

11262
2 of 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EFFECTO DE LA CLINDAMICINA SOBRE LA FUNCION
DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES

T E S I S
que para obtener el

GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

presenta

DR. ANTONIO HERIBERTO ARBO SOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE IGNACIO SANTOS PRECIADO

MEXICO, D.F.

FALLA DE ORIGEN

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PAGINA
I. INTRODUCCION.....	8
II. GENERALIDADES.....	10
III. EL EVENTO FAGOCITICO.....	16
A. Adherencia.....	16
B. Quimiotaxis.....	17
C. Opsonización y fagocitosis.....	20
D. Actividad bactericida.....	24
IV. ANTIBIOTICOS Y FUNCION DE PMNs.....	39
A. CLINDAMICINA.....	40
a. Captación intracelular de Clindamicina.....	44
b. Clindamicina y función de PMNs.....	46
1. Estudios in vitro.....	47
2. Estudios in vivo.....	51
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	53
VI. OBJETIVOS.....	55
VII. HIPOTESIS.....	56
VIII. MATERIAL Y METODOS.....	56
A. Obtención de PMNs.....	56
B. Captación de Clindamicina por los PMNs.....	58
C. Efecto in vitro de Clindamicina sobre la función de los PMNs.....	63
IX. ANALISIS ESTADISTICO.....	73
X. RESULTADOS.....	75
XI. DISCUSION.....	91

XII. CONCLUSIONES.....	98
XIII. RESUMEN.....	101
XIV. ANEXO.....	103
XV. REFERENCIAS.....	107

I. INTRODUCCION

A partir del año 1954, con la descripción de la Enfermedad Granulomatosa Fatal de la Infancia (enfermedad conocida actualmente como Enfermedad Granulomatosa Crónica) (1), y principalmente en los últimos 15 años, es cuando la sistematización en el estudio de la función de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y de los factores que participan en su regulación adquieren desarrollo intenso y continuo. En el presente se reconoce ampliamente que los PMNs constituyen células centrales entre los mecanismos de resistencia a las infecciones bacterianas, lo cual se evidencia por el incremento en la susceptibilidad a las infecciones en pacientes con alteraciones en su número o función (2).

Una vez desencadenado el proceso infeccioso, los PMNs desarrollan una secuencia de eventos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos en respuesta al estímulo inflamatorio. Cada uno de estos pasos puede hallarse afectado en forma particular o formando parte de un desarreglo más general de la función de las células fagocíticas, alteraciones que pueden presentarse en forma congénita o adquirida. Igualmente, numerosos factores endógenos o de naturaleza exógena pueden influir sobre la actividad de los PMNs. Entre los últimos se hallan diversos fármacos, los cuales al ser utilizados por el hombre, pueden ejercer efectos deletéreos (como los corticoides, los inmunosupresores en general) (3) o efectos beneficiosos (como el levamisol) (4) sobre su función. En este contexto están los antibióticos, los cuales a pesar de representar una de las más frecuentes prescripciones farmacológicas médicas, han recibido, sin embargo, escasa atención con respecto a su in-

teracción con las células fagocíticas, lo cual resulta sorprendente ya que al ser administrados necesariamente habrá exposición de estas a su acción. Por otra parte al dirigir ambos (PMNs y antibióticos) sus acciones contra el mismo blanco (el microorganismo), es deseable que no haya interferencias en las funciones de los neutrófilos por efecto del fármaco.

De ahí, que nos hemos propuesto evaluar el efecto de un antibiótico de la familia de las lincocinamidas, la clindamicina, de extensa utilización actual en el tratamiento de las infecciones por cocos Gram(+) y bacterias anaerobias, sobre la función de los PMNs, atendiendo que la información disponible a mas de ser escasa resulta sumamente contradictoria.

II. GENERALIDADES

El concepto de la importancia de las células fagocíticas en la defensa del hospedero contra las infecciones bacterianas es aceptado desde los estudios de Elie Metchnikoff hace más de 100 años. En experimentos con esponjas de mar, Metchnikoff observó que ciertas especies de hongos podían ser ingeridas y destruidas por los fagocitos; sin embargo, cuando las especies no eran matadas podían desencadenar enfermedad fatal(2). Metchnikoff planteó que las anomalías de las células fagocíticas actuaban comprometiendo las defensas del hospedero, hecho que fue ampliamente aceptado varias décadas más tarde al reconocerse el desarrollo frecuente de infecciones bacterianas y fúngicas fulminantes en casos de deficiencias cualitativas o cuantitativas de los neutrófilos polimorfonucleares.

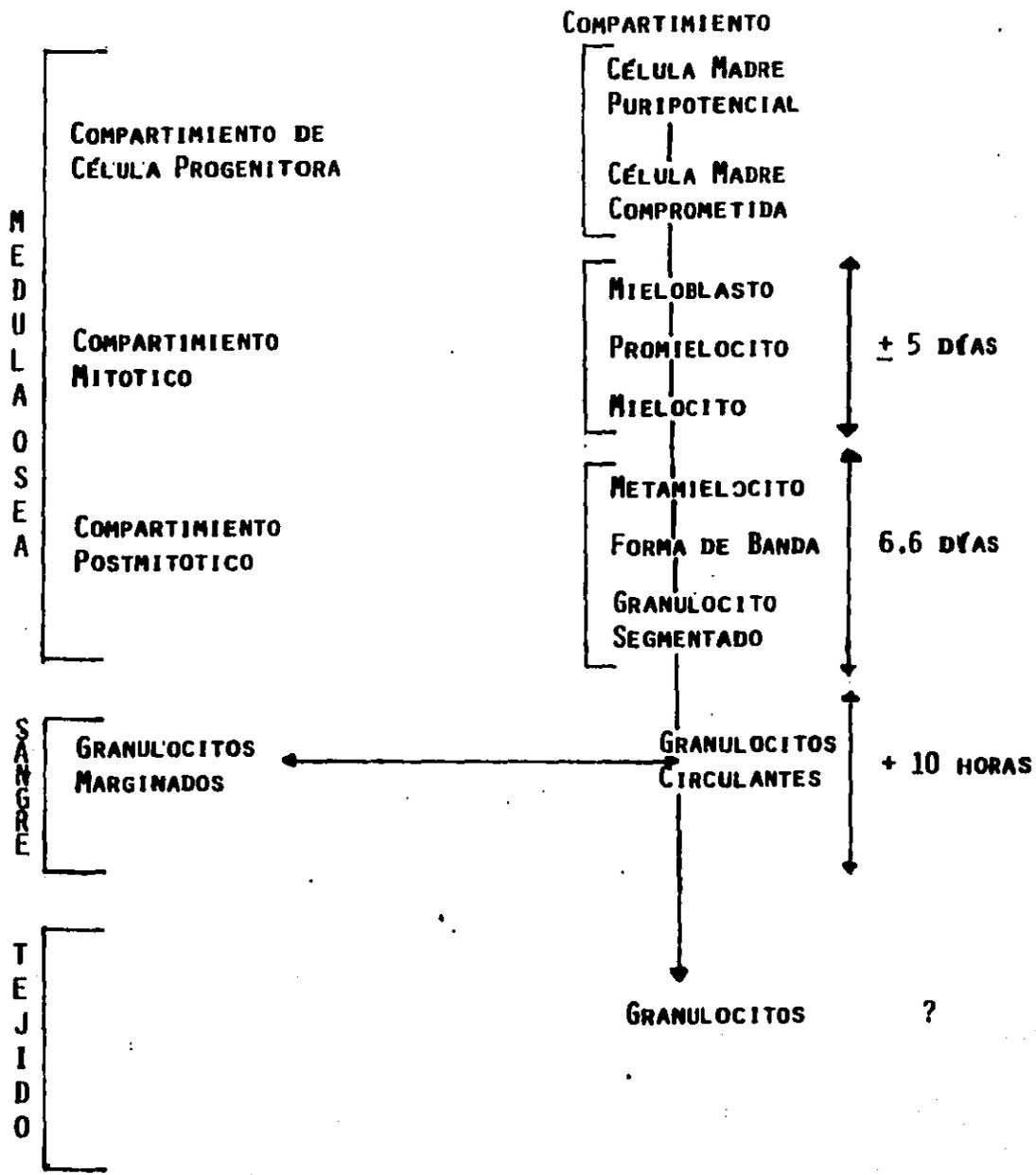
LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES(PMNs).

Los PMNs derivan de células hematopoiéticas pluripotenciales localizadas en la médula ósea; su producción se halla regulada principalmente por moléculas glicoproteicas denominadas colectivamente factores estimuladores de colonias (CSFs) (5), las cuales son producidas por macrófagos y linfocitos T activados (6). Otros factores también intervienen en su regulación como la lactoferrina neutrofilica (la cual inhibe la producción de PMNs a través de la inhibición de la producción y/o secreción de CSFs por macrófagos) y la prostaglandina E (PGE), la cual es producida por macrófagos e inhibe en forma directa la proliferación de las células madres hematopoiéticas(7).

Actualmente se hallan identificadas 4 CSFs en la especie humana: GM-CSF (CSF alfa, factor estimulador de granulocitos y macrófagos), la G-CSF (CSF beta, factor estimulador de granulocitos), CSF urinaria y la pluripoietina humana(5). La GM-CSF tiene 22000 dalton de PM, está constituida por 127 aminoácidos, incluyendo a 4 residuos de cisteína y ya ha sido clonada; la G-CSF, la cual estimula preferencialmente la formación de granulocitos a partir de las células progenitoras relativamente maduras (promielocitos y mielocitos), tiene aproximadamente 30000 dalton de PM, y aún no ha sido clonada ni purificada; la CSF urinaria fue la primera de estas glicoproteínas purificadas, tiene 45000 dalton de PM y ya ha sido clonada; aparentemente su efecto es indirecto estimulando la producción por las células adherentes de CSFs; y finalmente la pluripoietina humana, de 18000 dalton de PM tiene una combinación de las propiedades de la GM-CSF y G-CSF; aún no ha sido clonada(5).

Estas glicoproteínas, determinan la diferenciación de la célula madre común de granulocitos y monocitos (mieloblastos), ya sea hacia la línea monocítica o granulocítica. En este último caso, el desarrollo y maduración de neutrófilos ocurre en 2 fases, una fase mitótica y una no mitótica, cada una de las cuales dura aproximadamente 1 semana. Durante la primera, los mieloblastos maduran a promielocitos y mielocitos, proceso que se acompaña de la aparición de los característicos gránulos citoplasmáticos de los PMNs; la fase no mitótica, incluye el desarrollo posterior: metamielocitos, neutrófilos en banda (inmaduros), y neutrófilos segmentados (maduros) (6). Figura 1.

FIGURA 1. CINETICA DE MADURACION DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES
 ADAPTADO DE WALKER Y WILLENZE (6)



El proceso de maduración morfológica de los PMNs se acompaña de cambios antigénicos, enzimáticos y funcionales. Entre los cambios estructurales, la disminución del contenido de ácido siálico de las células, al disminuir la carga neta superficial de los granulocitos en desarrollo, intervendría en la liberación de PMNs de la médula ósea (8). La presencia de receptores Fc para el proceso de fagocitosis inmune es relativamente precoz, ya que aparecen en la etapa promielocítica, siendo funcionales en el caso de PMNs humanos poco tiempo después, a diferencia de PMNs murinos donde esta activación resulta retardada; los receptores del complemento (CR1 y CR3) aparecen más tardíamente (en la etapa metamielocítica y de neutrófilos en banda); el otro aspecto funcional crítico de los PMNs es la capacidad bactericida y se establece a partir de la etapa mielocítica, siendo mediada al principio casi exclusivamente por mecanismos no oxidativos; los mecanismos microbicidas oxidativos de los PMNs aparecen en la etapa de neutrófilos en banda. Finalmente, la función quimiotáctica de los PMNs es similarmente de aparición tardía durante la diferenciación funcional de los PMNs (formas en banda). Esta secuencia de diferenciación de PMNs (receptores Fc ----> fagocitosis ----> receptores del complemento ----> mecanismo microbicida no oxidativo ----> mecanismo microbicida oxidativo ----> quimiotaxis, se indica en la Figura 2(9).

El número de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) varía de acuerdo a la edad. Según PR Dallman(10), las cifras de los mismos en los diferentes grupos etarios serían (Tabla 1):

FIGURA 2. PROCESO DE MADURACION FUNCIONAL DE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES. ADAPTADO DE GLASSER Y FIEDERLEIN(9).

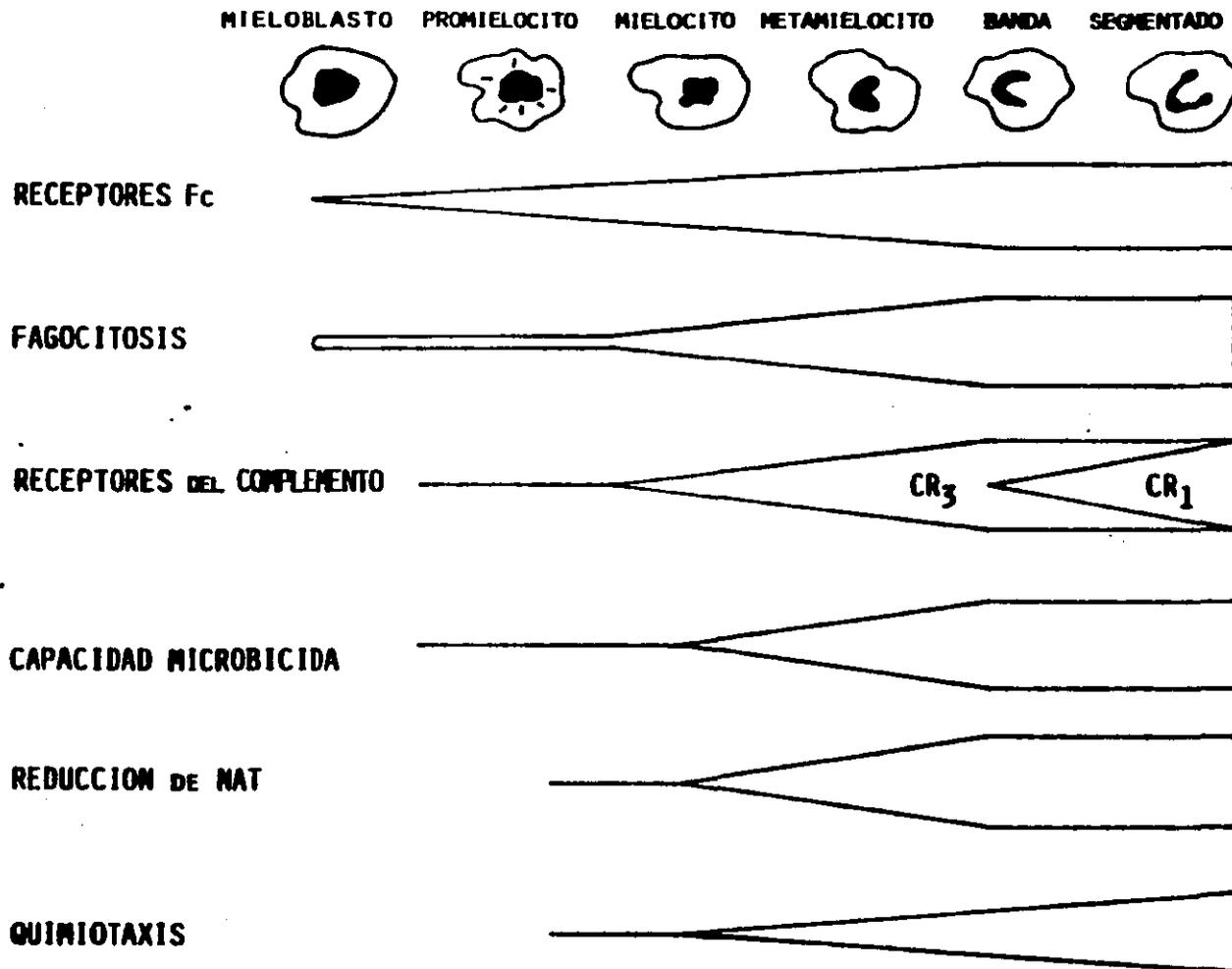


TABLA 1

NUMERO DE LEUCOCITOS TOTALES Y PMNs POR EDADES

EDAD	LEUCOCITOS totales(10^6)		PMNs(10^6)		%
	media	limites	media	limites	
Al nacer	18.1	(9.0-30.0)	11.0	(6.0-26.0)	61
12 hs.	22.8	(13.0-38.0)	15.5	(6.0-28.0)	68
24 hs.	18.9	(9.4-34.0)	11.5	(5.0-21.0)	61
1 sem.	12.2	(5.0-21.0)	5.5	(1.5-10.0)	45
2 sem.	11.4	(5.0-21.0)	4.5	(1.0-9.0)	40
1 mes	10.8	(5.0-19.5)	3.8	(1.0-9.0)	35
6 meses	11.9	(6.0-17.5)	3.8	(1.0-8.5)	32
1 año	11.4	(6.0-17.5)	3.5	(1.5-8.5)	31
2 años	10.6	(6.0-17.0)	3.5	(1.5-8.5)	33
4 años	9.1	(5.5-15.5)	3.8	(1.5-8.5)	42
6 años	8.5	(5.0-14.5)	4.3	(1.5-8.0)	51
8 años	8.3	(4.5-13.5)	4.4	(1.5-8.0)	53
10 años	8.1	(4.4-13.5)	4.4	(1.8-8.0)	54
16 años	7.8	(4.5-13.0)	4.4	(1.8-8.0)	57

 Tomado de PR Dallman(10).

La producción diaria de PMNs maduros es de 10^{11} células. El neutrófilo maduro circula con una vida media de 6 a 7 hs(11); sale al azar de la vasculatura y sobrevive en los tejidos o en contacto directo con el medio externo a nivel del aparato digestivo y respiratorio durante 1 a 4 días. En sangre periférica, el conjunto total de PMNs se halla constituido por dos poblaciones, una de células circulantes (de aproximadamente 22×10^7 células/kg) y otra de

células marginadas (de aproximadamente 17×10^7 células/kg) (12), las cuales probablemente tengan diferente capacidad funcional (13). Igualmente, a nivel de la médula ósea existe una tercera población de granulocitos maduros (reserva medular) los cuales son liberados en respuesta a estímulos inflamatorios o al stress (12).

III. EL EVENTO FAGOCITICO.

La invasión tisular por bacterias, hongos y otros microorganismos en general resulta en una secuencia de acontecimientos llevados a cabo por los PMNs—adherencia, quimiotaxis, internalización, puesta en marcha de los mecanismos microbicidas—destinados a la eventual destrucción del germen; el conjunto de estos eventos se ha denominado fagocitosis (14). Actualmente se cuentan con muy diversas técnicas laboratoriales, de diferentes grados de sofisticación, que permiten el análisis de los diferentes pasos del evento fagocítico; por otra parte cada una de estas etapas pueden hallarse afectadas, en variable grado de severidad, en forma congénita o adquirida, determinando una mayor susceptibilidad (en frecuencia y gravedad) a los procesos infecciosos en los hospederos afectados.

A. ADHERENCIA.

La migración de PMNs (descrita por M. Dutrochet) (2) y la adherencia al endotelio vascular—fenómeno informado por primera vez por J. Conheim (2)—constituyen los primeros pasos en el proceso fagocítico. En condiciones normales las cargas de superficie negativas de las células endoteliales y PMNs—característica general

de las células eucarióticas—tienden a impedir este fenómeno (15); sin embargo, la invasión bacteriana o la necrosis tisular inician la liberación de diversas sustancias, de las cuales algunas (factores quimiotácticos) causan una significativa disminución de las cargas de superficie de los PMNs, con el consecuente incremento de la adherencia vascular de los mismos (16). Este fenómeno de adherencia de los PMNs se halla parcialmente mediada por glicoproteínas de superficie que incluyen el receptor de C₃i (conocido como CR3), y las denominadas LFA-1 (factor de adherencia de linfocitos tipo 1) y p 150,95. Todas ellas se hallan estructuralmente constituidas por 2 subunidades (alfa y beta) de las cuales la segunda es común a las tres y posee un PM de 95000 dalton; la subunidad alfa, en cambio, es particular a cada una de ellas y su PM varía de 150000 a 180000 dalton (17). Las deficiencias de estas glicoproteínas se hallan asociadas a marcadas anormalidades en la función de adherencia de PMNs, pudiendo ser causa de mayor susceptibilidad a infecciones (18).

B. QUIMIOTAXIS.

Una vez adheridas al endotelio, las células fagocíticas deben migrar al sitio inflamatorio, donde sustancias quimioatrayentes son generadas por procesos inmunológicos o humorales (19). Factores quimiotácticos bien definidos incluyen C₅a, producto de la ruptura de C₅ durante la activación de la cascada del complemento ya sea por la vía clásica o alterna, el leucotrieno B₄, producto del metabolismo vía lipooxigenasa del ácido araquidónico, el factor activador plaquetario (PAF), varias linfocinas (producidas por linfocitos activados), productos de la síntesis proteica de bacte-

rias como los N-formilpéptidos(20).

Los PMNs son capaces de detectar y de migrar direccionalmente en respuesta a pequeños gradientes quimiotácticos. Se estima que estas células pueden diferenciar gradientes tan pequeños como del 0.1% a través de su superficie. Para tan sofisticada sensibilidad los PMNs tienen receptores de membrana específicos para los quimioatrayentes, los cuales sufren una exquisita regulación en cuanto a número, afinidad, o distribución durante el desarrollo quimiotáctico(21). En este sentido se ha postulado que durante el proceso de migración quimiotáctica(o por acción de agentes que inducen degranulación) se produce fusión de gránulos citoplasmáticos a la membrana plasmática(principalmente de gránulos específicos); esto puede representar uno de los mecanismos por el cual puede ocurrir el recambio de membrana plasmática y al mismo tiempo proveer de sitios receptores adicionales(22). Igualmente se ha demostrado que como consecuencia de la fusión antes descrita se liberan diversos productos leucocitarios al ambiente pericelular los que pueden dar lugar a la degradación de quimioatrayentes, lo cual aunado al aclaramiento de los mismos a nivel de los receptores ocupados(proceso de endocitosis de receptor unido a ligando), constituyen medios adicionales de regulación de la migración de PMNs al sitio inflamatorio(20).

