

ARTÍCULO ORIGINAL

## Evaluación de la función de los granulocitos en el síndrome de hiperinmunoglobulinemia E con infecciones recurrentes

Carlos Julio Montoya, Juan Álvaro López, Paula Andrea Velilla, Claudia Rugeles, Pablo Javier Patiño, Diana María García de Olarte

Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Corporación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

El síndrome de hiper-IgE con infecciones recurrentes (SHIEIR) se caracteriza por infecciones de la piel y el aparato respiratorio causadas especialmente por *Staphylococcus aureus* y algunos hongos, infecciones que se asocian frecuentemente con daño tisular. Para explicar esta evolución clínica se ha documentado en el SHIEIR una deficiencia en la quimiotaxis de las células fagocíticas, pero no se ha evaluado la expresión de las moléculas de adhesión que regulan este fenómeno. Además, a pesar del daño tisular observado en este trastorno, no se ha estudiado la producción de citocinas activadoras de los granulocitos ni la producción de moléculas reactivas derivadas del oxígeno. En seis pacientes con SHIEIR se evaluó la secreción de GM-CSF e IL-5 de las células mononucleares cultivadas con mitógenos y antígenos, la quimiotaxis de los granulocitos inducida por el N-formil-metionil-leucina-fenilalanina (FMLP) bajo gel de agarosa, la explosión respiratoria de los granulocitos después de la activación con forbol-miristato-acetato (PMA) determinada por citometría de flujo y la expresión de las moléculas de superficie L-selectina y CD11b en los granulocitos activados con PMA. Además, se determinó la modulación ejercida sobre estas funciones de los granulocitos por el GM-CSF y los sobrenadantes de cultivos. Con respecto a los controles, los pacientes con SHIEIR presentaron una producción normal de GM-CSF y un aumento en la secreción basal de IL-5, mientras que no existieron diferencias significativas en la quimiotaxis, la explosión respiratoria y la expresión de L-selectina y CD11b. El GM-CSF recombinante humano no moduló ninguna de las funciones evaluadas en los granulocitos de pacientes con SHIEIR, pero se observó que los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares tenían la capacidad de inhibir la quimiotaxis, incrementar la explosión respiratoria y causar la liberación de la L-selectina desde la superficie celular. Los pacientes con SHIEIR estudiados eran asintomáticos en el momento de realizar la investigación gracias a un programa de control y terapia permanente, por lo que estos hallazgos sugieren que en este síndrome los granulocitos se activan más fácilmente en respuesta a los factores proinflamatorios y que la producción de estas últimas sustancias es mayor en el SHIEIR.

**Palabras clave:** síndrome de hiper-IgE, GM-CSF, IL-5, quimiotaxis, explosión respiratoria, moléculas de adhesión.

### **Evaluation of granulocyte function in the hyper immunoglobulin E syndrome associated with recurrent infections**

The hyper-IgE syndrome with recurrent infections (HIESRI) is characterized by skin and respiratory infections due to *Staphylococcus aureus* and several fungi infections which are frequently associated with tissue damage. A deficiency in the chemotaxis of phagocytic cells has been documented to explain these findings; however, the expression of adhesion molecules, the secretion of cytokines that activate granulocytes and the production of oxygen reactive molecules have not been evaluated in HIESRI. Six HIESRI patients were evaluated for the following parameters: (1) secretion of GM-CSF and IL-5 by mitogen and antigen-activated mononuclear cells, (2) the chemotactic response of FMLP-activated granulocytes, (3) the respiratory burst of PMA-activated granulocytes, and (4) the expression of L-selectin and CD11b in PMA-activated granulocytes. Human recombinant GM-CSF and culture supernatants were evaluated for capacity

to modulate granulocytic function. Compared to controls, HIESRI patients showed a normal production of GM-CSF and an increase in the basal secretion of IL-5. No significant differences were observed for chemotaxis, respiratory burst or L-selectin and CD11b expression. The GM-CSF did not modulate these functions in granulocytes from HIESRI patients, but culture supernatants applied to granulocytes inhibited chemotaxis, increased respiratory burst and caused the shedding of L-selectin from the granulocyte surface. The 6 HIESRI patients were nonsymptomatic during the time of this research due to a program of continued treatment; findings suggest that granulocytes are activated more easily in response to proinflammatory factors and that production of these factors is higher in HIESRI.

**Key words:** hyper-IgE syndrome, GM-CSF, IL-5, chemotaxis, respiratory burst, adhesion molecules.

El síndrome de hiper-IgE con infecciones recurrentes (SHIEIR) o síndrome de Job es un trastorno multisistémico que compromete la respuesta inmune, la piel, el tejido conectivo, los huesos y la dentición. Las principales manifestaciones son una concentración sérica elevada de IgE, la dermatitis crónica pruriginosa, un síndrome de infección recurrente anormal con abscesos de piel y tejidos profundos causados especialmente por *Staphylococcus aureus*, el desarrollo de neumopatía supurativa con formación de neumatoceles y un retardo en el recambio dental con ausencia de reabsorción de la raíz en la dentadura decidua. Las manifestaciones clínicas del SHIEIR pueden aparecer desde las primeras semanas de vida y se considera que este síndrome se hereda en forma autosómica dominante con expresión variable y penetrancia incompleta (1,2).

Desde la caracterización inicial del SHIEIR se han descrito múltiples alteraciones inmunológicas que se asocian con la susceptibilidad anormal a las infecciones; los análisis de laboratorio han demostrado una mala regulación de la producción de IgE, eosinofilia, defectos en la quimiotaxis de los granulocitos y deficiencias en la respuesta inmune celular y en la producción de anticuerpos específicos (3, 4). Sin embargo, y probablemente debido a la marcada heterogeneidad de los

hallazgos clínicos y de laboratorio, los mecanismos fisiopatológicos responsables de este síndrome aún se desconocen.

En los pacientes con SHIEIR el número de granulocitos circulantes es normal, así como su capacidad fagocítica y microbicida; sin embargo, se ha informado repetidamente que estos individuos presentan una alteración variable pero persistente en la quimiotaxis de los granulocitos y en la respuesta inflamatoria, esta última expresada por la formación de abscesos fríos (4-7). Sin embargo, y en contradicción con estas alteraciones, también llama la atención el daño tisular grave que ocurre en los sitios de infección más frecuentes, en especial el pulmón.

En los pacientes con SHIEIR deben existir factores, como algunas citocinas, que contribuyen a los defectos en la quimiotaxis y la respuesta inflamatoria, pero que también favorecen el daño tisular en los sitios de infección. Para avanzar en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos responsables de estas alteraciones es necesario evaluar el comportamiento de las moléculas más importantes en la adhesión y migración de los granulocitos, así como las citocinas relevantes en la producción y activación de estas células.

Durante una reacción inflamatoria se produce la extravasación de los leucocitos desde el torrente circulatorio, fenómeno que requiere la interacción entre pares de moléculas de adhesión expresadas en la superficie de los leucocitos, las células endoteliales y la matriz extracelular (8,9). La interacción inicial, conocida como adhesión laxa, es mediada fundamentalmente por moléculas de la familia de las selectinas. Luego tiene lugar la

**Correspondencia:**

Carlos Julio Montoya, Carrera 51 D No. 62 - 29, Oficina 206, Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.  
Tel: (574) 510 6057 y (574) 510 6078; Fax: 263 3509  
cjmonto@catios.udea.edu.co

Recibido: 06/11/02; aceptado: 31/02/03

adhesión fuerte originada por la interacción de las integrinas leucocitarias con moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresadas en el endotelio. Cuando los granulocitos alcanzan la matriz extracelular se inicia la quimiotaxis gracias a la interacción de las integrinas de estas células con moléculas expresadas en la matriz; en este proceso cumplen la función más destacada la integrina CD11b/CD18 (MAC-1) y otras moléculas de la familia de las integrinas beta-1. En el SHIEIR, la alteración variable en la quimiotaxis podría deberse a un trastorno en la expresión de la L-selectina que impediría un rodamiento normal; se ha observado que la activación de los granulocitos lleva a la liberación de la L-selectina desde la membrana, por lo que un estado de preactivación por las infecciones recurrentes presentes en este síndrome podría estimular la eliminación de la L-selectina desde la superficie de los granulocitos y alterar su proceso normal de rodamiento (10). Este defecto en la migración de los granulocitos también podría deberse a alteraciones en la expresión o reorganización funcional de las integrinas leucocitarias, en especial del MAC-1.

El factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) actúa sobre los precursores medulares ya diferenciados hacia las líneas granulocítica y monocítica para estimular su maduración, proliferación y liberación. Adicionalmente, el GM-CSF también ejerce su acción sobre los granulocitos maduros estimulando diferentes funciones como la explosión respiratoria. Los intermediarios reactivos derivados del oxígeno, producidos durante la explosión respiratoria, cumplen un papel fundamental en la actividad microbicida, pero también se han asociados con el daño tisular presente en las reacciones inflamatorias agudas y crónicas (11-13).

En los seres humanos, la IL-5 es un factor de crecimiento específico para los eosinófilos. Cuando estas células ya están maduras, la IL-5 incrementa su supervivencia y activación en las respuestas inflamatorias (14,15). La capacidad de los eosinófilos para producir daño tisular ha sido sugerida por la naturaleza tóxica de las proteínas de sus gránulos y el hallazgo de estas células en

los tejidos de algunas enfermedades con notoria destrucción de tejidos (15).

El daño tisular que característicamente se asocia con las infecciones recurrentes observadas en el SHIEIR podría ser causado por una anomalía en la producción de citocinas, con secreción elevada de GM-CSF y de IL-5; estas dos proteínas se caracterizan por su capacidad de activar los neutrófilos y los eosinófilos, respectivamente. Adicionalmente, la eosinofilia en sangre y tejidos ha sido característicamente descrita en el SHIEIR y se sabe que la IL-5 es el principal promotor de la producción y actividad funcional de estas células. Para tratar de determinar las alteraciones en la función de los granulocitos en el SHIEIR en esta investigación se evaluó, en los pacientes con este síndrome, la producción de las citocinas GM-CSF e IL-5, la expresión de las moléculas de adhesión L-selectina y MAC-1, la quimiotaxis y la explosión respiratoria, haciendo énfasis en la modulación de estas funciones por factores solubles.

## **Materiales y métodos**

### ***Sujetos de estudio***

Se estudiaron seis pacientes (4 varones y 2 mujeres; rango de edad: 5-20 años), con diagnóstico de SHIEIR de acuerdo con los criterios definidos por el grupo de expertos de la OMS (16). Todos tenían antecedentes de inicio temprano de la sintomatología consistente en dermatitis crónica, candidiasis mucocutánea, abscesos en piel y tejido subcutáneo por *Staphylococcus aureus* y neumonías por *Streptococcus pneumoniae*. Cinco pacientes desarrollaron neumonía supurativa con neumatoceles persistentes y cuatro requirieron cirugía de tórax. En todos los pacientes, las subpoblaciones de células T (CD3+, CD4+, CD8+) fueron normales, así como la concentración sérica de IgG, IgM, IgA y los isotipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4); la concentración sérica de IgE estaba anormalmente elevada (rango: 1.600 a 24.000 UI/ml) y las pruebas de hipersensibilidad retardada con PPD y candidina fueron negativas.

En el momento de la evaluación, todos los pacientes con SHIEIR se encontraban en control mensual con los especialistas del Grupo de

Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia; como tratamiento recibían vitamina C y antibioticoterapia (trimetoprim sulfa o dicloxacilina) permanentes. De acuerdo con los registros clínicos, en los seis meses anteriores ninguno de los pacientes había requerido hospitalización ni padecido de infecciones agudas graves. Además, al tiempo de realizar los experimentos, la evaluación clínica y el extendido de sangre periférica realizado durante el procesamiento de las muestras para la citometría de flujo permitió establecer que ningún paciente presentaba manifestaciones de episodios infecciosos agudos.

Como controles se evaluaron en forma paralela, pareados por sexo y edad, seis individuos sanos sin antecedentes de enfermedades mediadas por IgE. La investigación recibió la aprobación del Comité de Ética del Centro de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquia y todos los participantes o sus tutores firmaron un formato de consentimiento informado.

#### ***Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP)***

Las CMSP se aislaron de sangre venosa periférica heparinizada, utilizando un gradiente de densidad con ficoll (Histopaque 1077, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) centrifugando a 400 g/30 min/T ° ambiente. Las CMSP fueron lavadas dos veces con medio RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) a 250 g/10 min/4 °C y se resuspendieron en RPMI a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml.

#### ***Cultivo de las CMSP***

Los cultivos de las CMSP se realizaron por duplicado en placas de 24 pozos, adicionando en cada pozo  $1 \times 10^6$  células en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal estéril (Gibco). Las células fueron estimuladas con 100  $\mu$ l de una solución del mitógeno fitohemaglutinina A (PHA, Sigma; concentración final de 5  $\mu$ g/ml) o antígeno (toxoides tetánico Connaught Laboratories, Swiftwater, PA; concentración final de 1:200). Las placas se colocaron en incubación en cámara de CO<sub>2</sub> al 5%/37 °C. Se prepararon varias placas para recolectar los sobrenadantes y medir en ellos la

concentración de las citocinas a las 24, 48, 72 y 144 horas.

Como control interno de los experimentos, y para descartar una contaminación o una alteración extrínseca en la activación, en cada caso se hizo un cultivo por triplicado con  $1 \times 10^5$  células por pozo en placas de 96 pozos, para evaluar la proliferación celular ante el estímulo con el mitógeno y el antígeno. La timidina tritiada (ICN, Costa Mesa, CA) se utilizó para pulsar los cultivos a las 48 horas (mitógeno) o a los 6 días (antígeno); la proliferación se determinó por las cuentas por minuto (cpm) cuantificadas en un contador de centelleo Beta (Beckman LS 3801, Beckman, Fullerton, CA).

#### ***Cuantificación de citocinas***

La concentración de las citocinas de interés en los sobrenadantes se determinó por medio de la técnica de ELISA no competitiva en *sandwich* (estuches comerciales para IL-5 y GM-CSF, Pharmingen, San Diego, CA).

#### ***Quimiotaxis de los granulocitos de sangre periférica en gel de agarosa***

Los granulocitos de sangre venosa periférica se aislaron mediante una técnica modificada de Yanai y col. (17), utilizando como anticoagulante ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio y dextrosa (ACD) a razón de 5:1. Brevemente, para sedimentar los glóbulos rojos la sangre se depositó sobre dextrán 70 al 6% (Pharmacia, Uppsala, Sweden) y se dejó por 45 min a 1 g; el sobrenadante se sometió a un gradiente de densidad con ficoll (Sigma), centrifugando a 400 g/30 min/T ° ambiente. Después de descartar el plasma y la capa de CMSP, se eliminaron del botón con los granulocitos los eritrocitos contaminantes por medio de una lisis hipotónica con KCl 0,6 N y agua destilada desionizada. Luego, la suspensión se centrifugó a 300 g/6 min/4 °C y los granulocitos se resuspendieron en tampón PBS pH 7,4 (Gibco). La viabilidad y la pureza evaluadas con azul tripano y violeta de genciana fueron mayores del 95%. Los granulocitos se llevaron a una concentración final de  $5 \times 10^7$  células/ml.

