismo; proteínas catiónicas (leukina, fagocitina) que dañan las membranas del microorganismo o diversas enzimas proteolíticas e hidrolíticas que digieren los microorganismos destruidos. Además, la formación de ácido láctico favorece un descenso del pH en el interior de la vacuola fagocítica, provocando un ambiente muy nocivo para el microorganismo.

Mecanismos oxígeno-dependientes

El inicio de la lisis, activa el metabolismo oxidativo celular de los PMNn⁽²⁰⁾. Ello trae consigo una serie de consecuencias: un aumento del consumo de oxígeno y una mayor utilización de la glucosa. Se activa la vía de las pentosas-fosfato dando como resultado la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de variedades oxígeno-reactivas, muy tóxicas, en el interior del fagosoma. Este cambio metabólico sufrido por las células fagocitarias se denomina «estallido respiratorio» (*respiratory burst*). Por otro lado, la activación de los PMNn, conduce a la liberación de ácido araquidónico. La fosfolipasa A2 es una enzima encargada de obtener ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos. El papel de la fosfolipasa en la estomatitis protética (EP) parece complejo y no es bien conocido. Samaranayake y cols.⁽²¹⁾ estudian la actividad fosfolipasa de distintas especies de *Candida* en pacientes con EP, encontrando que un 79% de las colonias de *Candida albicans* producían fosfolipasa, mientras que no se detectó producción en el resto de especies estudiadas. Esta enzima estimula a los diversos productos derivados del ácido araquidónico que son potentes promotores inflamatorios: ciclooxigenasa, lipooxigenasa, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrieno B₄, etc. y contribuyen a un aumento en la eficiencia de fagocitosis de *Candida albicans*^(22,23). En su metabolismo, la *Candida albicans* libera ácidos⁽²⁴⁾ lo que conlleva un descenso del pH. En pacientes con EP se ha observado un pH más bajo que en los controles⁽²⁵⁾. Este bajo pH trae consigo dos consecuencias principales: un efecto citotóxico directo sobre la mucosa oral y, un activación de la liberación de fosfolipasas y proteasas por parte del microorganismo, lo que contribuye a la perpetuación de la inflamación⁽²⁶⁾. También las células endoteliales vasculares en contacto íntimo con los PMNn sufren la acción citotóxica de los productos reactivos liberados apareciendo una serie de alteraciones de membrana que conducen a un aumento de la permeabilidad vascular y del edema intersticial⁽²⁷⁾.

El contacto de la *Candida albicans* con la mem-

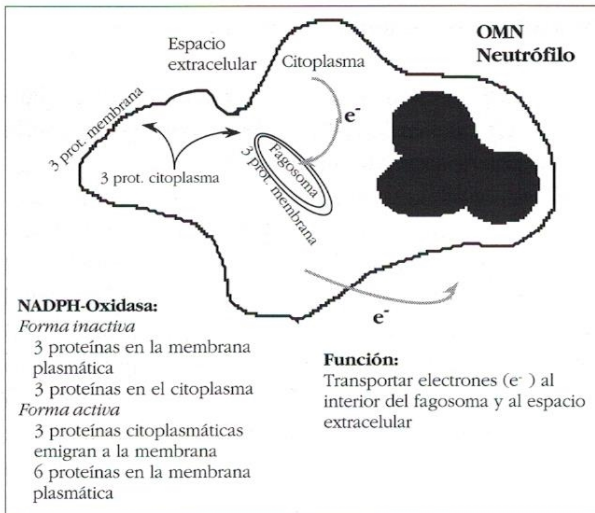
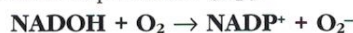


Figura 5. Esquema de la enzima: NADPH-oxidasa.

brana del neutrófilo es el responsable del desencadenamiento de todo el proceso. Como acabamos de decir, se produce una activación de la vía de las pentosas-fosfato, quedando como productos finales: un transportador de energía, el nicotín-amido-adenín-fosfato-dinucleótido reducido (NADPH) y una pentosa fosfato, la Ribosa-5-fosfato.