La unión entre el quimioatrayente y su receptor a nivel de PMNs es en evento que ocurre rápidamente. Así, en menos de 30 segundos, concentraciones a saturación de N-formilpéptidos ocupan el 50% de los 50000 a 70000 receptores específicos disponibles de los PMNs(23). Esta unión produce perturbación de membrana y da lu-

gar al desencadenamiento de flujo intracelular de calcio y sodio, con la consiguiente hiperpolarización de membrana (primer hecho detectable) (20), e iniciación de una secuencia de pasos metabólicos que llevan a un reordenamiento de elementos del citoesqueleto para la orientación y migración de las células hacia el origen del gradiente quimiotáctico. Sneiderman y col. (24) propusieron que una vez que el quimioatrayente se une a su receptor, activa a la proteína reguladora de nucleótidos de guanina, denominada proteína N, por facilitación del intercambio de GDP por GTP. La proteína N activada estimula a su vez a la fosfolipasa C, la cual cataliza el desdoblamiento de fosfoinositol difosfato (PIP₂) en 2 segundos mensajeros intracelulares: el 1,2 diacilglicerol (DAG) y el inositoltrifosfato (IP₃). El IP₃ media la liberación de Ca²⁺ de los sitios de almacenamiento intracelular, (principalmente retículo endoplásmico); este aumento de los niveles del calcio libre citoplasmático actúa como cofactor para la activación de dos proteína-quinasas, la dependiente de Calmodulina/Calcio (PK-Ca²⁺/CM) y la proteína-quinasa C (PK-C). Esta última puede ser activada directamente además por DAG. Las proteínas-quinasas activadas catalizan finalmente la fosforilación de diferentes proteínas celulares, las que van a ser las efectoras de las respuestas celulares, no solo las involucradas en la migración sino también de las que intervienen en la generación de mecanismos microbicidas intracelulares. Simultáneamente a la activación celular, se inician otros procesos regulatorios. En este contexto, el aumento de Ca²⁺ activaría a la fosfolipasa A, la cual al actuar sobre fosfolípidos de membrana libera ácido araquidónico con la consecuente formación de metabolitos del mismo, ya por la vía de la ciclooxigenasa (tromboxanos

y prostaglandinas (Pg), predominantemente Pg E₂) o por la vía de la lipooxigenasa, generando a una amplia variedad de hidroperoxieico-tetraenoicos (HETE) entre los que se hallan los leucotrienos. La importancia de estos productos derivados de la lipooxigenación como constituyentes intracelulares funcionales es sugerido por el hecho que inhibidores de la lipooxigenación suprimen la migración de PMNs. Por otra parte, la movilización de Ca²⁺ desencadenada por el quimioatrayente conduce similarmente a un aumento de los niveles de AMP cíclico (probablemente a través de la inhibición de la fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos), el cual al activar a la proteína-quinasa dependiente de AMP cíclico (PK-A), promueve la inactivación de la fosfolipasa C, deteniéndose de esta forma la hidrólisis de PIP₂, interviniendo así como mecanismo regulador. Igualmente la PK-C, activada por 1,2 DAG, puede detener esta hidrólisis, pero actuando a nivel de la proteína N. Esta secuencia de activación y regulación se esquematizan en la figura 3.

C. OPSONIZACIÓN Y FAGOCITOSIS.

Una vez abandonado el lecho vascular y alcanzado el sitio inflamatorio, los PMNs deben ejercer sus funciones primarias de fagocitosis y muerte de los microorganismos ingeridos. Si bien los PMNs pueden-aunque en forma limitada-ingерir directamente partículas y microorganismos, existen ciertos factores que promueven o facilitan la ingestión de los mismos, operando a manera de ligando entre la célula fagocítica y la partícula o microorganismo, a los que Wright y Douglas (25) denominaron con el nombre de opsoninas (del griego opsono: preparar para ingerir); inicialmente definidos

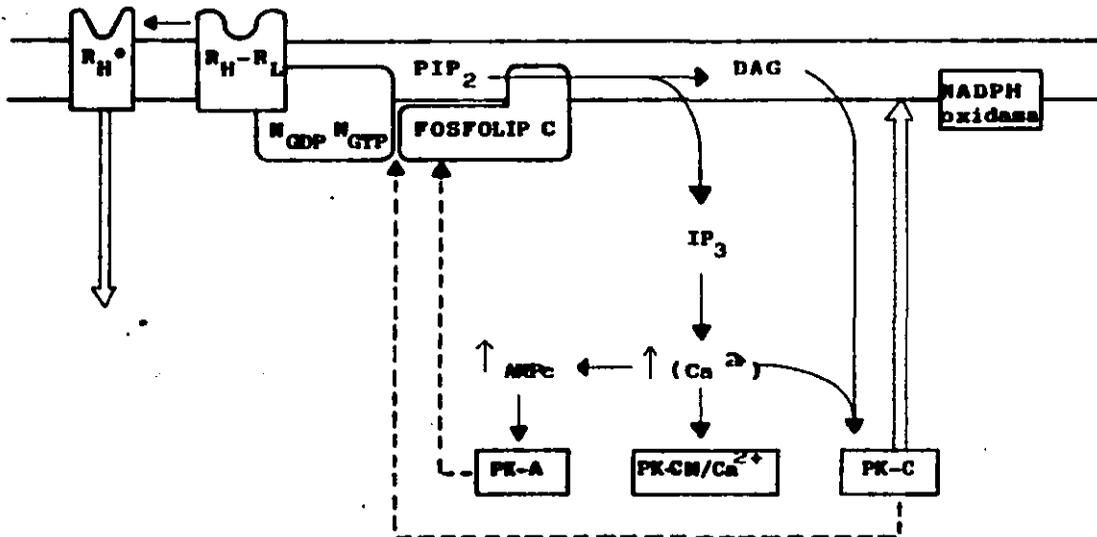


FIGURA 3. MODELO DE REGULACION DE LA RESPUESTA FAGOCITICA A QUIMIOATRAYENTES. R_H , R_L , R_H^* REPRESENTAN ESTADOS DE ALTA AFINIDAD REVERSIBLE, BAJA AFINIDAD Y ALTA AFINIDAD IRREVERSIBLE DEL RECEPTOR. \rightarrow REPRESENTA SEÑALES POSITIVAS. \dashrightarrow REPRESENTA SEÑALES NEGATIVAS. \uparrow REPRESENTA REDISTRIBUCION SUBCELULAR. ADAPTADO DE SNYDERMAN Y COL(24).

los componentes opsonicos del suero como termoestables y termolabiles, investigaciones posteriores revelaron que los mismos representaban a anticuerpos y complemento respectivamente.

De los anticuerpos, se ha definido que los que operan como opsoninas son principalmente las subclases de inmunoglobulinas de tipo IgG₁, IgG₂ e IgG₃ (25-26). En esta situación, los anticuerpos se combinan por su porción variable pero específica para el germen (Fab) con el microorganismo en tanto que la porción constante (Fc) de las inmunoglobulinas se adhiere a receptores específicos para los mismos presentes en la superficie de los fagocitos, formando de esta manera un puente entre la célula y el germen (27) (Figura 4). De los componentes del complemento, C₃ ha sido reconocido como una de las principales opsoninas de los mamíferos (28) y su activación puede realizarse mediante la participación de inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM (vía clásica) o bien por la vía alterna (29). Otras proteínas séricas pueden tener papel opsonico como la proteína C reactiva (30), la tuftsin (31) y la fibronectina (32), aunque con respecto a este último tal consideración ya no es aceptada por varios grupos de investigadores (33).

Los PMNs son denominados fagocitos profesionales debido a que poseen en su membrana receptores de naturaleza proteica para el dominio Fc de las inmunoglobulinas de tipo IgG (IgG₁ e IgG₃) (34) y receptores glicoproteicos para el tercer componente del complemento (35), tanto para el activado C₃ como a el producto de su desdoblamiento, C₃ bi. Son los denominados CR1 y CR3 respectivamente (36).

Las interacciones ligando-receptor son los determinantes críticos de la unión de la célula extraña, y por otra parte esencia-

les para la generación de las señales fagocíticas que inician el proceso de ingestión. Mientras los receptores Fc constitutivamente promueven la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG, desencadenando al mismo tiempo la síntesis y liberación de poderosos oxidantes (superóxidos, peróxidos de hidrógeno, oxhidrilos, singletes de oxígeno) (37), la capacidad de los receptores CR1 y CR3 de promover fagocitosis se halla regulada; a este respecto, se ha descrito que los receptores del complemento se hallan en 2 estados: un estado inactivo en el cual los receptores pueden mediar la adherencia de partículas a los fagocitos pero fallan en promover la ingestión, y un estado activo en el que además de la adherencia permiten la ingestión (36), pero a diferencia de los receptores Fc no desencadenan la liberación de oxidantes (38).

Una vez que el microorganismo opsonizado se adhiere al fagocito, produce la activación de la maquinaria de locomoción de membrana, mediante energía proporcionada por la vía anaerobia de la glicólisis (de ahí que la ingestión puede llevarse a cabo en condiciones anaerobias). El movimiento de pseudópodos alrededor de los microorganismos requiere de la actividad del aparato motor del PMN (filamentos de actina y miosina) (39). Durante este proceso de ingestión se va produciendo una interacción en cadena entre los ligandos opsónicos distribuidos homogéneamente sobre la superficie de la partícula a ser ingerida y los receptores de la membrana del fagocito, que da por resultado un flujo circunferencial de la membrana fagocítica alrededor de la partícula, envolviéndola a manera de cremallera (40). Al fusionarse los pseudópodos por encima del extremo distal de la partícula, queda completada el

proceso de ingestión, quedando la partícula ingerida en una vesícula membranosa (formada por la membrana plasmática invaginada durante la ingestión) y denominada fagosoma (41). Figura 5.

D. ACTIVIDAD BACTERICIDA.

Siguiendo a la ingestión (fagocitosis de microorganismos) una serie de distintos eventos ocurren dentro del PMN—que llevan finalmente a la destrucción microbiana— e incluyen: 1) la fusión de la membrana del fagosoma a los gránulos citoplasmáticos 2) la descarga del contenido granular en la vacuola fagocítica 3) desencadenamiento de la producción de oxidantes altamente reactivos (estallido respiratorio) 4) muerte y digestión del germen ingerido (42-44).

D 1. GRANULOS DE LOS PMNs.

Los PMNs contienen proteínas microbicidas que fueron sintetizadas y empaquetadas en vesículas limitadas por membranas (gránulos lisosómicos) durante el proceso de maduración de los PMNs en la médula ósea. Estos gránulos son: los gránulos primarios o azurófilos, (peroxidasa positivos) formados durante el estadio promielocítico y los gránulos secundarios o específicos, formados durante el mielocítico y responsables de la coloración rosada del citoplasma del PMN a la tinción de Wright. Un tercer tipo de gránulos — los gránulos terciarios— ha sido descrito, los cuales contienen gelatinasa, enzima que degrada la colágena desnaturalizada. El contenido de los diferentes tipos de gránulos se expresan en la tabla 2 (45).

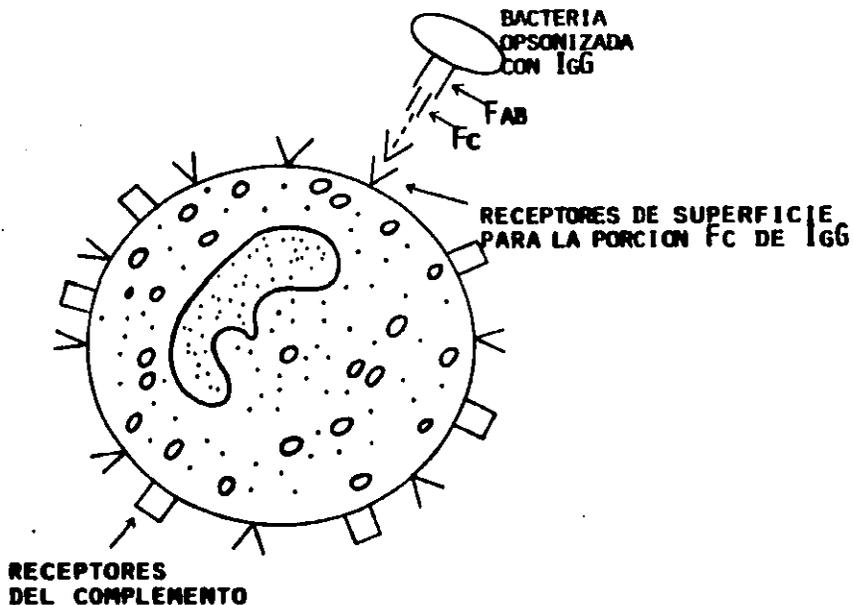


FIGURA 4. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE RECEPTORES SOBRE LA SUPERFICIE DE UN NEUTROFILO. ADAPTADO DE DRUTZ Y MILLS (27).

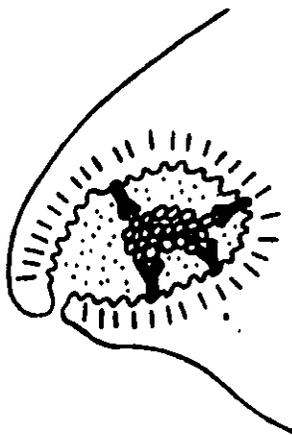


FIGURA 5. SECCION DE UN PMN QUE RODEA A UN RACIMO DE BACTERIAS OPSONIZADAS ENVOLVIENDOLAS A MANERA DE CREMALLERA.

ADAPTADO DE DRUTZ Y MILLS(27).

TABLA 2
CONTENIDO DE LOS GRANULOS DE LOS PMNs

CLASE DE CONTENIDO	GRANULOS AZUROFILOS	GRANULOS ESPECIFICOS
Enzimas microbidas	Mieloperoxidasa Lisozima	Lisozima
Serina-proteasas neutras	Elastasa Catapsina G Proteinasa 3	
Metaloproteinasas		Colagenasas
Hidrolasas ácidas.	N-acetil-B-glicosaminidasa Catapsina E Catapsina D B-glucuronidasa B-glicerofosfatasa α-mannosidasa	
Otras.	Proteinas catiónicas bacterianas (defensinas)	Lastoferrina Prot. de union B 12 Citoc.b Histamina-sa Receptores fmlp CR3

Adaptado de Fallon y Gallin (45).

El contenido de los gránulos secundarios y terciarios es preferencialmente liberado al ambiente pericelular (exocitosis) en respuesta a la fagocitosis, desempeñando de esta forma una función primariamente secretora y extracelular; al mismo tiempo, los gránulos secundarios a través de su fusión con la membrana plasmática, contribuyen al recambio, no solo de membrana, sino también de re-

ceptores, interviniendo de esta forma en la regulación de los fenómenos de agregación, migración, y estallido respiratorio. Los gránulos primarios, en cambio, a través de su fusión con los fagosomas—fusión fagolisosómica— y liberación de su contenido en la vacuola fagocítica intervienen fundamentalmente mediando y proporcionando los mecanismos microbicidas intracelulares de los PMNs (45-46).

D 2. MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS PMNs.

Los mecanismos microbicidas de los PMNs pueden ser divididos según su dependencia del oxígeno en oxidativos y no oxidativos. Tabla 3 (43).

TABLA 3

MECANISMOS MICROBICIDAS DE LOS PMNs.

1. Independientes del oxígeno.

- A. Acidez.
- B. Defensinas.
- C. Lisozima.
- D. Lactoferrina.
- E. Catepsina G.
- F. Elastasa.
- G. Proteína inductora de la permeabilidad.

2. Dependientes del oxígeno.

A. Mediado por mieloperoxidasa

B. Independiente de mieloperoxidasa

1. Peróxido de hidrógeno(H_2O_2).

2. Anión superóxido.

3. Radical hidroxilo.

4. Singlete de oxígeno.

Adaptado de Klebanoff(43).

El papel de los mecanismos microbicidas independientes de oxígeno adquiere importancia en condiciones en las cuales la concentración de O_2 disminuye a tal grado que se suprime el estallido respiratorio(anaerobiosis) o en trastornos en los que existen defectos en la producción de intermediarios de O_2 (Enfermedad Granomatosa Crónica, Deficiencia de mieloperoxidasa, Deficiencia de glutatión).

D 2 1. MECANISMOS MICROBICIDAS DEPENDIENTES DE OXIGENO.

Cuando los PMNs ingieren bacterias o partículas (o contactan con estímulos solubles como forbol-miristato, formilpéptidos), experimentan una serie coordinada de cambios en el metabolismo oxidativo denominados integralmente estallido respiratorio. Esta serie de eventos comprenden: 1) incremento del consumo de oxígeno 2) incremento en el flujo de glucosa a través de la vía del monofosfato de hexosa 3) incremento en la producción de metabolitos de oxígeno(anión superóxido, radical hidroxilo, singlete de oxígeno, peróxido de oxígeno) 4) incremento en la fijación de haluros a

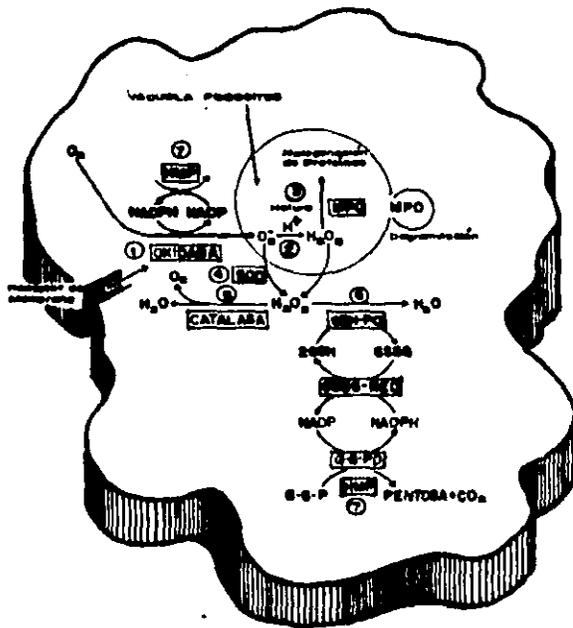


FIGURA 6. SUCESSION DE ACONTECIEMIENTOS QUE OCURREN DURANTE EL ESTALLIDO RESPIRATORIO.

HMS= CICLO DE HEXOSA MONOFOSFATO; MPO= MIELOPEROXIDASA;
 GSH= GLUTATIÓN REDUCIDO; GSSG= GLUTATIÓN OXIDADO; G-6-PD=
 GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA; G-6-P= GLUCOSA-6-FOSFATO.
 ADAPTADO DE ROOT Y COHEN (44). GENTILEZA NORMA GALINDO.

proteínas (ej. iodación) 5) generación de luz y 6) incremento en la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (figura 6) (44).

a. Consumo de oxígeno.

Los PMNs consumen poco oxígeno en reposo, derivando su energía principalmente de la glicólisis anaerobia. Durante la ingestión de partículas, el consumo de oxígeno incrementa marcadamente; su función es de proveer suficiente sustrato para la formación de metabolitos oxidativos participantes en el efecto microbicida de PMNs (59). La determinación del consumo de oxígeno de los PMNs durante el proceso fagocítico constituye por tanto una forma de evaluar la capacidad microbicida oxidativa de los PMNs (47).

b. Actividad de la vía del monofosfato de hexosa.

Paralelamente al mayor consumo de oxígeno, durante el estímulo fagocítico se produce en los PMNs un incremento en la oxidación de la glucosa por la vía del monofosfato de hexosa. A través del mismo, el primer carbono de la glucosa (glucosa-6-fosfato) es oxidado a CO_2 y pentosa por acción enzimática, actuando el fosfato de nicotinamidadinucleótido (NADP) -paso limitante de la reacción- como aceptor de electrones; en esta reacción se forman 2 moles de NADPH por cada mol de glucosa-6-fosfato oxidado, los cuales sufrirán translocación hasta la membrana celular del fagocito (48-49).

c. Formación de metabolitos del oxígeno.

Siguiendo a la interacción estímulo-PMN, y a la formación de la vacuola fagocítica, cuya membrana limitante es la resultante de

la invaginación de la membrana plasmática, una enzima de membrana-la NADPH oxidasa-es activada (50),catalizando la conversión de O_2 a anión superóxido(O_2^-) dentro de la vacuola fagocítica, utilizando a la NADPH como dador de electrones. El mecanismo de esta activación enzimática,aún cuando no se ha aclarado totalmente,se realizaría a través de la activación de la proteína-cinasa C (PK-C),paso final de una serie de eventos que se desarrollan tras la interacción ligando-receptor,a lo cual ya nos hemos referido previamente. Igualmente, esta activación de la NADPH oxidasa podría producirse en forma independiente a la participación de la PK-C a través de metabolitos del ácido araquidónico (51-52).

Debe mencionarse,que otros sistemas enzimáticos asociados a membrana se han propuesto que podrían actuar como catalizadores de la formación de anión superóxido(paso fundamental en el estallido respiratorio) (53-54).

El anión superóxido producido dentro de la vacuola fagocítica puede seguir varios caminos. Por una parte,puede liberarse al medio extracelular,fenómeno que puede detectarse laboratorialmente utilizando un sustrato que puede ser reducido como ferrocromocromo C(55);igualmente, O_2^- puede escaparse de la vacuola fagocítica al citoplasma donde es reducido a H_2O_2 por la enzima superóxido-dismutasa (SOD); capaces de causar daño autooxidativo de los PMNs,estos poseen un acabado sistema de detoxificación en el cual participan el glutatión,y las enzimas glutatión-peroxidasa y glutatión-reductasa; es la llamada via del glutatión(44,56).

