

11282 Ref. 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GOMEZ"

**" EFECTO DE FOSFATIDILCOLINA EN LA
DEPURACION RETICULOENDOTELIAL DE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE EN RATAS
RECIEN NACIDAS. PARTICIPACION DE
INTERLEUCINA-6 "**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA

JAVIER MANCILLA RAMIREZ

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	10
HIPOTESIS	10
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	15
DISCUSION	18
RESUMEN	22
REFERENCIAS	23
CUADROS	32
FIGURAS	34

INTRODUCCION

Las infecciones bacterianas sistémicas siguen siendo una de las primeras causas de morbilidad y muerte en recién nacidos (RN) y las bacterias gramnegativas continúan siendo los principales agentes causales de septicemia neonatal en nuestro medio (1,2). La mayor susceptibilidad del neonato a este tipo de infecciones está condicionada por su menor capacidad de respuesta inflamatoria aguda. La depuración retículoendotelial de bacterias encapsuladas, como *Klebsiella pneumoniae*, es deficiente en los recién nacidos, lo cual parece contribuir a la gran susceptibilidad del neonato a las infecciones sistémicas por este agente (3).

K. pneumoniae es una bacteria gramnegativa encapsulada. Es una de las primeras causas de bacteriemias primarias en pacientes hospitalizados en todo el mundo (4) y de septicemia y meningitis en recién nacidos en México (1,2,5). Al igual que las demás bacterias gramnegativas, contiene en su pared un lipopolisacárido o endotoxina, el cual es responsable de desencadenar varios aspectos de la respuesta inflamatoria aguda a la infección bacteriana e induce cambios sistémicos que se manifiestan con fiebre, somnolencia, taquicardia, cambios en las cuentas de leucocitos y plaquetas y aumento en la síntesis de proteínas reactantes de fase aguda (6). Todos estos cambios son mediados por proteínas con actividades hormonales que modulan la respuesta inmunológica y que pertenecen al grupo de factores solubles denominados citocinas (7). Entre más de 50 citocinas conocidas, el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores estimulantes de colonias en los órganos hematopoyéticos (CSF) y las interleucinas (IL), son las proteínas que inducen la mayoría de los cambios que se presentan como respuesta a una infección por bacterias gramnegativas o a la administración experimental de endotoxina (8).

En estudios con ratones, hemos observado que al administrar una suspensión de fosfatidilcolina (FC) de soya por vía intraperitoneal (ip) se presenta un aumento significativo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) circulantes, lo cual no sucede con la administración de otros lípidos saturados (9). La administración de FC aumenta la depuración retículoendotelial de partículas de carbono en ratones (10) y mejora la sobrevivencia de animales con infección experimental por *Staphylococcus aureus* (11).

En estudios *in vitro*, se ha observado que FC y su metabolito lisofosfatidilcolina (LFC) aumentan la actividad fagocítica de leucocitos mononucleares y PMN retados con partículas de látex o con bacterias muertas por calor (12,13). Además, los macrófagos peritoneales de ratones inoculados con FC por vía ip se convierten en macrófagos activados (11), los cuales son capaces de producir y liberar interleucina-1 (IL-1) a la circulación sistémica (7). Los efectos de leucocitosis y neutrofilia que hemos observado en ratones (9) y en ratas (14,15) inoculados con FC podrían ser explicados por efecto de IL-1.

En el presente estudio se describen los efectos de la administración ip de FC en las respuestas de sobrevida, en las cuentas de leucocitos circulantes, depuración retículoendotelial, hematopoyesis extramedular y producción de IL-1 y de IL-6 en ratas Wistar recién nacidas inoculadas con una dosis letal de *K. pneumoniae*.

ANTECEDENTES

Las infecciones bacterianas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todos los hospitales del mundo. Uno de los agentes causales de septicemia más frecuentes en pacientes hospitalizados es *Klebsiella pneumoniae* (4). Las infecciones nosocomiales producidas por esta bacteria son difíciles de controlar, debido a que frecuentemente están implicadas cepas resistentes a los antimicrobianos de uso común (16,17). Las principales bacterias que causan sepsis neonatal en varios hospitales de la Ciudad de México son *K. pneumoniae* y *Escherichia coli* (1,2,5,18). Estas dos bacterias, al igual que los estreptococos del grupo B y *Staphylococcus epidermidis*, que son actualmente las dos primeras causas de sepsis neonatal en Estados Unidos de Norteamérica (19), están provistas de una cápsula externa constituida por unidades repetitivas de varios monosacáridos que les dan características antigénicas por las que pueden ser reconocidas serológicamente (20)

Las bacterias que contienen una cápsula externa, generalmente constituida por un polisacárido, tienen la capacidad de evadir la fagocitosis. Este fenómeno se ha tratado de explicar por un mecanismo de tolerancia o "parálisis inmunológica" inducido por la presencia de grandes cantidades del polisacárido, las cuales ejercen un efecto de neutralización de anticuerpos, o por un efecto tóxico directo de la sustancia capsular de neumococos (21) o de *Klebsiella pneumoniae* (22) sobre las células fagocíticas y células inmunocompetentes.

Otro mecanismo de evasión de la fagocitosis que la cápsula proporciona a tales bacterias es el bloqueo de la opsonización por factores del complemento, como sucede con el estreptococo tipo III del grupo B, *Escherichia coli* K-1 y *Neisseria meningitidis* del tipo B, cuyos respectivos polisacáridos contienen un ácido siálico en posición terminal que produce una inhibición total de las dos vías de activación del complemento (23,24), a menos que se encuentren presentes anticuerpos capsulares específicos (25). En el caso de varias cepas capsuladas de *Streptococcus pneumoniae*, el factor C3b que se deposita sobre la cápsula muestra una gran disminución en la afinidad por el factor B-properdina, de tal manera que la amplificación del sistema por la vía alterna es mínima, lo cual limita

la capacidad de bacteriolisis del complemento, la opsonización de las bacterias y la fagocitosis (26,27).

A diferencia de las bacterias capsuladas, las que no lo son pueden inducir activación de la vía alterna del complemento mediante diversos componentes de su pared celular y, en el caso específico de bacterias gramnegativas, mediante el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de su pared externa (28). El LPS puede inducir también activación de la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpos específicos (29,30). Sin embargo, para que este mecanismo de activación sea inducido por bacterias encapsuladas, se requiere de la presencia de anticuerpos anticapsulares específicos (28).

Las células fagocíticas que participan en la depuración de bacterias son los leucocitos PMN, monocitos y macrófagos, los cuales poseen receptores de superficie en sus membranas celulares para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas de clase IgM e IgG y para el factor C3b del complemento (31-33). Cuando se produce bacteremia, la depuración de bacterias por monocitos y macrófagos que constituyen el sistema mononuclear fagocítico (SMF), antes conocido como sistema retículoendotelial (SRE), desempeña un importante papel en el control de los procesos de septicemia (34). Las células del SMF se distribuyen en diferentes órganos y tejidos del organismo y provienen de leucocitos mononucleares originados en la médula ósea y que en su fase previa de establecimiento como macrófagos en determinados tejidos se encuentran circulando como monocitos en la sangre (35). La localización de los macrófagos es muy extensa, pero los que desempeñan predominantemente funciones de fagocitosis se encuentran en hígado, bazo, pulmones, médula ósea y ganglios linfáticos. La actividad fagocítica de limpieza o depuración de bacterias de la sangre se lleva a cabo en un 85% a 90% en los macrófagos de hígado y de bazo (36). La participación de los macrófagos alveolares pulmonares parece tener importancia en etapas tempranas o incipientes de la bacteremia (37); sin embargo, su actividad de depuración se hace poco eficiente después, cuando ya la septicemia se encuentra establecida (38).

Cuando la bacteremia es prolongada, repetitiva o de gran magnitud, la depuración hepática y la esplénica adquieren gran importancia para controlar la septicemia. Estos hallazgos se han descrito en animales no inmunes infectados experimentalmente con *Streptococcus pneumoniae* (39) o con *K. pneumoniae* (40). La

depuración de varias cepas de *E. coli* y de *Salmonella* es menor en ratas recién nacidas (RN) que en las adultas (41), lo cual se relaciona con la capacidad del hígado para capturar bacterias, ya que ésta aumenta con la edad (42,43). También los macrófagos alveolares pulmonares de animales RN muestran actividades fagocítica y bactericida disminuídas cuando son retados con bacterias encapsuladas como *E. coli* o *Staphylococcus aureus* (44), lo cual parece estar relacionado con deficiencia en las actividades de lisozima, del ciclo de Krebs y de la vía hexosa-monofosfato de estas células (45). Tales funciones tienden a recuperarse después de la primera semana de edad (44).

La capacidad de depuración bacteriana pulmonar es deficiente en animales RN infectados experimentalmente con *Staphylococcus aureus* (46), con estreptococos del grupo B (47), con neumococos (48), o con *K. pneumoniae* (40). Aunque la cantidad de macrófagos alveolares por gramo de tejido pulmonar es menor en los animales RN que en los adultos, la depuración pulmonar de bacterias sigue siendo deficiente en las primeras semanas de edad, aún a pesar del incremento en el número de células fagocíticas residentes en los pulmones (44,46-48). La depuración hepática y esplénica de coloide se ha reportado disminuída en ratas RN (49). En las primeras semanas de edad se encuentra en este modelo animal una mejoría gradual de la depuración hepática de coloide, pero no de la depuración en el bazo. De estos resultados se ha sugerido una hipoesplenia fisiológica en animales RN, que explicaría en parte su mayor susceptibilidad a las infecciones por bacterias encapsuladas, tal como sucede en huéspedes asplénicos (50-52).

En estudios previos, efectuados en ratas Wistar con sepsis experimental por *Klebsiella pneumoniae*, hemos observado una notable diferencia entre los patrones de depuración bacteriana de ratas adultas y recién nacidas, con una importante depuración pulmonar en las fases tempranas de la septicemia en ratas adultas, a diferencia de una depuración pulmonar tardía y deficiente en los animales RN (40). También observamos un predominio discreto de la depuración esplénica en las ratas adultas y un claro predominio en la depuración hepática en las ratas RN; sin embargo, la eliminación de bacterias fue más efectiva en el bazo. La bacteremia cuantitativamente mayor y de duración más prolongada en las ratas RN sugiere una hipoesplenia fisiológica, manifestada por la menor capacidad de depuración esplénica, y una menor capacidad del

hígado para eliminar a la bacteria, aún a pesar de la mayor capacidad de este último órgano para captar bacterias de la sangre (40).