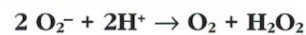
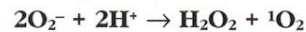
En la membrana plasmática del neutrófilo y en la del fagosoma hay una enzima, la NADPH-oxidasa que forma parte de un complejo sistema de transporte de electrones desde el citoplasma al interior del fagosoma y al espacio extracelular. La NADPH-oxidasa es una enzima bastante compleja. Está formada por 6 proteínas diferentes: tres de ellas, localizadas en la membrana del neutrófilo o del fagosoma; y las otras tres, en el citoplasma. Con esta configuración la enzima no es activa. Cuando se produce la activación del neutrófilo, las 3 proteínas citoplasmáticas se incorporan a las membranas, uniéndose a las 3 proteínas existentes en ellas, formando la enzima activa (Fig. 5).

La oxidación del NADPH, mediada por la NADPH-oxidasa, tiene como resultado la formación de NADP⁺ y anión superóxido (O₂⁻).

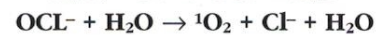


Por la acción de otras enzimas como la superóxi-

do-dismutasa o la catalasa, el superóxido se disgrega en una serie de productos de gran potencia microbicida «per se» como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el oxígeno único o «singlet» (¹O₂) y los radicales libres hidroxilo (•OH). Un radical libre es un átomo con un electrón no apareado en su órbita más externa. Se representa con un punto situado a la izquierda del símbolo). Esta configuración inestable lo convierte en una especie química altamente reactiva con un gran actividad energética y cinética.



En el interior del fagosoma, mediante una reacción denominada «halogenización» mediada por la mieloperoxidasa -principal constituyente de los gránulos azurófilos del neutrófilo- el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) reacciona con el ión cloro (Cl⁻) generándose ión hipoclorito (OCl⁻), oxígeno «singlet» (¹O₂) y agua.



El oxígeno «singlet» (¹O₂) es un estado de excitación electrónica del oxígeno que se forma cuando un electrón no apareado es promovido hacia una órbita de mayor energía con una inversión del «spin».

El OCl⁻ es una variedad muy tóxica con una alta capacidad microbicida, pero con una vida muy corta. Sin embargo, reacciona con aminas y forma N-cloraminas, compuestos más estables y con actividad microbicida⁽²⁸⁾.

MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA

Existen diversos métodos para el análisis funcional de la capacidad fagocítica de los PMNn en la estomatitis por prótesis^(29,30). La funcionalidad de estas células se puede estudiar midiendo:

- La movilidad de estas células,
- La capacidad fagocítica y
- La actividad metabólica.

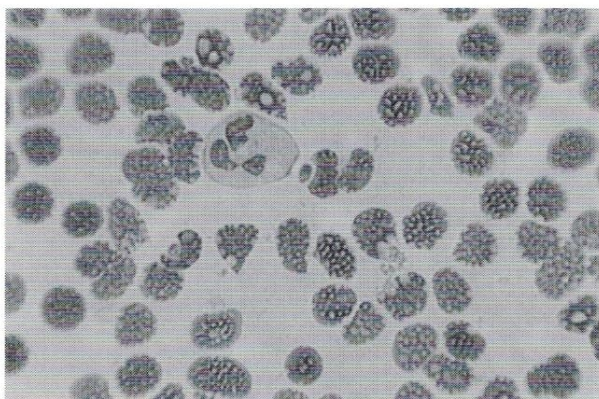


Figura 6. Detalle de un PMNn y una levadura de *Candida* (H&E 100x).