El tercer camino que puede seguir el anión O_2^- ,el cual es de extraordinaria importancia para la función microbicida de los

PMNs es la dismutación espontánea, a favor del Ph Acido del fagocitoma, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo cual ocurre con aproximadamente el 80% del O_2^- generado durante la fagocitosis (57). En el transcurso de la reducción de O_2^- a H_2O_2 , se producen al mismo tiempo una substancial proporción de otros intermediarios inestables como radical hidroxilo (OH^\bullet), anión peróxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) - que rápidamente se reduce a OH^\bullet (50); además, Haber y Weiss presentaron evidencias de que O_2^- y H_2O_2 en solución pueden reaccionar para formar como productos OH^\bullet y una substancia altamente reactiva conocida como singlete de oxígeno, en presencia de metales catalíticos susceptibles de ser oxidados y reducidos como el hierro (43-44, 50). El singlete de oxígeno puede formarse igualmente por la reacción entre un ión hipohalito y H_2O_2 . En la tabla 4 se resumen las reacciones entre oxígeno, anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

TABLA 4
INTERRELACIONES ENTRE OXIGENO, SUPEROXIDO Y

PEROXIDO DE HIDROGENO	
1)	$\text{O}_2 \text{ ---- } \text{H}_2\text{O}_2$ Reducción divalente por oxidasas
2)	$\text{O}_2 \text{ ---- } \text{O}_2^-$ Reducción univalente por NADPH oxidasa
3)	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \text{ ---- } \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ Dismutación de O_2^-
4)	$\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ ---- } \text{OH}^\bullet + \text{O}_2 + \text{OH}^-$ Reacción de Haber-Weiss
5)	$\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \text{ ---- } \text{H}_2\text{O}_2$
6)	$\text{OH}^\bullet + \text{O}_2^- \text{ ---- } \text{O}_2 + \text{OH}^-$

Adaptado de Shepherd (58).

Sistema microbicida oxidativo mediado por mieloperoxidasa.

Otra vía de producción de especies oxidantes(59) y que representa el principal mecanismo oxidativo del cual dispone el PMN, es la producida por la interacción del H_2O_2 y la enzima mieloperoxidasa(MPO)(60). La enzima MPO es una hemoproteína altamente catiónica, rica en arginina, de un peso molecular de 120000 a 150000 dalton. Su pH de función óptima es de 5.0 a 5.5. Se halla localizada en los gránulos azurófilos en concentraciones de 3 a 5 $\mu g/10^6$ PMNs, representando aproximadamente el 5% de las proteínas totales de los PMNs (46). Difiere estructural y funcionalmente de las otras peroxidasas(peroxidasa eosinofílica, lactoperoxidasa).

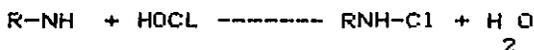
Siguiendo a la ingestión de microorganismos, la fusión fagolisosómica permite la formación de un complejo MPO- H_2O_2 por la reacción del H_2O_2 con el grupo Hem del MPO. Haluros(Cl_2^- , Br_2^- , I_2^-) pueden ser oxidados por este complejo, resultando en potentes agentes microbicidas que pueden atacar una gran variedad de patógenos y células, o bien montar respuestas oxidativas secundarias que perpetúan el fenómeno (43-44).

Se ha demostrado que la halogenación de constituyentes de la pared bacteriana(principalmente tirosina, histidina) por I_2^- o Cl_2^- , al producir reemplazamiento de H^+ en localizaciones cruciales, puede desencadenar la muerte bacteriana. Esta capacidad de los PMNs para halogenar proteínas se ha utilizado para cuantificar de manera indirecta la capacidad bactericida de los PMNs (método de iodinación de proteínas)(61). El I_2^- activado puede actuar también como oxidante de grupos sulfidrilos(SH), el cual es componente crítico de varios sistemas enzimáticos. El Cl_2^- activado por el

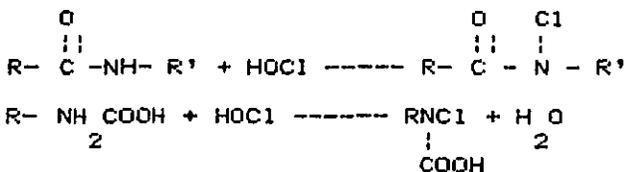
complejo $MPO-H_2O_2$ puede reaccionar con compuestos nitrogenados (aminoácidos, proteínas bacterianas) dando lugar a la formación de cloraminas o cloramidas altamente reactivas (figura 7)(44); estas pueden ser tóxicas per se para microorganismos al inhibir enzimas claves del metabolismo por daño oxidativo de grupos sulfidrilo u otros (como el residuo de metionina del inhibidor de la alfa 1-proteasa) de los cuales son dependientes para su actividad. Igualmente, las cloraminas y cloramidas pueden dar lugar a través de la deaminación o decarboxilación de aminoácidos a la formación de aldehídos tóxicos, los que actúan modificando gravemente a aminoácidos bacterianos estructurales o funcionales. Pueden, por otra parte, actuar como reservorio de agentes oxidantes ya que al hidrolizarse pueden regenerar H_2O_2 (cloruro activado) prolongando de esta forma la toxicidad del sistema H_2O_2 -MPO (44).

FIGURA 7

Formación de cloraminas



Formación de cloramidas



Adaptado de Root y Cohen(44).

d. Quimioluminiscencia.

Allen y col(62) demostraron que cuando PMNs fagocitaban microorganismos, se producía una súbita emisión de luz, y aunque en

pequeñas cantidades, se podía amplificar mediante la adición de determinadas sustancias y registrar con fotomultiplicadores sensibles como contadores de centelleo líquido. A este fenómeno se denominó Quimioluminiscencia y se observó que el mismo no se constataba en condiciones anaerobias o con PMNs provenientes de pacientes con trastornos genéticos del desencadenamiento del estallido respiratorio (Deficiencia de MPO, Enfermedad granulomatosa crónica) (63-64).

Inicialmente se consideró que la respuesta de quimioluminiscencia era consecuencia directa de la generación de $O_2^{\cdot -}$ durante la fagocitosis debido a que el fenómeno era inhibido en presencia de la enzima superóxidodismutasa (65). Sin embargo, al reconocerse que el anión superóxido desempeña el papel central como precursor de los metabolitos oxidativos del oxígeno y comprobarse que su degradación enzimática solo inhibe el 70% de la luz generada, se plantearon hipótesis alternativas.

Actualmente se considera que el fenómeno luminiscente es secundaria a la generación de las diversas especies oxidativas electrónicamente excitadas, que se producen durante la actividad microbicida de los PMNs, aún cuando no existe unanimidad en cuanto a la especie causal principal. Allen y col (66) han postulado que la generación de $O_2^{\cdot -}$ lleva a la formación del singlete de oxígeno, ya sea en forma directa por dismutación espontánea no enzimática en presencia del ión hidrógeno o en forma indirecta como producto del sistema $MPO-H_2O_2$ -haluro. El singlete de oxígeno, sustancia altamente inestable, puede a su vez mediar reacciones de oxidación sobre otros sustratos, con formación secundaria, entre otros, de

grupos carbonilos electrónicamente excitados. El paso al estado de reposo del singlete de oxígeno y de sus productos de oxidación, trae por consecuencia emisión de luz, como mecanismo de pérdida de energía.

Chesson y col(67), en cambio, consideran que la quimioluminiscencia no depende primariamente de la relajación del singlete de oxígeno (en forma directa ni indirecta). Asumen esta conclusión en base a experimentos en los que estimularon a los PMNs con agentes no particulados (con fluoruro de sodio) observando que en esta situación, a pesar de generarse $\overset{-}{O}_2$ y H_2O_2 (en consecuencia singlete de oxígeno) no se producía emisión de luz. Este grupo propuso que para que se desencadene la quimioluminiscencia de PMNs se requiere de la presencia de agentes particulados y su generación sería secundaria a reacciones entre constituyentes (no especificaron) de estos últimos y metabolitos oxidativos del PMN (O_2 , H_2O_2 , OH^{\cdot}). Esta propuesta ya no es aceptada al demostrarse que otros factores solubles, como formilpéptidos, pueden desencadenar emisión de luz por los PMNs(68).

Cheung y col(69) lograron suprimir totalmente la generación de luz por PMNs estimulados con zimosano adicionando inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico (AA) a la mezcla fagocítica. En base a sus observaciones propusieron que al producirse la perturbación de membrana en el desarrollo del evento fagocítico, se libera AA de los fosfolípidos de membrana (por acción de la fosfolipasa A activada) los que sufren oxidación por las vías de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Metabolitos de ambas vías serían finalmente los responsables de la emisión de luz. Las especies oxidativas derivadas del oxígeno intervendrían en el

proceso facilitando la oxidación del AA. El incremento de la concentración intracelular de AMP cíclico secundaria a la generación de prostaglandinas sugiere la proposición de este grupo sería responsable de una retroalimentación negativa una vez desencadenado el fenómeno. Sostienen que la ausencia de quimioluminiscencia cuando los PMNs son estimulados con fluoruro de sodio se explicaría por su efecto activador de la adenilciclase y consiguientemente de AMP cíclico.

La medición de la quimioluminiscencia de PMNs ha contribuido al mejor conocimiento de la función del PMN y de sus alteraciones. La sensibilidad del método y su facilidad operativa (utilización de menor número de células, falta de necesidad de ambiente oscuro durante la realización del ensayo) se incrementó con la adición de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) a la mezcla fagocítica como amplificador lumínico (70), el cual sirve como sustrato de metabolitos oxidativos generados en la respuesta fagocítica. Su oxidación da origen al anión aminoftalato excitado, que al pasar al estado de reposo emite luz (como mecanismo de pérdida de energía) magnificando así el fenómeno luminescente. Aún cuando su mecanismo de generación no se ha aclarado totalmente, la determinación de la quimioluminiscencia está ampliamente aceptada por la comunidad científica como una metodología muy sensible de la medición de la capacidad fagocítica e integridad del estallido respiratorio de las células fagocíticas (63-64,71).

f. Reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT).

El nitroazul de tetrazolio es un colorante amarillo en su

forma oxidada y puede actuar como aceptor de electrones de una variedad de donadores(72). Al reducirse,precipita formando forma-zán de color azul.Cuando PMNs son incubados con el NAT,un pequeño porcentaje de células exhiben el colorante fagocitado y reducido (generalmente menor del 10%). Sin embargo,cuando se adiciona un estímulo fagocítico,el porcentaje de células que reducen NAT aumenta dramáticamente(a más del 80%).Esta reducción es secundaria a la generación de metabolitos oxidativos en respuesta al estímulo fagocítico(73).Aunque varios componentes del metabolismo oxidativo de los PMNs pueden catalizar esta reducción, se considera que el principal responsable es al anión superóxido.En apoyo a este concepto,el fenómeno es principalmente inhibido por la superóxidodismutasa (74).

La reducción del nitroazul de tetrazolio se utiliza extensamente como prueba de escrutinio en la evaluación laboratorial de pacientes con sospecha de trastornos en la capacidad fagocítica y bactericida de los células fagocíticas (75).

Hemos revisado los diferentes eventos desarrollados (y resultados) por los PMNs que conducen finalmente a la fagocitosis y eventual muerte de los microorganismos. Es la indemnidad de los diferentes pasos de esta función efectora la que determinará el éxito de los PMNs como primera línea de defensa contra las infecciones bacterianas.

IV. ANTIBIOTICOS Y FUNCION DE PMNs

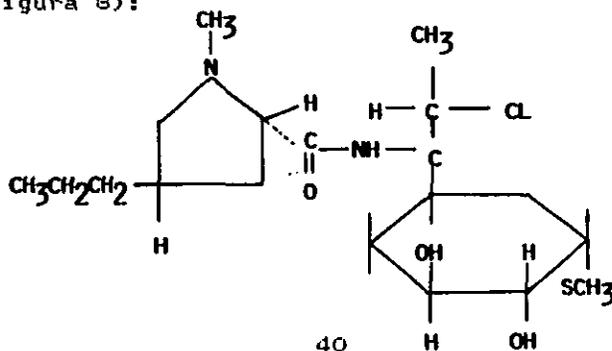
Uno de los mas importantes avances en el campo de la interacción Hospedero-Parásito, ha constituido el desarrollo y aplicación de los fármacos antimicrobianos, y en especial de los antibióticos, cuya introducción ha tenido un impacto dramático en las tasa de morbi-mortalidad de muchas enfermedades infecciosas (76). Durante el tratamiento antimicrobiano, inevitablemente el fármaco interaccionará con los diferentes componentes del huésped participantes del proceso inflamatorio, entre ellos los PMNs (77). Si bien en este contexto, la eficacia del tratamiento dependerá principalmente del antibiótico usado contra el agente microbiano, factores de defensa del hospedero contribuyen definitivamente a la erradicación del proceso infeccioso. Ejemplo de esto último es que pacientes inmunocomprometidos, entre ellos los que presentan trastornos, congénitos o adquiridos, del número o función de los neutrófilos polimorfonucleares, presentan mayor morbimortalidad infecciosa (78-79).

Los antibióticos, según su capacidad de penetración y concentración intracelular, estructura química, mecanismo de acción, dosis y sensibilidad individual, tienen la probabilidad de afectar la función de los PMNs. Una de las primeras investigaciones en este sentido se remonta al año 1950 cuando Muñoz y Geister (80), estudiaron el efecto de una tetraciclina sobre la función fagocítica de los PMNs y observaron que podía inhibir marcadamente la fagocitosis de Staphylococcus albus in vitro. Desde entonces, las investigaciones de los efectos de fármacos antimicrobianos sobre la función de PMNs, aunque de creciente interés, ha sido comparativa-

mente escasa y fundamentalmente desordenada debido a que los métodos utilizados en la evaluación han sido extremadamente variables (función específica estudiada con diferentes técnicas metodológicas, número de células utilizadas, diferentes tiempos de incubación, concentración variable de antibióticos y generalmente utilizada en cantidades no alcanzables terapéuticamente); esto ha hecho, que los resultados reportados hayan sido extremadamente variables y conflictivos; por otra parte, la mayor parte de los estudios fueron observacionales y poco esfuerzo se ha hecho para intentar dilucidar los mecanismos de producción de tales efectos (2). En este contexto nos hemos propuesto evaluar el efecto de una lincosinamida, la clindamicina, sobre la función de los neutrófilos polimorfonucleares.

IV A. CLINDAMICINA

La clindamicina es un fármaco antibiótico semisintético, derivado de la lincomicina, sustancia producida por Streptomyces lincolnensis. Varias modificaciones químicas de esta molécula han conducido a su obtención (81). Estructuralmente es un aminoazúcar, derivado de un aminoácido, el ácido trans-L-4-n-propilpirrolidino, unido a una octosa que contiene azufre (82). Su fórmula es la siguiente (figura 8):



Desde el punto de vista de su mecanismo de acción, clindamicina inhibe la síntesis proteica bacteriana, actuando específicamente sobre la subunidad 50 S, afectando el proceso de iniciación de la síntesis de la cadena peptídica (83). Su espectro antibacteriano incluye cocos Gram(+), como Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus viridans; prácticamente todas las bacterias Gram(-) aerobias son resistentes; sin embargo, las bacterias anaerobias son habitualmente sensibles a clindamicina, siendo los aislamientos resistentes poco frecuentes; algunos protozoarios son igualmente sensibles a clindamicina, como Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Toxoplasma gondii (84).

Este fármaco es biodisponible tanto por vía oral como por vía parenteral. Administrado por vía oral se absorbe en un 60%, alcanza su pico de nivel sérico a las 1 a 2 hs pos-ingesta y la presencia de alimentos no afecta significativamente su absorción. Así, tras una dosis de 150mg, se obtiene un pico sérico de 2.5 a 3 ug/ml, y de 4 a 8 ug/ml, cuando se utilizan dosis de 300 a 600 mg (85-86). Por vía I.V., los niveles séricos son mayores y son alcanzados más rápidamente; la infusión endovenosa de 300 mg de clindamicina resulta en un pico sérico de 14.7 ug/ml a los 30 min el cual cae a 4.9 ug a las 2 a 4 hs. Por vía intramuscular, igualmente se obtienen niveles séricos satisfactorios (84). Las lincosinamidas se hallan en suero parcialmente unidas a proteínas en un porcentaje que varía del 5 al 60% (84).

Se metaboliza principalmente a nivel hepático, y sus metabolitos activos (N-dimetil clindamicina y sulfóxido de clindamicina) e inactivos son excretados por orina. Igualmente puede excretarse

sin metabolizarse por orina el 2.6 a 10% de una dosis administrada por vía oral y 30% cuando es administrado por vía parenteral. Por vía biliar e intestinal se excretan en proporción variable, del 5 al 15% (85).

Una vez administrada, clindamicina se distribuye ampliamente a nivel tisular, incluyendo líquido pleural y peritoneal. A nivel del líquido cefalorraquídeo no se alcanzan concentraciones terapéuticas, en cambio en bilis, tejido óseo, saliva y esputo las concentraciones alcanzadas son óptimas. Las lincosinamidas en general, atraviesan la placenta y pueden encontrarse en la leche materna en niveles comparables a los séricos maternos (84).

La utilización terapéutica de clindamicina puede acompañarse, en algunos casos, de efectos indeseables. Molestias gastrointestinales como sabor metálico, náuseas, vómitos se han reportado ocasionalmente al igual que leves anomalías (laboratoriales) del funcionamiento hepático. Raramente se ha informado ictericia y reacciones de hipersensibilidad (exantema, síndrome de Stevens-Johnson, anafilaxia, neutropenia) (86). Sin embargo, el efecto colateral más importante y reconocido del uso de clindamicina es la colitis pseudomembranosa (87), la cual es una enfermedad gastrointestinal severa que se presenta entre los 2 y 25 días del inicio del tratamiento y se caracteriza por fiebre, diarrea con sangre, dolor abdominal en los cuadrantes inferiores, constatándose endoscópicamente una mucosa colónica edematosa, friable con exulceraciones (en algunos casos hasta ulceraciones) recubiertas por membranas amarillentas formadas por la conglutinación de fibrina, mucus, células epiteliales descamadas e inflamatorias. Complicaciones ma-

yores de este cuadro son la deshidratación grave, hipoalbuminemia, colon tóxico, perforación intestinal y choque endotóxico. Se considera que es secundaria a la masiva colonización intestinal por Clostridium difficile productor de toxina citopática (88). Debe tenerse en cuenta que este mismo cuadro puede asociarse a otros antibióticos (de ahí el nombre de colitis asociada a antibióticos) como a alteraciones obstructivas intestinales.

Clindamicina, además de inhibir el crecimiento o causar la muerte microbiana, puede ejercer diversas acciones sobre microorganismos (incluso aquellos resistentes a su efecto antibiótico) así como sobre los diferentes componentes del sistema de defensa del hospedero, y entre ellas las células fagocíticas. Gemmell y col (89-90) reportaron que gérmenes del género Streptococcus (principalmente Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae y en menor medida Streptococcus del grupo B) expuestos a concentraciones subinhibitorias de clindamicina, se vuelven mas susceptibles a la fagocitosis por PMNs, probablemente por cambios en la estructura de la pared bacteriana por el antibiótico (disminución de la proteína M del Streptococcus pyogenes, disminución del material capsular de Streptococcus pneumoniae y del Streptococcus del grupo B), haciendolos mas susceptibles a la opsonización. Este mismo efecto (potenciación de la fagocitosis por alteraciones de la pared bacteriana) se ha observado incubando Bacteroides fragilis (91-92), Staphylococcus aureus (93), Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae y Proteus mirabilis (94), con concentraciones subinhibitorias de clindamicina.

El aspecto de la acción no antibiótica de la clindamicina—la interacción con las células fagocíticas—adquiere gran importancia

por ser estas células componentes cruciales del sistema de defensa del hospedero contra las infecciones bacterianas. Varios grupos de investigadores se han ocupado de este tema y a las observaciones reportadas en este terreno nos referiremos a continuación.

IV A a. CAPTACION DE CLINDAMICINA POR LAS CELULAS FAGOCITICAS

La capacidad de un fármaco de penetrar dentro de la célula fagocítica puede constituirse en uno de los factores determinantes de su eficacia terapéutica (por ej. en infecciones por gérmenes intracelulares). Existen reportes referentes a este hecho en los que se evaluó la captación de clindamicina por las células fagocíticas. Así, Hand y King-Thompson (95), estudiaron la captación de clindamicina por macrófagos alveolares de conejo. Incubaron ⁷ 10/ml de macrófagos alveolares con 10 ug de clindamicina tritiada y observaron que el fármaco era activamente captado (dependía de energía), alcanzando su meseta a los 30 minutos de incubación, momento en el cual la relación entre concentración intra y extracelular era de 40 o más. Esta captación requería de viabilidad celular y era inhibida a 4 grados centígrados, siendo óptima a 37 grados. Posteriormente se constató que inhibidores del sistema enzimático Na-K ATPasa (ej. ouabaina) y del metabolismo oxidativo mitocondrial (ej. cianuro, 2,4-dinitrofenol) deprimían la penetración intracelular indicando que la energía para el transporte proviene en parte de la respiración oxidativa mitocondrial, y en parte de la actividad del sistema Na-K ATPasa. Por otra parte, la captación de clindamicina disminuía marcadamente en presencia

de nucleósidos como adenosina, puronomicina, pero no en presencia de aminoácidos o hexosas en exceso; basado en el conocimiento previo que los macrófagos alveolares poseen sistemas de transportes específicos para hexosas, aminoácidos y nucleósidos, propusieron que clindamicina era transportada en estas células por el mismo sistema de nucleósidos. Sin embargo, todas estas observaciones se basaron en estudios en los que se utilizó concentraciones de clindamicina no alcanzables durante su utilización terapéutica (200 a 425 ug/ml, hasta 100 veces el rango normal).

Klempner y Styrt (96) evaluaron la captación de clindamicina por PMNs humanos, incubando 10^7 /ml de neutrófilos con 10 ug del fármaco. Constataron captación intracelular de clindamicina, de carácter rápido (evidenciable ya a los 30 seg), saturable, óptima a 37 grados centígrados, alcanzando su pico entre los 5 y 10 min, momento en el cual la relación entre concentraciones intra y extracelular es de aproximadamente 43 veces. Con respecto al mecanismo de transporte hallaron que adicionando sustancias que colapsan el gradiente de Ph (potencial) transmembrana (como carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona) se producía una significativa depresión de la captación; esto implicaba que clindamicina era transportada de áreas de mayor a menor Ph, favoreciendo no solo su concentración intracelular, sino también su eventual concentración en lisosomas (zona de mayor acidez intracelular) (97).