La respuesta de leucocitos PMN, que constituyen la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas agudas, se caracteriza en animales y humanos RN por una leucocitosis temprana y fugaz que representa una salida rápida de reservas medulares de granulocitos (53-55), seguida de una respuesta de leucopenia que puede llegar a representar agotamiento de las reservas medulares cuando la infección se prolonga y no es controlada (56). Las reservas de granulocitos en el RN son de 5 a 7 veces menores que en el adulto (57) y la proliferación medular de precursores de granulocitos es deficiente en los neonatos (58); de tal manera, que durante una infección grave los RN pueden cursar con neutropenia absoluta y alto riesgo de muerte (56). Las fases de leucocitosis y leucopenia descritas por Christensen, las hemos observado también en las ratas RN infectadas por *Klebsiella* (40).

En otros estudios, hemos investigado en ratones, ratas y pacientes pediátricos el efecto del fosfolípido fosfatidilcolina (FC) sobre la respuesta aguda a la infección y especialmente sobre la capacidad fagocítica y la actividad bactericida de las células fagocíticas (9,14,59-62). El fosfolípido más abundante de la capa externa de las membranas celulares es la FC, que de acuerdo a su relación proporcional con el colesterol determina la fluidez y movilidad de la membrana celular y cambios de carga eléctrica en esta capa (63,64). Las membranas celulares están constituidas por una bicapa de fosfolípidos que presenta grupos hidrofóbicos en la interfase de las dos capas y grupos hidrofílicos expuestos al citoplasma o al espacio extracelular (65). La presencia de FC en la membrana es regulada por varios mecanismos de síntesis y catabolismo (66,67) y la administración exógena de FC modifica la relación colesterol:FC en la membrana (68,69), lo cual disminuye la microviscosidad lipídica y aumenta la fluidez de la membrana celular; tales cambios modifican la disponibilidad de receptores de superficie (70) y alteran los mecanismos de señales intracelulares (66,71).

La membrana celular de los fagocitos juega un importante papel en el proceso de fagocitosis, exponiendo receptores para los anticuerpos y factores del complemento que opsonizan a las bacterias y partículas extrañas al organismo (32,33) y desencadenando los mecanismos bactericidas de estas células (72). Las fosfolipasas A1 y

A2, enzimas asociadas a la membrana, actúan sobre la FC para producir lisofosfatidilcolina (LFC) (67,73). Este metabolito de la FC estimula *in vitro* la capacidad fagocítica de leucocitos PMN (13) y de macrófagos (12), inhibe a la enzima adenil-ciclase y estimula a la guanil-ciclase (71), lo cual limita la producción de AMP cíclico y favorece la producción de GMP cíclico. El GMP cíclico, a su vez, promueve la quimiotaxis y degranulación de leucocitos PMN (74).

Al administrar FC por vía ip a ratones infectados experimentalmente con *Staphylococcus aureus*, Sowar y cols. observaron que la sobrevivencia de los animales mejoró (11). De igual manera, Santos y cols. demostraron un efecto protector de la FC en las crías de ratas con infección experimental por estreptococos del grupo B (59). En ratones adultos inoculados con FC por vía ip, hemos observado una respuesta de neutrofilia en ausencia de infección (9). Esta respuesta de leucocitosis fue mucho más significativa 24 horas después de retar con una dosis letal media (DL₅₀) de *Klebsiella pneumoniae* a ratas Wistar adultas que habían sido previamente inoculadas con FC (14,15).

Tanto en ratas adultas (9,14,15,62) como en ratas RN (17) con septicemia experimental por *Klebsiella*, hemos observado que la FC mejora la sobrevivencia de los animales. La depuración bacteriana en ratas adultas tratadas con FC e infectadas con *Klebsiella pneumoniae* tres días después es más rápida (14). Este hallazgo podría estar relacionado con la capacidad de FC para activar macrófagos peritoneales (11), los cuales muestran mayor capacidad de depuración de partículas inertes después del inóculo de FC por vía ip (10). La posibilidad de que FC produzca una activación inespecífica de macrófagos, con la subsecuente producción de interleucina-1 (IL-1) por los macrófagos estimulados (7), podría explicar la leucocitosis y la neutrofilia que observamos en los animales inoculados con FC (9,14,15). Esto sugiere la posibilidad de que una adecuada biodisponibilidad de la FC exógena (75) permita su incorporación a las membranas celulares de los fagocitos (68,69), llámense macrófagos o PMN. La mayor capacidad de depuración de bacterias (40) y de partículas de carbono (10), así como el incremento en el número de leucocitos PMN en los animales tratados con FC, sugieren que las células fagocíticas de estos animales mejoran su actividad fagocítica de depuración y su capacidad bactericida.

En un estudio reciente, se observó que los leucocitos PMN de adultos sanos que fueron alimentados por tres días con FC duplicaron

su capacidad para fagocitar y matar a *Candida albicans* y la cantidad de ácido araquidónico (AA) en sus membranas se triplicó, dando lugar a una mayor producción de leukotrieno B₄ (61). Aunque en ese estudio no se determinó la producción de otros metabolitos del AA, como prostaglandinas y tromboxanos, el hecho de demostrar que la administración exógena de FC es capaz de aumentar las reservas de AA sugiere que los factores que estimulan su degradación por activación de 5-ciclooxigenasa, como el LPS y la interleucina-1 (7), estarían en posibilidad de generar más metabolitos activos y modificar la intensidad de la respuesta inflamatoria aguda a las infecciones.

Considerando las características propias de la inmunidad del huésped RN, en particular su deficiente capacidad de respuesta leucocitaria a la infección aguda y su pobre capacidad de depuración bacteriana, que le hacen más susceptible a las infecciones por bacterias encapsuladas como *K. pneumoniae*, y tomando en cuenta que los estudios experimentales con FC sugieren la posibilidad de mejorar, precisamente, la respuesta leucocitaria y la depuración bacteriana por un mecanismo de inmunoestimulación inespecífica, nos propusimos en este estudio tratar de modificar el patrón de depuración retículoendotelial bacteriana en ratas RN mediante la administración de FC.

Diversos productos bacterianos, en especial el LPS de las bacterias gramnegativas, son capaces de estimular en los macrófagos la producción de mediadores solubles de la respuesta inflamatoria aguda a la infección (7). IL-1, antes conocida como el pirógeno endógeno, es el principal de tales productos y ejerce sus efectos en prácticamente todos los tejidos del organismo (76). En las infecciones sistémicas por bacterias gramnegativas, IL-1 es el principal mediador del choque séptico (77). Además, es el principal estímulo para la producción de IL-6, la cual induce en los hepatocitos la síntesis de las proteínas reactantes de fase aguda, actúa como un factor hematopoyético y como factor de maduración para que los linfocitos B produzcan inmunoglobulinas de clase IgG (78,79). Muchos de los efectos de IL-1 son mediados a través de la generación de metabolitos del ácido araquidónico, tales como las prostaglandinas (PG). La inhibición de PGE₂ por bloqueadores de la 5-ciclooxigenasa puede reducir la fiebre y otros efectos inducidos por IL-1, pero no modifica los cambios hemodinámicos del choque séptico cuando la infección se ha establecido (7,76,77,80). IL-6 se ha postulado como una citocina anti-inflamatoria (80) que puede regular negativamente

la producción de IL-1 (81). Es posible que una producción deficiente de IL-6 pudiera ser parcialmente responsable de la menor capacidad de respuesta inflamatoria que se observa en el periodo neonatal. Sin embargo, la dinámica de producción *in vivo* de esta citocina en RN con septicemia no ha sido estudiada.

Con los antecedentes expuestos, se plantea la posibilidad de que la respuesta inflamatoria inducida por la bacteria gramnegativa *Klebsiella pneumoniae* pueda ser modificada por la administración exógena de FC. En el presente trabajo de Tesis de Doctorado, nos propusimos determinar el efecto de FC en la depuración bacteriana, la respuesta leucocitaria y su relación con la producción de IL-1 y de IL-6 en ratas RN con septicemia por *K. pneumoniae*, utilizando para tales fines el modelo de infección experimental establecido en mi trabajo de Tesis de Maestría (40).

OBJETIVOS

1. Modificar el patrón de depuración retículoendotelial de *Klebsiella pneumoniae* en ratas recién nacidas mediante la administración ip de fosfatidilcolina.
2. Modificar la respuesta leucocitaria a la sepsis experimental por *Klebsiella pneumoniae* en ratas recién nacidas mediante la administración ip de fosfatidilcolina.
3. Determinar la capacidad de producción de interleucina-1 y de interleucina-6 en ratas recién nacidas inoculadas con fosfatidilcolina y retadas con *Klebsiella pneumoniae*.

HIPOTESIS

La susceptibilidad de las ratas recién nacidas a la sepsis experimental por *Klebsiella pneumoniae* disminuye al mejorar la depuración bacteriana y la respuesta leucocitaria por efecto de la administración de fosfatidilcolina.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de FC: Se utilizó una preparación de FC 95 purificada de lecitina de soya. La proporción de los radicales de ácidos grasos que contiene el fosfolípido utilizado es la siguiente: linoléico (65.9%), palmítico (12.8%), oléico (10.6%) y linolénico (6.5%). La FC 95 fue emulsificada por agitación en solución salina balanceada de fosfatos (PBS) a pH 7.2, bajo condiciones de estricta esterilidad y se almacenó a -40°C en alícuotas de 100 mg hasta su utilización.

Bacterias: Se utilizó una cepa de *K. pneumoniae* de serotipo capsular K8, aislada de una epidemia de septicemia neonatal y previamente utilizada para establecer un modelo de septicemia experimental en ratas RN (40,82), con una cinética de crecimiento que alcanza la fase logarítmica en dos horas y media. Se cultivó en caldo soya tripticasa (CST) durante 12 h a 37°C y se sembraron 0.5 ml en 5 ml de CST nuevo, hasta alcanzar la fase logarítmica. Se lavó dos veces con PBS pH 7.2 y se ajustó a una concentración de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, mediante nefelometría de McFarland en un espectrofotómetro (Beckman, modelo 26) a 540 nm de longitud de onda en luz visible. Una vez ajustado el número de UFC en PBS, la suspensión de bacterias se conservó a 4°C por no más de 30 minutos antes de ser utilizada.