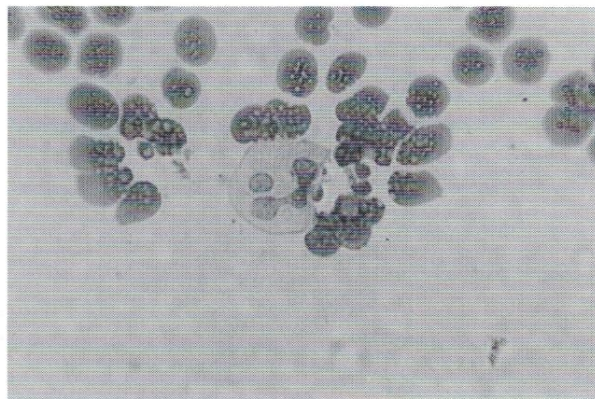


Figura 7. *Candida* fagocitada por el PMNn (H&E 100x).

Evaluación de la movilidad de los PMNn

Para estudiar la movilidad de los PMNn se puede utilizar una cámara de Boyden, donde añadimos una sustancia quimiotáctica que atrae a las células fagocitarias. Esta cámara se compone de dos compartimentos: superior (donde se colocan las células que estudiamos) e inferior (donde se colocan los factores quimiotácticos), separados por un filtro.

Evaluación de la capacidad fagocítica

Evaluación de la capacidad fagocítica de PMNn sanguíneos cultivados «in vitro» en presencia de diferentes especies de *Candida*

La capacidad fagocítica de PMNn se puede medir observando en el microscopio el porcentaje de células que han fagocitado partículas inertes (látex) o microorganismos, en nuestro caso, diferentes especies del género *Candida*.

El método que nosotros hemos utilizado para estudiar la capacidad fagocítica en pacientes con estomatitis por prótesis (EP), consiste básicamente en la valoración y cuantificación de la capacidad fagocítica de PMNn sanguíneos cuando se cultivan «in vitro» con distintas colonias del género *Candida*.

Se le extrae a cada sujeto 5 ml de sangre perifé-

rica que se dispensa en tubos de vidrio y se anticoagula con heparina (20 UI/ml). A continuación, con asa de siembra estéril, se añade la colonia de *Candidas* (200 µl, 2×10^6 células) a los tubos y tras la centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos, se incuba en estufa a 37°C durante 30 minutos⁽³¹⁾. Posteriormente, se realizan extensiones de la sangre en portaobjetos y se tiñen con la técnica clásica de Hematoxilina-Eosina. La lectura de los resultados se realiza con microscopio óptico, seleccionándose un campo de PMNn y calculándose el porcentaje de PMNn en los que se observaba la presencia de *Candidas* en el interior. En la figura 6 se observa un PMNn y una levadura de *Candida*. En la figura 7, la emisión de pseudópodos por parte del PMNn intentando englobar al microorganismo. En la figura 8 la *Candida* ingerida, en el interior de un fagosoma. En ocasiones, la cantidad de *Candida* fagocitada era tan grande que daba lugar a la destrucción de la célula fagocitaria (Fig. 9).

Medición de la capacidad fagocítica de PMNn utilizando un marcador radiactivo

La técnica consiste básicamente en medir la radiación emitida por un grupo de polimorfonucleares neutrófilos (PMNn) que fagocitan microorganismos (*Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*) marcados radioactivamente con Carbono-14 ^{14}C ⁽³²⁾.

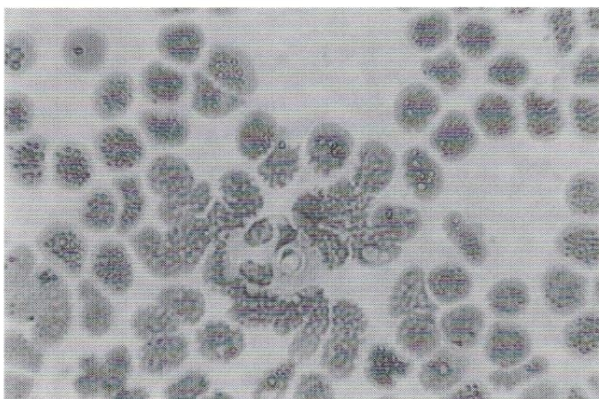


Figura 8. *Candida* en el interior del fagosoma formado en el citoplasma del PMNn (H&E 100x).