La quimiotaxis se realizó de acuerdo con la técnica modificada de Nelson y col. (18). En cajas de Petri

de poliestireno de 60 x 15 mm (Falcon Becton Dickinson & Co, Oxnard) se preparó una mezcla de agarosa tipo II (Sigma) en 4,16 ml de agua destilada desionizada suplementada con medio esencial mínimo 2X (MEM, Gibco), HEPES 0,01 M (Sigma) y suero humano inactivado al 10%. En el gel solidificado se prepararon 6 filas verticales de tres pozos cada una (3 mm de diámetro; tres filas para el paciente y tres para el control, para una evaluación por triplicado en cada experimento). En los pozos interiores se adicionaron 10 ml de una solución de Hanks con gelatina al 0,1% (Gibco) para evaluar la migración espontánea de las células; en los pozos exteriores se depositaron 10 ml de FMLP ( $10^{-7}$ M, Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, CA) como factor quimiotáctico; en los pozos centrales se colocaron 10  $\mu$ l de la suspensión de células a  $5 \times 10^7$ /ml. Las cajas de Petri se incubaron en una cámara con CO<sub>2</sub> al 5%/2,5 h/37 °C. Luego, las células se fijaron con glutaraldehído (Sigma) al 2,5% y se colocaron durante toda la noche a 4 °C. En la mañana siguiente, se descartó la capa de agarosa y se tiñeron las células con colorante de Wright/15 min. Para determinar el diferencial quimiotáctico se realizó la lectura de la migración dirigida y a ésta se le restó el valor de la migración espontánea, utilizando un microscopio de luz con un ocular calibrado y un objetivo 3,2/10. El diferencial quimiotáctico promedio se obtuvo de los valores de las tres filas y se expresó en unidades de migración (1 U=0,2 mm).

#### ***Evaluación de la explosión respiratoria de los granulocitos por citometría de flujo***

Para este estudio se obtuvieron 3 ml de sangre venosa periférica heparinizada y se utilizó el protocolo de separación de leucocitos propuesto por Rothe y Valet (19), en el cual se eliminan los eritrocitos por un método que inhibe el contacto de los leucocitos con cualquier medio de separación, evitando así su activación. Brevemente, los 3 ml de sangre heparinizada se colocaron sobre 3 ml de ficoll (Sigma); los eritrocitos se sedimentaron a 1 g/40 min/T° ambiente. Luego, se extrajeron los 800 ml superiores del sobrenadante rico en leucocitos y se colocaron en hielo para inhibir la activación espontánea.

La explosión respiratoria se evaluó por duplicado midiendo la producción de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo utilizando la dihidrorrodamina 123 (DHR123); este compuesto se oxida en presencia del peróxido de hidrógeno formando un compuesto fluorescente denominado rodamina. En un tubo de polipropileno se mezclaron 100 ml de la suspensión de leucocitos con 1 ml de PBS y 10 ml de la solución de DHR 123 (DHR, Molecular Probes, Eugene, OR; solución de trabajo 100 mM en PBS), incubando 5 min/37 °C en baño maría. Luego, las células fueron activadas con 10 ml de PMA (Sigma, solución 1 mM in N,N-dimethylformamide) durante 10 min/37 °C y, finalmente, las muestras se leyeron en un citómetro de flujo (Coulter Epics XL, Coulter, Miami, FL) para analizar la fluorescencia verde emitida por la rodamina en 10.000 células de la región que correspondía a los granulocitos.

#### ***Evaluación de la expresión de moléculas de adhesión en los granulocitos: CD62L (L-selectina) y CD11b***

En tubos de polipropileno de 12 x 75 mm se depositaron 100  $\mu$ l de sangre venosa periférica más 5 ml de cada anticuerpo monoclonal contra CD62L-FITC, CD11b-PE y los isotipos de control correspondientes (Pharmingen). Luego, se hizo una incubación por 20 min/oscuridad/T° ambiente, seguida de la lisis de los eritrocitos con 2 ml de un tampón de lisis 1X (Facs Lysis Reagent, Becton Dickinson). A continuación, las células se lavaron con 2 ml de tampón de citometría (PBS pH 7,37, suero bovino fetal al 1% y azida de sodio al 0,1%) centrifugando a 250 g/5 min/T° ambiente. Luego de aspirar el sobrenadante, las células se fijaron con tampón de fijación (PBS pH 7,2, paraformaldehído al 1% y azida de sodio 0,1%) y la región de los granulocitos fue analizada en el citómetro de flujo (Coulter) de acuerdo con la distribución en el SSC y el FSC.

#### ***Modulación de la función de los granulocitos ejercida por los sobrenadantes de cultivos de pacientes y controles y por el GM-CSF recombinante humano***

Antes de realizar estos experimentos, utilizando células de individuos sanos, se efectuaron curvas

de dosis-respuesta con los diferentes estímulos con el objetivo de seleccionar las concentraciones más eficientes para las condiciones experimentales.

Se escogieron los sobrenadantes de pacientes y controles provenientes de cultivos de CMSP estimuladas con PHA por 48, 72 y 144 horas, pues fue este estímulo, a estos tiempos, el que indujo la mayor secreción de citocinas. Estos sobrenadantes se mezclaron para poder tener unas condiciones de estimulación idénticas en los dos grupos de estudio; la dilución escogida de esta mezcla de sobrenadantes fue de 1:5 en PBS. El efecto del GM-CSF recombinante humano (Pharmingen) se evaluó a una concentración de 10 ng/ml; el del FMLP a  $10^{-7}$ M y el del anti GM-CSF humano (Pharmingen) a 0,25 µg/ml.

Para determinar la modulación ejercida por estos estímulos sobre la quimiotaxis, la explosión respiratoria y la expresión de L-selectina y CD11b, se incubaron previamente las células con los diferentes estímulos durante 60 min/37 °C en baño maría; luego se procedió a realizar los experimentos como se ha descrito anteriormente.

#### **Análisis estadístico**

Con los resultados de los diferentes experimentos se determinaron la media aritmética y el error estándar. Debido a la distribución normal de los datos, la comparación estadística entre los resultados de cada grupo estudiado se realizó utilizando una prueba *t* de Student.

#### **Resultados**

##### **Deficiente proliferación linfocitaria en las CMSP de pacientes con SHIEIR estimuladas con un mitógeno o un antígeno**

Como se observa en la figura 1, en ausencia de estimulación, la proliferación fue muy baja y no varió significativamente entre pacientes y controles, lo que sugiere la ausencia de contaminación. En el cultivo con PHA se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, pues las CMSP de los pacientes con SHIEIR presentaron una proliferación menor que los controles ( $p=0,0053$ ). Después del reto con toxoide tetánico, la diferencia en la proliferación entre pacientes y controles fue aún

más significativa, debido a una respuesta muy baja de las CMSP de los pacientes con SHIEIR ( $p=0,0002$ ).

##### **Secreción normal de GM-CSF e incremento de IL-5 en el SHIEIR**

Como se puede observar en el cuadro 1, luego del cultivo de las CMSP con mitógenos y antígenos, en los sobrenadantes de los dos grupos evaluados se detectó por ELISA la presencia de GM-CSF a los diferentes tiempos analizados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de esta citocina entre los dos grupos, con las diferentes condiciones de estimulación y a los distintos tiempos de evaluación. Sin embargo, la mayor producción de GM-CSF se obtuvo luego de la incubación de las CMSP con PHA, alcanzando niveles significativos desde las 24 horas de cultivo y aumentando gradualmente con el tiempo de cultivo. De otro lado, el toxoide tetánico sólo indujo un aumento notable en la secreción de esta citocina luego de 144 horas de cultivo. En los sobrenadantes de las CMSP no estimuladas, por lo general, la concentración de GM-CSF fue establemente baja.

En cuanto a la producción de IL-5, en los sobrenadantes de cultivos de CMSP de pacientes y controles, se detectó la secreción de IL-5 con todas las condiciones de estimulación y en todos los tiempos evaluados. Sin embargo, cuando las CMSP no fueron estimuladas, se observó en los sobrenadantes de los pacientes con SHIEIR una concentración más alta de IL-5, aunque sólo mostró diferencias significativas a las 24 horas de cultivo ( $p=0,0465$ ) (cuadro 1). De nuevo, el mejor estímulo para inducir la secreción de IL-5 en los dos grupos estudiados fue la PHA, pero no se observaron diferencias significativas entre ellos. Luego del reto con el toxoide tetánico durante 24 horas, los pacientes con SHIEIR secretaron una cantidad significativamente mayor de IL-5 ( $p=0,0451$ ). No obstante, el cultivo con este antígeno en los otros tiempos evaluados no llevó a diferencias significativas entre los dos grupos en la secreción de IL-5, pues la producción de esta citocina aumentó gradualmente en los controles de acuerdo con el tiempo de cultivo (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Concentración de GM-CSF e IL-5 (en picogramos/ml) en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de pacientes con SHIEIR y controles sanos.