Animales: Se utilizaron ratas Wistar RN, menores de 48 horas de edad, con peso promedio de 8 g. Se distribuyeron en dos grupos de 90 ratas cada uno y se administró al primer grupo una dosis ip de FC a razón de 800 µg/g de peso corporal (9,14,62). A los animales del segundo grupo se les inyectó un volumen similar de PBS pH 7.2 por vía ip. Se asignaron en grupos de 10 animales a ratas nodrizas y 72 h después se inocularon por vía subcutánea (sc) en la base de la cola con una DL₅₀ de *K. pneumoniae* (1.36×10^7 UFC), la cual había sido determinada previamente (82).

Sobrevida: La sobrevida de los animales a 21 días se determinó en 118 ratas Wistar RN distribuidas en dos grupos de 78 ratas inoculadas ip con FC y 40 ratas inoculadas ip con PBS. En este caso, ambos grupos fueron infectados 72 h después con una DL₁₀₀ de *K. pneumoniae* (1×10^8 UFC) por vía sc.

Depuración bacteriana: Se sacrificaron por hipercarbia y dislocación cervical a seis animales de cada grupo en diferentes intervalos: tiempo cero, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, y cada 24 h después, hasta las 144 h de haber inoculado la bacteria. Se obtuvo la mayor cantidad posible de sangre por punción cardíaca aséptica y se tomaron muestras por expresión del fémur derecho. Se extrajeron en condiciones de esterilidad los pulmones, el hígado y el bazo; se lavaron en PBS estéril y se pesaron por separado en una balanza analítica. Cada uno de los órganos se trituró y se homogeneizó en 5 ml de agua bidestilada estéril mediante pistones de teflón con un rotor eléctrico de control manual (40). Se sembraron muestras de 10 μ l de sangre y 10 μ l de cada una de las suspensiones de los órganos en placas de agar de eosina azul de metileno (EAM), las cuales se incubaron a 37°C por 18 h para determinar la cantidad de bacterias viables. Los resultados se reportan como un índice de UFC/ml de sangre, o UFC/gramo de peso de cada uno de los órganos cultivados.

Respuesta leucocitaria: Se determinaron cuentas totales de leucocitos en las muestras de sangre, utilizando pipetas de Thoma y cámaras de Neubauer. Las cuentas diferenciales se hicieron en frotis teñidos con Wright, contando de 100 a 200 células en microscopio óptico a 100x y multiplicando los porcentajes por las cuentas totales de cada muestra. Los valores del tiempo cero se consideraron como basales en este estudio.

Depósitos medulares de granulocitos: Los frotis de médula ósea se tiñeron con Wright y se contaron 400 células a 100x para determinar el porcentaje de granulocitos y sus precursores en médula ósea. Para su análisis, se agruparon en dos compartimentos de depósito medular: proliferativo, y de reserva. El primero está constituido por mieloblastos, promielocitos y mielocitos, en tanto que el de reserva consiste en el grupo de metamielocitos, neutrófilos en banda y PMN (54,57). Se reportaron los valores promedio para cada grupo en los diferentes intervalos de estudio.

Niveles circulantes de IL-1 y de IL-6: La bioactividad de estas citocinas en la respuesta a la infección por *K. pneumoniae* se determinó cuantitativamente en las muestras de plasma de los dos grupos de ratas. Se utilizaron dos bioensayos específicos para estas interleucinas. La subclona de células D10S, derivada de la línea murina de linfocitos T cooperadores D10.G4.1, que prolifera en respuesta a IL-1 (83) y la línea de hibridoma B9.9 que lo hace en

respuesta a IL-6 (81). Las células fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal de ternera (SFT) (Hyclone, Logan, UT); las células D10S se cultivaron durante seis días y las B9.9 durante tres días. Las células se ajustaron a 1×10^4 en 200 μ l de RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, 2-mercaptoetanol 50 μ M, y SFT al 2.5%, en microplacas de 96 pozos de fondo plano y se incubaron por 72 h a 37°C en presencia de diluciones seriadas 4x de las muestras de plasma de las ratas RN. Como curva estándar se usaron diluciones de 100 pg/ml a 1.5 fg/ml de IL-1 β recombinante para la línea D10S, o de IL-6 recombinante para la B9.9. Durante las últimas 4 horas de incubación, se adicionaron 250 μ g/ml del colorante vital MTT (Sigma Co., St Louis, MO) a cada pozo, según el método colorimétrico descrito por Mosmann (84). El medio de cultivo fue removido por succión y se adicionaron 100 μ l de isopropanol para lisar las células y exponer los cristales del MTT reducido, que dan un color violáceo. La intensidad de la reducción del MTT se correlaciona directamente con la proliferación de las líneas celulares y se mide según la densidad óptica a 570 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad, modelo 3550). Algunos de los experimentos se hicieron adicionando 0.5 μ Ci de [3 H]timidina por pozo, las células fueron cosechadas, colocadas en líquido de centelleo, y la incorporación de [3 H]timidina se midió en un contador de emisión beta. Se observó una estrecha correlación entre el método colorimétrico y el de incorporación de [3 H]timidina. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron en unidades por ml, tomando como una Unidad a la concentración de interleucina que produjo el 50% de la proliferación celular máxima (81).

Hematopoyesis extramedular: Se inocularon por vía ip a doce ratas RN con FC y a doce más con PBS. Tres días después, se sacrificaron a seis animales de cada grupo y a los restantes se les inoculó por vía sc una DI_{50} de *K. pneumoniae* y 72 horas después fueron sacrificados. Se extrajeron el bazo y el hígado de todas las ratas, se fijaron en formol al 10% y se hicieron cortes en parafina con tinción de hematoxilina y eosina. Se trataron de identificar focos de hematopoyesis extramedular, con especial atención en las series de granulocitos y de megacariocitos, calificando de 1 a 5, según el número de focos de hematopoyesis observados. Al investigador que hizo la observación microscópica de las muestras no se le informó a que animales correspondían. Se hizo un promedio de las muestras de los animales no infectados de cada grupo y se comparó con las

observaciones individuales en los animales infectados con *K. pneumoniae*.

Producción in vitro de IL-1 y de IL-6: Se inocularon seis ratas Wistar RN con 800 µg/g de FC y otras seis con PBS pH 7.2 por vía ip. Tres días después, se sacrificaron los animales y se hicieron lavados peritoneales con PBS estéril y se extrajeron los bazo de los animales en condiciones de estricta asepsia. Los bazo se trituraron y se pasaron a través de una malla fina, lavando con PBS estéril, a fin de separar las células. Las suspensiones de células, tanto peritoneales como esplénicas, se lavaron dos veces con RPMI 1640 a 4°C y se centrifugaron a 800x g; finalmente, se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y 2-ME 50 µM. Se determinó por exclusión de azul de tripano que la viabilidad celular fuera mayor de 90% y se colocaron muestras de 100 µl en microplacas de 96 pozos de fondo plano. La concentración de células peritoneales viables fue de 5×10^5 y la de células esplénicas fue de 1×10^6 por ml. Por cuadruplicado, se adicionaron los siguientes estímulos: 10 ng/ml de LPS de *E. coli* O55:B5, 100 ng/ml de concanavalina A, o 100 pg/ml de IL-1 α . Para cada muestra hubo un control con células sin estímulos (respuesta basal) y un control sin células con los estímulos (respuesta no específica). Las placas se incubaron por 24 h a 37°C y se pasaron por tres ciclos de congelamiento a -70°C y descongelamiento a 37°C para lisar las células y exponer la producción total de interleucinas. IL-1 e IL-6 se determinaron mediante los bioensayos D10S y B9.9 ya descritos, utilizando el método colorimétrico con MTT (84). De las respectivas muestras se restaron los valores de las respuestas no específicas, ya que la IL-1 α utilizada como estímulo induce la producción de IL-1, pero también estimula directamente la proliferación de las células D10S (83). Los resultados se reportaron como U/ml (81).

Análisis estadístico: Se analizaron las curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier y se establecieron diferencias mediante la prueba de Wilcoxon (85). Las diferencias entre los dos grupos de estudio en cuanto a las cuentas leucocitarias, los depósitos medulares de granulocitos, la depuración de bacterias, la captación retículo-endotelial de bacterias, los niveles circulantes de IL-1 y de IL-6 y la hematopoyesis extramedular se contrastaron mediante pruebas de varianza múltiple. La producción in vitro de IL-1 y de IL-6 se contrastó mediante la prueba χ^2 , considerando significativo un nivel alfa de 0.05 (86,87).

RESULTADOS

FC mejora la sobrevivencia de ratas RN sépticas: Al término de 21 días de observación en los animales infectados con una dosis letal de *K. pneumoniae*, sólo tres (7.5%) de las 40 ratas del grupo testigo que recibió PBS sobrevivieron; mientras que en el grupo que recibió FC sobrevivieron 19 (24.4%) de los 78 animales infectados. Esta diferencia fue significativa a un nivel de $p < 0.05$ (Cuadro 1).

FC mejora la depuración bacteriana: La bacteremia por *K. pneumoniae* se produjo en forma temprana en los dos grupos de estudio, alcanzando un pico máximo a las 12 horas en ambos grupos y disminuyendo gradualmente después. Sin embargo, mientras que las ratas tratadas con FC tuvieron todos sus hemocultivos negativos a partir de las 72 horas, las del grupo testigo continuaron con bacteremia, incluso a los seis días después del reto con la bacteria ($p < 0.05$). La depuración bacteriana en los órganos cultivados mostró un patrón muy similar al observado para la bacteremia, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas en bazo, pero sí en hígado ($p < 0.01$) y pulmones ($p < 0.05$). Fig. 1.

FC modifica la respuesta leucocitaria: Las cuentas totales de leucocitos mostraron variaciones con una cinética diferente en los dos grupos de animales. El grupo testigo tuvo una leucocitosis temprana a las 3 h post-infección, regresando a valores basales y cayendo gradualmente en una leucopenia que fue más notable a las 72 horas. En cambio, las ratas del grupo FC presentaron una leucocitosis menos temprana, a las 12 h, una discreta leucopenia a las 48 h y una recuperación más rápida que la del grupo control (Fig. 2A). Las cuentas diferenciales mostraron que estos cambios fueron debidos principalmente a modificaciones en las cuentas de leucocitos PMN circulantes, aunque llama la atención que la fase de leucocitosis temprana en el grupo testigo no coincidió con neutrofilia. El punto de mayor bacteremia, a las 12 h del reto con la bacteria, se acompañó de una respuesta de neutrofilia evidente en el grupo tratado con FC (Fig. 2B).