La medición de la capacidad fagocítica se realiza en distintos intervalos de tiempo. Se valorará a los 0, 5, 10, 20 y 30 minutos. Se rotulan tubos de vidrio con los distintos intervalos de tiempo.

En los tubos, previamente introducidos en hielo, destinados a la evaluación de la capacidad fagocítica en los distintos tiempos se dispensa:

- una concentración constante de PMNn ($2,5 \times 10^6$ células)
- 100 μ l de suero
- 300 μ l de solución salina balanceada de Hank (HBSS).

En los tubos usados como control se dispensa sólo el suero y el HBSS.

El tubo de los 0 minutos se deja en el hielo, mientras que el resto de tubos se incuban a 37°C durante 5 minutos.

A continuación se añade a todos los tubos, 100 μ l de microorganismo marcado y se incuban a 37°C los tiempos establecidos. Al final de cada tiempo de incubación se detiene el proceso de fagocitosis en los correspondientes tubos aplicando 2 ml de solución de parada «ice-cold».

Posteriormente, se centrifugan los tubos a 1000 rpm durante 5 minutos y se decantan cuidadosamente, eliminando el sobrenadante restante.

Se realizan dos lavados resuspendiendo en solución de parada «ice-cold» y a continuación se añaden

Fagocitosis de polimorfonucleares neutrófilos frente a especies *Candida* en la estomatitis por prótesis. Métodos de evaluación de la capacidad fagocítica

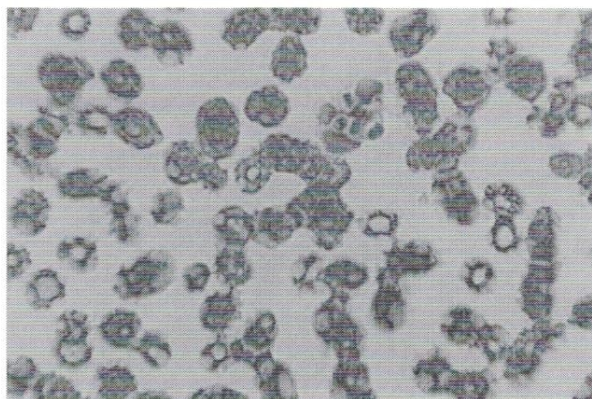


Figura 9. Destrucción de la célula fagocitaria por acción de la *Candida* (H&E 100x).

a los tubos 500 μ l de NaOH 0,5 N, incubándose en estufa a 56°C durante 3 horas.

Tras esta última incubación, se añaden 200 μ l de ácido acético al 3% para corregir el pH y se valoran los resultados en un contador-gamma midiéndose las cuentas por minuto (cpm).

El porcentaje de fagocitosis se calcula según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fagocitosis} = \frac{\text{muestras } ^{14}\text{C (cpm)} \times 1,2}{\text{control } ^{14}\text{C (cpm)}} \times 100$$

Los porcentajes normales de fagocitosis se sitúan entre el 45%-55% con una proporción microorganismos/PMNn de 10:1 y, entre el 8%-10% con una proporción de 500:1.

Análisis de la capacidad microbicida de los PMNn utilizando lisostafina

En esta técnica se enfrentan los microorganismos con los PMNn en presencia de suero en distintos intervalos de tiempo. Los microorganismos son destruidos con lisostafina, mientras que se hace estallar a los PMNn mediante lisis hipotónica, liberándose los microorganismos ingeridos. Estos microorganismos se cultivan en placas de petri y se hace un recuento de colonias⁽²⁸⁾.

Se prepara los tubos y placas de petri identificados según cada tiempo de incubación. Los tiempos de

incubación establecidos son de 20, 30, 60 y 90 minutos, respectivamente.

En los tubos de las muestras experimentales se dispensa una concentración constante de PMNn ($2,5 \times 10^6$ células), 100 μ l de suero y 300 μ l de solución salina balanceada de Hank (HBSS). En las muestras control libres de PMNn: 100 μ l de suero y 400 μ l de HBSS. Todos los tubos se incuban a 37°C durante 5 minutos.