Tipo y tiempo de estimulación (horas)	Pacientes SHIEIR (n=6)		Controles (n=6)		Valor p
	Media +/- EE *	Media +/- EE *	Media +/- EE *	Media +/- EE *	
<i>GM-CSF</i>					
Ninguno					
24	8,0 +/- 3,8	1,8 +/- 1,8	0,0854		
48	8,7 +/- 4,2	5,5 +/- 5,5	0,3277		
72	3,7 +/- 3,6	6,9 +/- 4,8	0,2544		
144	23,8 +/- 12,5	6,2 +/- 3,1	0,1004		
PHA					
24	29 +/- 9,0	18,3 +/- 14,3	0,2704		
48	124 +/- 39,2	264 +/- 116,8	0,1411		
72	103 +/- 26,8	284 +/- 156,4	0,1402		
144	279 +/- 130,6	177 +/- 122,1	0,2905		
Toxoide tetánico					
24	6,7 +/- 4,24	8,7 +/- 8,7	0,4199		
48	10,2 +/- 6,5	2,5 +/- 2,5	0,1458		
72	8,3 +/- 5,6	1,7 +/- 1,7	0,1438		
144	44 +/- 34,21	29,2 +/- 9,7	0,3430		
<i>IL-5</i>					
Ninguno					
24	33,6 +/- 10,7	8,4 +/- 8,4	0,0465		
48	32,6 +/- 10,3	10,0 +/- 7,8	0,0554		
72	32,6 +/- 10,3	15,6 +/- 9,9	0,1309		
144	35,6 +/- 11,3	18,2 +/- 11,7	0,1544		
PHA					
24	44,2 +/- 15,7	40,2 +/- 24,6	0,4469		
48	91 +/- 37,6	173 +/- 84,5	0,1980		
72	66,7 +/- 14,8	183 +/- 115,0	0,1700		
144	111 +/- 50,6	72,9 +/- 31,3	0,2683		
Toxoide tetánico					
24	31 +/- 9,8	7,7 +/- 7,6	0,0451		
48	33,8 +/- 10,9	17,6 +/- 9,7	0,1462		
72	25,6 +/- 11,4	30,4 +/- 14,4	0,3995		
144	40,1 +/- 12,9	126 +/- 97,6	0,2016		

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IL-5: interleucina 5; PHA: fitohemaglutinina A  
 SHIEIR: síndrome de hiper-IgE con infecciones recurrentes

\* Media +/- EE: media aritmética y error estándar de la concentración de cada citocina en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares.

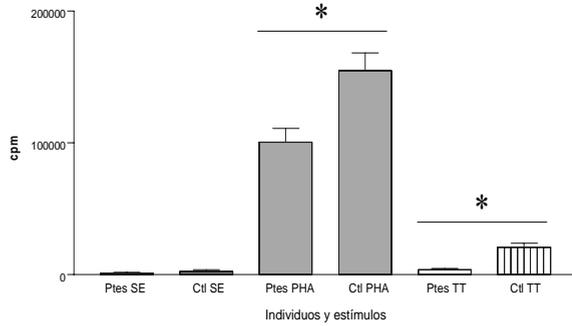
**Los sobrenadantes de cultivo de las CMSP disminuyen la actividad quimiotáctica de los granulocitos de pacientes con SHIEIR**

Como se observa en la figura 2, cuando se utilizó el FMLP como estímulo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el diferencial quimiotáctico de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR y los respectivos controles (p=0,0716).

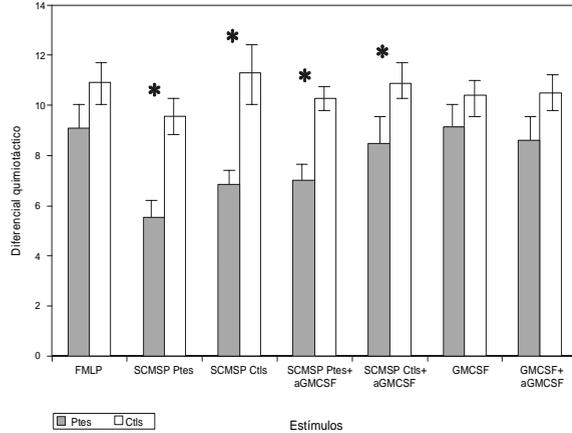
De otro lado, la incubación de los granulocitos con los sobrenadantes de cultivo de los pacientes

produjo una disminución estadísticamente significativa de la quimiotaxis en los pacientes comparado con los controles (p=0,0031). El mismo efecto se observó cuando los granulocitos fueron preincubados con los sobrenadantes de cultivo de los controles, pues se produjo una disminución significativa en la quimiotaxis de los granulocitos de los pacientes (p=0,0025) (figura 2).

Cuando los granulocitos se preincubaron con los sobrenadantes de cultivos más un anticuerpo monoclonal anti GM-CSF humano, se observó un



**Figura 1.** Deficiente proliferación linfocitaria de las células mononucleares de pacientes con SHIEIR estimuladas con un mitógeno o un antígeno.  
 Ptes: pacientes con SHIER; Ctl: controles sanos; SE: sin estimulación; PHA: fitohemaglutinina A; TT: toxoide tetánico; cpm: cuentas por minuto.  
 \*:  $p < 0,05$ .



**Figura 2.** La incubación con los sobrenadantes de cultivo de las células mononucleares disminuye la actividad quimiotáctica de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR.  
 FMLP: N-formil-metionil-leucina-fenilalanina; SCMSP: sobrenadantes de cultivos de células mononucleares; Ptes: pacientes con SHIEIR; Ctl: controles sanos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; aGMCSF: anticuerpo monoclonal anti GM-CSF; SHIEIR: síndrome de hiper-IgE con infecciones recurrentes.  
 \*:  $p < 0,05$ .

ligero incremento en la actividad quimiotáctica de los granulocitos de los dos grupos con respecto a los que fueron incubados sólo con los sobrenadantes. Sin embargo, siguió existiendo una diferencia significativa en el diferencial quimiotáctico entre los dos grupos estudiados tanto para la preincubación con sobrenadantes de pacientes más anti GM-CSF ( $p=0,0036$ ) como para la incubación con sobrenadantes de controles más anti GM-CSF ( $p=0,0441$ ).

La incubación de los granulocitos de pacientes y controles con GM-CSF recombinante humano solo y con GM-CSF más el anticuerpo anti GM-CSF humano no indujo diferencias significativas en el diferencial quimiotáctico entre los dos grupos de estudio ( $p=0,1672$  y  $p=0,0850$ , respectivamente).

Debido a la poca variabilidad en el diferencial quimiotáctico de los granulocitos de los controles con las diferentes condiciones de estimulación, cuando se analizó el efecto de esos estímulos sobre la quimiotaxis exclusivamente en el grupo de los controles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados). Como se puede observar en el cuadro 2, los hallazgos interesantes se observaron al analizar el efecto de los diferentes estímulos sobre los granulocitos de los pacientes con SHIEIR. Comparada con la estimulación únicamente con FMLP, la incubación de los granulocitos de los pacientes con los sobrenadantes de pacientes o de los controles llevó a una disminución significativa de la quimiotaxis ( $p=0,0101$  y  $p=0,0236$ , respectivamente). Sin embargo, al comparar el efecto inhibitorio inducido por los sobrenadante de cultivos de pacientes y controles sobre la quimiotaxis de los granulocitos de pacientes no se halló una diferencia estadísticamente significativa, lo que sugiere no sólo la presencia de factores solubles inhibidores en los dos tipos de sobrenadantes sino también una predisposición particular de los granulocitos de pacientes con SHIEIR para modular negativamente la actividad quimiotáctica en respuesta a esos factores. Tampoco se observó una diferencia significativa cuando se compararon los diferenciales quimiotácticos de los granulocitos de pacientes luego de la estimulación con FMLP y con GM-CSF.