FC no altera los cambios por sepsis en los depósitos medulares de granulocitos: Las reservas medulares de granulocitos se modificaron moderadamente en respuesta a la septicemia inducida experimentalmente, pero no se observaron diferencias entre los dos grupos de estudio (Cuadro 2). Considerando que la etapa fetal y del recién nacido se caracteriza por presentar focos de hematopoyesis

extramedular, principalmente en bazo e hígado, se planteó la conveniencia de buscar modificaciones en otros focos de hematopoyesis como explicación a los cambios observados en las cuentas circulantes de leucocitos y particularmente de granulocitos.

FC induce mayores niveles circulantes de IL-6, pero no de IL-1: La elevación de estas dos interleucinas se presenta en forma temprana como parte de la respuesta aguda a la infección. En este estudio, un grupo de ratas RN que fueron inoculadas con FC, pero que no fueron inoculadas con *K. pneumoniae* sirvió como un control adicional. La Fig.3A muestra que los dos grupos de animales con septicemia presentaban más de 12,000 U/ml de IL-1 a las 12 h de la infección, mientras que el grupo no infectado no mostró elevación de esta citocina en las muestras de plasma probadas. En cambio, IL-6 se elevó muy considerablemente en el grupo tratado con FC, alcanzando niveles dos veces más altos que en el grupo testigo que había recibido PBS antes de la infección experimental (Fig. 3B). Una unidad en el bioensayo D10S para IL-1 fue de 0.7 pg/ml y en las células B9.9 fue de 0.5 pg/ml de IL-6 recombinante. Las variaciones intra e interensayos fueron menores del 10% en ambos casos.

FC induce granulopoyesis y megacariopoyesis extramedular: Los cortes de hígado no mostraron grandes cambios. Sin embargo, al revisar los cortes de bazo se observaron diferencias importantes en la cantidad de focos de granulopoyesis y de megacariopoyesis. Los animales tratados con FC mostraron tres días después de haber sido infectados con *K. pneumoniae*, un importante incremento en el índice de hematopoyesis extramedular de granulocitos ($p < 0.05$) y de megacariocitos ($p < 0.01$), lo cual no fue tan importante en el grupo testigo. El índice de hematopoyesis de la serie granulocítica (Fig. 4A) y de megacariocitos (Fig. 4B), aumentó por efecto de la infección experimental, un promedio de dos veces en el grupo testigo y cuatro veces en las ratas que recibieron FC. En el grupo FC se observó también una proliferación reactiva de folículos T y B (Fig. 5 y 6). No se observaron diferencias importantes entre los animales del grupo control y los del grupo FC que no fueron retados con la bacteria; el hallazgo más sobresaliente fue la ausencia de proliferación de células hematopoyéticas en los controles no infectados.

FC induce mayor producción in vitro de IL-6, pero no de IL-1: La producción de IL-6 en respuesta a los diferentes estímulos usados fue mayor en las células que procedían de las ratas RN que habían sido inoculadas con FC por vía ip (Fig. 7). Las células esplénicas (Fig.

7B) produjeron más IL-6 que las peritoneales (Fig. 7A), especialmente en respuesta al estímulo con LPS. En todos los casos, las células de animales tratados con FC fueron capaces de duplicar o triplicar su producción de IL-6, en contraste con la producción de las células de los controles ($p < 0.001$). En cambio, la producción de IL-1 por células peritoneales y esplénicas en respuesta a los estímulos utilizados fue similar en los dos grupos de estudio. FC no modificó la producción de IL-1 (Fig. 8). La capacidad de las células peritoneales (Fig. 8A) para responder a IL-1 α fue algo mayor que las del bazo (Fig. 8B), no obstante que el número de células peritoneales fue la mitad de las esplénicas. Los resultados *in vitro* apoyan la observación de los mayores niveles circulantes de IL-6 en los animales con septicemia por *K. pneumoniae* que habían sido inoculados con FC y sugieren que FC estimula los mecanismos de producción de IL-6, pero no modifica los de IL-1 en la respuesta a diferentes estímulos.

DISCUSION

La función principal del sistema mononuclear fagocítico es depurar de la sangre y los tejidos a partículas y sustancias extrañas al organismo. El SMF está constituido por los macrófagos de diferentes tejidos y los monocitos de sangre periférica (34,35). En estudios previos, hemos observado que la depuración de *K. pneumoniae* por el SMF en ratas Wistar recién nacidas es deficiente cuando se compara con el patrón observado en ratas adultas (40). Durante la septicemia experimental por esta bacteria se presenta una leucopenia grave y prolongada en los animales RN, lo cual coincide con el mayor pico de bacteremia y no se presenta la leucocitosis que se observa en las ratas adultas (40). También observamos que la cantidad de bacterias requeridas para una dosis letal media (DL₅₀) en ratas adultas es 50 veces mayor que en las ratas RN, lo cual indica una mayor susceptibilidad de los animales RN a la infección por *K. pneumoniae* (40).

En este estudio, la mejoría en la sobrevivencia de las ratas RN con septicemia por *Klebsiella pneumoniae*, previamente inoculadas con FC, se correlacionó con una mejor capacidad de depuración reticuloendotelial de la bacteria. Tal efecto *in vivo* de FC es similar a lo observado en animales adultos por Sowar y cols (11), Kappes y cols. (10) y por nosotros mismos (14,15,62). Los cambios en las cuentas leucocitarias que se presentaron en respuesta a la infección bacteriana aguda sugieren que los animales tratados con FC modifican la cinética de su respuesta, siendo notable que en los momentos de mayor bacteremia elevaron más sus cuentas de leucocitos y particularmente las de PMNs, mientras que en el grupo control esta respuesta fue insignificante. La falta de cambios en los depósitos medulares de granulocitos nos llevaron a investigar la posibilidad de focos de hematopoyesis extramedular, los cuales se encontraron en bazo, siendo muy evidentes los focos de granulopoyesis y de megacariopoyesis en las ratas manejadas con FC. El hallazgo de proliferación reactiva de folículos linfoides en el bazo de estos animales apoya la posibilidad de que se producen factores solubles que inducen cambios sistémicos en respuesta a la FC.

Tales resultados sugieren que la FC produce activación de macrófagos peritoneales y cuando los animales son retados con *K. pneumoniae*, sus células tienen una mayor capacidad para

fagocitar y destruir a la bacteria y para producir y secretar ciertos mediadores solubles responsables de los cambios observados. La determinación de IL-1 en sangre no mostró diferencias en los dos grupos de estudio, pero el grupo FC mostró una gran elevación temprana de IL-6. Esta citocina, recientemente caracterizada, es producida por células mononucleares y células endoteliales, principalmente (78). Entre sus múltiples efectos biológicos, IL-6 induce en los hepatocitos la producción de proteínas reactantes de fase aguda (88), es un factor pirógeno endógeno, al igual que IL-1, aunque menos potente que ésta (89); actúa como un factor de maduración de linfocitos B estimulando la producción de IgG (79); junto con IL-1 induce la proliferación de linfocitos T (90) y actúa como estimulante de la hematopoyesis (91,92), especialmente de los megacariocitos, dando lugar a la producción de plaquetas en ratones y primates (93,94). Tiene también la particularidad de actuar como una señal negativa para la producción de IL-1 (81).

En este estudio, observamos diversos efectos de la administración de FC en este modelo de infección neonatal experimental. La sobrevida de los animales mejora, lo cual parece relacionarse con diversos cambios atribuibles a la elevación de IL-6 circulante y a una mayor capacidad de las células que producen IL-6 para responder al estímulo con LPS o IL-1. La inducción de focos de hematopoyesis extramedular, especialmente la de megacariocitos y la proliferación de folículos linfoides en bazo, son dos cambios que indican efectos biológicos directos de IL-6. De manera adicional, el efecto regulador que IL-6 tiene sobre la producción de IL-1 (81) podría estar limitando los efectos indeseables de la hiperproducción de esta citocina que se presenta invariablemente como respuesta a la infección sistémica por bacterias gramnegativas (80). Tales efectos de IL-1 y que son sinérgicos con los de TNF incluyen la inducción de choque séptico y caquexia, los cuales llevan a la muerte a un gran porcentaje de pacientes (8,80). Otra posibilidad, no explorada aún, es que IL-6 induzca algún otro factor regulador de los efectos sinérgicos de IL-1 y TNF; un candidato en este complejo sistema de interregulación de citocinas es el antagonista natural del receptor de IL-1 (IL-1ra), que apenas recientemente ha sido descrito (95), y con el cual hemos observado un efecto protector y cambios muy similares a los inducidos por FC en el modelo de infección neonatal por *K. pneumoniae* en ratas (96). Una posibilidad más atractiva es que FC favorezca la producción de IL-6 y del IL-1ra sobre la de IL-1, pero sin bloquear la producción normal de esta última, con lo cual la FC pasaría a ser un inmunomodulador específico. La falta de una prueba

específica para medir IL-1ra de rata nos ha limitado para responder esta pregunta. Actualmente, se encuentra apenas disponible un radioinmunoensayo para IL-1ra de origen humano, no hay bioensayos para el antagonista y no existe aún una forma recombinante de IL-1ra de rata para producir los anticuerpos que permitan establecer una prueba de detección adecuada.

En la fisiopatogenia de la septicemia se ha descrito la participación de varios sistemas de mediadores, tales como el complemento y el sistema de la coagulación, los cuales generan la producción de pequeños péptidos que causan un aumento de la permeabilidad y dilatación capilares. El papel de las citocinas en estos cambios determina, mediante una compleja interregulación, la intensidad de la respuesta inflamatoria a la septicemia (80). El aumento de los niveles de IL-6 en pacientes con septicemia parece ser una respuesta general y es más significativo en los pacientes que desarrollan choque séptico (97), lo cual se relaciona directamente con mayores niveles de IL-1. En un momento dado, los altos niveles circulantes de IL-6 son un reflejo de la gran cantidad de IL-1 que se está produciendo en respuesta a la endotoxemia y su determinación en pacientes con septicemia puede servir como factor pronóstico y un indicador del riesgo de choque y de muerte (97). La elevación persistente de IL-6 en la circulación puede ser un indicador de que los mecanismos reguladores de IL-1 están fallando.