A continuación se añaden 100 μ l de microorganismo a los tubos y se incuba a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, se añaden 10 μ l de lisostafina (10 U/ml) y se completa el tiempo de incubación que falta hasta completar los tiempos totales de incubación.

A continuación se obtienen alícuotas de los tubos de muestras experimentales y de los controles, y se vierten en tubos de lisis que contienen distintas cantidades de agua destilada según las diferentes concentraciones de las alícuotas previamente preparadas. Así para diluciones de 10^{-3} se añaden 1000 μ l de agua destilada. Posteriormente, se incuban los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Una vez realizada el estallido de los PMNn, se realizan cultivos en placas de petri con medio de Trypticase soy agar (TSA), se tapan las placas y se incuban a 37°C durante 24 h.

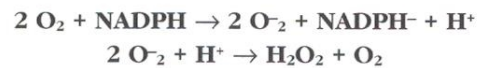
Se hace un recuento de las colonias y el porcentaje de células destruidas en cada intervalo de tiempo se calcula:

$$\% \text{ destrucción (tiempo determinado)} = 100 - \% \text{ supervivencia (t determinado)}$$

Los valores normales oscilan entre el 93% y el 98% en tiempos comprendidos entre 60 y 90 minutos.

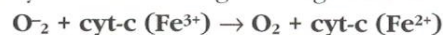
Evaluación de la actividad metabólica

La actividad metabólica de los PMNn se puede estudiar midiendo la cantidad de productos oxígeno-reactivos derivados de la combustión respiratoria que ocurre durante la fagocitosis. Se produce un aumento en el consumo de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un transportador de energía (NADPH) según las siguientes reacciones:



La cantidad de superóxido (O_2^-) puede determinarse gracias a dos pruebas principales: el Test de Nitroazul de Tetrazoilo (NBT) y la prueba del citocromo-C (Cyt-c) mediante las técnicas de: análisis cinético de la formación de superóxido y de evaluación de la producción de superóxido mediante la técnica de ruptura celular.

El oxígeno molecular (O_2) se oxida en presencia de superóxido (O_2^-) y de citocromo-C (cyt-c). A su vez, el cyt-c se reduce según la siguiente reacción:



Test de nitroazul de tetrazoilo (NBT)

Es una técnica sencilla que permite cuantificar la capacidad de los PMNn para generar productos reactivos del oxígeno⁽³³⁾. Uno de estos productos derivados es el superóxido (O_2^-). El superóxido junto con el NBT es reducido a formazán y oxígeno, según la siguiente reacción:



En portas de vidrio se dibuja un círculo con lápiz de cera o diamante. A continuación se añade una gota de estimulador (endotoxinas o fitohemaglutinina -PHA-) que se extiende a todo el círculo y se deja secar a temperatura ambiente.

Una vez secos los portas, se añade 1-2 gotas de sangre y se incuban los portas a 37°C durante 2 horas, para que se forme el coágulo. Posteriormente, desprendemos cuidadosamente el coágulo con una pinza y lavamos el porta abundantemente con PBS. A continuación se añaden al mismo 2 gotas de NBT y se de nuevo se incuba durante 20 minutos. Tras la incubación, lavamos los portas con PBS y fijamos con metanol al 100% durante 1 minuto.

Tras el fijado, lavamos brevemente en agua y teñimos en safranina durante 10 minutos; volvemos a lavar y secamos con aire. Con esta tinción se tiñen los núcleos y, aquellos PMNn que han sufrido combustión respiratoria por la fagocitosis (NBT+), también muestran una tinción granular citoplasmática de color negro-azulado.

40 Los resultados se evalúan en el microscopio óptico contando el porcentaje de células NBT+ en un campo de 200 PMNn.

Análisis cinético de la formación de superóxido

En esta técnica se cuantifica el grado de formación de superóxido (O_2^-) por parte de PMNn estimulados⁽³⁴⁾.