Cuando se compararon con el efecto inducido por la incubación con el GM-CSF, los sobrenadantes de cultivos de pacientes y controles llevaron a una disminución significativa en la quimiotaxis de los granulocitos de los pacientes ( $p=0,0105$  y  $p=0,0392$ , respectivamente), lo que indica la presencia en los sobrenadantes de otros factores solubles con más potencia para modular la actividad quimiotáctica. Esto se pudo comprobar cuando los granulocitos de los pacientes fueron

**Cuadro 2.** Comparación del efecto de los diferentes estímulos sobre la quimiotaxis de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR.

Estímulos comparados	Efecto de los estímulos sobre los granulocitos de pacientes con SHIEIR	
	Media +/- EE * de las unidades de DQ **	Valor p
FMLP SCMSP de pacientes***	9,1 +/- 0,96 5,55 +/- 0,89	0,0101
FMLP SCMSP de controles ***	9,1 +/- 0,96 6,85 +/- 0,66	0,0236
FMLP GM-CSF recombinante humano	9,1 +/- 0,96 9,15 +/- 0,97	0,4905
SCMSP de pacientes SCMSP de controles	5,55 +/- 0,89 6,85 +/- 0,66	0,1339
SCMSP de pacientes GM-CSF recombinante	5,55 +/- 0,89 9,15 +/- 0,97	0,0105
SCMSP de controles GM-CSF recombinante	6,85 +/- 0,66 9,15 +/- 0,97	0,0392
SCMSP de pacientes SCMSP pacientes + anti GM-CSF	5,55 +/- 0,89 7,03 +/- 0,79	0,1210
SCMSP de controles SCMSP controles + anti GM-CSF	6,85 +/- 0,66 8,48 +/- 1,03	0,1061

FMLP: N-formil-metionil-leucina-fenilalanina; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; SHIEIR: síndrome de hiper-IgE con infecciones recurrentes; SCMSP: sobrenadantes de cultivo de células mononucleares.

\* Media +/- EE: media aritmética y error estándar del diferencial quimiotáctico de los granulocitos luego de la incubación con los diferentes estímulos

\*\* DQ: unidades de diferencial quimiotáctico (1 U=0,2 mm); resulta de restar la migración espontánea de la migración estimulada por el agente quimiotáctico

\*\*\* Los sobrenadantes utilizados corresponden a una mezcla de los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares estimuladas con PHA por 48, 72 y 144 horas (dilución de 1:5 en PBS)

incubados con alguno de los dos tipos de sobrenadantes más un anticuerpo anti GM-CSF; si bien esta combinación disminuyó la capacidad inhibidora de los dos sobrenadantes, no se observó una diferencia significativa entre la quimiotaxis después de la incubación con los sobrenadantes solos y la incubación con los sobrenadantes más el anti GM-CSF (p=0,1210 para el sobrenadante de pacientes y p=0,1061 para el de los controles).

**Los granulocitos de pacientes con SHIEIR no tienen alterada la producción de peróxido de hidrógeno después de la modulación con factores activadores**

Cuando se evaluó la explosión respiratoria en los granulocitos de sangre periférica sin ninguna

estimulación, se observó que, aunque los granulocitos de los pacientes con SHIEIR mostraban una mayor producción de peróxido de hidrógeno, no existía una diferencia significativa al compararla con la de los controles sanos (p=0,0901). Después de la incubación de los granulocitos con los otros diferentes estímulos analizados (PMA, FMLP, sobrenadante de cultivos, GM-CSF y anti GM-CSF) no se observaron diferencias significativas en la producción de peróxido de hidrógeno entre los granulocitos de pacientes y los de los controles.

El mejor estímulo para inducir la explosión respiratoria de los granulocitos fue el PMA, seguido por los sobrenadantes de cultivo de los pacientes. El FMLP, el GM-CSF y los

sobrenadantes de cultivos de los controles mostraron un nivel similar de activación de la explosión respiratoria (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que en los sobrenadantes de los pacientes con SHIEIR existe una mayor concentración o un tipo diferente de factores activadores de los granulocitos, fenómeno que ayudaría a explicar el daño tisular observado en este síndrome.

A pesar de que con las diferentes condiciones de estimulación evaluadas no existieron diferencias significativas en la producción de peróxido de hidrógeno por los granulocitos de pacientes y

controles, al analizar el efecto de los diferentes estímulos dentro de cada grupo estudiado, se encontraron evidencias de la modulación del sistema NADPH oxidasa en cada grupo (cuadro 3). Cuando los granulocitos se activaron con PMA, tanto en los pacientes como en los controles se observó un aumento significativo en la explosión respiratoria ( $p=0,0002$  y  $p<0,0001$ , respectivamente). Sin embargo, y debido a la mayor producción basal de peróxido de hidrógeno por las células de los pacientes, cuando se comparó la explosión respiratoria de los granulocitos no estimulados y la de aquéllos

**Cuadro 3.** Comparación del efecto de los diferentes estímulos sobre la explosión respiratoria de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR y los controles sanos.

Estímulos comparados	Efecto de los estímulos sobre los granulocitos de pacientes con SHIEIR		Efecto de los estímulos sobre los granulocitos de los controles	
	Media +/- EE (IMF)*	*Valor p	Media +/- EE * (IMF)	Valor p
Sin estimulación PMA	7,48 +/- 3,25 55,88 +/- 8,59	0,0002	2,65 +/- 0,79 62,96 +/- 8,55	<0,0001
Sin estimulación FMLP	7,48 +/- 3,25 10,88 +/- 2,83	0,2242	2,65 +/- 0,79 11,20 +/- 2,55	0,0047
Sin estímulo SCMSP de pacientes **	7,48 +/- 3,25 33,86 +/- 9,12	0,0107	2,65 +/- 0,79 38,63 +/- 14,02	0,0141
Sin estímulo SCMSP de controles **	7,48 +/- 3,25 16,88 +/- 7,82	0,1465	2,65 +/- 0,79 9,81 +/- 3,69	0,0435
Sin estímulo GM-CSF recombinante	7,48 +/- 3,25 9,93 +/- 4,49	0,3339	2,65 +/- 0,79 11,90 +/- 7,22	0,1158
SCMSP de pacientes SCMSP de controles	33,86 +/- 9,12 16,88 +/- 7,82	0,0940	38,63 +/- 14,02 9,81 +/- 3,69	0,0374
SCMSP de pacientes GM-CSF recombinante	33,86 +/- 9,12 9,93 +/- 4,49	0,0202	38,63 +/- 14,02 11,90 +/- 7,22	0,0605
SCMSP de controles GM-CSF recombinante	16,88 +/- 7,82 9,93 +/- 4,49	0,2293	9,81 +/- 3,69 11,90 +/- 7,22	0,4009
SCMSP de pacientes SCMSP pacientes + anti GM-CSF	33,86 +/- 9,12 42,03 +/- 13,46	0,3131	38,63 +/- 14,02 31,73 +/- 7,01	0,3346
SCMSP de controles SCMSP controles + anti GM-CSF	16,88 +/- 7,82 22,13 +/- 11,56	0,3573	9,81 +/- 3,69 26,18 +/- 12,81	0,1238

Ver leyendas cuadros 1 y 2

\* Intensidad media de fluorescencia

retados con FMLP no se presentó una diferencia significativa en los pacientes con SHIEIR ( $p=0,2242$ ), mientras que en los controles sí se apreció un aumento significativo en la producción de peróxido de hidrógeno inducida por el FMLP ( $p=0,0047$ ). Este resultado sugiere un estado de preactivación basal en los granulocitos de los pacientes con SHIEIR.

Comparada con la producción de peróxido de hidrógeno en condiciones basales, los granulocitos de ambos grupos presentaron un aumento significativo en la explosión respiratoria luego de la incubación con los sobrenadantes de cultivos de pacientes ( $p=0,0107$  y  $p=0,0141$ , respectivamente, cuadro 3). Sin embargo, cuando se comparó la producción de peróxido de hidrógeno inducida por los sobrenadantes de cultivos de controles con la producción basal en los pacientes no se presentaron diferencias significativas ( $p=0,1465$ ), mientras que en los controles el estímulo con este sobrenadante sí indujo una activación significativamente mayor de la explosión respiratoria ( $p=0,0435$ ). Estos hallazgos pueden indicar la presencia de diferentes factores activadores de los granulocitos en los sobrenadantes de cultivo; la diferencia en la respuesta obtenida en los dos grupos se puede explicar porque los granulocitos de los pacientes con SHIEIR tenían una mayor producción basal de peróxido de hidrógeno.