Hand y Prokesch (98) trabajando igualmente con PMNs humanos, incubaron 10^7 /ml neutrófilos con 10 a 13 ug/ml de clindamicina; observaron que el fármaco penetraba rápidamente en los PMNs, era dependiente de la viabilidad celular y óptima a 37 grados, alcanzan-

do el pico de concentración a los 10 minutos y su meseta a los 30 min. Sin embargo el índice de concentración reportado fue menor a lo informado por Klempner(C IN/Ex=10). A diferencia de sus estudios con macrófagos alveolares, observaron que la penetración, si bien era similarmente dependiente de energía, esta provenía principalmente de la glicólisis y no del metabolismo oxidativo mitocondrial.

Recientemente, Jacobs y Thompson(99), también utilizando PMNs humanos, obtuvieron similares resultados en cuanto a penetración intracelular de clindamicina; por otra parte, el índice de concentración reportado fue mucho menor al de los autores anteriores (C In/Ex de 2.95 a los 30 min y de 3.4 a los 120 min.). Sin embargo, hubo diferencias substanciales en cuanto al número de células utilizadas, ya que emplearon 5×10^6 /ml de PMNs (una proporción más relacionada al número de neutrófilos por ml de sangre), pero no especificaron la concentración de clindamicina con la que realizaron sus observaciones.

De esta manera podemos concluir que todos los grupos coinciden en que clindamicina es un fármaco que penetra y se concentra en PMNs humanos. Sin embargo, la proporción de tal concentración es variable, dependiendo de las condiciones empleadas durante su estudio. Debe destacarse, que todas las observaciones adolecen del defecto fundamental de no haber considerado las concentraciones séricas habituales de clindamicina durante su uso terapéutico (0.5 a 5 ug por ml).

IV A b. CLINDAMICINA Y SU EFECTO SOBRE LA FUNCION DE LOS PMNs.

El estudio del efecto de clindamicina sobre la función de los

PMNs principia en 1976, seis años después de que se haya aprobado su utilización en humanos(100). Varios grupos han valorado su acción sobre diferentes aspectos del evento fagocítico. Como podrá comprobarse las observaciones se han realizado, en términos generales, siguiendo diferentes metodologías y con diferentes variables farmacológicas, para evaluar un mismo aspecto funcional.

Pasaremos revista de lo reportado en la literatura tanto con respecto a estudios in vitro como in vivo.

IV A c. ESTUDIOS IN VITRO.

1. Clindamicina y quimiotaxis de PMNs.

Majeski y col(101) evaluaron el efecto de varios antibióticos, incluyendo clindamicina, sobre la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos. Realizaron sus ensayos utilizando la cámara de Boyden para quimiotaxis y suero en caseína como quimioatrayente, adicionando los antibióticos tanto a las células como al quimioatrayente—es decir todo el procedimiento se realizó en presencia del antibiótico—; las lecturas se realizaron tras un tiempo de incubación de 2 hs. No observaron modificación de la quimiotaxis de los PMNs en presencia de 1, 10 o 100ug/ml de clindamicina, pero 1000 ug/ml de este fármaco produjo un efecto estimulatorio.

Oleske y col(102) estudiaron este mismo aspecto de la función de los PMNs y su relación con antibióticos, incluyendo clindamicina. Para tal fin, utilizaron el método de migración en agarosa y suero activado por zimosano como quimioatrayente. Los antibióticos se adicionaron a las células 30 minutos antes del ensayo, en una

concentración 10 veces el pico de la concentración sérica (en el caso de clindamicina entre 20 y 140 ug/ml) y no se procedió a lavarlas antes del ensayo. Las lecturas se realizaron tras un tiempo de incubación de 3 hs. Estos autores informaron incremento en la quimiotaxis de los neutrófilos por efecto de la clindamicina.

Scevola y col(103), evaluaron igualmente la capacidad migratoria de los PMNs y la eventual modulación de la misma por clindamicina utilizando el método de la cámara de Boyden y albúmina sérica bovina(??) como quimioatrayente; las lecturas se realizaron tras 60 min de incubación, no encontrando modificación de la migración de los PMNs cuando el fármaco fue utilizado a concentraciones de 1 y 5 ug/ml e inhibición de la leucotaxis a 10ug/ml. No especificaron si realizaron incubación previa de los PMNs con clindamicina, lavado de las células etc.

2. Clindamicina y capacidad fagocítica de los PMNs.

Varias metodologías se utilizaron para evaluar la capacidad fagocítica de los PMNs y el efecto sobre la misma de clindamicina.

Algunos emplearon la quimioluminiscencia, la cual permite la medición de la actividad metabólica oxidativa de los PMNs a través de la luz emitida por los metabolitos reactivos generados durante el proceso fagocítico al pasar al estado de reposo y perder energía en forma de luz.

Welch y col(104) utilizaron esta última metodología, incubando ⁵ 5X10 PMNs humanos y zimosano como partícula a fagocitar, adicionando 20 ug de clindamicina a la mezcla fagocítica. No observaron ningún efecto sobre la quimioluminiscencia de los PMNs. Resultados

similares utilizando esta misma metodología fueron reportados por Siegel y Remington(105),utilizando clindamicina a una concentración de 25 ug,por Faden(106) utilizando a una concentración de 40 ug en la mezcla fagocítica,y por Liembert y col(107);este grupo a diferencia de los anteriores empleó para sus estudios PMNs de cobayo.

Conclusiones diferentes a los grupos anteriores al utilizar la quimioluminiscencia como método para evaluar el efecto de clindamicina sobre los PMNs fueron obtenidas por Oleske y col (102). Incubaron 1×10^6 /ml de neutrófilos con una concentración de clindamicina 10 veces mayor de su pico sérico (entre 20 y 140 ug) 30 min antes del procedimiento y no lavaron las células pos-incubación;utilizaron zimosano como partícula a fagocitar y constataron incremento significativo de la quimioluminiscencia de los PMNs.

Finalmente,Scevola y col(103),procedieron a evaluar la actividad fagocítica oxidativa por quimioluminiscencia.Emplearon para sus ensayos 1×10^6 /ml de PMNs y clindamicina a una concentración de 1,5 y 10 ug.No especificaron si se procedió a incubación previa de las células con el fármaco.Observaron que clindamicina a una concentración de 1 y 5 ug,pero no de 10 ug,producen incremento de la quimioluminiscencia de los PMNs.

Por tanto,si bien varios grupos evaluaron el efecto de clindamicina sobre la capacidad fagocítica de los PMNs, medida por quimioluminiscencia,todos-a excepción de Scevola y col- utilizaron concentraciones no alcanzables durante su uso terapéutico.

La evaluación de la capacidad fagocítica por medición del número de partículas ingeridas por los PMNs fue utilizado por algu-

nos para evidenciar efecto de clindamicina sobre los PMNs. En este contexto, Welch y col(104) utilizando levaduras de Saccharomyces cerevisiae como partícula a fagocitar, con tinción diferencial con azul de metileno, y adicionando clindamicina a 20 ug/ml, no observaron ninguna modificación al igual que Scevola y col(103) quienes utilizaron Staphylococcus aureus como partícula y clindamicina a concentraciones de 1,5 y 10 ug.

3. Clindamicina y capacidad microbicida de los PMNs.

La medición del número de gérmenes viables pos-incubación con neutrófilos, ha sido empleada por otros como metodología evaluativa del efecto de clindamicina sobre la capacidad microbicida de los PMNs. Welch y col(104), ya mencionado, con esta metodología y utilizando 2×10^5 PMNs, levaduras de Streptomyces cerevisiae y 20ug de clindamicina en la mezcla fagocítica, tras 30 min de incubación, no observaron diferencias en cuanto al número de levaduras viables pos-incubación comparándolas con mezclas control sin el fármaco. Pickering y col(108), midieron la capacidad microbicida de los PMNs frente a Escherichia coli; adicionaron 10ug de clindamicina, utilizando 60 min como tiempo de incubación y tampoco constataron modificación. Scevola y col(103), incubaron 1×10^7 PMNs con igual número de Staphylococcus aureus (relación 1:1), en presencia de clindamicina a concentraciones de 1,5 y 10 ug en la mezcla fagocítica; midieron el número de unidades formadoras de colonias (UFC) pos-incubación, no observando incremento de la capacidad microbicida en presencia del fármaco.

Silva y col(109), examinaron el efecto de clindamicina utilizando PMNs de donadores normales y de pacientes con Enfermedad

Granulomatosa Crónica(EGC)-cuyas células son severamente deficientes en la función microbicida. El ensayo consistió en incubar 10^7 PMNs y $2-4 \times 10^6$ S. aureus opsonizado con suero AB, en presencia de 0.5 ug de clindamicina. Constataron un leve incremento pero significativo de la actividad bactericida de PMNs de pacientes con EGC; sin embargo, la cepa utilizada era sensible a su acción antimicrobiana, por lo que sus resultados no permiten discriminar si lo observado fue el resultado de la modulación de la función leucocitaria por el fármaco o simplemente se debió a su efecto como antibiótico. De este mismo defecto adolecen los estudios de Jacobs y Wilson(110), Zimmerli y col(111), los que si bien apreciaron incremento de la capacidad microbicida de los PMNs frente a S.aureus al adicionar clindamicina, el germen era sensible al fármaco el cual se utilizó además en concentraciones iguales o mayores a la concentración bactericida mínima(CBM).

Por lo tanto, después de haber revisado la información publicada referente al efecto de clindamicina in vitro sobre la función de los PMNs, podemos—desde una perspectiva general—sostener que no existe suficiente congruencia entre las metodologías adoptadas para la demostración de un efecto modulador de clindamicina sobre la actividad fagocítica y microbicida de los PMNs.

IV A d. ESTUDIOS IN VIVO.

Conocemos de dos estudios en los que se trató de evaluar el efecto de clindamicina in vivo sobre la función de los PMNs en adultos voluntarios sanos.

Faden y col(112) estudiaron la función de PMNs en 13 adultos

sanos, quienes recibieron 1200 mg/día de clindamicina en 4 dosis vía oral. Evaluaron, antes del inicio del tratamiento y 2 hs después de la última dosis, la capacidad quimiotáctica (por migración en agarosa), la quimioluminiscencia y la capacidad fagocítica y bactericida (por la técnica de fluorescencia de naranja de acridina, utilizando como germen S.aureus resistente a clindamicina). No encontraron diferencias en las funciones estudiadas, excepto un incremento significativo en la capacidad bactericida post-tratamiento. No realizaron estudios adicionales para tratar de encontrar una explicación del efecto observado y en la técnica que utilizaron, no procedieron a opsonizar al germen.

Bassaris y col(113), administraron a 10 adultos voluntarios sanos 600mg de clindamicina, en dosis única, por vía intramuscular y midieron la función fagocítica y microbicida de los PMNs pre y post-tratamiento utilizando la técnica de naranja de acridina como método y como gérmenes bacilos Gram(-) resistentes a clindamicina (Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Proteus mirabilis). Obtuvieron PMNs antes de la administración del fármaco y 3 hs después. Observaron incremento en ambas funciones de los PMNs, pero sólo cuando se utilizó el suero obtenido 3 hs post-medicación como opsonizante. Concluyeron que el efecto beneficioso observado era mediado por el suero y no por efecto del fármaco sobre los neutrófilos.

Los estudios, in vivo, aún cuando mas escasos, asemejan a los realizados in vitro, en cuanto a diferencias de metodologías utilizadas, dosis del fármaco en estudio, momento del mismo, por lo que como consecuencia lógica, las conclusiones alcanzadas resultan contradictorias.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hasta hace pocos años, el interés académico en el campo de la antibioticoterapia se había dirigido principalmente hacia estudios de inhibición del crecimiento bacteriano in vitro e in vivo, y búsqueda de nuevas alternativas para tal efecto, a examinar la tolerancia y farmacocinética antibiótica en modelos animales y en voluntarios humanos, y finalmente a ensayos clínicos de corroboración de su eficacia terapéutica. La frecuente falta de correlación entre los datos experimentales in vitro en cuanto a eficacia antibacteriana y los resultados clínicos, ha conducido a que en la evaluación de la interacción Hospedero-Infección-Antibiótico se empezara a considerar la eventual influencia beneficiosa o deletérea que podrían tener estos fármacos sobre los mecanismos de defensa del hospedero incluyendo las células fagocíticas, células con las que inevitablemente interactuarían en el curso de su utilización.

En este contexto es que nos hemos propuesto evaluar el efecto de un antibiótico del grupo de las lincosinamidas-la clindamicina- y su efecto sobre la función de los PMNs. Su elección como modelo de estudio fue en base a reportes de la literatura, que informaban de su buena penetración intracelular lo que eventualmente lo llevaría a interactuar con los mecanismos intracelulares que rigen la función de las mismas. Por otra parte, si bien existen observaciones de varios grupos que se ocuparon de este tema, las mismas han resultado sumamente contradictorias debido a que existen considerables diferencias con respecto a las funciones

examinadas, a las metodologías seguidas, a los tiempos de incubación y gérmenes utilizados como modelo de estudio de función microbici­da, y a las concentraciones empleadas del fármaco ya que en la mayoría de los casos se utilizaron concentraciones no alcanzables durante su uso terapéutico. De ahí que hemos considerado necesario enfocarnos a analizar el efecto de la clindamicina sobre la función de los PMNs, poniendo énfasis en manejar los controles necesarios que nos permitiera discriminar la acción antibiótica del fármaco de su efecto como modulador del comportamiento leucocitario.

De los mecanismos oxidativos intracelulares responsables del efecto microbici­da de los PMNs probablemente el de mayor importancia sea el mediado por la mieloperoxidasa(60), sistema con el cual un fármaco de penetración intracelular eventualmente interactuaría. Por tanto interesa conocer el efecto de clindamicina sobre dicho sistema. Por otro lado, se ha demostrado que diversas sustancias con un halógeno en su composición molecular- como tiroxina y triiotironina que poseen iodo(61)- pueden actuar aportando el halógeno como cofactor del sistema mediado por MPO. De ahí que se nos plantee la interrogante de si la clindamicina en virtud del átomo de cloro de su molécula y de su penetración intracelular, no pudiera actuar por un mecanismo similar, aportando el halógeno cofactor del mecanismo microbici­da mediado por MPO de los PMNs.

VI. OBJETIVOS

1. Establecer la dosis óptima de captación intracelular de clindamicina por PMNs humanos in vitro.
2. Evaluar el efecto in vitro de clindamicina sobre la capacidad quimiotáctica, fagocítica y microbicida de PMNs humanos.
3. Evaluar la participación de clindamicina en el sistema microbicida mediado por mieloperoxidasa (MPO) de los PMNs.

VII. HIPOTESIS

1. Clindamicina no modifica in vitro la capacidad quimiotáctica, fagocítica y bactericida de PMNs humanos.
2. Clindamicina amplifica y/o actúa como cofactor del sistema microbicida mediado por mieloperoxidasa de los PMNs.

VIII. MATERIAL Y METODOS

A. OBTENCION DE NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES.

Los PMNs fueron separados de sangre venosa de adultos voluntarios sanos (personal de laboratorio y donadores del Banco de sangre del Hospital Infantil de México Federico Gómez). La sangre fue obtenida en jeringas desechables estériles, utilizándose como anticoagulante 10 U de heparina (HEPARth-1000, 20th Century Chemical de México, S.A. de C.V.) por cada ml de sangre. La separación se realizó siguiendo la metodología de Boyum (114) modificada.

a. Procedimiento: La sangre obtenida y colocada en tubos de 15 ml de polipropileno (Polypropylene tubes 25319, Corning Glass Works, N.Y.) fue diluida y mezclada en solución salina isotónica a volúmenes iguales; luego se le adicionó Ficoll-Hypaque de una densidad de 1.077 (el cual permite la separación, por gradiente de densidad y centrifugación, de los mononucleares—los que forman una capa en el sobrenadante—de los PMNs y eritrocitos) colocándolo en la base del tubo en un volumen de 1:6; por diferencia de densidad la columna sanguínea queda superpuesta a la capa de Ficoll-Hypaque. Luego de centrifugar a 1500 revoluciones por min (R/m) a 4 grados centígrados durante 25 minutos, se desechó el sobrenadante, incluida la capa de mononucleares, y se resuspendió el botón, conteniendo PMNs y eritrocitos, en igual volumen de solución salina isotónica; una vez mezclada se le agregó dextran al 6% en volumen 1:3 y tras nueva mezcla por agitación suave, se puso a sedimentar en incubadora a 37 grados centígrados con CO₂ al 5%. Este paso permite la

separación—por sedimentación—de los PMNs que quedan en suspensión de los eritrocitos que sedimentan. A los 20 min de incubación, se pasó el sobrenadante a otro tubo, igualmente estéril, y se centrifugó a 1500 R/m durante 10 minutos. Luego de decantar el sobrenadante, el botón conteniendo PMNs y eritrocitos residuales se lavó una vez con solución salina isotónica y posteriormente se procedió a lisis de los eritrocitos residuales resuspendiendo el botón celular en cloruro de amonio al 0.85% y dejando reposar a temperatura ambiente (22 grados) durante 10 min. Luego se lavó nuevamente con solución salina isotónica y el botón resultante, luego de decantar el sobrenadante se resuspendió en 1 ml de Solución salina balanceada de Hank (SSBH) pasando finalmente a realizar el recuento del número de PMNs obtenidos, con control de la viabilidad y pureza.

b. Recuento de PMNs: El recuento del número de células se realizó en microscopio óptico, utilizando la cámara de Neubauer en la que se colocó una alícuota de una dilución 1:4 de la suspensión final. Se obtuvo el número de células por cuadrante y se calculó el número de células/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{No de células/ml} = \text{No de células por cuadrante} \times 5 \times 10^4$$

c. Viabilidad y pureza: Se corroboró la viabilidad de los PMNs por técnica de exclusión del colorante supravital azul tripano (el principio radica en que las células vivas excluyen el colorante, el cual tiñe en cambio las células muertas) contando el porcentaje de células teñidas con azul tripano en muestra tomada de una mezcla de volúmenes iguales de la suspensión celular y el

colorante preparada inmediatamente antes de la lectura.

La pureza se controló por exámen de frotis preparados de la suspensión celular final y teñido con la coloración de Wright.

B. ESTUDIO DE LA CAPTACION INTRACELULAR DE CLINDAMICINA.

a. Fundamentos.

El estudio de la captación de clindamicina por los PMNs lo realizamos siguiendo la técnica de Johnson y Hand(115) con modificaciones. Esencialmente se basa en el empleo de una técnica de centrifugación con velocidad y gradiente, utilizando una minicentrífuga de altas velocidades de centrifugación. Se utiliza un gradiente el cual permite la separación de las células de la solución. Un gradiente de este tipo puede prepararse colocando en viales de polipropileno aceite siliconado y por encima, la suspensión celular. Al ser sometidas a alta velocidad de centrifugación (mayor de 6000 R/m), las células atraviezan el aceite siliconado, alcanzando el plano inferior del vial, en tanto que la solución no, el cual queda por encima de la capa de aceite siliconado. Si en la base del vial, se coloca una sustancia que lise las células como el ácido fórmico, las células al alcanzar esta capa experimentarán lisis por lo que liberarán su contenido. Por lo tanto, si se incuban células PMNs, con una sustancia radiomarcada [generalmente marcada con tritio (^3H)] y luego una muestra de la misma se somete a centrifugación sobre un gradiente formado por ácido fórmico y aceite siliconado, podrá conocerse la fracción de captación intracelular de la sustancia por medición de las cuentas radioactivas en los diferentes estratos. En nuestro caso, si

incubamos PMNs con clindamicina tritiada, si este es captado intracelularmente, empleando esta metodología, los PMNs liberarán al fármaco en la capa de ácido fórmico y la parte no captada del antibiótico quedará en solución en el estrato superior del vial (encima del aceite siliconado). Los diferentes estratos pueden ser separados por corte (previa congelación de los viales a -50 grados) y la cantidad de antibiótico de cada uno de ellos puede ser cuantificada en contador de centelleo líquido, expresándose las cuentas radioactivas en cuentas por minuto (cpm).

b. Medidas de seguridad.

Como en esta técnica se emplea material radioactivo, nos hemos sujetado a las recomendaciones y condiciones dictadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) de los Estados Unidos Mexicanos, en cuanto a autorización de trabajo, Área exclusivamente destinada al desarrollo de técnicas radioactivas, precauciones en el recibimiento, almacenaje, conservación, manejo y desecho del material radioactivo, y medidas de protección personal y de los demás integrantes del laboratorio.

c. Resistencia de los viales.

Para el desarrollo de esta técnica empleamos viales de polipropileno de 400 ul de volumen. Para evaluar la resistencia de los viales a la fuerza de centrifugación, y debido a la necesidad de tener esta seguridad por el trabajo con material radioactivo, viales conteniendo soluciones no radioactivas fueron centrifugadas a velocidades de diferentes revoluciones por minuto: 5000, 7000,

9000, 10000 y 12000 R/m, durante tiempos variables: 1, 3, 5, 7, y 10 min en una microcentrifuga (Microcentrifuga, modelo 12, Beckman Instruments Inc, Spinco Division, Palo Alto, Ca, USA); comprobamos que a partir de 9000 R/m, el 10% de los viales experimentaban ruptura, aumentando el porcentaje al 30% a 12000 R. Por esa razón decidimos trabajar con una velocidad de centrifugación de 7000 R/m. Con esta fuerza de centrifugación, el tiempo tras el cual se formaba un botón celular adecuado fue el de 7 minutos, que fueron finalmente la velocidad y tiempo que empleamos en nuestros ensayos.

d. Función separadora de células-solución del aceite siliconado.

Utilizamos el aceite siliconado SF-1250 (Harwick, Wilmington, Mass., USA). En base a observaciones preliminares de que parte de las células eran retenidas pos-centrifugación en el estrato superior del gradiente formado por 20 ul de ácido fórmico al 88% y 100 ul de aceite siliconado en capas sucesivas, sin atravesar la capa de aceite siliconado, recurrimos a disminuir la tensión superficial del aceite siliconado adicionándole tween 80 al 0.1%. Con esta maniobra, se producía el paso efectivo de las células a la base de los viales, lo cual corroboramos substituyendo el ácido fórmico por el colorante violeta de Turk (el cual no lisa PMNs) en la base de los viales y cuantificando el contenido celular de esta capa. De esta forma, el aceite siliconado separaba las células de la solución.