En los tubos de las muestras se mezclan 2 ml de solución buffer P₁-CM-G con 200 µl de suspensión de PMNn (2×10^6 células) y 20 µl de Citocromo-c 0,1 mM. En los tubos estándar se añaden 20 µl de P₁-CM-G y 20 µl de superóxido-dismutasa (SOD).

Posteriormente se añaden a todos los tubos 20 µl de PHA y se meten los tubos en el espectrofotómetro leyéndose los resultados a una longitud de onda de 550 nm durante un tiempo de 5-10 minutos. Se determina la tasa máxima de producción de superóxido a partir de la pendiente máxima (D), utilizando la absorbancia específica (Abs). (En este caso la del citocromo-c reducido $Abs=21,1/mM/cm$).

$$\text{Tasa máx.} = \frac{D \text{ (A/min)} \times \text{reacción vol. (ml)} \times 10^6 \text{ nmol/nmol}}{\text{Abs (A/nmol/l)} \times 1000 \text{ ml/l}}$$

El citocromo reducido provoca una reducción en la absorbancia que es fácilmente cuantificable espectrofotométricamente.

Evaluación de la producción de superóxido mediante la técnica de ruptura celular

Esta técnica es muy útil para el estudio de las fracciones proteicas específicas de la oxidasa y su mecanismo de acción en la activación enzimática o en la catalisis⁽³³⁾.

Se dispensa en tubos una suspensión de PMNn, PBS y glucosa ajustada a 10^8 células/ml. Se añade a los tubos diisopropilfluorofosfato (DFP) 2mM y se incuban en hielo durante 20 minutos.

A continuación se centrifugan los tubos a 1000 rpm durante 6 minutos a 4°C. Se resuspende en solución buffer de relajación, ajustándose de nuevo a 10^8 células/ml.

Se provoca la ruptura celular por presurización en aparato de cavitación a 350 psi de nitrógeno durante

20 minutos a 4°C. Una vez acabado el proceso, se libera la presión y se añade EGTA 1,25 mM.

Centrifugamos de nuevo a 1000 rpm durante 6 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante resultante y se centrifuga a alta velocidad, 54000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recoge de nuevo el sobrenadante resultante, se extrae la fracción membrana y se lava en 2-3 ml de solución buffer de relajación. Repetimos la centrifugación a alta velocidad y se resuspende en solución buffer de relajación ajustándose a una concentración de 3×10^8 células-equivalentes/ml.

Se preparan alícuotas para las muestras experimentales de 0,5 ml de volumen final compuestas por fracción citosol (10^7 células-equivalentes); 5 µl de citocromo-c 0,1 mM y solución buffer P₂M.

Las alícuotas para las muestras de referencia se componen de los mismos componentes que las anteriores, reemplazando 5 µl de P₂M con 5 µl de superóxido-dismutasa (SOD). A continuación se les añaden los agentes activadores: dodecil-sulfato sódico (SDS) y ácido araquidónico y se introduce en el espectrofotómetro durante 2 minutos a 37°C.

Se inicia la reacción añadiendo 5 µl de NADPH 16mM. Se anota la absorbancia de citocromo reducido a 550 nm durante varios minutos. La tasa máxima de producción de superóxido se calcula en función de la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa máx.} = \frac{D \text{ (A/min)} \times 0,5 \text{ ml} \times 10^6 \text{ nmol/nmol}}{\text{Abs (A/nmol/l)} \times 1000 \text{ ml/l}}$$

Análisis de la formación de peróxido de hidrógeno

Esta técnica permite cuantificar la generación de peróxido de hidrógeno por parte de PMNn estimulados⁽³⁵⁾.

En tubos de vidrio se mezclan 2 ml de solución buffer P₁CM-G, 20 µl de ácido homovanílico (HVA) 10 mM, 20 µl de peroxidasa y 20 µl de H₂O₂ a distintas concentraciones: 1 mM, 2, 4, 6, 8 y 10 mM.

Se incuban a 37°C durante 5 minutos. Se determina la fluorescencia de cada muestra estándar y se confecciona la curva estándar.