En el grupo de pacientes no se encontró una diferencia significativa en la explosión respiratoria cuando se compararon los efectos de la estimulación de los granulocitos con los sobrenadantes de cultivo de pacientes y controles ( $p=0,0940$ , cuadro 3). Sin embargo, en el grupo de los controles esta comparación sí arrojó una diferencia significativa ( $p=0,0374$ ). Lo anterior se puede explicar por la mayor producción de peróxido de hidrógeno por los granulocitos de los pacientes luego de la incubación con los sobrenadantes de los controles, fenómeno que también sugiere una mayor respuesta de los granulocitos en el SHIEIR a los estímulos proinflamatorios.

En los dos grupos analizados la estimulación con el GM-CSF recombinante humano no originó diferencias significativas en la producción de

peróxido de hidrógeno cuando se comparó con la producción por los granulocitos no estimulados (cuadro 3). De otro lado, en el grupo de pacientes se observó una producción significativamente mayor de peróxido de hidrógeno luego del estímulo con el sobrenadante de cultivo de pacientes al compararla con la producción por la estimulación con el GM-CSF ( $p=0,0202$ ), mientras que en el grupo de los controles no se encontró una diferencia significativa en la explosión respiratoria de los granulocitos al comparar estos dos estímulos ( $p=0,0605$ ). Lo anterior también apoya la sugerencia de que los granulocitos en el SHIEIR son más susceptibles a la activación por factores solubles.

Finalmente, al comparar en cada grupo la explosión respiratoria de los granulocitos incubados con alguno de los sobrenadantes de cultivo y la explosión respiratoria luego del estímulo con uno de los sobrenadantes más el anti GM-CSF, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en los dos grupos evaluados (cuadro 3). Es más, en la mayoría de los casos la incubación con los sobrenadantes más el anti GM-CSF aumentó la explosión respiratoria, lo que podría parecer paradójico. Sin embargo, y como está descrito en los métodos, para esta estimulación se utilizaron los sobrenadantes de cultivo que contenían la mayor concentración de GM-CSF y el entrecruzamiento de las moléculas de GM-CSF unido a su receptor de membrana por los anticuerpos anti GM-CSF puede incrementar las señales de activación llevando a un aumento en la explosión respiratoria.

***Los pacientes con SHIEIR y los controles tienen una expresión similar de CD62L y CD11b luego de la modulación con diferentes factores activadores***

Tanto en condiciones basales (sin estímulo) como luego de la incubación con los diferentes estímulos no se presentaron diferencias significativas entre los pacientes con SHIEIR y los controles en el porcentaje de granulocitos que expresaban L-selectina. La mayor expresión de esta molécula se encontró en las células de sangre periférica no estimuladas. Con la excepción del GM-CSF, los demás estímulos llevaron a una disminución en

el porcentaje de granulocitos que expresaban L-selectina, siendo la incubación con PMA la del efecto más potente (datos no presentados).

Al analizar, en cada uno de los grupos, el efecto modulador de los diferentes estímulos sobre la expresión superficial de la L-selectina en los granulocitos, se observó que tanto en los pacientes como los controles se presentaba el mismo comportamiento. Por esa razón, se muestra sólo el análisis del grupo de interés que son los pacientes con SHIEIR (cuadro 4). Cuando se comparó la expresión de la L-selectina en la superficie de los granulocitos no estimulados con la de aquéllos incubados con los diferentes factores, se observó una disminución significativa luego de la incubación con PMA ( $p < 0,0001$ ), sobrenadantes de cultivo de pacientes ( $p = 0,0021$ ) y sobrenadantes de cultivo de controles ( $p = 0,0017$ ); este fenómeno no se observó luego de la incubación con el GM-CSF ( $p = 0,4870$ ).

Al comparar el efecto del sobrenadante de cultivos de pacientes y el de los controles no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la L-selectina en los granulocitos ( $p = 0,4909$ ). Sin embargo, la disminución en la expresión de esta molécula inducida por alguno de los dos sobrenadantes fue significativa cuando se comparó con el efecto del GM-CSF ( $p = 0,0017$  para el sobrenadante de los pacientes y  $p = 0,0013$  para el de los controles). Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de la L-selectina sobre los granulocitos cuando se comparó el efecto de cada uno de los dos sobrenadantes versus el efecto de la incubación con uno de los sobrenadantes más el anticuerpo anti GM-CSF.

Con respecto a la expresión de la molécula CD11b en la superficie de los granulocitos, en todas las condiciones experimentales analizadas, tanto sin estímulo como luego de las diferentes

**Cuadro 4.** Comparación del efecto de los diferentes estímulos sobre la expresión de la L-Selectina en los granulocitos de pacientes con SHIEIR.

Estímulos comparados	Efecto de los estímulos sobre los granulocitos de pacientes con SHIEIR	
	Media +/- EE * (IMF)*	Valor p
Sin estimulación	72,66 +/- 7,54	
PMA	4,68 +/- 4,22	< 0,0001
Sin estímulo	72,66 +/- 7,54	
SCMSP de pacientes **	21,91 +/- 11,50	0,0021
Sin estímulo	72,66 +/- 7,54	
SCMSP de controles **	22,28 +/- 10,82	0,0017
Sin estímulo	72,66 +/- 7,54	
GM-CSF recombinante	72,33 +/- 6,41	0,4870
SCMSP de pacientes **	21,91 +/- 11,50	
SCMSP de controles **	22,28 +/- 10,82	0,4909
SCMSP de pacientes **	21,91 +/- 11,50	
GM-CSF recombinante	72,33 +/- 6,41	0,0017
SCMSP de controles **	22,28 +/- 10,82	
GM-CSF recombinante	72,33 +/- 6,41	0,0013
SCMSP de pacientes **	21,91 +/- 11,50	
SCMSP pacientes + anti GM-CSF **	32,21 +/- 11,73	0,2723
SCMSP de controles **	22,28 +/- 10,82	
SCMSP controles + anti GM-CSF **	29,11 +/- 8,45	0,3148

Ver leyendas cuadros 1 y 2

\* Intensidad media de fluorescencia

incubaciones, no se presentaron diferencias significativas en la expresión del CD11b entre el grupo de los pacientes con SHIEIR y el de los controles (datos no presentados). Además, la expresión basal de esta molécula no presentó cambios estadísticamente significativos luego de los diferentes estímulos, por lo que no se analizó la modulación en cada uno de los grupos estudiados.

### Discusión

Una de las manifestaciones más importantes del SHIEIR es la susceptibilidad a las infecciones recurrentes de la piel y el aparato respiratorio, causadas frecuentemente por *Staphylococcus aureus* y algunos hongos. Para explicar este cuadro clínico se han documentado defectos en la respuesta inmune innata y adquirida, especialmente en la activación de los linfocitos T y la producción de anticuerpos específicos (1). Sin embargo, este tipo de infecciones se observa característicamente en aquellos pacientes con deficiencias en la función de las células fagocíticas, como los defectos de adhesión leucocitaria, las neutropenias congénitas y la enfermedad granulomatosa crónica (20).

En los pacientes con SHIEIR se ha observado una alteración en la respuesta quimiotáctica de las células fagocíticas, pero su presencia es variable en el tiempo y entre los pacientes (5,7). Para explicar esta anomalía hasta ahora no se había evaluado la expresión de las moléculas de adhesión en este síndrome. También, y a pesar de que el daño tisular es una de las consecuencias comunes del SHIEIR, pocos estudios analizaron la explosión respiratoria y la producción de moléculas reactivas derivadas del oxígeno (10). En esta investigación nos propusimos realizar una evaluación más completa de la función de los granulocitos en el SHIEIR, estudiando un mayor número de pacientes que se encontraban en tratamiento permanente y que no habían presentado infecciones agudas o graves en los últimos seis meses.