Con base en las estrechas interacciones y correlaciones que IL-1 e IL-6 mantienen (81), Dinarello (76,80) ha propuesto que el papel principal de IL-6 en la fisiopatogenia de la septicemia y del choque séptico es actuar primordialmente como un mediador anti-inflamatorio que regula los efectos proinflamatorios de IL-1. En el proceso de intermodulación de estas dos citocinas parece intervenir de manera fundamental la producción de metabolitos del AA en respuesta a LPS y a IL-1. Por ejemplo, el efecto pirogénico de IL-6 es mediado por la inducción de PGE₂ en cerebro, al igual que lo hace IL-1; sin embargo, mientras que IL-1 es capaz de inducir la producción de PGE₂ en células de sangre periférica, IL-6 no lo hace (89). Además, aunque IL-1 e IL-6 producen fiebre al inducir PGE₂, sus efectos no son aditivos ni sinérgicos, lo cual indica que sus mecanismos de acción sobre fosfolipasas y ciclooxigenasa son diferentes. A pesar de que algunos de los efectos biológicos de IL-1 e IL-6 son similares, como la inducción de fiebre y de proteínas reactantes de fase aguda, otros efectos son definitivamente

diferentes, como es el caso de la capacidad de IL-6 para inducir hematopoyesis (91-94).

Una de las aportaciones importantes de este trabajo de tesis es el hallazgo de hematopoyesis extramedular, sin cambios medulares, que al parecer fue mediada por la inducción temprana de IL-6 en las ratas RN tratadas con FC. Considerando que los RN con septicemia desarrollan cambios leucocitarios que pueden llevarlos a un agotamiento de reservas medulares (53-58), la inducción de hematopoyesis extramedular puede amortiguar la falta de una adecuada y oportuna producción y liberación de leucocitos por médula ósea y de su disponibilidad en la circulación sistémica. Se plantea la posibilidad de que en etapas iniciales de sepsis por gramnegativos en pacientes con alto riesgo, como son los recién nacidos, se pueda usar como parte del tratamiento a IL-6 u otros factores, como la FC, que estimulen su producción endógena sin alterar la producción de otras citocinas, como IL-1, que son potencialmente perjudiciales cuando se encuentran en grandes cantidades (7,8,80).

La posibilidad de contar con inmunomoduladores naturales para regular la intensidad de la respuesta aguda a la infección bacteriana, abre una expectativa alentadora de terapia y profilaxis en pacientes altamente susceptibles, como son los neonatos y los desnutridos. Esto es particularmente atractivo cuando se trata de factores que pueden ser incluidos en la dieta normal, como es el caso de la FC utilizada en este estudio.

RESUMEN

Las infecciones por bacterias gramnegativas siguen siendo una de las primeras causas de muerte en el recién nacido. La depuración de bacterias en el neonato es deficiente y ésto parece aumentar su susceptibilidad a este tipo de infecciones. En este estudio se logra mejorar el patrón de depuración de *Klebsiella pneumoniae* en ratas Wistar recién nacidas inoculadas por vía ip con 800 µg/g de fosfatidilcolina de soya (FC), en contraste con el grupo testigo que fue inyectado con PBS ($p < 0.05$). La sobrevivencia de los animales aumentó ($p < 0.05$) y los cambios leucocitarios se caracterizaron por una mayor leucocitosis y neutrofilia durante el pico de bacteremia en los animales tratados con FC. Los niveles circulantes de interleucina-6 fueron mayores en el grupo de ratas con FC, observándose además hematopoyesis extramedular de las series granulocítica ($p < 0.05$) y de megacariocitos ($p < 0.01$) en el bazo de los animales del grupo FC. No se observaron cambios significativos en los depósitos de granulocitos en la médula ósea de ambos grupos de estudio. Las células de ratas tratadas con FC produjeron más IL-6 que las de los controles en respuesta a estímulos *in vitro* como el LPS de *E. coli*, pero no modificaron la producción de IL-1. La mejoría de la sobrevivencia, los cambios leucocitarios y los focos de hematopoyesis extramedular en los animales sépticos tratados con FC parecen asociarse con un aumento en la producción de IL-6. Los resultados sugieren que IL-6 participa en el mecanismo de protección que FC induce en este modelo de septicemia neonatal por *K. pneumoniae* en ratas. Posiblemente, IL-6 induce una regulación de los efectos indeseables de la hiperproducción de IL-1 en respuesta a la endotoxemia. Se propone que FC podría ser utilizado como un inmunomodulador inespecífico de la respuesta aguda a la infección.

REFERENCIAS

1. Martínez-Limón AJ, Mancilla-Ramírez J, Santos-Preciado JI: Sepsis neonatal: Experiencia 1980-1985 del Hospital Infantil de México. Bol Med Hosp Infant Mex 1989; 46:77-78.
2. Mancilla-Ramírez J, Sánchez-Saucedo LU: Septicemia neonatal: diferencias entre recién nacidos a término y de pretérmino. Bol Med Hosp Infant Mex 1990; 47:227-233.
3. Quie, PG: Antimicrobial defenses in the neonate. Semin Perinatol 1990; 14(Supl):2-9.
4. Montgomerie JZ, Ota JK: *Klebsiella* bacteremia. Arch Intern Med 1980; 140:525-527.
5. Vargas A, Escobedo E, Mercado A: Epidemiología de las bacteremias en una unidad de cuidado intensivo neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex 1985; 42:306-309.
6. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM: New concepts on the pathogenesis of fever. Rev Infect Dis 1988; 10:168-189.
7. Dinarello CA: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. Adv Immunol 1989; 44:153-205.
8. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, y cols: Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. J Infect Dis 1990; 161:79-84.
9. Mancilla J, Nurko S, García MP, Mejía JS, Santos JI: Modificaciones leucocitarias por fosfatidil-colina en un modelo animal. Bol Med Hosp Infant Mex 1986; 43:713.
10. Kappes JC, Tsuchiya Y, Nutini LG: The effect of phosphatidylcholine on the reticuloendothelial system, as determined by carbon clearance assay. IRCS Med Sci 1983; 11:389.
11. Sowar MC, Tsuchiya Y, Nutini LG: The prophylactic effect of a phosphatidylcholine on *Staphylococcus aureus* infections in swiss albino mice. IRCS Med Sci 1981; 9:459.

12. Wilkinson PJ, Cater DB: An electron-microscope study of the effects of lysolecithin on BP-8 ascites-tumour cells and phagocytes of mice, compared with the effects of a specific anti-tumour serum plus complement. *J Pathol* 1969; 97:219-230.
13. Elsbach P, van den Berg JWO, van den Bosch H, van Deenen LLM: Metabolism of phospholipid by polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Acta* 1965; 106:338.
14. Mancilla J, Nurko S, García MP, Mejía JS, Santos JI: Efecto de fosfatidilcolina en la respuesta leucocitaria en sepsis experimental por *Klebsiella pneumoniae* K-8. 3rd. Panamerican Congress of Infectious Disease and Chemotherapy. Puerto Rico, USA, 1986.
15. Nurko-Shein S: Respuesta de leucocitos modificada por fosfatidilcolina en sepsis experimental por *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, UNAM. México, 1987.
16. Markowitz SM, Veazey JM Jr., Macrina FL, Mayhall CG, Lamb VA: Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Implication of a conjugative R plasmid. *J Infect Dis* 1980; 142:106-112.
17. Casewell MW, Phillips I: Aspects of the plasmid-mediated antibiotics resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med* 1981; 70:459-462.
18. Vargas A, Jasso L, Gálvez MA: Frecuencia y etiología de las bacteremias. *Rev Mex Pediatr* 1980; 47:163-166.
19. Klein JO, Marcy SM: Bacterial sepsis and meningitis. En: Remington JS, Klein JO, eds: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 3a. ed. WB Saunders, Philadelphia, 1990; pp: 601-656.
20. Orskov I, Orskov F: Serotyping of *Klebsiella*. En: *Methods in Microbiology*. Academic Press, London, 1984; 14:143-164.
21. Felton LD, Ottinger B: *J Bacter* 1942; 43:94.
22. Orskov I: "Immunological paralysis" induced in rabbits by a heavily capsulated *Klebsiella* strain. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1956; 38:375-384.

23. Horwitz MA, Silverstein SC: Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest* 1980; 65:82-94.
24. Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, Baker CJ, Nicholson-Weller A: Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III group B streptococci. *J Immunol* 1982; 128:1278-1283.
25. Edwards MS, Nicholson-Weller A, Baker CJ, Kasper DL: The role of specific antibody in alternative complement pathway mediated opsonophagocytosis of type III group B *Streptococcus*. *J Exp Med* 1980; 151:1275-1287.
26. Brown E, Joiner K, Gaither T, Hammer C, Frank M: The interaction of C3b bound to pneumococci with factor H, factor I and properdin factor B of the human complement system. *J Immunol* 1983; 131:409-415.
27. Kasper DL: Bacterial capsule -Old dogmas and new tricks. *J Infect Dis* 1986; 153:407-415.
28. Joiner KA, Brown EJ, Frank MM: Complement and bacteria: Chemistry and biology in host defense. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:461-491.
29. Betz SJ, Isliker H: Antibody-independent interactions between *Escherichia coli* J5 and human complement components. *J Immunol* 1981; 127:1746-1751.
30. Clas F, Loos M: Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of *Salmonella minnesota*. *Infect Immun* 1981; 31:1138-1144.
31. Cline MJ, Lehrer RI: Phagocytosis by human monocytes. *Blood* 1968; 32:423.
32. Cline MJ, Moore MAS: Embryonic origin of the mouse macrophage. *Blood* 1972; 39:842-849.
33. Huber H, Fudenberg HH: Receptor sites of human monocytes for IgG. *Int Arch Allergy* 1968; 32:181.