A continuación, en tubos de vidrio, se mezclan 2 ml de P₁CM-G, 20 µl de HVA 10 mM, 20 µl de peroxidasa, 20 µl de SOD, 20 µl de ácido sódica 10 mM y 200 µl de PMNn (2x10⁶ células).

Se colocan todos los tubos en el espectrofluorómetro y se agitan. Se equilibra la temperatura a 37°C durante 1-2 minutos.

Se añaden 20 µl de PHA y se sigue midiendo la fluorescencia, calculando el tiempo transcurrido y el máximo de formación de H₂O₂.

La tasa de producción de peróxido de hidrógeno se estima, extrapolando los valores de fluorescencia en función de la curva estándar previamente confeccionada, obteniendo así la cantidad máxima de peróxido de hidrógeno formado. (Para un tiempo de 1 minuto de fluorescencia, la concentración de H₂O₂ es 0,5 µM y para un tiempo de 2 minutos, 6,5 µM).

$$(0,5 \text{ o } 6,5) \mu\text{mol/l} \times 2 \text{ ml} \times 1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$$

Tasa máx. prod.=

$$\frac{\quad}{1000 \text{ ml/l}}$$

Durante cierto tiempo, nuestro grupo ha estado cuantificando la capacidad fagocítica de los PMNn en pacientes con EP. Se utilizó la técnica anteriormente descrita, observando la fagocitosis frente a diferentes

especies del género *Candida*. Se realizó un estudio en una población de 50 sujetos (32 pacientes con EP y 18 controles). Nuestros resultados muestran una clara disminución de la capacidad fagocítica en el grupo de pacientes con estomatitis por prótesis (X=17,46 ± 3,69) frente a la obtenida en los controles (X=31,11 ± 6,55). Sin embargo, la presencia o no de *Candida* en ambos grupos de población no modificaba la capacidad fagocítica de los PMNn (p> 0,05). De igual manera, la antigüedad de la prótesis determinaba la capacidad fagocítica en pacientes con prótesis de más de 5 años de antigüedad con respecto a los sujetos con prótesis de menos de 5 años, existiendo diferencias significativas entre ambas poblaciones (p< 0,05). Estos resultados ponen de manifiesto el interés que puede tener el estudio de esta primera fase de la respuesta inmune en la evolución y pronóstico de esta patología.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Srta. M^a Gertrudis Gómez Villaescusa, técnica de laboratorio, por su asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arendrof TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil* 1987; **14**: 216-27.
2. Tizard IR. Carbohydrates antigens. En: Roitt IM, Delves PJ. *Encyclopedia of immunology*. Vol I. Londres: Academic Press, 1992: 281-85.
3. Iniciación respuesta inmune. En: Peña Martínez J. *Inmunología*. 2ª ed. Madrid: Pirámide, 1988: 56-75.
4. Palma C, Cassone A, Serbousek D, Pearson CA, Djeu JY. Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1992; **60**: 4604-11.
5. Simms HH, D'Amico R, Monfils P, Burchard KW. Altered polymorphonuclear leukocyte Fc gamma R expression contributes to decreased candidicidal activity during intrabdominal sepsis. *J Lab Clin Med* 1991; **117**: 241-49.
6. Bjercknes R, Vindenes H, Laerum OD. Altered neutrophil functions in patients with large burns. *Blood Cells* 1990; **16**: 127-43.
7. Verhoef J. Phagocytosis. En: Roitt IM, Delves PJ. *Encyclopedia of immunology*. Vol. III. Londres: Academic Press, 1992: 1220-22.
8. Bendel CM, Hostetter MK. Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Identification the participating ligands and development of inhibitory peptides. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1840-49.
9. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; **48**: 61-69.
10. Jupin C, Parant M, Chedid L. Involvement of reactive oxygen metabolites in the candidicidal activity of human neutrophils stimulated by muramyl dipeptide or tumor necrosis factor. *Immunobiology* 1989; **180**: 68-79.
11. Blasi E, Farinelli S, Varesio L, Bistoni F. Augmentation of GG2EE macrophage cell line-mediated anti-*Candida* activity by gamma interferon, tumor necrosis factor, and interleukin-1. *Infect Immun* 1990; **58**: 1073-77.
12. Steinhagen A, Van Furth R. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. *Clin Exp Immunol* 1993; **91**: 170-75.