En primer lugar, quisimos determinar en los pacientes con SHIEIR la secreción de dos citocinas importantes en la producción y activación de los granulocitos. Se encontró una producción normal

del GM-CSF en los pacientes, tanto en condiciones de no estimulación como después del cultivo con un mitógeno y un antígeno. Anteriormente nuestro grupo reportó una elevada secreción de esta citocina en pacientes con SHIEIR (10). Consideramos que esta diferencia se debe a que para la primera investigación los pacientes estudiados tenían poco tiempo de seguimiento después del diagnóstico y se encontraban en condiciones clínicas muy diferentes a las actuales, con procesos infecciosos de difícil control y neumopatía crónica. Se ha descrito que el GM-CSF se produce en respuesta a los estímulos infecciosos agudos y crónicos, además que es secretado por las células epiteliales pulmonares y contribuye en la respuesta inmune generada en el pulmón (21,23). Así, los trastornos infecciosos crónicos, en especial en el aparato respiratorio como se presentan en el SHIEIR, pueden contribuir a aumentar la síntesis de esta citocina.

Otro hallazgo característico del SHIEIR, que puede estar relacionado con el daño tisular, es la eosinofilia presente en sangre periférica y los tejidos infectados. En los seres humanos, la IL-5 es la citocina responsable de la producción de los eosinófilos y la regulación de sus funciones (14). Al momento de realizar esta investigación no existía ningún informe en la literatura sobre la producción de la IL-5 en pacientes con el SHIEIR. En este trabajo se encontró que las CMSP de los pacientes con SHIEIR producían IL-5 aún en condiciones de no estimulación y que en estos pacientes existía un aumento significativo en la concentración de esta citocina luego de la incubación por 24 horas con toxoide tetánico. La estimulación con PHA hizo desaparecer esta diferencia, ya que activó tempranamente la síntesis de múltiples citocinas por los linfocitos T de pacientes y controles. Estos hallazgos sugieren que, en condiciones basales, las CMSP de los pacientes con SHIEIR están produciendo IL-5 anormalmente, fenómeno que nos proponemos confirmar a nivel transcripcional, pues si las CMSP de estos individuos se encuentran *in vivo* en un estado de preactivación, la síntesis anormal de esta citocina podría incidir en la eosinofilia y el daño tisular. Se conoce la naturaleza

tóxica de las proteínas de los gránulos de los eosinófilos y se han encontrado estas células en los tejidos de otras enfermedades que presentan daño tisular (14,24).

Como control del funcionamiento de los cultivos celulares, se evaluó la proliferación linfocitaria luego de la estimulación; las CMSP de los pacientes con SHIEIR mostraron una disminución significativa en la respuesta proliferativa luego de la estimulación, especialmente con el antígeno. En los pacientes estudiados en este trabajo, la anormalidad descrita ha sido persistente, pues diferentes evaluaciones de la blastogénesis con toxoide tetánico, candidina y *Dermatophagoides pteronyssinus* han mostrado la misma alteración (25). Lo anterior refleja un patrón permanente de activación deficiente de los linfocitos T ante los retos antigénicos en este síndrome. Sin embargo, es paradójico que este fenómeno no altera la secreción de citocinas, hecho que amerita investigaciones adicionales; nosotros también hemos comprobado a nivel transcripcional que la expresión de los genes para diferentes citocinas como la IL-2, IFN gamma e IL-13 es normal (manuscrito en preparación). Desde la descripción inicial del SHIEIR, varios investigadores han informado una inadecuada respuesta proliferativa de las células mononucleares ante el estímulo con antígenos (3,4,26); éste es un hallazgo característico del síndrome y sugiere que, ante unas subpoblaciones normales de linfocitos T, podría existir un defecto en la comunicación que normalmente se establece entre las células T y las células presentadoras al momento de la interacción consignada.

Con respecto a los defectos en la quimiotaxis de los granulocitos de pacientes con SHIEIR, esta anormalidad es variable en el tiempo y más aparente en los momentos en que se presentan las infecciones (2,5-7). En este trabajo no se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles en la migración de los granulocitos estimulados por el FMLP; sin embargo, estudios previos en estos mismos pacientes al momento del diagnóstico y durante varios años de observación han mostrado alteraciones en la migración dirigida por este factor quimiotáctico. El hallazgo de una quimiotaxis

normal en el presente estudio puede estar relacionado con las condiciones clínicas en las que se encuentran los pacientes, puesto que están la mayor parte del tiempo sin infecciones y reciben antibioticoterapia y vitamina C permanentemente. Estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en individuos con síndrome de Chediak-Higashi (27) y en sujetos sanos (28) informaron que el ácido ascórbico modulaba positivamente la migración de los neutrófilos; esto puede explicar parcialmente los buenos resultados clínicos que tiene en el SHIEIR la terapia combinada de antibióticos y vitamina C, a pesar de la severidad y complejidad que tiene este trastorno en su evolución natural sin tratamiento.

Un hallazgo interesante es la disminución en la respuesta quimiotáctica de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR luego de la incubación con los sobrenadantes tanto de pacientes como de los controles. Anteriormente, se había informado que las CMSP de pacientes con este síndrome producían factores que inhiben el proceso quimiotáctico (6), pero esas sustancias tampoco se identificaron plenamente. Estos resultados podrían reflejar una susceptibilidad de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR a responder a los estímulos proinflamatorios secretados por las CMSP en cultivo, pues este mismo efecto no se observó cuando los granulocitos de los controles fueron retados con los dos tipos de sobrenadantes.

Resultados previos sobre la producción de citocinas en el SHIEIR sugirieron que una elevada secreción del GM-CSF en estos pacientes podría modular negativamente la quimiotaxis de los granulocitos (10). En esta investigación se demostró que el GM-CSF no afecta significativamente la quimiotaxis de los granulocitos de los pacientes con SHIEIR y que el efecto inhibitorio que tienen los sobrenadantes de cultivo sobre la quimiotaxis de los granulocitos de los pacientes no fue contrarrestado por un anticuerpo contra el GM-CSF. La presencia de otros factores en los sobrenadantes que pueden modular las diferentes funciones de los leucocitos hace difícil proponer una sola molécula como la responsable de las alteraciones en la migración de los fagocitos; sin embargo, recientemente se

describió en el SHIEIR la expresión anormal de los genes para algunas citocinas proinflamatorias y quimocinas (29), hallazgo que requiere ser validado con estudios que demuestren la consecuencia funcional de estos defectos en la expresión génica.

Otro propósito de esta investigación era definir el comportamiento de la explosión respiratoria en el SHIEIR, pues esta reacción genera moléculas que podrían estar involucradas en el daño tisular. La explosión respiratoria de los granulocitos, evaluada determinando la producción de peróxido de hidrógeno luego de diferentes estímulos, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con SHIEIR y los controles. Sin embargo, los granulocitos de los pacientes en condiciones basales produjeron una cantidad superior de peróxido de hidrógeno a la observada en los controles y muy similar a la inducida por el FMLP. Este hallazgo podría sugerir que los granulocitos circulantes de los pacientes con SHIEIR están expuestos a microambientes preactivadores, que incrementan la capacidad de respuesta a los diferentes estímulos funcionales.

También llamó la atención el efecto de los sobrenadantes sobre la explosión respiratoria de los granulocitos. Con respecto al nivel basal, la producción de peróxido de hidrógeno se incrementó significativamente después de la incubación de los granulocitos con los sobrenadantes, pero este efecto fue mucho más marcado para los sobrenadantes de los pacientes. La activación de la explosión respiratoria desencadenada por los sobrenadantes de pacientes se ubicó cuantitativamente en un nivel intermedio cuando se comparó con el FMLP y el PMA, indicando que en esos sobrenadantes existen sustancias con capacidad de incrementar la actividad del sistema NADPH oxidasa. La modulación de la explosión respiratoria por sobrenadantes de cultivo ya ha sido informada en el modelo de asma (30).