Con el fin de demostrar que el aceite siliconado con tween 80 al 0.1% no deja pasar soluciones, al centrifugarlo a 7000 R durante 7 min., procedimos a colocar en lugar de la suspensión celular, 200 ul de solución salina balanceada de Hank con rojo neutro.

En experimentos previos pudimos observar que tanto el ácido fórmico y el aceite siliconado (ambos de color blanco) adquieren fácilmente el color de la solución anterior. Así, constatamos que los colores del ácido fórmico y del aceite siliconado, permanecían sin cambios pos-centrifugación; en cambio, si se substituía la capa de aceite siliconado por Ficoll-Hypaque 1.077, sí se producía coloración de ambos.

Con estos experimentos, alcanzamos la conclusión de la utilidad del aceite siliconado como separador de células-solución.

e. Utilización de PMNs fijados con glutaraldehído.

Para tener el control de que la presencia de clindamicina H³ en la base de los viales, no fuera simplemente el resultado de arrastre pasivo por agentes particulados, utilizamos como control células PMNs momificadas (células muertas), en las que no puede haber penetración intracelular. La momificación se realizó tratando las células con glutaraldehído al 1 %, por el siguiente procedimiento: PMNs a una concentración de 5×10^6 /ml fueron inicialmente incubados con 2 ml de Glutaraldehído al 1% (Glutaraldehyde grade II, Sigma Chemical Company, USA) durante 30 min, a 4 grados centígrados; pos-incubación se lavaron las células con solución balanceada de fosfatos (SBF), centrifugándolas a 1500 R/m durante 10 minutos, 2 veces; luego de decantado el sobrenadante, el botón se incubó con 2 ml de glicina 0.1 M (Glycine, Sigma Chemical Co., USA) durante 5 min a temperatura ambiente (22 grados centígrados), tras lo cual se lavó 2 veces con SBF, suspendiéndola finalmente en SSBH para su utilización.

Comprobamos que cuando la suspensión con PMNs fijados con glutaraldehído era puesta a centrifugar sobre el gradiente antes descrito, se producía la separación de células-solución por efecto del aceite siliconado.

f. Clindamicina Tritiada³(H).

La clindamicina H³ utilizada para los estudios de captación intracelular (Lote No 2353-054, NEN Products, du Pont de Nemours & Co. Inc.) posea una radioactividad de 342 milicurios por milimol; se mantuvo refrigerada a 4 grados centígrados y las diluciones añadidas a la suspensión celular fueron preparadas inmediatamente antes de los ensayos.

Las lecturas de la substancia radioactiva se realizaron en un contador de centelleo Packard 300 R, utilizando como solvente y amplificador una solución de tolueno-PP0-POPOP (Ver anexo I). Las cuentas radioactivas se expresaron en cuentas por minuto (cpm).

g. Procedimiento.

PMNs (5X10⁶) obtenidos de adultos voluntarios sanos como previamente se ha descrito, fueron incubados con clindamicina H³ a concentraciones de 0.5, 2, 5, y 10 ug, durante 30 minutos a 37 grados centígrados en atmósfera con CO₂ al 5%; la elección de este tiempo de incubación se basó en informes que reportaron que la penetración intracelular del fármaco alcanza su meseta en este lapso. Como control del ensayo se utilizaron 1) Solución balanceada de fosfatos con rojo neutro y 2) PMNs fijados con glutaraldehído al 1%, los cuales fueron incubados con similares concentraciones de clindamicina H³ y en iguales condiciones.

Pos-incubación, se tomaron alicuotas de 200 ul de las diferentes muestras, por duplicado, y se colocaron en viales de 400 ul de polipropileno que contenían un gradiente formado por 20ul de ácido fórmico al 88% y 100 ul de aceite siliconado con tween 80 al 0.1% en capas sucesivas. Se procedió a centrifugar a 7000 R, durante 7 min, tras lo cual los viales se procedieron a congelar a -50 grados centígrados (Ultra low temperature freezer, Revco) hasta el momento de las lecturas. Para este efecto, se pasó a separar por corte con hoja de bisturí No 21 las diferentes capas del vial, las cuales fueron colocadas en tubos de plástico de 6ml que contenían como solvente y amplificador de lecturas -5 ml de la solución de tolueno-PPQ-POPOP y finalmente introducidas en un contador de centelleo líquido Packard 300 R para sus lecturas las que fueron expresadas en cpm. Se procedió luego a calcular la fracción de captación intracelular (FC) empleando la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{\text{cpm botón} + \text{cpm aceite}}{\text{cpm sobrenadante}}$$

C. ESTUDIO DEL EFECTO IN VITRO DE CLINDAMICINA SOBRE LA FUNCION DE PMNs.

a. Preparación de Clindamicina.

Para estudiar el efecto de la clindamicina sobre la función de PMNs in vitro, utilizamos la sal clorhidrato de clindamicina (Lote 0130 A, Potencia 0.5540, Upjohn, S.A. de C.V., México D.F., México); fue disuelta por enérgica agitación en solución salina balanceada de Hank a una concentración de 1000 ug/ml de la base. La

solución antibiótica fue mantenida en refrigeración a 4 grados centígrados y fue utilizada en el curso de la semana de su preparación.

b. Tratamiento de PMNs con clindamicina.

PMNs separados de sangre periférica de adultos voluntarios sanos fueron incubados, en concentración de 5×10^6 /ml, con 2 y 10 ug de clindamicina, o con igual volumen de SSBH como control, a 37 grados en atmósfera de CO_2 al 5% durante 30 min. Pos-incubación, se procedió a lavar las células con SSBH centrifugándolas a 1500 R/m durante 10 min y resuspendidos finalmente en SSBH a una concentración de 5×10^6 /ml para los ensayos de capacidad bactericida y de 2×10^6 /ml para los ensayos de quimiotaxis, reducción de nitroazul de tetrazolio, y quimioluminiscencia.

c. Quimiotaxis

Quimiotrayente. Utilizamos para el ensayo de quimiotaxis como quimioatrayente suero AB activado. Radica en el principio de la activación del sistema del complemento por la vía alterna al incubar suero con sustancias como endotoxinas, agentes particulados, diversos microorganismos con la consiguiente generación de productos secundarios como C a de poderosa acción quimioatrayente sobre los PMNs(116). El suero AB lo obtuvimos del Centro Nacional de la Transfusión sanguínea-SS, el cual fue alicuotado y mantenido a -20 grados centígrados hasta su uso.

Como activador del suero se empleó zimosano(116)(levaduras de Saccharomyces cereviciae, Sigma Chemical, Co., USA) el cual fue sus-

pendido, mediante vigorosa agitación en vortex, en SBF en una concentración de 10 mg/ml y hervido durante 30 min; posteriormente se realizaron 2 lavados en SBF, para resuspenderlo finalmente en SSBH a una concentración final de 10 mg/ml ($20-30 \times 10^6$ levaduras/ml) y mantenidos en alícuotas de 1 ml a -10 grados centígrados hasta su uso.

Para la preparación del quimioatrayente, los viales de zimosa-no, luego de descongelados y lavados una vez, fueron incubados con suero AB al 20% en SSBH durante 30 min a 37 grados centígrados en atmósfera de CO_2 al 5%, tras lo cual se centrifugó a 3000 R/m a 4 grados centígrados durante 5 min; finalmente el sobrenadante (suero AB activado) se alícuotó y conservó a -50 grados hasta su utilización como quimioatrayente.

Procedimiento. El ensayo quimiotáctico lo realizamos siguiendo la metodología de Fulk, Goodwin y Leonard (117), empleando una microcámara de 48 pozos (48 well Neuroprobe, Bethesda, Mariland) y filtros de nitrocelulosa de 120 μ m de espesor con poros de 3 μ m de diámetro (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA), los cuales fueron humedecidos en solución balanceada de Gey-Hepes-Albúmina (ver Anexo 1) antes de su uso. El quimioatrayente se colocó en los pozos inferiores, utilizando como testigo (migración al azar) SSBH y los PMNs se aplicaron en los pozos superiores (en volúmenes de 50 μ l de la suspensión celular de 2×10^6 /ml). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

La cámara una vez montada fue incubada a 37 grados en atmósfera de CO_2 al 5% durante 1 hora; al cabo de este tiempo, se retiró el filtro el cual luego de fijación en etanol-agua 1:1 du-

rante por lo menos 2 hs se tiñó con hematoxilina. El filtro fue montado para su lectura en portaobjetos con resina histológica (Sigma Chemical Co.,USA).La interpretación se realizó según el método de Zigmon y Hirsh (118) utilizando para tal efecto un microscopio de luz convencional, midiendo por observación con el objetivo de 10X la distancia migrada en um (desde donde se encuentra la mayor densidad de células hasta el plano donde se observen cuando menos 5 células), que se traduce por el recorrido del tornillo micrométrico graduado.

d. Reduccion del nitroazul de tetrazolio(NAT)

La determinación de este ensayo se realizó siguiendo el procedimiento de medición cuantitativa de la reducción de NAT de Baehner y Nathan (119) con modificaciones. Para ello utilizamos los siguientes reactivos:1)NAT al 1% en SSBH,2) ácido clorhídrico al 0.5 N 3)dimetilsulfóxido(Sigma Chemical Co.,USA)4)levaduras de Streptomyces cereviciae en solución salina(20-30X10⁶ levaduras/ml) como partícula a fagocitar.

Procedimiento: PMNs(2X10⁶ en 1 ml de SSBH sin rojo fenol)se incubaron con 100 ul de la solución de levaduras de Streptomyces cereviciae y 500 ul de NAT al 1% durante 1 hora a 37 grados en atmósfera con CO₂ al 5%.La reacción se paró adicionándole 500 ul de HCL al 0.5 N;² luego se centrifugó a 1500R/m durante 10 min.Al sedimento obtenido,luego de decantar el sobrenadante,se agregó 1 ml de dimetilsulfóxido para extraer el formazán y se procedió a leer la densidad óptica de la solución final en un espectrofotómetro Beckman modelo 26,a una longitud de onda de 570nm,utilizan-

do como blanco de referencia al dimetilsulfóxido.

e. Quimioluminiscencia

Otra función de los PMNs que se evaluó fue la emisión de luz por PMNs en respuesta al estímulo fagocítico o quimioluminiscencia, el cual constituye un sensible indicador de la capacidad fagocítica y bactericida de los PMNs. Para tal efecto utilizamos el método de Selveraj y col(120), con modificaciones, incrementando la sensibilidad del ensayo con la adición de luminol(5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione)[quimioluminiscencia amplificada por luminol]. Como partícula a fagocitar se utilizó zimosano, el cual fue opsonizado por el procedimiento siguiente: Viales con 10 mg/ml de zimosano, preparados como ya se había descrito, fueron descongelados, lavados y posteriormente incubados con suero AB al 20% en SSBH por 30 minutos a 37 grados en atmósfera con CO₂ al 5%. Luego de centrifugados, se utilizó el sobrenadante como quimio-atrayente, y el botón conteniendo las partículas de zimosano fueron lavadas 1 vez, y reconstituidas en su volumen original con SSBH para su uso como partícula a fagocitar.

Ensayo de quimioluminiscencia: En viales de vidrio de centelleo de 20 ml de volumen se procedió a colocar 100 ul de PMNs (concentración de 2×10^6 /ml), 100 ul de la solución de zimosano opsonizado (partícula a fagocitar), 100 ul de luminol (como amplificador lumínico), adicionándole finalmente SSBH hasta un volumen final de 700 ul; se utilizaron como controles los siguientes sistemas:

1) PMNs + luminol + SSBH

2) zimosano + luminol + SSBH

El primer sistema se utilizó como referencia de cambio de la actividad oxidativa desencadenada por el estímulo y el segundo, sirvió como control del background del aparato de lectura, ya que no debía producir cuentas.

Los ensayos fueron por duplicado, y a temperatura ambiente; las lecturas se realizaron en un contador de centelleo líquido Packard 300 R, midiéndose la luz emitida durante el enfrentamiento fagocítico durante una hora, en ciclos repetidos de 0.10 min. Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (cpm) y se consideró al momento de realizar los análisis comparativos tanto el pico medio de cuentas por minuto como las cpm a los 60 minutos.

f. Capacidad microbicida

Para la medición de esta función, utilizamos el método de Edwards y col(121), con modificaciones. Consiste en un micrométodo lo cual proporciona ventaja en cuanto que utiliza menor número de células que las metodologías habituales para estudiar esta función. Fundamentalmente consiste en incubar en microplacas de titulación PMNs y bacterias, previamente opsonizadas, realizando cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) al inicio y al término del periodo de incubación.

Preparación de la bacteria: Utilizamos como germen para medir la función microbicida de los PMNs una cepa de Staphylococcus aureus resistente a Clindamicina (CIM > 128 ug). La razón de utilizar un germen con este patrón de sensibilidad antibiótica fue para que

permitiera discriminar un eventual efecto modulador del fármaco sobre la función microbicida de los PMNs de su efecto como anti-biótico.

La bacteria se cultivó para su uso en caldo de soya triptica-sa, durante 18 hs ("overnight") a 37 grados centígrados (bacteria en fase logarítmica de crecimiento). Para su utilización fue lavada 3 veces con solución salina centrifugando a 4 grados y 6000 R/m durante 10 minutos y resuspendiendo finalmente en SSBH. Para conocer la concentración bacteriana por ml se procedió previamente a correlacionar la escala de Mc Farland de densidad bacteriana por ml con densidades ópticas en un espectrofotómetro Beckman modelo 26, realizando las lecturas a 540 nm de longitud de onda. Tal correlación puede observarse en la tabla 6 ,cuya validez lo confirmamos por el método de dilución de la suspensión bacteriana, siembra en placas y cuenta de UFC.

TABLA 6
CORRELACION ENTRE ESCALA DE MCFARLAND Y
DENSIDAD ÓPTICA

Escala de McFarland	Densidad óptica	Bacterias/ml
1	0.358	3X10 ⁸
2	0.660	6X10 ⁸
3	0.780	9X10 ⁸
4	1.020	12X10 ⁸
5	1.130	15X10 ⁸
6	1.278	18X10 ⁸
7	1.388	21X10 ⁸
8	1.580	24X10 ⁸
9	1.665	27X10 ⁸
10	1.770	30X10 ⁸

Una vez construida nuestra escala de densidad óptica, las lecturas de las concentraciones bacterianas se realizó espectrofotométricamente y fueron ajustadas a la concentración de 10^8 /ml para su opsonización, la cual se realizó incubando 0.1 ml de la suspensión bacteriana con suero AB al 10% en SSBH 10 minutos antes del ensayo microbicida (concentración bacteriana final de 10^7 /ml opsonizado con suero AB al 10%).

Células: Para el estudio de esta función de PMNs, las células, obtenidas como previamente se ha descrito, se ajustaron a una concentración de 5×10^6 /ml en SBF.

Placas de agar de soya tripticasa: Para las cuentas de UFC se utilizaron placas de agar soya tripticasa (Bioxon de México, S.A. de C.V.); para su preparación, el polvo de TSA al 4% en agua destilada, fue esterilizado en autoclave a 121 grados (15 libras de presión) durante 15 minutos, y distribuido en placas de petri en volúmenes de 15 ml por placa, las que luego se dejaron a temperatura ambiente para gelificación y sometidas a un control de esterilidad de 48 hs antes de su utilización.

Procedimiento: En microplacas de titulación de 96 pozos de fondo redondeado, se colocaron por pozo 80 ul de la suspensión celular y 80 ul de la suspensión bacteriana opsonizada como se indicó antes (Relación PMN/bacteria de 1:2). Los ensayos se realizaron por duplicado. Una vez montado el ensayo microbicida, las microplacas se incubaron a 37 grados en atmósfera de CO_2 al 5%, en agitación durante 120 min. Antes de la incubación y al término de la misma, se procedió a tomar una alícuota de 10 ul de cada mezcla fagocítica, las cuales fueron diluidas 4 veces en agua destilada (lo cual

permite la lisis de los PMNs) y se sembró 0.1 ml de la última dilución en placas de agar soya tripticasa con asa de vidrio. Las placas sembradas fueron incubadas a 37 grados durante 18 hs tras lo cual se leyeron las unidades formadoras de colonias(UFC), usando un contador de colonias Quebec(American Optical, Buffalo, USA). Los resultados fueron expresados como logaritmo(log) de disminución del número de UFC pos-incubación:

$$\text{Log de reducción bacteriana} = \frac{\text{UFC a los 0 min}}{\text{UFC a los 120 min}}$$

g. Validación del micrométodo de estudio de función microbicida

Para validar las modificaciones y eficiencia del micrométodo, lo comparamos en experimentos previos realizados en forma paralela, con el ensayo clásico de capacidad microbicida de P Guie(122). Para este fin, colocamos en un mismo tubo 0.5 ml de una suspensión de 10^7 /ml de PMNs, 0.1 ml de suero AB como opsonizante, 0.1 ml de la suspensión bacteriana preparada como se ha indicado (10^8 /ml) y ajustando el volumen con SSBH hasta completar 1 ml (Relación PMN/bacteria de 1:2). Los tubos fueron incubados en agitación en condiciones similares al micrométodo, durante 120 min. Al inicio y al término de la incubación, se tomó una alícuota de 10 ul de la mezcla fagocítica, la cual fue diluida 4 veces en agua destilada, agitada energicamente, sembrando 0.1 ml de la última dilución en placas de TSA, las que fueron incubadas, leídas e interpretadas de forma similar a como se procedió con el micrométodo.

h. Efecto de clindamicina sobre el sistema microbicida
mediado por mieloperoxidasa(MPO)

Para evaluar el efecto de clindamicina sobre el sistema microbicida mediado por MPO de los PMNs, procedimos a realizar el ensayo montando un sistema libre de células. Componentes del mismo fueron MPO, H₂O y como fuente de haluros cloruro de sodio, siguiendo el método de Clark y Klebanoff (123). Las lecturas de las reacciones se realizaron en contador de centelleo líquido Packard 300 [método de Allen(124)].

La enzima mieloperoxidasa que utilizamos durante los experimentos fue proporcionada por el Dr. Robert Clark (Departament of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA 52242), la cual fue preparada de PMNs caninos por el método de Agner(123).

Procedimiento: Los ensayos se realizaron en viales de vidrio de 20 ml de volumen, en los que se colocó la mezcla microbicida constituida por 90 unidades de MPO, 5×10^{-5} M de H₂O y 0.1 M de NaCl utilizando como amortiguador SBF hasta alcanzar un volumen final de 700 ul. En paralelo, a viales con la misma mezcla se agregó 2 y 10 ug de clindamicina. Igualmente, para determinar si clindamicina puede actuar como cofactor del sistema mediado por MPO, a viales con 90 U de MPO y 5×10^{-5} H₂O, se adicionó el fármaco en las concentraciones anteriores. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (a 22 grados) y por duplicado. Las lecturas se realizaron en el contador de centelleo antes descrito expresándose la magnitud de la reacciones en cuentas por minuto (cpm).

IX. ANALISIS ESTADISTICO

La expresión de los resultados y los análisis estadísticos variaron según la función estudiada (125-126).

Captación intracelular de clindamicina.

Los resultados se expresaron como fracción de captación intracelular; en cada concentración examinada se contrastaron con los resultados de tal fracción al utilizar PMNs fijados con glutaraldehído. Se utilizó el estadígrafo no paramétrico U de Mann-Whitney ya que no hubo distribución normal por pruebas de sesgo y curtosis.

Quimiotaxis.

Los resultados se expresaron en um de migración y se demostró homogeneidad de varianzas de los grupos por lo que se utilizó para la contrastación el análisis de varianza de bloques aleatorizados (para diferencias generales) y la T de students para muestras pareadas para diferencias entre grupos.

Quimioluminiscencia.

Los resultados fueron expresados en \log_{10} de las cpm considerando para los análisis el pico medio de cpm y las cpm a los 60 min. Los PMNs utilizados para evaluar los efectos de 2 ug por una parte y 10 y 100 ug por otra parte, no provinieron de los mismos donadores. En el primer caso al no constatarse distribución normal, para encontrar significancias se utilizó la prueba de Wilcoxon (prueba no paramétrica para muestras pareadas). En el se-

gundo caso(testigo,10 y 100 ug)se recurrió a la prueba no paramétrica de bloques aleatorizados de Friedman para diferencias generales y a la de Wilcoxon para diferencias entre grupos.

Reducción del Nitroazul de tetrazolio.

Los resultados fueron expresados en densidades ópticas;la búsqueda de diferencias significantes entre grupos se realizó por el estadígrafo no paramétrico U de Mann-Withney.

Capacidad microbicida.

Para la validación del micrométodo utilizado, determinamos el el grado de correlación positiva con el macrométodo empleando una medida de correlación lineal(r de Pearson).

Para los experimentos en los que se evaluó el efecto de clindamicina sobre esta función de los PMNs,la contrastación de los grupos(testigo,2 ug y 10 ug) se realizó utilizando prueba no paramétrica para determinar varianza (para diferencias generales) y la prueba de Wilcoxon para diferencias entre grupos.

X. RESULTADOS

A. Características de la población celular.

Recuentos diferenciales realizados luego del proceso de separación celular, durante la fase de estandarización, demostró que el 95% o más de las células obtenidas fueron neutrófilos polimorfonucleares (grado de pureza). Igualmente la viabilidad controlada con azul tripano mostró que el 95% o más de los PMNs excluyen el colorante indicación de que prácticamente todas las células obtenidas se hallaban viables. El rendimiento del método empleado, en cuanto al porcentaje de PMNs obtenidos a partir del número inicial presente en la sangre extraída, fue del 75% o más.