13. Kletter Y, Bleiberg I, Golde DW, Fabian I. Antibody to Mol abrogates the increase in neutrophil phagocytosis and degradation induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur J Haematol* 1989; **43**: 389-96.
14. Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; **163**: 579-83.
15. Richardson MD, Brownlie CE, Shankland GS. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF-activated human neutrophils. *J Med Vet Mycol* 1992; **30**: 433-41.
16. Bleiberg I, Kletter Y, Riklis I, Fabian I. Induction of murine macrophage fungal killing by interleukin 3. *Exp Hematol* 1989; **17**: 895-97.
17. Marodi L, Korchak NH, Johnston RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1991; **146**: 2783-89.
18. Baginski B, Grube B. Effect of lead, zinc and cadmium on the cytotoxic action of human polymorphonuclear leukocytes on yeast cells. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1991; **191**: 28-35.
19. Roos D. Neutrophils. En: Roitt IM, Delves PJ. *Encyclopedia of immunology*. Vol. III. Londres: Academic Press, 1992: 1163-66.
20. Claesson R, Johansson E, Carlsson J. Oxygen-dependent modulation of release and activity of polymorphonuclear leukocyte granule products. *Oral Microbiol Immunol* 1994; **9**: 81-87.
21. Samaranayake LP, Raeside JM, McFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouradia* 1984; **22**: 201-7.
22. Bravo AB, Homo FD, Orbach SA. Phospholipase A2, an in vivo immunomodulator. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990; **40**: 31-8.
23. Fabian I, Kletter Y, Mor S y cols Activation of human eosinophil and neutrophil functions by haematopoietic growth factors: comparisons of IL-1, IL-3, IL-5 and GM-CSF. *Br J Haematol* 1992; **80**: 137-43.
24. Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol Med* 1986; **15**: 61-65.
25. Samaranayake LP, Weetman O, Geddes DAM, McFarlane TW. Carboxylic acids and pH of denture plaque in patients with denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1983; **12**: 84-89.
26. Samaranayake LP, Raeside JM, McFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *J Med Vet Mycol* 1984; **22**: 201-7.
27. De Vicente JC, Pérez A, Alvarez IM, Junquera LM, Llorente S, Zapico E. Radicales libres del oxígeno. Conceptos básicos e implicaciones fisiopatológicas en cirugía maxilofacial. *Rev Esp Cirug Oral Maxilofac* 1993; **15**: 125-35.
28. Immunology of oral infections. En: Roitt IM, Lehner T. *Immunology of oral diseases*. 2ª ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983: 375-94.
29. Metcalf JA, Galling JI, Nauseef WM, Root RK. *Laboratory manual of neutrophil function*. New York: Raven Press, 1985: 2-10.
30. Disabato G, Everse J. Immunochemical techniques. Part 5: Phagocytosis and cell mediated cytotoxicity. *Methods Enzymol* 1986; **1**: 132-56.
31. Isolation and functional analysis of neutrophils. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. *Current Protocols in Immunology*. Vol I. National Institute of Health. New York: Greene Publishing Assoc., 1992: 7.23.1-7.23.17.
32. Root RK, Isturiz R, Molavia A, Metcalf JA, Malech HL. Interactions between antibiotic and human neutrophils in the killing of staphylococci. *J Clin Invest* 1981; **67**: 247-59.
33. Ochs HD, Igo RP. The nitroblue tetrazolium slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J Pediatr* 1973; **83**: 77-82.
34. Borregaard N, Heipille JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the c-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase. Translocation during activation. *J Cell Biol* 1983; **97**: 52-61.
35. Ruch W, Cooper PH, Baggiolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase. *J Immunol Methods* 1983; **63**: 347-57.