Previamente habíamos informado un aumento en la explosión respiratoria de los granulocitos en los pacientes con SHIEIR (10) y quisimos evaluar si este fenómeno estaba asociado con una producción anormal de GM-CSF. Como se

demonstró con este estudio, el GM-CSF indujo un incremento muy moderado en la explosión respiratoria, apenas comparable a la lograda por la incubación con el FMLP. Además, la incubación simultánea de los sobrenadantes de cultivos con el anticuerpo anti GM-CSF no alteró la capacidad de esos sobrenadantes para estimular la explosión respiratoria. Se considera que el GM-CSF es un preactivador que sinergiza en esa acción con otros quimioatrayentes; también se ha observado que la incubación prolongada de los neutrófilos en presencia del GM-CSF induce positivamente la expresión de receptores de FMLP de baja afinidad concomitantemente con un incremento moderado en el metabolismo oxidativo (31).

El análisis de la expresión de las moléculas de adhesión L-selectina y CD11b sobre la superficie de los granulocitos no mostró diferencias significativas entre los pacientes con SHIEIR y los controles. Sin embargo, al analizar el comportamiento de los diferentes estímulos sobre la expresión de la L-selectina, se encontró que los sobrenadantes de pacientes y controles inducen una reducción significativa de la expresión de la L-selectina cuando se compara con la encontrada en condiciones basales, fenómeno sólo observado luego de la incubación con el PMA. Este efecto no se debió al GM-CSF, pues la incubación de los granulocitos con este factor no disminuyó significativamente la expresión de la L-selectina, además la incubación de las células con los sobrenadantes más el anticuerpo anti GM-CSF no mejoró significativamente la expresión observada en la incubación de las células con los sobrenadantes solos. Así mismo, previamente habíamos demostrado que el GM-CSF no tenía un efecto modulador importante sobre la expresión de la L-selectina (32). Se ha sugerido que la regulación negativa en la expresión de la L-selectina es un mecanismo fisiológico que se desencadena con la activación celular (33,34); así, la disminución significativa en la expresión de la L-selectina en los granulocitos del grupo de pacientes con SHIEIR puede explicarse por la combinación de una mayor respuesta a los factores activadores más la presencia de sustancias proinflamatorias presentes en los sobrenadantes de cultivo.

En conclusión, esta investigación permitió descartar en el SHIEIR una anomalía en la producción del GM-CSF y documentar por primera vez un aumento en la secreción de IL-5 en condiciones basales, hallazgo que amerita una investigación más profunda. No se detectaron otros defectos funcionales que comprometieran la actividad de las células fagocíticas; sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de otras investigaciones en este síndrome y considerando el tratamiento que desde años atrás recibían los pacientes evaluados de esta investigación, estos hallazgos sugieren que las alteraciones en las células fagocíticas informadas previamente podrían obedecer más a un estado de infección crónica. Estos resultados también pueden ayudar a sustentar los beneficios de realizar un estricto control de los pacientes con SHIEIR suministrando antibioticoterapia y vitamina C.

### Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia, del Banco de la República de Colombia y de Colciencias.

Los autores agradecen la valiosa colaboración de Fernando Montoya Maya en el análisis estadístico de los resultados.

### Referencias

- Buckley RH.** The hyper-IgE syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001;20:139-54.
- Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, et al.** Hyper-IgE syndrome with recurrent infections. An autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med* 1999;340:692-702.
- Buckley RH, Wray B, Belmaker E.** Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics* 1972;49:59-70.
- Geha RS, Leung DYM.** Hyper immunoglobulin E syndrome. *Immunodeficiency Reviews* 1989;1:155-172.
- Hill HR, Quie PG, Pabst HF, Ochs HD, Clark RA, Klebanoff SJ, et al.** Defect in neutrophil granulocyte chemotaxis in Job's syndrome of recurrent «cold» staphylococcal abscesses. *Lancet* 1974;II:617-9.
- Donabedian H, Gallin JI.** Mononuclear cells from patients with the hyperimmunoglobulin E-recurrent infection syndrome produce an inhibitor of leukocyte chemotaxis. *J Clin Invest* 1982;69:1155-63.
- Donabedian H, Gallin JI.** Two inhibitors of neutrophil chemotaxis are produced by hyperimmunoglobulin E-recurrent infection syndrome mononuclear cells exposed to heat-killed staphylococci. *Infect Immun* 1983;40:1030-7.
- Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM.** Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;13:93-100.
- Springer TA.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
- Vargas L, Patiño PJ, Rodríguez MF, Forero C, Montoya F, Montoya CJ, et al.** Increase in granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor secretion and the respiratory burst with decreased L-selectin expression in hyper-IgE syndrome patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:245-51.
- Nakayama N, Hatake K, Arai K, Yokota T.** Colony-stimulating factors, cytokines and hematopoiesis. *Curr Opin Immunol* 1989;2:68-77.
- Khwaja A, Carver J, Linch D.** Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood* 1992;79:745-53.
- Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
- Sanderson CJ.** Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79:3101-9.
- Bagley CJ, López AF, Vadas MA.** New frontiers for IL-5. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:725-8.
- WHO Scientific Group.** Primary immunodeficiency diseases. Report of a WHO scientific group. *Clin Exp Immunol* 1995;99:1-24.
- Yanai M, Quie PG.** Chemiluminescence by polymorphonuclear leucocytes adhering to surfaces. *Infect Immunol* 1981;32:1181-6.
- García de O D, Abramson J.** Simplified under-agarose method for measuring neutrophil chemotaxis. *J Infect Dis* 1983;147:1104.
- Rothe G, Valet G.** Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Meth Enzymol* 1994;233:539-48.
- Holland SM, Gallin JI.** Evaluation of the patient with recurrent bacterial infections. *Annu Rev Med* 1998;49:185-99.
- Vadas MA, López A.** Regulation of granulocyte function by colony stimulating factors. *Lymphokine Res* 1984;3:45-50.
- Fleishmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC.** Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria in human neutrophils. *Blood* 1986;68:708-11.

23. **Dranoff G, Crawford AD, Sadelian M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, *et al*.** Involvement of granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 1994;264:713-6.
24. **Klebanoff SJ.** Oxygen metabolites from phagocytes. En: Gallin JI, Goldstein M, Snyderman R, editores. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1992. p.541-88.
25. **Rodríguez MF, Patiño PJ, Montoya F, Montoya CJ, Sorensen RU, García de O D.** Interleukin 4 and interferon gamma secretion by antigen and mitogen-stimulated mononuclear cells in the hyper-IgE Syndrome: no TH-2 cytokine pattern. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81:443-7.
26. **Buckley RH.** Disorders of the IgE system. En: Stiehm RE, editor. *Immunologic disorders in infants and children*. 4th. ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. p.409-22.
27. **Boxer LA, Watanabe AM, Rister M, Besch HR, Allen J, Baehner RL.** Correction of leukocyte function in Chediak-Higashi syndrome by ascorbate. *N Engl J Med* 1976;295:1041-4.
28. **Goetzl EJ, Wasserman SI, Gigli I, Austen KI.** Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid. *J Clin Invest* 1974;53:813-8.
29. **Cehimi J, Elder M, Greene J, Noroski L, Stiehm ER, Winkelstein JA, *et al*.** Cytokine and chemokine dysregulation in hyper-IgE syndrome. *Clin Immunol* 2001;100:49-56.
30. **Vargas L, Patiño PJ, Montoya F, Vanegas AC, Echavarría A, García de O D.** A study of granulocyte respiratory burst in patients with allergic bronchial asthma. *Inflammation* 1998;22:45-54.
31. **Weisbart RH, Golde DW, Gasson JC.** Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-met-leu-phe-receptors. *J Immunol* 1986;137: 3584-7.
32. **Montoya CJ, Velilla PA, Martínez A, Olarte JC.** Modulación de la expresión de la L-selectina por agentes quimiotácticos y GM-CSF. *Biomédica* 2002;22:6-13.
33. **Mengelers HJ, Maikoe T, Hooibrink B, Kuypers TW, Kreukniet J, Lammers JW, *et al*.** Down modulation of L-selectin expression on eosinophils recovered from bronchoalveolar lavage fluid after allergen provocation. *Clin Exp Allergy* 1993;23:196-204.
34. **Tamatani T, Kitamura F, Kuida K, Shirao M, Mochizuki M, Suematsu M, *et al*.** Characterization of rat LECAM-1 (L-selectin) by the use of monoclonal antibodies and evidence for the presence of soluble LAECAM-1 in rat sera. *Eur J Immunol* 1993;23:2181-8.