B. Captación intracelular de clindamicina.

Estudiamos la captación de clindamicina por los PMNs tras 30 minutos de incubación. Pudimos constatar que clindamicina penetra en los PMNs en todas las dosis estudiadas. Examinamos primeramente la captación por PMNs fijados con glutaraldehído y observamos que la misma no difiere en su fracción de captación de las obtenidas con clindamicina H₃ en SSBH, lo cual no varió con las dosis utilizadas del antibiótico. Así las fracciones de captación de 0.5 ug de clindamicina H₃ adicionados a SSBH o a PMNs fijados con glutaraldehído fueron de $(\bar{X} \pm \text{ESM})$: 0.042 ± 0.01 y 0.042 ± 0.015 respectivamente; para 2 ug fueron de 0.048 ± 0.015 y 0.068 ± 0.009 ; para 5 ug fueron 0.046 ± 0.021 y 0.047 ± 0.01 y finalmente para 10 ug las fracciones de captación respectivas de PMNs fijados con glutaraldehído y en SSBH fueron de 0.085 ± 0.014 y

0.065 $\bar{+}$ 0.007 (Tablas 1,2,3 y 4).

Al analizar las fracciones de captación de PMNs provenientes de adultos sanos, la mayor fracción de captación se obtuvo cuando los PMNs fueron incubados con 2ug de clindamicina H (Tabla 2). Así, la fracción obtenida con esta concentración fue de $(X \bar{+} EMS)$ 0.829 $\bar{+}$ 0.15, en tanto que para las dosis de 0.5, 5 y 10 ug las fracciones de captación fueron de 0.475 $\bar{+}$ 0.09, 0.456 $\bar{+}$ 0.08 y 0.178 $\bar{+}$ 0.02 respectivamente (Tablas 1,3 y 4). Al contrastar cada grupo con la fracción de captación de PMNs fijados con glutaraldehído e incubados con la misma concentración de clindamicina H, la mayor significancia se obtuvo con el grupo incubado a 2 ug ($T=3.8$, $p < 0.01 > 0.001$); sin embargo, con los demás grupos las diferencias fueron igualmente significativas. Así, con los grupos de 0.5ug, 5 ug y 10 ug obtuvimos una $p < 0.05$; estos resultados reflejan que clindamicina se concentra en los PMNs en todas las dosis estudiadas, aunque la mayor fracción de captación se observó cuando los PMNs se incubaron con 2 ug de clindamicina.

TABLA 1

FRACCION DE CAPTACION DE CLINDAMICINA H +³
 CONCENTRACION DE 0.5 ug/ml

PMNs n=11	PMNs fijados n=4	SSBH n=5
0.628	0.036	0.048
1.200	0.078	0.064
0.306	0.037	0.015
0.287	0.020	0.021
0.821		0.062
0.351		
0.316		
0.534		
0.356		
0.093		
$\bar{X}=0.475 +$ 0.09	$\bar{X}=0.042 +$ 0.01	$\bar{X}=0.042 +$ 0.011

+ $\bar{X} +$ ESM

* $p < 0.05$

TABLA 2

FRACCION DE CAPTACION DE CLINDAMICINA H +³
 CONCENTRACION DE 2 ug/ml

PMNs n=10	PMNs fijados n=5	SSBH n=2
0.788	0.039	0.061
0.632	0.004	0.075
0.635	0.039	
0.767	0.088	
0.534		
0.854		
0.218		
1.666		
1.546		
0.659		
$\bar{X}=0.829 +$ 0.148	$\bar{X}=0.048 +$ 0.015	$\bar{X}=0.068 +$ 0.009

+ $\bar{X} +$ ESM

* $p < 0.01$

TABLA 3
FRACCION DE CAPTACION DE CLINDAMICINA H +³
CONCENTRACION DE 5 ug/ml

PMNs n=7	PMNs fijados n=3	SSBH n=4
0.153	0.044	0.048
0.724	0.045	0.071
0.407	0.048	0.047
0.293		0.022
0.413		
0.475		
0.731		
$\bar{X}=0.456 \pm$ 0.085	$\bar{X}=0.046 \pm$ 0.002	$\bar{X}=0.047 \pm$ 0.011

+ $\bar{X} \pm$ ESM
* $p < 0.05$

TABLA 4
FRACCION DE CAPTACION DE CLINDAMICINA H +³
CONCENTRACION DE 10 ug/ml

PMNs n=8	PMNs fijados n=4	SSBH n=5
0.227	0.122	0.038
0.164	0.077	0.075
0.213	0.062	0.069
0.155	0.079	0.078
0.228		0.065
0.080		
0.257		
0.100		
$\bar{X}=0.178 \pm$ 0.024	$\bar{X}=0.085 \pm$ 0.014	$\bar{X}=0.065 \pm$ 0.007

+ $\bar{X} \pm$ ESM
* $p < 0.05$

C. Clindamicina y función quimiotáctica de PMNs.

La respuesta quimiotáctica de PMNs de adultos voluntarios sanos fue ($\bar{X} \pm$ ESM) de 120 ± 9.6 μ m (Tabla 5). Pos-incubación con clindamicina, se observó que cuando los neutrófilos polimorfonucleares se trataron con 2 μ g del fármaco, la migración quimiotáctica de las células aumentó a 152 ± 9 μ m, incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$). En cambio a la concentración de 10 μ g, la respuesta quimiotáctica no difirió de los controles (129 ± 15 μ m, $p > 0.1$) (Tabla 5).

TABLA 5

EFECTO DE LA CLINDAMICINA SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE PMNs+			
MUESTRA	NO tratados	2 μ g	10 μ g
1	96	150	95
2	113	175	155
3	153	194	205
4	153	153	185
5	167	193	180
6	80	125	75
7	92	145	83
8	122	150	105
9	110	118	113
10	110	120	95
	$\bar{X} = 120 \pm 9.6$	$\bar{X} = 152 \pm 9$ *	$\bar{X} = 129 \pm 15$ **

+ migración en μ m, $\bar{X} \pm$ ESM

* $p < 0.01$, comparado con el grupo testigo.

** $p > 0.1$, NS, comparado con el grupo testigo.

C. Clindamicina y reducción de nitroazul de tetrazolio de PMNs.

Esta prueba que mide la capacidad oxidativa inicial de los

PMNs (generación de anión superóxido) fue utilizada para evaluar el efecto de clindamicina sobre la capacidad fagocítica de los PMNs. Pudimos observar que si bien con las concentraciones de 2 y 10 μg de clindamicina aumentó la capacidad de reducción de NAT, medida cuantitativamente, de los PMNs tratados, sin embargo, solo el incremento pos-tratamiento con 2 μg alcanzó significancia estadística al compararlos con los controles (0.389 ± 0.05 vs 0.286 ± 0.03 , $p < 0.05$). Tabla 6.

TABLA 6
REDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO DE PMNs Y
EFECTO DE CLINDAMICINA +

MUESTRA	NO tratados	2 μg	10 μg
1	0.306	0.200	0.220
2	0.230	0.385	0.332
3	0.225	0.327	
4	0.267	0.267	0.404
5	0.408	0.555	0.290
6	0.409	0.582	0.530
7	0.288	0.266	0.306
8	0.150	0.356	
9	0.298	0.306	
10	0.452	0.652	
	$\bar{X} = 0.303 \pm 0.03$	$\bar{X} = 0.389 \pm 0.05$ *	$\bar{X} = 0.347 \pm 0.04$ **

+ Lecturas a D.O. de 570 nm, $\bar{X} \pm \text{ESM}$

* $p < 0.05$, al contrastarlo con el grupo testigo.

** $p > 0.1$, NS, al contrastarlo con el grupo testigo.

D. Efecto de clindamicina sobre la quimioluminiscencia de PMNs.

Evaluamos el efecto de clindamicina sobre esta función fagocítica con PMNs provenientes de 30 adultos sanos. En la realización de este ensayo, 15 muestras se trataron con 2 μg de clindami-

cina y las otras 15 con 10 y 100 ug, y las respuestas de quimioluminiscencia se compararon con testigos sin tratamiento provenientes de los mismos donadores. No hubo diferencias en la capacidad fagocítica basal (sin tratamiento), medida por esta metodología, entre la población de PMNs que se trató con 2 ug ($\bar{X} \pm \text{ESM}$, cpm $\log_{10} 6.13 \pm 0.09$) y la población que se trató con 10 y 100 ug (cpm $\log_{10} 6.08 \pm 0.1$, $p > 0.1$); sin embargo, luego de 30 min de incubación, se constató un incremento significativo en la quimioluminiscencia de los PMNs cuando fueron tratados con 2 ug de clindamicina, tanto en el pico de la respuesta (cpm $\log_{10} 6.26 \pm 0.09$, $p < 0.004$) como a los 60 min (cpm $\log_{10} 6.06 \pm 0.09$, $p < 0.001$), al compararlos con las cuentas basales (Tablas 7 y 8). En cambio, no se observó este incremento cuando los PMNs fueron tratados con 10 o 100 ug de clindamicina, sino por el contrario una disminución significativa de las cpm, tanto en el pico como a los 60 min. Así, las cpm del pico medio fueron de $\log_{10} 5.89 \pm 0.17$ ($p < 0.02$), para PMNs tratados con 10ug del fármaco y de $\log_{10} 5.79 \pm 0.17$ ($p < 0.02$) para PMNs tratados con 100 ug. (Tablas 9 y 10). A los 60 minutos, mientras las cpm de PMNs no tratados fueron de ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) de 5.76 ± 0.11 , los PMNs preincubados con 10 o 100 ug presentaron 5.48 ± 0.18 y 5.42 ± 0.67 cpm respectivamente ($p < 0.03$).

TABLA 7
EFECTO DE CLINDAMICINA SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE PMNs
METODO DE Quimioluminiscencia

<u>MUESTRA</u>	<u>sin tto.</u>	<u>2 ug</u>
1	6.40	6.58
2	6.33	6.62
3	6.52	6.51
4	6.09	6.15
5	6.20	6.42
6	5.89	5.93
7	6.47	6.49
8	6.35	6.57
9	6.47	6.55
10	6.59	6.67
11	5.59	5.90
12	5.89	6.21
13	5.74	5.92
14	5.55	5.64
15	<u>5.52</u>	<u>5.72</u>

$$\bar{X} = 6.13 \pm 0.09 \quad \bar{X} = 6.26 \pm 0.09 *$$

+ cpm en log₁₀ $\bar{X} \pm$ ESM

* P < 0.004

TABLA 8
EFECTO DE LA CLINDAMICINA SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE PMNs
cpm a los 60 min.+

<u>MUESTRA</u>	<u>sin tto.</u>	<u>2 ug</u>
1	6.32	6.56
2	6.24	6.59
3	6.01	6.04
4	5.83	5.86
5	6.12	6.23
6	5.76	5.85
7	6.08	6.21
8	6.15	6.45
9	6.08	6.26
10	6.04	6.17
11	6.44	6.22
12	5.49	5.95
13	5.01	5.36
14	5.36	5.49
15	<u>5.46</u>	<u>5.68</u>

$$\bar{X} = 5.89 \pm 0.11 \quad \bar{X} = 6.06 \pm 0.09 *$$

+ cpm en log₁₀ $\bar{X} \pm$ EMS

* p < 0.001

TABLA 9

EFFECTO DE CLINDAMICINA SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE LOS PMNs

METODO DE Quimioluminiscencia

pico medio de cpm +

<u>MUESTRA</u>	<u>sin tto.</u>	<u>10 ug</u>	<u>100 ug</u>
1	6.15	6.50	6.56
2	6.30	6.27	5.70
3	5.31	5.52	5.13
4	6.62	6.43	6.41
5	6.57	6.43	6.46
6	6.69	6.58	6.53
7	6.17	5.87	5.81
8	6.26	5.52	6.25
9	6.01	5.93	5.88
10	6.12	5.63	5.57
11	6.29	6.10	5.78
12	5.24	3.99	4.16
13	5.96	5.94	5.82
14	5.84	5.09	5.00
15	5.74	5.39	5.85
	$\bar{X}=6.08 \pm 0.11$	$\bar{X}=5.81 \pm 0.17$ *	$\bar{X}= 5.79 \pm 0.17$ **

+ cpm en log $\bar{X} \pm \frac{ESM}{10}$

* Prueba de Friedman p < 0.005

Prueba de Wilcoxon p < 0.02, comparado con el grupo testigo.

** Prueba de Wilcoxon, p < 0.02, comparado con el grupo testigo; p > 0.4, NS, contrastado con el grupo de 10 ug.

TABLA 10

EFFECTO DE CLINDAMICINA SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE PMNs

METODO DE Quimioluminiscencia

cpm a los 60 min. +

<u>MUESTRA</u>	<u>Sin tto.</u>	<u>10 ug</u>	<u>100 ug</u>
1	5.64	6.19	6.34
2	6.19	6.18	5.65
3	5.05	5.31	4.96
4	6.33	6.21	6.17
5	6.18	6.01	6.02
6	6.38	6.29	6.19
7	6.01	5.32	5.35
8	5.95	5.06	5.20
9	5.73	5.34	5.33
10	5.02	5.01	4.72
11	5.83	5.70	5.45
12	5.07	3.62	3.78
13	5.81	5.83	5.63
14	5.76	4.98	4.89
15	5.49	5.12	5.70
	$\bar{X}=5.76 \pm 0.11$	$\bar{X}= 5.48 \pm 0.18$ *	$\bar{X}=5.42 \pm 0.67$ **

+ cpm en log $\bar{X} \pm$ ESM
10

* Prueba de Friedman, p < 0.005.

Prueba de Wilcoxon, p < 0.03, contrastado con grupo testigo.

** Prueba de Wilcoxon, p < 0.03, contrastado con grupo testigo;
p > 0.4, NS, comparado con el grupo 10 ug.

E.Efecto de la clindamicina sobre la capacidad bactericida de PMNs

La evaluación del efecto de la clindamicina sobre esta función de los PMNs lo realizamos utilizando un micrométodo (metodología de Edwards) al cual le introducimos modificaciones en cuanto al

número de células, volumen y preparación de la bacteria con respecto a la técnica original. De ahí que para validar el método lo comparamos con el ensayo microbicida clásico de PG Que (macrométodo, estándar de oro), comprobando que el micrométodo tenía un nivel de eficiencia comparable al macrométodo. Así, realizamos 11 ensayos en paralelo (utilizando la misma población de PMNs para cada ensayo) obteniendo un índice de reducción bacteriana de $3.2 \bar{+} 0.27 (\bar{X} \bar{+} \text{ESM})$ con el micrométodo vs $3.26 \bar{+} 0.5$ con el macrométodo (r de pearson de 0.869, $p < 0.001$) (Tabla 11).

TABLA 11
CAPACIDAD MICROBICIDA DE PMNs MEDIDA POR MICRO Y MACRO-
+
METODO

MUESTRA	MICRO	MACRO
1	3.40	4.40
2	3.30	4.40
3	4.07	4.00
4	3.50	4.00
5	3.33	3.50
6	3.30	3.50
7	3.40	3.33
8	3.40	3.33
9	2.64	3.00
10	1.93	2.00
11	1.73	2.00
	$\bar{X}=3.26 \bar{+}$ 0.28	$\bar{X}=3.24 \bar{+}$ 0.25

+ Índice bactericida, log₁₀ de reducción bacteriana.

* r de pearson de 0.8699, $p < 0.001$.

Al examinar el efecto de la clindamicina sobre la capacidad microbici-
 da de los PMNs, observamos que los PMNs tratados con 10 ug del
 fármaco, presentaron una capacidad microbici- da comparable a los
 testigos no tratados ($1.64 \bar{+} 0.17$ vs $1.58 \bar{+} 0.15$, $p > 0.1$), en cam-
 bio tras el tratamiento con 2 ug se observó un incremento signi-
 ficativo de esta función ($2.52 \bar{+} 0.24$, $p < 0.01$). Tabla 12.

TABLA 12

EFECTO DE CLINDAMICINA SOBRE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE PMNs ⁺			
MUESTRA	Sin tto.	2 ug	10 ug
1	1.3	3.0	2.2
2	1.4	2.3	1.9
3	1.7	2.1	1.2
4	1.3	1.7	1.8
5	2.6	2.5	1.2
6	1.4	1.8	1.0
7	2.2	4.2	2.3
8	1.2	3.0	1.0
9	1.4	2.5	1.6
10	1.3	2.1	2.2
	$\bar{X}=1.58 \bar{+}$ 0.15	$\bar{X}=2.52 \bar{+}$ 0.23 *	$\bar{X}=1.64 \bar{+}$ 0.16 **

+ Índice de reducción bacteriana, $\log_{10} \bar{X} \bar{+} \text{ESM}$

* $p < 0.01$, contrastado con el grupo testigo.

** $p > 0.5$, NS, contrastado con el grupo testigo.

F. Efecto de la clindamicina sobre el sistema microbicida de PMNs
mediado por mieloperoxidasa.

El efecto de la clindamicina sobre el sistema microbicida mediado por mieloperoxidasa (MPO) de los PMNs lo evaluamos utilizando el sistema libre de células de Clark y Klebanoff. No observamos ninguna modificación en las cpm del sistema basal al adicionarla 2, 10 o 100 ug de clindamicina: cpm log₁₀ de 6.08 ± 0.02 vs 6.03 ± 0.017 , 6.02 ± 0.02 y 6.04 ± 0.07 respectivamente, media de tres experimentos (Figura 8). Igualmente, al examinar si clindamicina pudiera actuar como cofactor de este sistema (a través del átomo de cloro de su molécula), a las diferentes dosis estudiadas (2, 10 y 100 ug) las cpm obtenidas fueron inferiores al 1% del sistema completo: 0.35, 0.35 y 0.13% respectivamente (medias de 3 experimentos) (Figura 9 y 10).

FIG. 8. EFECTO DE CLINDAMICINA SOBRE
EL SISTEMA MPO-NA₂S₂O₈-H₂O₂*

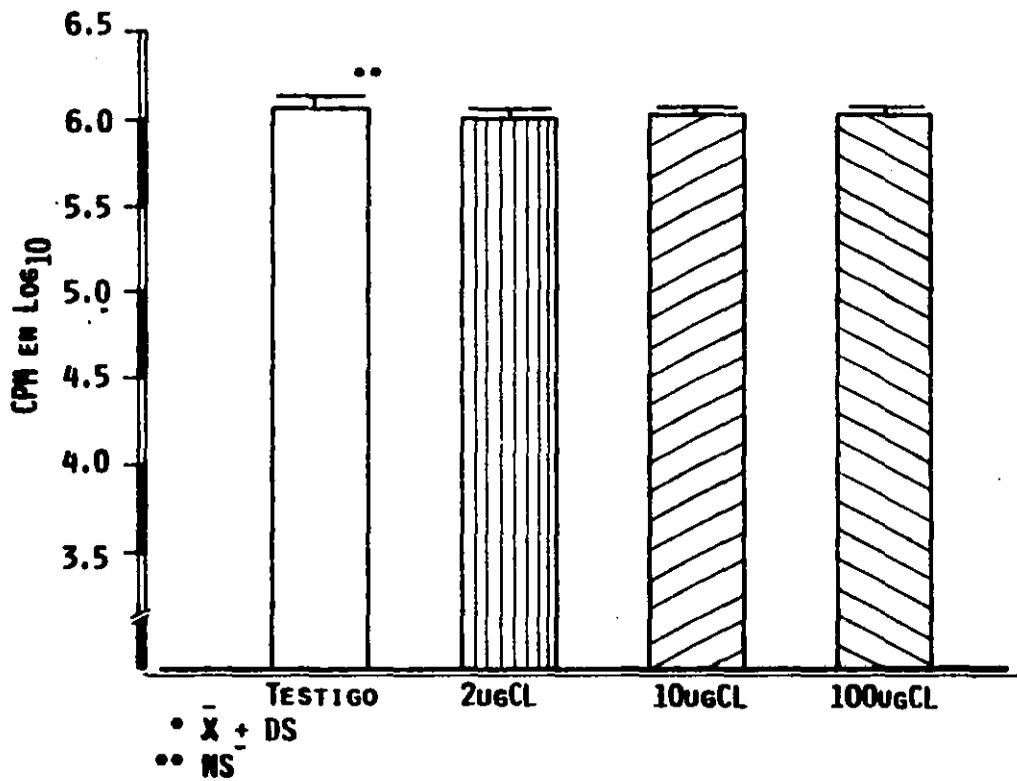


FIG. 9. PARTICIPACION DE CLINDAMICINA COMO COFACTOR DEL SISTEMA NPO-H₂O₂*

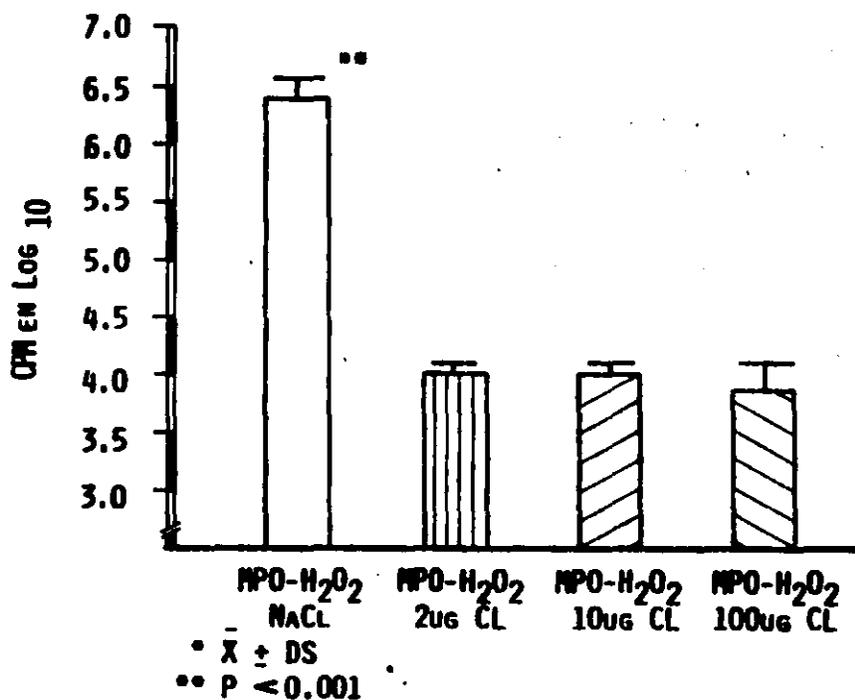
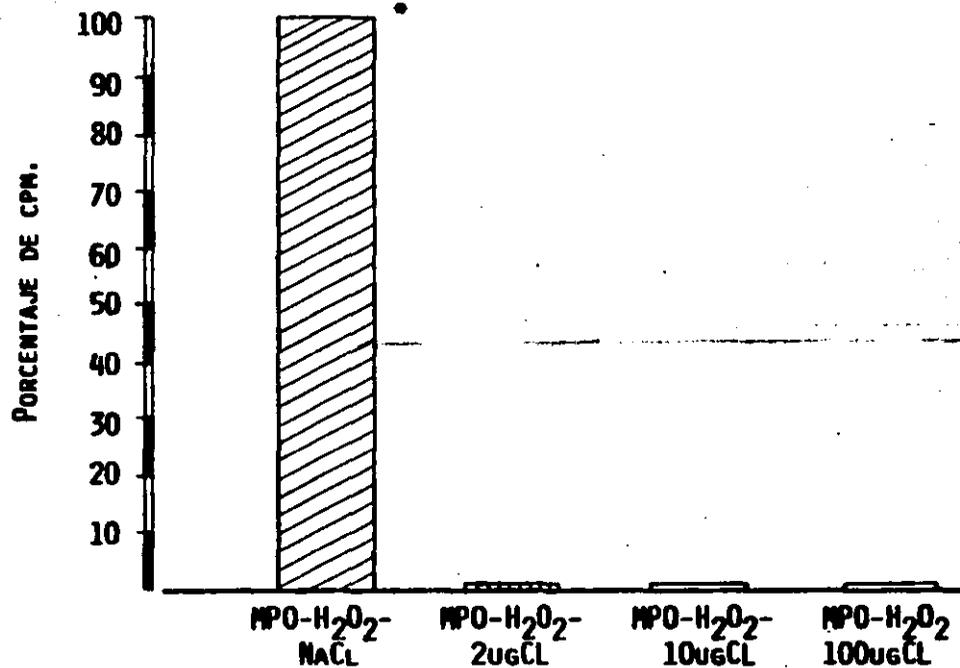


FIG. 10 PARTICIPACION DE CLINDAMICINA COMO COFACTOR DEL SISTEMA MPO-H₂O₂.