34. Cates KL: Host factors in bacteremia. *Am J Med* 1983; 75(Supl):19-25.
35. van Furth R, Cohn ZA: Origins and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968; 128:425.
36. Saba TM: Physiology and pathophysiology of the reticuloendothelial system. *Arch intern Med* 1970; 126:1031-1052.
37. Hosea SW, Brown EJ, Frank MM: The role of complement activation in a model of adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1980; 66:375-382.
38. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM: The role of complement in the localization of pneumococci in the splanchnic reticuloendothelial system during experimental bacteremia. *J Immunol* 1981; 126:2230-2235.
39. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM: The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. *Rev Infect Dis* 1983; 5(Supl 4):797-805.
40. Mancilla-Ramírez J. Depuración retículoendotelial de *Klebsiella pneumoniae* en un modelo animal. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. UNAM. México, 1988.
41. Reade PC, Jenkin CR: The functional development of the reticuloendothelial system. I. *Immunology* 1965; 9:53-60.
42. Karthigasu K, Reade PC, Jenkin CR: The functional development of the reticuloendothelial system. III. *Immunology* 1965; 9:67-73.
43. Reade PC, Turner JK, Jenkin CR: The functional development of the reticuloendothelial system. IV. *Immunology* 1965; 9:75-84.
44. Zeligs BJ, Nerurkar LS, Bellanti JA: Maturation of the rabbit alveolar macrophage during animal development. III: Phagocytic and bactericidal functions. *Pediatr Res* 1977; 11:1208-1211.
45. Nerurkar LS, Zeligs BJ, Bellanti JA: Maturation of the rabbit alveolar macrophage during animal development. II: Biochemical and enzymatic studies. *Pediatr Res* 1977; 11:1202-1207.

46. Sherman M, Goldstein E, Lippert W, Wennberg R: Neonatal lung defense mechanisms: A study of the alveolar macrophage system in neonatal rabbits. *Am Rev Res Dis* 1977; 116:433-440.
47. Sherman M, Goldstein E, Lippert W, Wennberg R: Group B streptococcal lung infection in neonatal rabbits. *Pediatr Res* 1982; 16:209-212.
48. Coonrod JD, Jarrells MC, Bridges RB: Impaired pulmonary clearance of pneumococci in neonatal rats. *Pediatr Res* 1987; 22:736-742.
49. Ozsoylo S, Hosain F, McIntyre PA: Functional development of phagocytic activity of the spleen. *J Pediatr* 1977; 90:560-562.
50. Ellis EF, Smith RT: The role of the spleen in immunity. With special reference to the post-splenectomy problem in infants. *Pediatrics* 1966; 37:111-119.
51. Solberg CO: Infections in the immunocompromised host. *Scand J Infect Dis* 1980; 24(Supl):36-43.
52. Johnston RB Jr.: Recurrent bacterial infections in children. *N Engl J Med* 1984; 310:1237-1243.
53. Christensen RD, Shigeoka AO, Hill HR, Rothstein G: Circulating and storage neutrophil changes in experimental type II group B streptococcal sepsis. *Pediatr Res* 1980; 14:806-808.
54. Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G: The leukocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. *J Pediatr* 1981; 98:101-105.
55. Erdman SH, Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G: Supply and release of storage neutrophils. A developmental study. *Biol neonate* 1982; 41:132-137.
56. Christensen RD, Rothstein G: Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. *J Pediatr* 1980; 96:316-318.
57. Christensen RD, Macfarlane JL, Taylor NL, Hill HR, Rothstein G: Blood and marrow neutrophils during experimental group B streptococcal infection: quantification of the stem cell, proliferative, storage and circulating pools. *Pediatr Res* 1982; 16:549-553.

58. Christensen RD, Hill HR, Rothstein G: Granulocytic stem cell (CFUc) proliferation in experimental group B streptococcal sepsis. *Pediatr Res* 1983; 17:278-280.
59. Santos JI, Cortiella J, Zeisel SH, Vitale JJ: Phosphatidylcholine in the treatment of experimental type II group B *Streptococcus* infection. *Pediatr Res* 1984; 18:(Resumen).
60. Santos JI, Gifaldi AS, Alpuche C, Arredondo JL, Mancilla J, Vitale JJ: Phosphatidylcholine improves phagocytic and bactericidal activities of neutrophils from malnourished children with acute infections. *Arch Invest (Mex)* 1992; (En prensa)
61. Jannace PW, Lerman RH, Santos JI, Vitale JJ: The effects of oral soy phosphatidylcholine on human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis, killing and arachidonate levels. *Am J Clin Nutr* 1992; (En prensa).
62. Mancilla J, Santos JI, Vitale JJ: Phosphatidylcholine (PC) improves reticuloendothelial system (RES) clearance of experimental *Klebsiella pneumoniae* sepsis in newborn rats. *Pediatr Res* 1988; 23:466A.
63. Thompson GA Jr., Martin CE: Regulation of phospholipid fatty acid composition. En: *Physiology of membrane fluidity*. CRC Press, Florida, 1984; I:99-129.
64. Cullis PR, Hope MJ, De Kevijff B, Verkleij AJ, Tilcock CPS: Structural properties and functional roles of phospholipids in biological membranes. En: *Phospholipids and cellular regulation*. CRC Press, Florida, 1985; I:1-59.
65. Brestcher MS: Moléculas de la membrana celular. *Investigación y Ciencia* 1985; 111:66-75.
66. Hirata F, Axelrod J: Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 1980; 209:1082-1090.
67. Rakhit G: Phospholipid methylation and membrane fluidity. En: *Physiology of membrane fluidity*. CRC Press, Florida, 1984; I:175-184.

68. Dianzani MU, Torrielli MV, Canuto RA, Garcea R, Feo F: The influence of enrichment with cholesterol on the phagocytic activity of rat macrophages. *J Pathol* 1976; 118:193-199.
69. Rivnay B, Globerson A, Shinitzky M: Perturbation of lymphocyte response to concanavalin-A by exogenous cholesterol and lecithin. *Eur J Immunol* 1978; 8:185-189.
70. Shinitzky M: Membrane fluidity and cellular functions. En: *Physiology of membrane fluidity*. CRC Press, Florida, 1984; I:1-51.
71. Shier WT, Baldwin JH, Nilsen-Hamilton M, Hamilton RT, Thanassi NM: Regulation of guanylate and adenylate cyclase activities by lysolecithin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:1586-1590.
72. Root RK, Cohen MS: The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Dis* 1981; 3:505-598.
73. Weltzien HV: Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochem Biophys Acta* 1979; 559:259-287.
74. Estensen RD, Hill HR, Quie PG, Hogan N, Goldber ND: Cyclic GMP and cell movement. *Nature* 1973; 245:458-460.
75. Zeisel SH: Lecithin in health and disease. En: Szuhaj B, List JR, eds.: *Lecithins*. American Oil Chemists Society, Washington DC, 1985; pp:323-345.
76. Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77:1627-1652.
77. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA: Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988; 81:1162-1172.
78. Kishimoto T: The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74:1-10.
79. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al: Complementary DNA for a novel interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324:73-77.

80. Dinarello CA: The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991; 163:1177-1184.
81. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA: Correlations and interactions in the production of IL-6, IL-1 and TNF by human blood mononuclear cells: IL-6 supresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75:40-47.
82. Mancilla-Ramírez J, Nurko-Shein S, Castellanos-Cruz C, Santos-Preciado JI: Efectividad terapéutica de inmunoglobulina intravenosa pH 4.25 en sepsis neonatal experimental por *Klebsiella pneumoniae*. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1989; 46:89-93.
83. Orencole SF, Dinarello CA: Characterization of a subclone (D10S) of the D10.G4.1 helper T-cell line wich proliferates to attomolar concentrations of interleukin-1 in the absence of mitogens. *Cytokine* 1989; 1:14-22.
84. Mosmann, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth* 1983; 65, 55-63.
85. Coldman AJ, Elwood JM: Examining survival data. *CMA J* 1979; 121:1065-1071.
86. Siegel S: Estadística no paramétrica, 2a. ed. Trillas, México, 1972; pp. 121-130.
87. Downie NM, Heath RW: Métodos estadísticos aplicados, 3a. ed. Harla, México, 1973; pp. 212-231.
88. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp PM, Baumann H: Interferon β 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7251.
89. Dinarello CA, Cannon JG, Mancilla J, Bishai I, Lees J, Coceani F: Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res* 1991; 562:199-206.

90. Helle M, Boeijs I, Aarden LA: IL-6 is an intermediate in IL-1-induced thymocyte proliferation. *J Immunol* 1989; 142:4335-4338.
91. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M: Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9035-9039.
92. Gardner JD, Liechty KW, Christensen RD: Effects of interleukin-6 on fetal hematopoietic progenitors. *Blood* 1990; 75:2150-2155.
93. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, et al: Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 1989; 74:1241-1244.
94. Asano S, Okano A, Ozawa K, et al: In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood* 1990; 75:1602-1605.
95. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, et al: Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990; 343:336-340.
96. Mancilla J, García P, Dinarello CA: IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) can either protect or enhance the lethality of *Klebsiella pneumoniae* sepsis in newborn rats. *Cytokine* 1991; 3:502 (313).
97. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJF, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJM, Eerenberg-Belmer AJM, Thijs LG, Aarden LA: Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74:1704-1710.

CUADRO 1. Efecto de Fosfatidilcolina en la Sobrevida de Ratas Wistar Recién Nacidas con Septicemia Experimental por *Klebsiella pneumoniae*

GRUPO	No. RATAS	SOBREVIVEN (%)
PBS (Testigo)	40	3 (7.5)
FOSFATIDILCOLINA	78	19 (24.4)*

* $p < 0.05$

CUADRO 2. Depósitos Medulares de Granulocitos en Ratas Recién Nacidas con Septicemia por *Klebsiella pneumoniae*

COMPARTIMENTO*	PBS (Testigo)	FOSFATIDILCOLINA
DE RESERVA		
PREINFECCION	45.3 ±4.7	41.5 ±5.6
POSTINFECCION	40.1 ±4.4	39.8 ±3.7
PROLIFERATIVO		
PREINFECCION	39.8 ±6.7	40.6 ±4.7
POSTINFECCION	41.7 ±3.1	42.6 ±2.9

* % Granulocitos: Promedio ± D.E.