* $p < 0.001$

XI. DISCUSION.

Los antibióticos, además de su efecto antimicrobiano, pueden influir en algunos aspectos de los componentes del mecanismo de defensa del hospedero, entre los cuales se hallan las células fagocíticas, las cuales constituyen el centro de la respuesta inicial a la invasión bacteriana. Idealmente, un antibiótico debería de ser activo contra bacterias extracelulares—ser capaz, entre otras condiciones (como buena tolerancia, escasa o nula toxicidad), de penetrar dentro de las células fagocíticas y no interferir en la acción de las mismas. En este contexto, los antibióticos pueden ejercer efectos deletéreos o beneficiosos, las menos de las veces, sobre la función de los neutrófilos, lo cual podría tener implicación en la respuesta clínica a la infección, ya que una eficiente función de los sistemas de defensa del hospedero, constituye un factor determinante en la respuesta de la terapia antimicrobiana en pacientes infectados.

En años recientes, varios antibióticos, han sido investigados con respecto a su influencia sobre la función de los PMNs. Sin embargo, los estudios no han sido lo suficientemente extensos, en comparación a su amplia prescripción y utilización clínica, ni han tenido una adecuada consistencia. Una de las principales críticas a los trabajos surgidos con respecto al efecto de antibióticos en la función leucocitaria, es que los diferentes grupos han utilizado condiciones sumamente variables al examinar la interacción antibióticos—células fagocíticas. Así, se pueden mencionar el origen de PMNs (humanos vs animal), condiciones de incubación (número de células, tiempo de la misma), condiciones en las

que se evaluó la función (en presencia o ausencia del antibiótico), técnica utilizada al examinar una determinada función (diferentes técnicas de estudio de quimiotaxis, fagocitosis, capacidad bactericida), germen de referencia para el estudio de la función microbicida (germenes que al ser sensibles al antibiótico en estudio no permiten diferenciar el efecto farmacomodulador leucocitario del efecto antimicrobiano) y diferentes concentraciones de un mismo fármaco (y generalmente fuera del rango terapéutico). Como colorario, las conclusiones con respecto a un mismo antibiótico con frecuencia han resultado controvertidas y conflictivas (2).

El presente trabajo se enmarca dentro de este campo de la investigación Hospedero-antibiótico, habiéndonos enfocado a evaluar el efecto de una lincocinamida, la clindamicina, de amplia utilización actual en el tratamiento de infecciones bacterianas por cocos Gram (+) y anaerobios en general. Existen antecedentes con respecto a este tema. Sin embargo, lo reportado comparte las críticas a las que ya nos hemos referido anteriormente.

Hemos examinado primeramente la captación intracelular de clindamicina in vitro incubando 5×10^6 PMNs/ml (número representativo de lo que se encuentra normalmente por ml en sangre periférica) con concentraciones del fármaco que se hallan en los niveles séricos que se pudieran alcanzar durante su utilización terapéutica. Pudimos constatar que clindamicina penetra en los PMNs en todas las dosis estudiadas (0.5, 2, 5 y 10 ug), conclusión a la que llegamos en base a las fracciones de captación obtenidas con las diferentes dosis: 0.475 ± 0.09 , 0.829 ± 0.09 , 0.456 ± 0.085 y 0.178 ± 0.024 para 0.5, 2, 5, y 10 ug respectivamente y comparándolas con las fracciones de captación obtenidas al incubar las

mismas concentraciones del antibiótico con PMNs fijados con glutaraldehído y con SSBH (los cuales se utilizaron como control),- las que resultaron menor a 0.085 en todos los casos. El empleo de PMNs fijados con glutaraldehído (células momificadas en las que no pueden producirse penetraciones intracelulares) como control nos ha permitido diferenciar entre captación intracelular y contaminación de la fracción celular por mecanismo de arrastre superficial por agente particulado durante el ensayo. El hecho que la fracción de captación de PMNs fijados con glutaraldehído resultara similar a la obtenida con el antibiótico en solución libre de células (SSBH) confirma lo anterior. Nuestra observación- penetración intracelular de clindamicina- coincide con lo previamente reportado por otros grupos de investigadores; sin embargo, a diferencia de los demás, nosotros evaluamos el fenómeno de penetración intracelular con varias concentraciones del fármaco, manteniendo constante la variable células. Este hecho, nos permitió apreciar que la mayor fracción de captación se produjo con PMNs incubados con 2 ug de clindamicina ($\bar{X} = 0.829 \pm 0.09$), que cuando se utilizaron las concentraciones de 0.5 ($\bar{X} = 0.475 \pm 0.09$), 5 ($\bar{X} = 0.456 \pm 0.085$), y 10 ug ($\bar{X} = 0.178 \pm 0.024$). Esta observación, que las mayores fracciones de captación se obtuvieron con las menores concentraciones estudiadas (0.5, 5 y 2 ug) adquiere importancia ya que son justamente las encontradas en suero luego de su administración por vía oral o poco después del pico sérico cuando la administración del fármaco se realiza por vía parenteral. Con la metodología utilizada, podemos inferir contrastando la fracción de antibiótico asociada al estrato celular al utilizar PMNs viables,

con el asociado al mismo estrato al utilizar PMNs momificados, que clindamicina se concentra en los neutrófilos entre 2.1 veces en promedio (0.178/0.085) al incubarlo a 10 ug, hasta 17.3 veces (0.829/0.048) a 2 ug. Debe destacarse que estos valores son aproximados e inferenciales ya que no realizamos medición del agua intra y extracelular, lo cual hubiera sido lo óptimo (115).

Una vez definido que a concentraciones que se encuentran dentro de límites terapéuticos, clindamicina se concentra en los PMNs, pasamos a evaluar el efecto del fármaco in vitro sobre la quimiotaxis, la reducción del nitroazul de tetrazolio, fagocitosis (por el método de quimioluminiscencia) y capacidad microbicida de los PMNs, funciones que representan los diferentes eventos, luego de producida la marginación y adherencia al endotelio vascular, desarrollados por estas células fagocíticas desde la vasculatura hasta el sitio inflamatorio, cuyo desenlace finalmente dependerá en gran medida por la integridad de cada una de las mismas.

Con respecto a la función migratoria, observamos que clindamicina a la concentración de 2 ug incrementa significativamente la capacidad quimiotáctica de los PMNs, de $120 \pm 9.6 \mu\text{m}$ a $152 \pm 9 \mu\text{m}$, $p \leq 0.01$; a 10 ug, en cambio, hubo un leve incremento, el cual no alcanzó significancia estadística ($120 \pm 9.6 \mu\text{m}$ a $129 \pm 15 \mu\text{m}$, $p > 0.1$). Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado por Scevola y col(103), y Oleske y col (102), aunque difiere de lo informado por Faden(106), Majeski y col(101); Como se ha hecho mención en los antecedentes, hubieron diferencias metodológicas importantes con los demás grupos. No conocemos el mecanismo por el cual clindamicina pudiera actuar incrementando la quimiotaxis de los PMNs ni hemos realizado estudios adicionales tendientes a

dilucidarlo, aunque podrían hacerse especulaciones en este sentido; una posibilidad es que clindamicina por su carácter de base débil y tendencia a concentrarse en gránulos intracelulares (lisosomas), puede determinar liberación de calcio de los sitios de depósito intracelular (fenómeno observado por Styrt y Klemperer) (127), ión que juega un papel central como segundo mediador de la respuesta leucocitaria.

Hemos analizado también el efecto de la clindamicina sobre la función fagocítica de los PMNs utilizando 2 metodologías, que miden diferentes etapas del estallido respiratorio que se desencadena en respuesta al estímulo fagocítico: 1) la reducción del nitroazul de tetrazolio, que mide la generación de anión superóxido y 2) la quimioluminiscencia, que evalúa globalmente el fenómeno, a través de la medición de la luz emitida por PMNs durante la fagocitosis. Pudimos constatar que clindamicina incrementa la capacidad de reducción de nitroazul de tetrazolio, aunque tal incremento alcanzó significancia estadística solo a 2 µg (media de 0.389 ± 0.05 vs 0.303 ± 0.03 del grupo testigo, $p < 0.05$). Igualmente, PMNs incubados con esta misma concentración de clindamicina presentaron incremento significativo en la capacidad fagocítica, medida por quimioluminiscencia, tanto en el pico medio de la respuesta (media de cpm de 6.26 ± 0.09 vs 6.13 ± 0.09 , $p < 0.004$) como a los 60 min de su inicio (media de cpm de 6.06 ± 0.09 vs 5.89 ± 0.09 , $p < 0.001$), lo cual indica que PMNs expuestos a clindamicina presentan, no solamente mayor capacidad fagocítica oxidativa, sino también que la misma persiste aumentada, al compararlos con PMNs testigos sin el fármaco. Por otra parte, cuando

PMNs se incubaron o trataron con 10 o 100 ug, la capacidad fagocítica comparada con el grupo testigo fue significativamente menor (media de cpm de 6.08 ± 0.11 vs 5.81 ± 0.17 del grupo con 10 ug y 5.79 ± 0.17 del de 100 ug, $p < 0.02$). No tenemos explicación para lo observado en relación al efecto diferencial de clindamicina en función a concentración sobre la actividad fagocítica.

La última etapa de nuestro trabajo fue la evaluación del efecto de clindamicina sobre la capacidad microbicida de los PMNs. Para medir esta función estandarizamos una metodología en micrométodo, siguiendo básicamente lo utilizado por Edwards y col(121). La misma se ha comportado muy similar en relación al macrométodo tradicional del ensayo bactericida (r de Pearson de 0.8699, $p < 0.001$). La diferencia con respecto a esta radica principalmente en que se requiere menor número de células (4×10^5 vs 5×10^6 PMNs por variable estudiada), lo cual lo hace muy ventajoso para el examen de esta función en aquellas situaciones en que por razones éticas o técnicas deben extraerse volúmenes limitados de sangre, como serían los pacientes pediátricos, anémicos, infectados graves. Empleando esta metodología estudiamos la capacidad microbicida de PMNs tratados previamente con 2 y 10 ug de clindamicina, observando al igual que con las otras funciones analizadas, que este fármaco a la concentración de 2ug incrementa la capacidad microbicida (media de 2.52 ± 0.23 vs 1.58 ± 0.15 , $p < 0.01$) en forma significativa; en cambio a 10 ug, no se constató modificación (media de 1.64 ± 0.16 vs 1.58 ± 0.15 , $p > 0.1$). Consideramos que este incremento en la capacidad microbicida de los PMNs no puede

explicarse por el efecto antibiótico ya que la medición se realizó utilizando un germen resistente a su acción antibacteriana. No podemos descartar, sin embargo, que modificaciones no letales de la pared bacteriana por el antibiótico pudieran hacerlo más susceptible a los mecanismos microbicidas leucocitarios, aunque los PMNs utilizados para el ensayo microbicida fueron lavados pos-incubación y, por otra parte, si esta fuera la causa, no explica que una concentración mayor del fármaco no haya reproducido el efecto beneficioso.

De ahí que, finalmente, para dilucidar si el efecto incrementador de la función microbicida de los PMNs por clindamicina tenía lugar a través del mecanismo microbicida mediado por MPO, examinamos la influencia del fármaco sobre dicho sistema, en un modelo libre de células y realizando las mediciones en un contador de centelleo líquido en cpm. No observamos ninguna modificación de la reactividad del sistema mediado por MPO en presencia de clindamicina. Igualmente se comprobó que el fármaco no actúa como cofactor oxidable del sistema H_2O_2 -MPO, ya que las cuentas por min² obtenidas al adicionarlo fueron menores al 1% al compararlas con las producidas por el sistema completo (H_2O_2 -MPO-Haluro), dando así respuesta negativa a la interrogante que nos habíamos formulado referente a la participación del fármaco como cofactor de dicho sistema a través de la presencia de cloro en su molécula. Por tanto, el incremento de la capacidad bactericida que observamos por efecto de la clindamicina no se explica por acción del fármaco a nivel del sistema oxidativo mediado por MPO, y que representa el principal, pero no el único, de los mecanismos microbicidas del cual disponen los neutrófilos polimorfonucleares.

XII. CONCLUSIONES

Hemos examinado in vitro la interacción de clindamicina, lincoicinamida de utilización actual como antibiótico, con los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en dos contextos: 1) la captación intracelular del fármaco por los PMNs y 2) el efecto de clindamicina sobre la función de los PMNs, en los aspectos de quimiotaxis, fagocitosis (medida por reducción del nitroazul de tetrazolio y quimioluminiscencia) y capacidad microbicida.

Con respecto a la captación intracelular de clindamicina por los PMNs, constatamos que el fármaco penetra en estas células en todas las dosis estudiadas (0.5, 2, 5 y 10 μg), conclusión alcanzada en base a las fracciones de captación celulares obtenidas utilizando una metodología que nos permitió separar los PMNs de la solución en la cual se hallaban suspendidas y que contenían las concentraciones antes mencionadas del antibiótico. Estas fracciones de captación fueron de $(\bar{X} \pm \text{ESM})$: 0.475 ± 0.09 , 0.629 ± 0.09 , 0.456 ± 0.08 y 0.178 ± 0.024 , para 0.5, 2, 5 y 10 μg de clindamicina respectivamente, las cuales fueron contrastadas con las fracciones de captación obtenidas utilizando PMNs momificados con glutaraldehído (células en las que no pueden producirse penetración intracelular) e incubadas con concentraciones similares del fármaco, las que resultaron menor a 0.085 en todos los casos. Igualmente, observamos que la mayor fracción de captación se produjo con PMNs incubados con 2 μg de clindamicina lo que implicaría que el fármaco penetra en los PMNs a través de un mecanismo de penetración saturable en función a concentración farmacológica.

Con respecto al efecto in vitro del fármaco sobre la función de los PMNs, observamos que clindamicina a una concentración de 2 ug incrementa la capacidad quimiotáctica (de 120 ± 9.6 a 152 ± 9 um, $p < 0.01$), y la función fagocítica de los PMNs, la cual fue evaluada a través de la reducción cuantitativa de nitroazul de tetrazolio (incremento de 0.303 ± 0.03 a 0.389 ± 0.05 de densidad óptica, $p < 0.05$) y de la quimioluminiscencia, tanto en el pico medio de la respuesta (de $\text{cpm log } 6.13 \pm 0.09$ a 6.26 ± 0.09 , $p < 0.004$) como a los 60 minutos (de $\text{cpm log } 5.89 \pm 0.09$ a 6.06 ± 0.09 , $p < 0.001$). Este mismo efecto se observó con la capacidad microbicida la cual incrementó de 1.58 ± 0.15 a 2.52 ± 0.23 (índice de reducción bacteriana, $p < 0.01$); en cambio, al evaluar el efecto de 10 ug sobre los PMNs no se observó modificación benéfica de ninguna función examinada e incluso, en el caso de la quimioluminiscencia inhibición discreta pero significativa. No hemos realizado estudios para definir este efecto diferente de clindamicina en razón a dosis sobre la función de los PMNs, pero comportamiento similar se ha observado con otras drogas que actúan sobre los PMNs, como pentoxifilina (128).

Finalmente no pudimos demostrar que el efecto beneficioso de clindamicina sobre la función microbicida de los neutrófilos tenga lugar a través del sistema microbicida oxidativo mediado por mieloperoxidasa de estas células, ya que la reactividad de este sistema ($\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ -Haluro) medida en cpm , no varió al adicionar 2, 10 o 100 ug de clindamicina. Observamos igualmente que clindamicina no actúa como cofactor oxidable del sistema $\text{MPO-H}_2\text{O}_2$, hipótesis que habíamos planteado en virtud de la presencia de un átomo de haluro en su molécula.

La observación que clindamicina incrementa in vitro la actividad quimiotáctica, fagocítica y microbicida de los PMNs en concentraciones susceptibles de ser alcanzadas a nivel sérico durante su utilización terapéutica plantea su potencial empleo como farmacomodulador leucocitario en situaciones de deficiencia congénita o adquirida de la función de los PMNs, aún cuando esta aseveración requiera de demostración.

XIII. RESUMEN

En la presente tesis, en su primera parte, hemos evaluado la captación intracelular de clindamicina (CL), antibiótico del grupo de las lincocinamidas, por los neutrófilos (PMNs). Para este efecto, utilizamos el antibiótico radiomarcado en concentraciones semejantes a las alcanzadas en suero durante su administración terapéutica (0.5, 2, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) y empleando como metodología una técnica de centrifugación a alta velocidad a través de un gradiente que permite la separación de las células de la solución en la que se hallan. Observamos que CL se concentra en los PMNs en todas las concentraciones estudiadas, produciéndose el mayor índice de captación a la dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$ (C In/Ex de 17.3).

Posteriormente, pasamos a evaluar el efecto in vitro de CL sobre la función de PMNs provenientes de adultos sanos, atendiendo a que la escasa información disponible resulta sumamente contradictoria. Se constató que este fármaco a la concentración de 2 μg incrementa la capacidad quimiotáctica (de 120 ± 9.6 a 152 ± 9 μm , $p < 0.01$), la actividad fagocítica, medida por la capacidad de reducción del nitroazul de tetrazolio (de 0.303 ± 0.03 a 0.389 ± 0.05 , $p < 0.05$) como a través de la quimioluminiscencia (de \log_{10} 6.13 ± 0.09 a 6.26 ± 0.09 cpm, $p < 0.004$) y la capacidad microbicida de los PMNs (de un índice de reducción de UFC de 1.58 ± 0.15 a 2.52 ± 0.23 , $p < 0.01$). Para esta última determinación estandarizamos una técnica en micrométodo que ofrece ventaja sobre la metodología tradicional (macrométodo) en cuanto que utiliza menor número de células, haciéndolo útil para casos en que por razones médi-

caso éticas se deban utilizar volúmenes limitados de sangre.

Finalmente, no observamos ningún incremento en la reactividad del sistema microbicida oxidativo mediado por mieloperoxidasa de los PMNs(en un modelo acelular)en presencia de CL ni participación del fármaco como cofactor del mismo, hipótesis planteada en un intento de dilucidación del mecanismo de producción del efecto beneficioso de CL sobre la capacidad bactericida de los PMNs.

XIV. ANEXO
REACTIVOS Y SOLUCIONES

A. REACTIVOS.

1. Ficoll Type 400. No F-4375. Sigma Chemical Co. USA.
2. Hypaque (Diatrizoato de sodio)50%.Winthrop Products Inc. USA.
3. Dextran T 500. Pharmacia. Uppsala,Sweden.
4. Zimosano A. No Z-4250. Sigma Chemical Co. USA.
5. NitroBlue Tetrazolium. No N-6876. Sigma Chemical Co. USA.
6. Glicina. No 6-7126. Sigma Chemical Co. USA.
7. Glutaraldehido. No G-6257. Sigma Chemical Co. USA.
8. Aceite siliconado. No 1250. Harwick,Wilmington,Mass. USA.
9. Hematoxilina. No 75290. Fisher Scientific Co. USA.
10. Luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) No 3606.
Eastman Kodak Co. USA.
11. PPO (2,5-diphenyloxazole). Fisher Scientific Co. USA.
12. POPOP (1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]bencene). Sigma Chemical
Co. USA.
13. Cloruro de sodio. JT Baker S.A. de C.V. Xalostoc,México.
14. Cloruro de Potasio. JT Baker S.A. de C.V. Xalostoc,México.
15. Fosfato dibásico de sodio dianhidro. JT Baker S.A. de C.V.
Xalostoc,México.
16. Fosfato monobásico de potasio. JT Baker S.A. de C.V. Xalos-
toc,México.
17. Cloruro de amonio. Mallinckrodt Chemical Works. USA.
18. Cloruro de calcio (dihidrato). No 1511. Allied Chemical Co.USA.
19. Cloruro de magnesio(hexa-anhidro). Allied Chemical Co. USA.

20. Sulfato de magnesio cristalizado. Allied Chemical Co. USA.
21. Hepes(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid).
No H-3375. Signal Chemical Co. USA.
22. Caldo de soya tripticaseína. Bioxon de México,S.A. de C.V.
23. Agar de soya tripticaseína. Bioxon de México,S.A. de C.V.

B. SOLUCIONES.

1. Solución salina isotónica.

Cloruro de sodio	0.85 grs
Agua destilada	100 ml

2. Ficoll-Hypaque 1.077

Ficoll	9.6 grs
Hypaque 50%	30 ml
Agua destilada	120 ml

3. Dextran al 6%

Dextran	6 grs
solución salina isotónica	100 ml

4. Solución salina balanceada de de Hank(SSBH)

Cloruro de sodio	8.0 grs
Cloruro de potasio	0.4 grs
Fosfato dibásico de sodio	0.06 grs
Fosfato monobásico de potasio	0.06 grs
Glucosa	1.0 gr
Hepes	2.38 grs
Cloruro de calcio	0.14 grs
Cloruro de magnesio	0.10 grs
Sulfato de magnesio	0.10 grs
Agua destilada	1000 ml

5. Solución balanceada de fosfatos(SBF)

Fosfato dibásico de sodio	8.094 grs
Fosfato monobásico de potasio	2.448 grs
Cloruro de sodio	4.40 grs
Agua destilada	1000 ml

6. Cloruro de amonio al 0.85%

Cloruro de amonio	0.85 grs
Agua destilada	100 ml

7. Violeta de turk

Violeta de genciana	1 gr
Acido acético al 1.5%	100 ml

8. Azul tripano

Azul tripano	0.1 gr
Soluci6n salina isot6nica	25 ml

9. Medio de Gey-Hepes-Albúmina

a. soluci6n A

Cloruro de calcio	0.085 grs
Cloruro de magnesio	0.135 grs
Hepes	1.190 grs
Agua destilada	5 ml

b. soluci6n final

Cloruro de sodio	0.79 grs
Cloruro de potasio	0.034 grs
Dextrosa	0.1 gr
Albúmina al 22%	4.545 ml
Agua destilada	100 ml

10. Colorante de hematoxilina

Hematoxilina	0.25 grs
Etanol	2.5 ml
Alumbre de amonio	5.0 grs
Oxido de mercurio	0.125 grs
Acido acético	2 ml
Agua destilada	50 ml

11. Luminol

Fosfato dibásico de sodio	2.3004 grs
Fosfato monobásico de potasio	0.5206 grs
Luminol	0.1771

12. Fluido de centelleo

PPQ	6.0 grs
POPQP	0.05 grs
Tolueno	1000 ml

13. Solución de nitroazul de tetrazolio

Nitroazul de tetrazolio	0.1 gr
Solución salina bal. de Hank	100 ml

14. Medio liquido de cultivo de soya-tripticasa

Caldo de soya tripticaseina	3.0 grs
Agua destilada	100 ml

15. Agar de soya-tripticasa

Agar de soya tripticaseina	4 grs
Agua destilada	100 ml

XV. REFERENCIAS

1. Berendes H, Bridges RH, Good RA: A fatal granulomatous disease of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med* 1957; 40: 309-312.
2. Rotrosen D, Gallin JI: Disorders of phagocyte function. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 127-150.
3. Mandell L: Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocyte. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 683-697.
4. Hogan NA, Hill HR: Enhancement of neutrophil chemotaxis and alterations of levels of cellular cyclic nucleotides by levamisole. *J Infect Dis* 1978; 138: 437-444.
5. Metcalf D: The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; 67: 257-267.
6. Walker RI, Willemze R: Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 505-598.
7. Pulus LM, Bromeyer HE, Kurland SI et al: Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. *J Exp Med* 1979; 150: 257-267.
8. Lichtman MA, Weed RI: Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation: relationship to the cell function. *Blood* 1972; 39: 301-316.

9. Glasser L, Fiederlein RL: Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 1987; 69: 937-944.
10. Dallman PR, in *Pediatrics*, 16 th Ed., AM Rudolph, ed. New York: Appleton-Century-Crofts, Inc, 1977.
11. Athems JW, Hoob OP, Roob SO et al: Leukokinetics studies IV. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J Clin Invest* 1961; 40: 989-995.
12. Athems JW, Hoob OP, Roob SO et al: Leukokinetics studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J Clin Invest* 1961; 40: 159-164.
13. Gallin JI: Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood* 1984; 63: 977-983.
14. Hill HR: Clinical disorders of leukocyte function. In: *Contemporary topics in immunobiology*, R Snyderman, ed. New York: Plenum, 1984; 14: 345-393.
15. Hoover RL, Briggs RT, Karnovsky MJ: The adhesive interaction between polymorphonuclear leukocytes and endothelial cells in vitro. *Cell* 1978; 14: 423-428.
16. Gallin JI: Degranulating stimuli decrease the negative surface charge and increase the adhesiveness of human neutrophils. *J Clin Invest* 1980; 65: 298-306.
17. Springer TA, Thompson WS, Miller J et al: Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p-150, 95 glycoprotein family and its molecular basis. *J Exp Med* 1984; 160: 1901-1918.

18. Malech HL, Gallin JI: Neutrophils in human diseases. N Eng J Med 1987; 317: 687-694.
19. Gallin JI: Abnormal phagocyte chemotaxis: pathophysiology, clinical manifestations and management of patients. Rev Infect Dis 1981; 3: 1196-1220.
20. Snyderman R, Goetzl E: Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. Science 1981; 213: 830-837.
21. Painter RG, Sklar LA, Jesaitis AJ et al: Activation of neutrophils by N-formyl chemotactic peptides. Fed Proc 1984; 43: 2737-2742.
22. Fletcher MK, Gallin JI: Degranulating stimuli increase the availability of receptors on human neutrophils for the chemoattractant f-met-leu-phe. J Immunol 1980; 124: 1585-1588.
23. Cochrane CG: Mechanisms coupling stimulation and function in leukocytes. Fed Proc 1984; 43: 2729-2731.
24. Snyderman R, Smith ChD, Verghese MW: Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptor: roles of a guanine-nucleotide regulatory protein and polyphosphoinositide metabolites. J Leuk Biol 1986; 40: 785-800.
25. Root RK, Ryan JL: Humoral immunity and complement. In: Principles and practice of infectious diseases: GL Mandell, GR Douglas & JE Bennett, eds. New York: Wiley Medical, 1985; pp 31-57.
26. Horowitz MA: Phagocytosis of microorganisms. Rev Infect Dis 1982; 4: 201-225.

27. Drutz DJ, Mills J: Inmunidad e infección. En: Inmunología básica y clínica: DP Stites, H Fudenberg, D Stobos y JV Wells, eds. México DF: El Manual Moderno, 5a. Ed., 1985: pp 201-225.
28. Johnston RB, Klempner MR, Alper CA et al: The enhancement of bacterial phagocytosis by serum: the role of complement components and two cofactors. J Exp Med 1969; 129: 1275-1290.
29. Jasin HE: Human heat labile opsonins: evidence for their mediation via the alternative pathway of complement activation. J Immunol 1972; 109:26-31.
30. Joiner KA, Brown EJ, Frank MM: Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. Ann Rev Immunol 1984; 2:461-491.
31. Constantopoulos A, Najjar VA, Smith JW: Tuftsin deficiency: A new syndrome with defective phagocytosis. J Pediatr 1972; 80: 564-572.
32. Raynor RH, Doran JE, Reese AC: A polymorphonuclear leukocyte monolayer system for studies of phagocytosis. J Reticuloend Soc 1981; 29: 441-449.
33. Proctor RA: Fibronectin: A enhancer of phagocyte function. Rev Infect Dis 1987; 9: 6412-419.
34. Kulczycky AJ, Solanky L, Cohen L: Isolation and partial purification of Fc-binding proteins of human leukocytes. J Clin Invest 1981; 68: 1558-1565.

35. Fearon DT: Identification of the membrane glycoprotein that is the C3 b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B-lymphocyte and monocyte. J Exp Med 1980; 152: 20-30.
36. Wright SD, Griffin FM: Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. J Leuk Biol 1985; 38: 327-339.
37. Scribner DJ, Fahrney D: Neutrophil receptors for Ig G and complement: their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis. J Immunol 1976; 116: 892-897.
38. Wright SD, Silverstein SC: Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. J Exp Med 1983; 158: 2016-2023.
39. Wilkinson PC: The physiology and biochemistry of leukocyte chemotaxis. In: Chemotaxis and Inflammation: PC Wilkinson, ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1982; pp 63-105.
40. Boxer GJ, Curmutte JT, Boxer LA: Polymorphonuclear leukocyte function. Hosp Pract 1985; 20: 69-90.
41. Baehner RL, Boxer LA: Disorders of polymorphonuclear leukocyte function related to alterations in the integrated reactions of cytoplasmic constituents with the plasma membrane. Sem Hematol 1979; 16: 148-162.
42. Dechatelet LR: Oxidative bactericidal mechanisms of polymorphonuclear leukocytes. J Infect Dis 1975; 131: 295-303.

43. Klebanoff SJ: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* 1975; 12: 117-142.
44. Root RK, Cohen MS: The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 565-598.
45. Fallon J, Gallin JI: Neutrophil granules in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77 : 653-662.
46. Ganz T, Selsted ME, Lehrer R.I: Antimicrobial activity of phagocyte granule proteins. *Sem Resp Infect* 1986; 1: 107-117.
47. Root RK, Metcalf J, Oshino N et al: H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation and some regulating factors. *J Clin Invest* 1975; 55: 945-955.
48. Sbarra AJ, Karnovsky NL : The biochemical basis of phagocytosis. I Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1969; 234: 1355-1362.
49. Cohn ZA, Morse SI : Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes. I Observations on the requirements and consequences of particle ingestion. *J Exp Med* 1960; 111: 667-687.
50. Babior B: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Eng J Med* 1978; 298: 659- 668.
51. Tauber AI: Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood* 1987; 69: 711-720.

52. Gabig TG, English D: The arachidonate dependent activator of the subcellular neutrophil NADPH oxidase acts independent of phosphorylation. Clin Res 1986; 34: 657a.
53. Segal AW, Jones DTG, Wester D et al: Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. Lancet 1978; 2: 446-449.
54. Badwey JA, Curmutte JT, Karnovsky ML: The enzyme of granulocytes that produces superoxide and peroxide: an elusive pimpernel. N Engl J Med 1979; 300: 1157-1160.
55. Babior BM, Kipnes RS, Curmutte JJ: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of peroxide a potential bactericidal agent. J Clin Invest 1973; 52: 741-744.
56. Reed PW: Glutathione and hexosemonophosphate shunt in phagocytosing and hydrogen peroxide-treated rat leukocytes. J Biol Chem 1969; 244: 2459-2464.
57. Root RK, Metcalf JA: H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis: relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H_2O_2 . J Clin Invest 1977; 60: 1266-1279.
58. Shepherd VL: The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. Sem Resp Infect 1986; 1: 99-106.
59. Klebanoff SJ: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann Intern Med 1980; 93: 480-489.

60. Klebanoff SJ: Myeloperoxidase-Halide-hydrogen Peroxide anti-bacterial sistem. J Bacteriol 1968;95:2131-2138.
61. Klebanoff SJ: Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. J Exp. Med 1967; 126:1063-1078.
62. Allen RC, Stjernholm RL, Steelerh: Evidence for the generation of an electronic oxidation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. Biochem Biophys Res Commun 1972; 47: 679-684.
63. Dechatelet LR, Shirley PS: Evaluation of chronic granulomatous disease by a chemiluminescence assay of microliter quantities of whole blood. Clin Chem 1981; 27:1739-1741.
64. Cohen MS, Shirley PS, Dechatelet LR: Futher evaluation of luminol-enhanced luminescence in the diagnosis of disorders of leukocyte oxidative metabolism: role of myeloperoxidase. Clin Chem 1983; 29: 513-515.
65. Webb LS, Keele BB, Johnston RB: Inhibition of phagocytosis-associated chemiluminescence by superoxide dismutase. Infect Immun 1974; 9: 1051-1056.
66. Allen RC, Yevich SJ, Orth RW et al: The superoxide anion and singlet molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte. Biochem Biophys Res Commun 1974; 60: 909-917.

67. Chesson BD, Christensen RL, Sperling R et al: The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J Clin Invest* 1976; 58: 789-796.
68. Hatch GE, Gardner DE, Menzel DF: Chemiluminescence of phagocytic cells caused by N-formylmethionyl peptides. *J Exp Med* 1978; 147: 182-195.
69. Cheung K, Archibald AC, Robinson MF: The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. *J Immunol* 1983; 130: 2324-2329.
70. Allen RC, Coose LD: Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69: 245-252.
71. Stevens P, Winston DJ, Van Dyke K: In vitro evaluation of opsonic and cellular granulocyte function by luminol-dependent chemiluminescence: utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states. *Infect Immun* 1978; 22: 41-51.
72. Segal AW: Nitroblue-Tetrazolium tests. *Lancet* 1974; 2: 1248-1252.
73. Baehner RL, Boxer LA, Davis J: The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1979; 48: 309-313.

74. Johnston RB, Keele BB, Misra HP et al: The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity: studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. J Clin Invest 1975; 55: 1357-1372.
75. Kretshmer RR, Papierniak CK, Stewardson-Krieger P et al: Quantitative nitroblue-tetrazolium reduction by normal newborn monocytes. J Pediatr 1977; 90:306-309.
76. Cowan DL, Seglman AB, eds: Antibiotics in historical perspective. Merck Sharp and Dohme International, 1981.
77. Hand WL: Interaction between antibiotics, phagocytes and bacteria. Clin Immunol News 1984; 5: 157-161.
78. Quie PG, Hetherington SV: Patients with disorders of phagocytic cell function. Pediatr Infect Dis 1984; 3: 272-280.
79. Pizzo PA: Granulocytopenia and cancer therapy. Cancer 1984; 54: 2649-2661.
80. Muñoz J, Geister R: Inhibition of phagocytosis by aureomycin. Proc Soc Exp Biol Med 1950; 75: 367-370.
81. Magerlein BJ, Birkenmeyer RD, Kagan F: Chemical modification of lincomycin. Antimicrob Agents Chemother 1966; 6: 727-736.
82. Sande MA, Mandell GL: Agentes antimicrobianos. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. AG Gilman, LS Goodman y A Gilman, eds. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 6a. Ed. 1982; p 1197-1221.

83. Reusser F: Effect of lincomycin and clindamycin on peptide chain inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7: 32-37.
84. Kucers A, Mck Bennett N: Lincomycin and clindamycin. In: *The use of antibiotics*, A Kucers and N Mck Bennett, eds. London: W Heineman Medical Book 1979; 470-495.
85. Keusch GT, Present DH: Summary of a workshop on clindamycin colitis. *J Infect Dis* 1976; 133: S 578-587.
86. Levison ME, Brau JC, Ries K: Treatment of anaerobic bacterial infections with clindamicyn-2-phosphate. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5: 276-280.
87. Neu HC, Prince A, Neu CO et col: Incidence of diarrhea and colitis associated with clindamicyn therapy. *J Infect Dis* 1977; 135: S 120-125.
88. Lesson HE, Prince AB, Honour P et al: *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1978; 1: 1063-1066.
89. Gemmel CG, Peterson PK, Schmeling D et al: Potentiation of opsonization and phagocytosis of Streptococcus pyogenes following growth in the presence of clindamycin. *J Clin Invest* 1981; 67: 1249-1256.
90. Gemmel CG, Abdul-Amir MK: Antibiotic-induced changes in streptococci with respect to their interaction with human polymorphonuclear leukocytes. In: *Current Infect Dis*: J Nelson, C Grassi, eds. Am Soc Microbiol, Washington DC, 1980; 810-812.

91. Howard RJ, Soucy DM: Potentiation of phagocytosis of Bacteroides fragilis following incubation with clindamycin. J Antimicrob Chemo 1983; 12: S 63-68.
92. Zaleznik DF, Zhang Z, Onderdonik AB et al: Effect of subinhibitory doses of clindamycin on the virulence of Bacteroides fragilis: role of lipopolysaccharide. J Infect Dis 1986; 155: 40-46.
93. Veringo E, Verhoef J: Influence of antibiotics on phagocytic defense. Clin Immunol News 1985; 6: 49-51.
94. Lianou PE, Bassaris HP, Votta EG et al: Interaction of sub-minimal inhibitory concentrations of clindamycin and gram-negative aerobic organisms: effects on adhesion on polymorphonuclear leukocyte function. J Antimicrob Chemo 1985; 15: 481-487.
95. Hand WL, King-Thompson: Membrane transport of clindamycin in alveolar macrophages. Antimicrob Agents Chemo 1982; 21: 241-247.
96. Klempner MS, Styrt B: Clindamycin uptake by human neutrophils. J Infect Dis 1981; 144: 472-479.
97. Klempner MS, Styrt B: Alkalinization of the intralysosomal pH by clindamycin and its effects on neutrophil function. J Antimicrob Chemo 1983; 12: S 39-50.
98. Prokesch RC, Hand WL: Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob Agents Chemo 1982; 21: 373-380.

99. Jacobs RF, Thompson JW, Kiel DP et al: Cellular uptake and cell-associated activity of third generation cephalosporins. *Pediatr Res* 1986; 20: 909-912.
100. Clindamycin-Med Letter. 1970; 12: 83.
101. Majeski JA, McClellan MA, Alexander JW: Effect of antibiotics on the in vitro neutrophil chemotactic response. *Am Surg* 1976; 785-788.
102. Oleske JM, De la Cruz A, Ahdieh AH et al: Effects of antibiotics on polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence and chemotaxis. *J Antimicrob Chemo* 1983; 12: S 355-38.
103. Scevola D, Concia E, Tinelli M et al: Chemiluminescence, phagocytosis, chemotaxis and killing activity of human leukocytes exposed to clindamycin. *Microbiologica* 1986; 9: 209-214.
104. Welch WD, Davis D, Thrupp LD: Effect of antimicrobial agents on human polymorphonuclear leukocyte microbicidal function. *Antimicrob Agents Chemo* 1981; 20: 15-20.
105. Siegel JP, Remington JS: Effect of antimicrobial agents on chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes in response to phagocytosis. *J Antimicrob Chemo* 1982; 10: 505.
106. Faden HS: Effects of antibiotics on neutrophil functions. *Clin Immunol News* 1984; 5: 161-164.

107. Limbert M, Seibert G, Schninner E: The influence of antibiotics on the phagocytosis-associated chemiluminescence of guinea pig polymorphonuclear neutrophils. In: The influence of antibiotics on the Host-Parasite relationship, Eichemberg, Halm, Opferkuch, eds. New York. Springer Verlag, 1982; 74-86.
108. Pickering LK, Erisson CD, Kohl S: Effect of chemotherapeutic agents on metabolic and bactericidal activity of polymorphonuclear leukocytes. *Cancer* 1978; 42:1741-1746.
109. Silva J, Dembinski S, Schaberg D: Effects of subinhibitory antibiotics on bactericidal activity of chronic granulomatous disease granulocyte in vitro. *J Antimicrob Chemo* 1983; 12:21-27.
110. Jacobs RF, Wilson CB: Activity of antibiotics in chronic granulomatous disease leukocytes. *Pediatr Res* 1983; 17: 916-919.
111. Zimmerli W, Lew PD, Suter S et al: In vitro efficacy of several antibiotics against intracellular S. aureus in chronic granulomatous disease. *Helv Paediatr Acta* 1983; 38: 51-61.
112. Faden H, Hong JJ, Ogra PL: In vivo effects of clindamycin on neutrophil functions. *J Antimicrob Chemo* 1985; 16: 649-657.
113. Bassaris HP, Lianon PE, Skoutelis AT et al: In vitro effects of clindamycin on polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and killing of gram-negative organisms. *J Antimicrob Chemo* 1987; 19: 467-473.
114. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: S 77-88.

115. Johnson JD, Hand WL, Francis JB et al: Antibiotic uptake by alveolar macrophages. J Lab Clin Med 1980; 95: 429-439.
116. Leukocyte Chemotaxis: Microfilter method of evaluation. In: Investigation of phagocytes in disease: SD Douglas, PG Quie, eds. New York: Churchill Livingstone, 1981; pp 15-19.
117. Fulk W, Goodwin RH, Leonard EI: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J Immunol Methods 1980; 33: 239-247.
118. Zigmond SH, Hoesch JG: Leucocyte locomotion and chemotaxis. J Exp Med 1973; 137-410.
119. Baehner RL, Nathan DG: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. N Eng J Med 1968; 278: 971-976.
120. Selvaraj RJ, Sbarra AJ, Thomas GB et al: A microtechnique for studying chemiluminescence response of phagocytes using whole blood and its application to the evaluation of phagocytes in pregnancy. J Reticuloendothel Soc 1982; 31: 3-16.
121. Edwards MS, Baker CJ, Kasper DL: Opsonic specificity of human antibody to the type III polysaccharide of group B Streptococcus. J Infect Dis 1979; 140: 1004-1008.
122. Quie PG, Mills EL: Granulocyte microbicidal activity. In: Investigation of phagocytes in disease, SD Douglas, PG Quie, eds. New York: Churchill Livingstone, 1981; pp 62-65.

123. Clark RA, Klebanoff SJ, Einstein AB et al: Peroxidase- H O -
2 2
Halide System: Citotoxic effect on mammalian tumor cells.
Blood 1975; 45: 161-170.
124. Allen RC: Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated
antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in
the phenomenon of electronic excitation. Biochem Bioph Res
Commun 1975; 63: 675-683.
125. Downie NM, Heath RW: Métodos Estadísticos aplicados. México:
Harla S.A. de C.V., 3 Ed; 1973.
126. Daniel WW: Bases bioestadísticas para el análisis de las cien-
cias de la salud. México DF: Editorial Limusa, 1985.
127. Styrt B, Klempner MS: Effect of lysosomotropic weak bases on
calcium redistribution by stimulated neutrophils. Clin Res
1985; 33: 420 A.
128. Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL: Inhibition of proinflama-
tory neutrophil (PMN) activation by pentoxifilline (abstr).
Clin Res 1987; 35:618a.