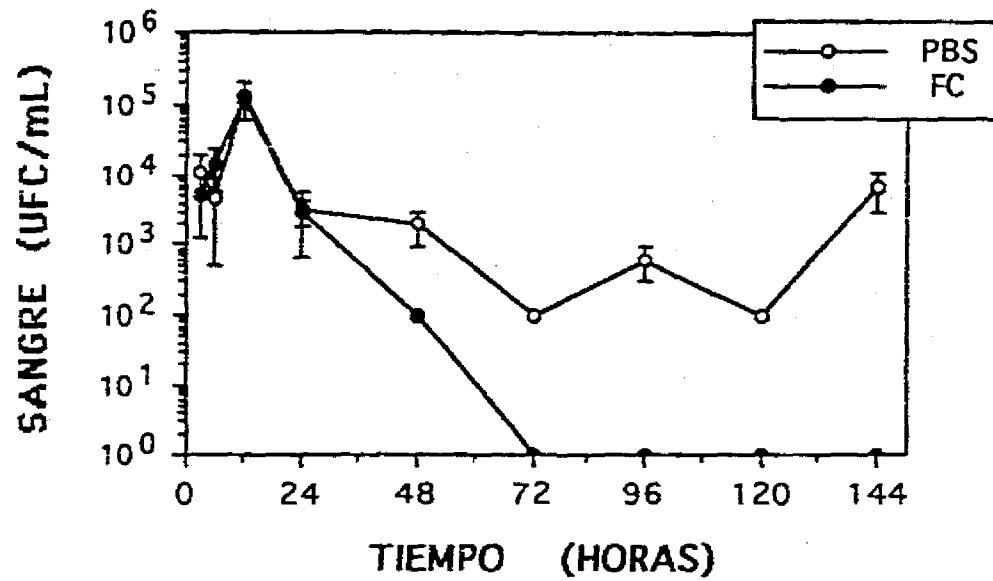
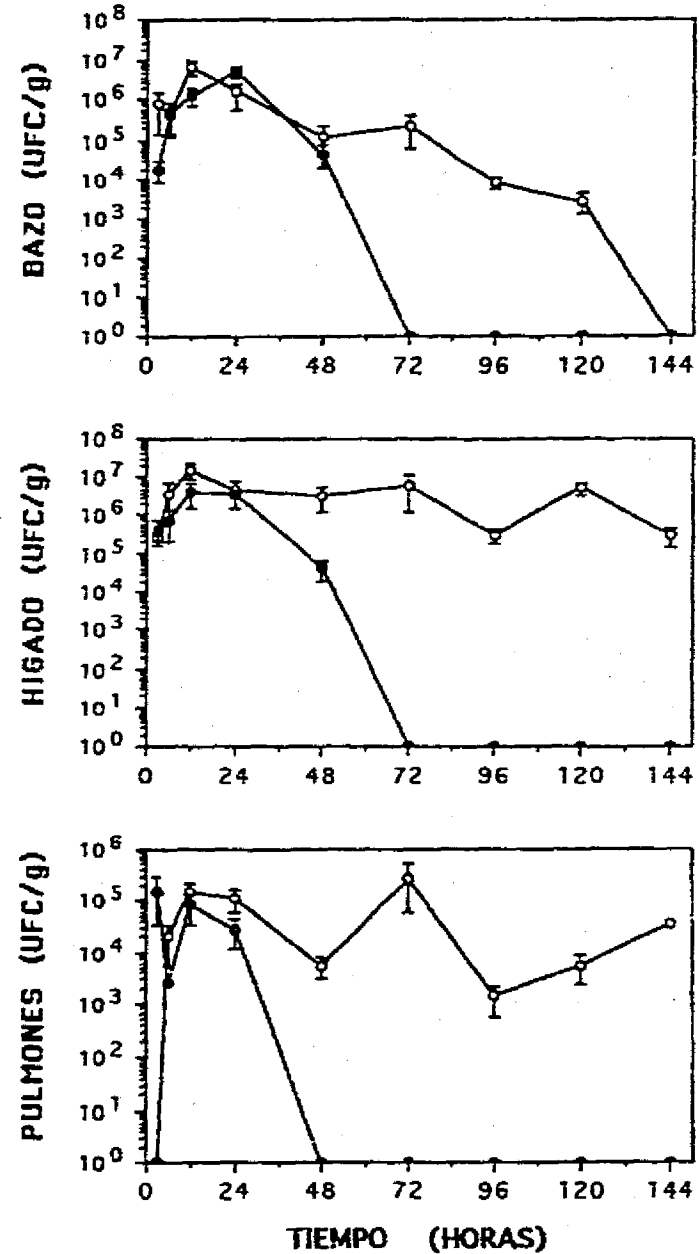


Fig. 1. El mayor grado de bacteremia se observó a las 12 h de inoculada la bacteria en ambos grupos de estudio. En el grupo tratado con FC, los hemocultivos fueron negativos a partir de las 72 h del reto con una DL_{50} de *Klebsiella pneumoniae*. Los cultivos en hígado, pulmones y bazo tuvieron una cinética de depuración bacteriana similar a la observada en los hemocultivos. Las diferencias entre los dos grupos fueron significativas por ANOVA en los cultivos de sangre ($p < 0.05$), en los de hígado ($p < 0.01$) y pulmones ($p < 0.05$).



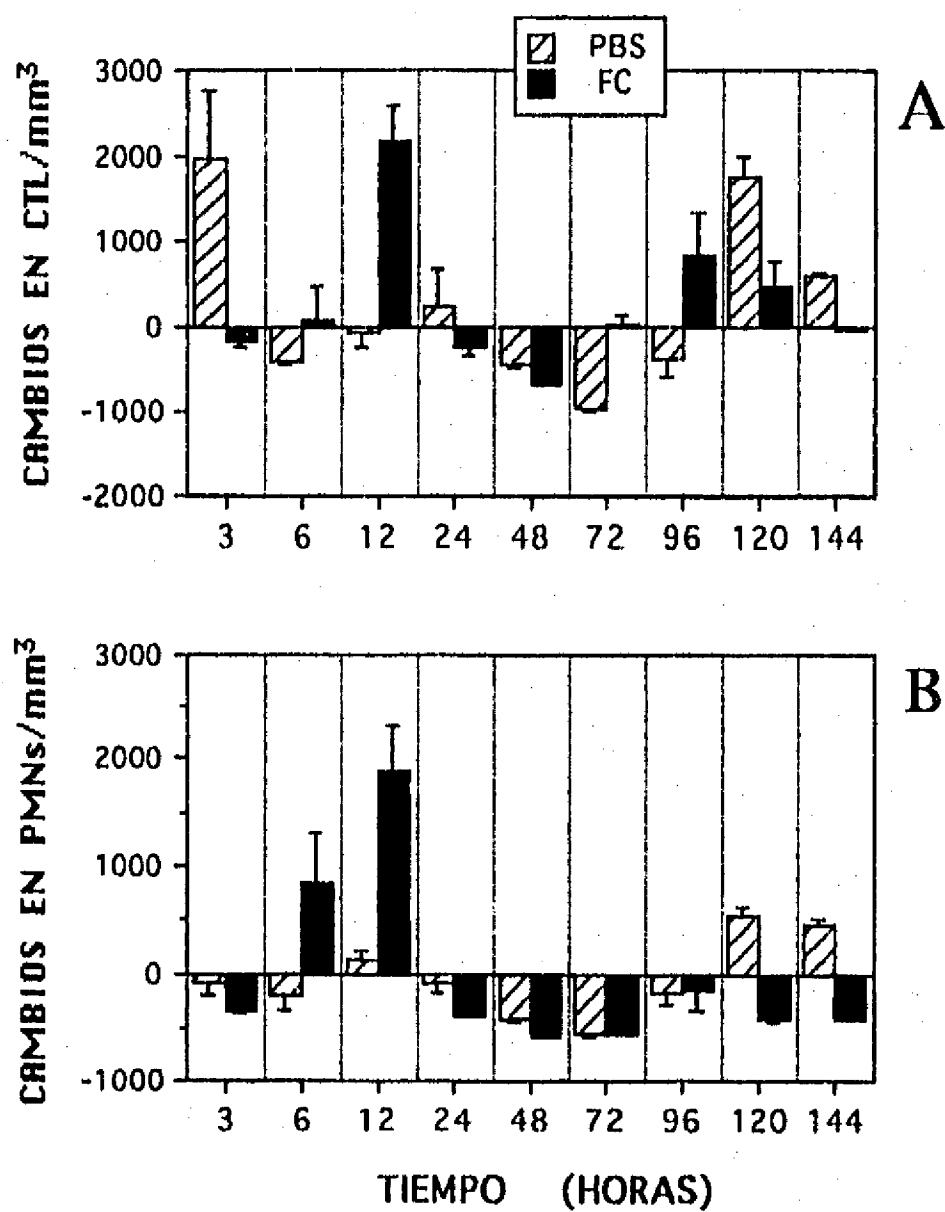


Fig. 2. Los animales tratados con FC presentaron un pico de leucocitosis que coincidió con el pico de bacteremia a las 12 h y sólo mostraron discreta leucopenia a las 48 h (A). Además, el grupo FC mostró una elevación de las cuentas de leucocitos PMNs, coincidiendo con el momento de mayor bacteremia, mientras que el grupo testigo PBS no presentó neutrofilia (B).

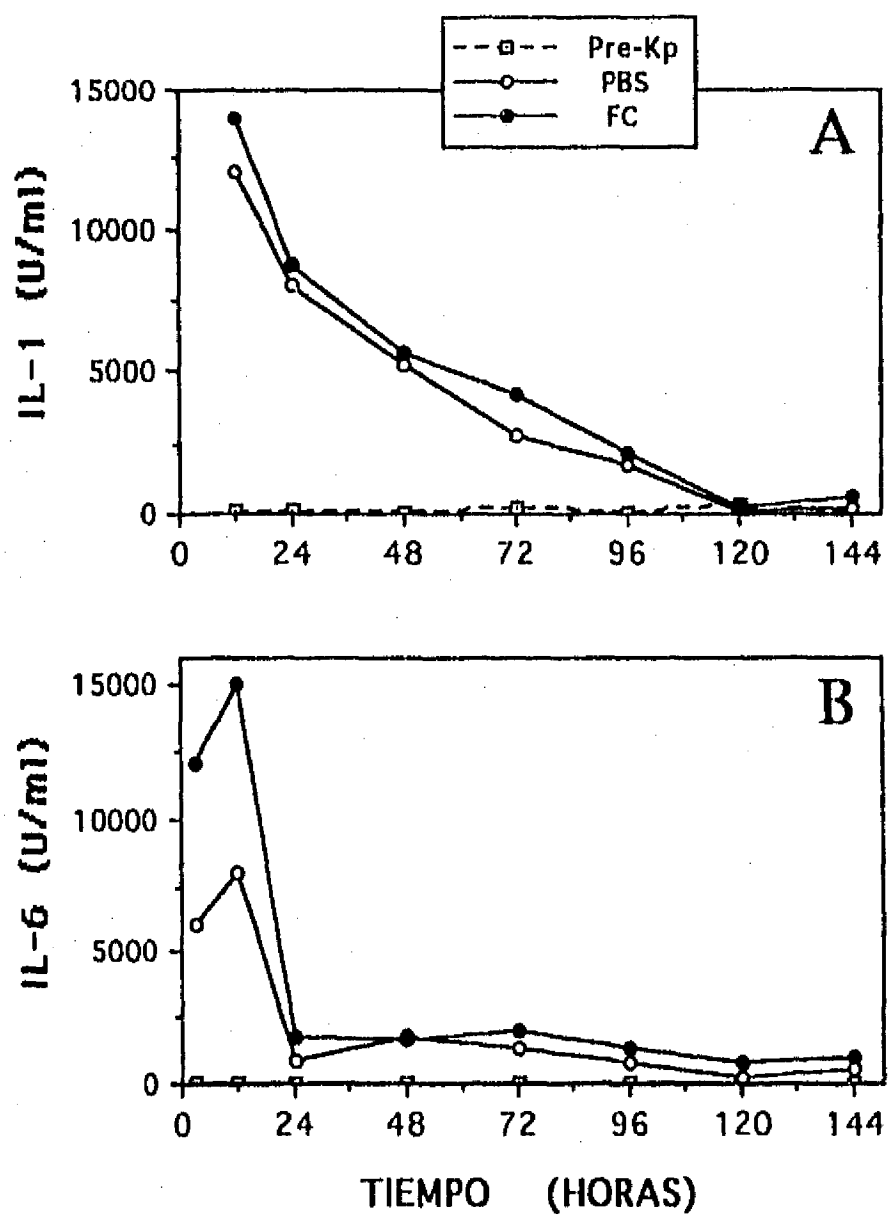


Fig. 3. Los niveles circulantes de interleucina-1 se elevaron en la misma proporción en los dos grupos de estudio, pero no aumentaron en un grupo de ratas no infectadas (A). En cambio, interleucina-6 se elevó más en el grupo FC que en el testigo PBS durante la fase de mayor bacteremia (B), para regresar gradualmente en ambos grupos a valores basales.

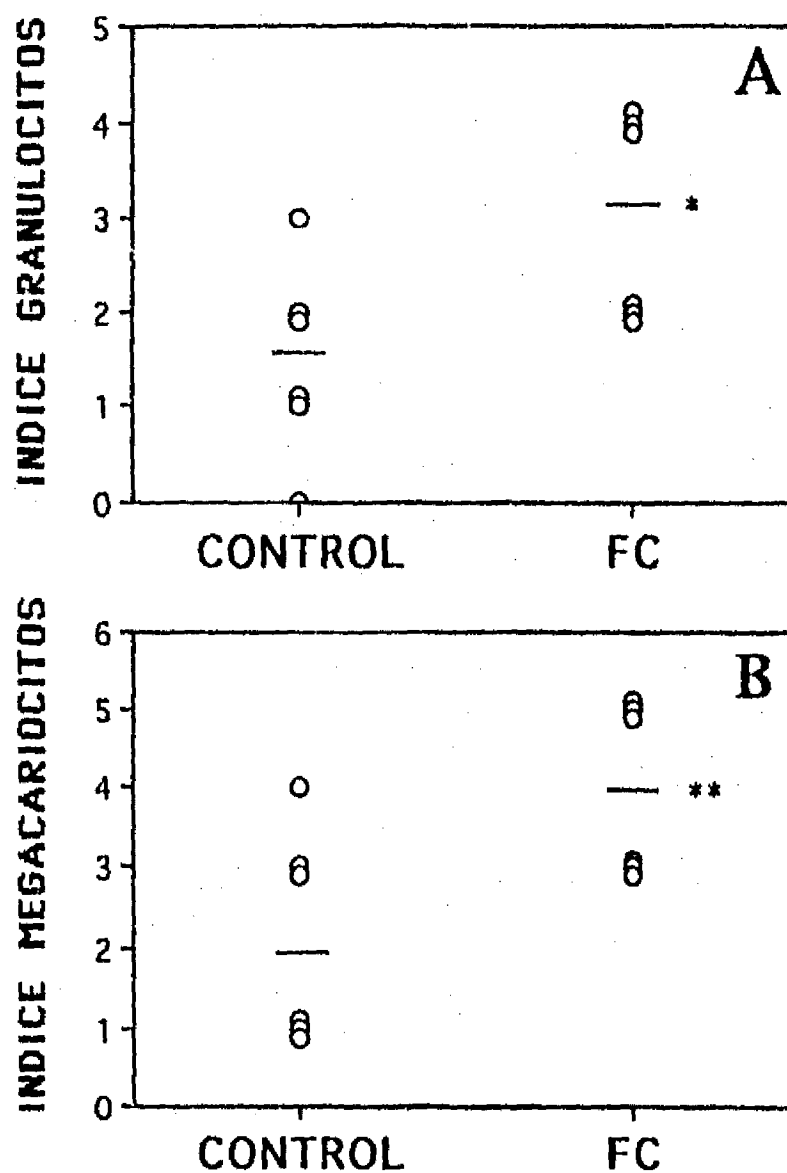


Fig. 4. El índice de focos de hematopoyesis de granulocitos y megacariocitos en el bazo de los animales infectados se incrementó, en contraste con el de ratas no infectadas (índice =1). Los focos de hematopoyesis extramedular fueron más abundantes en el grupo que recibió FC, tanto en la serie de granulocitos (A), como en la de megacariocitos (B). ANOVA * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

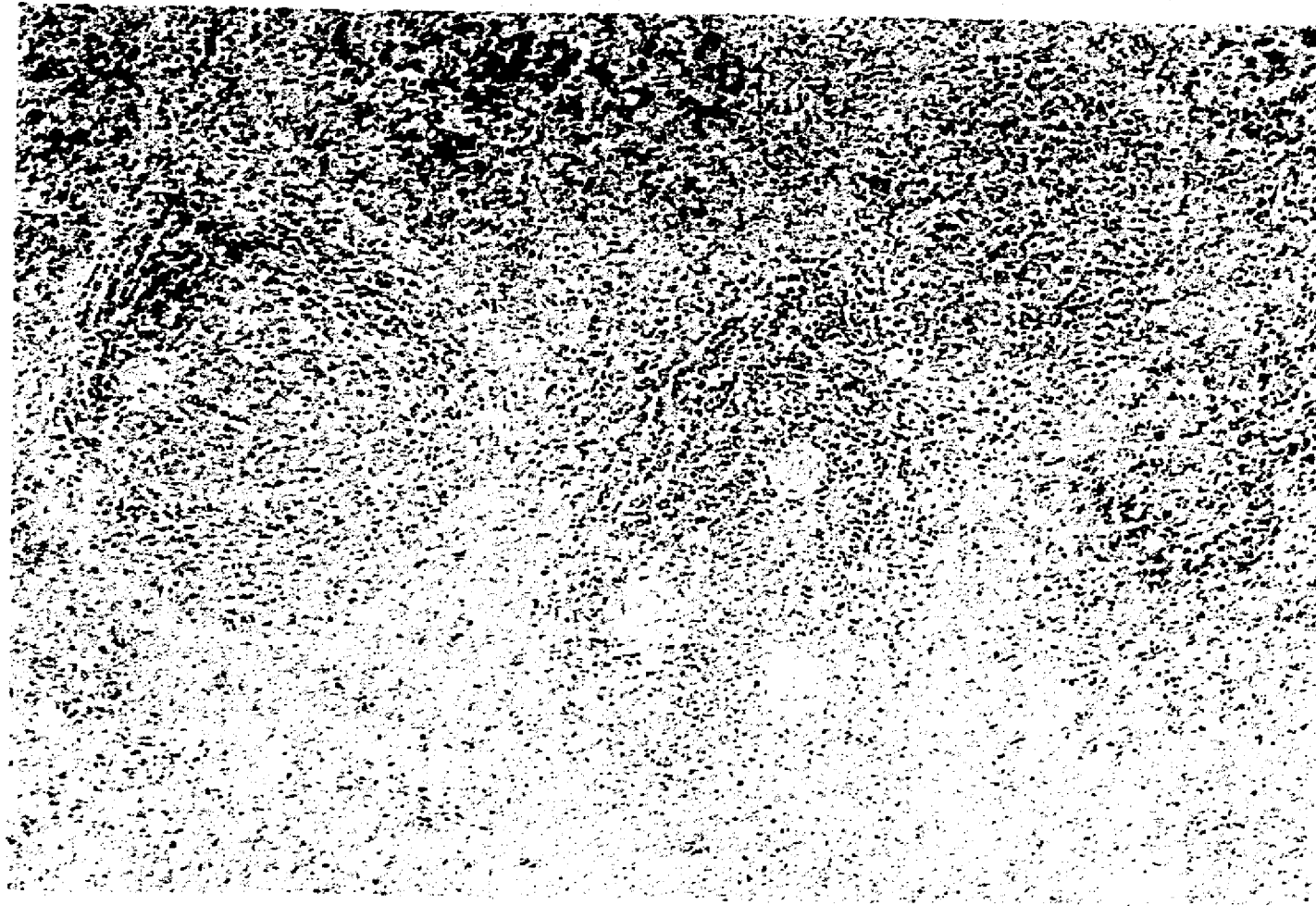


Fig. 5. Se aprecian hiperplasia reactiva de folículos linfoides B y T, y numerosos megacariocitos en este corte de bazo de una rata del grupo FC, tres días después de la infección con *K. pneumoniae*. Tinción con hematoxilina y eosina, 300x.

ESTR. UNIV. N.º 39
SERIE
77 DE MARZO DE 1957
BIBLIOTECA



Fig. 6. En este acercamiento se aprecian mejor los focos de hematopoyesis de granulocitos y megacariocitos en el bazo de una rata tratada con FC e infectada con *K. pneumoniae*. Tinción con hematoxilina y eosina, 400x.

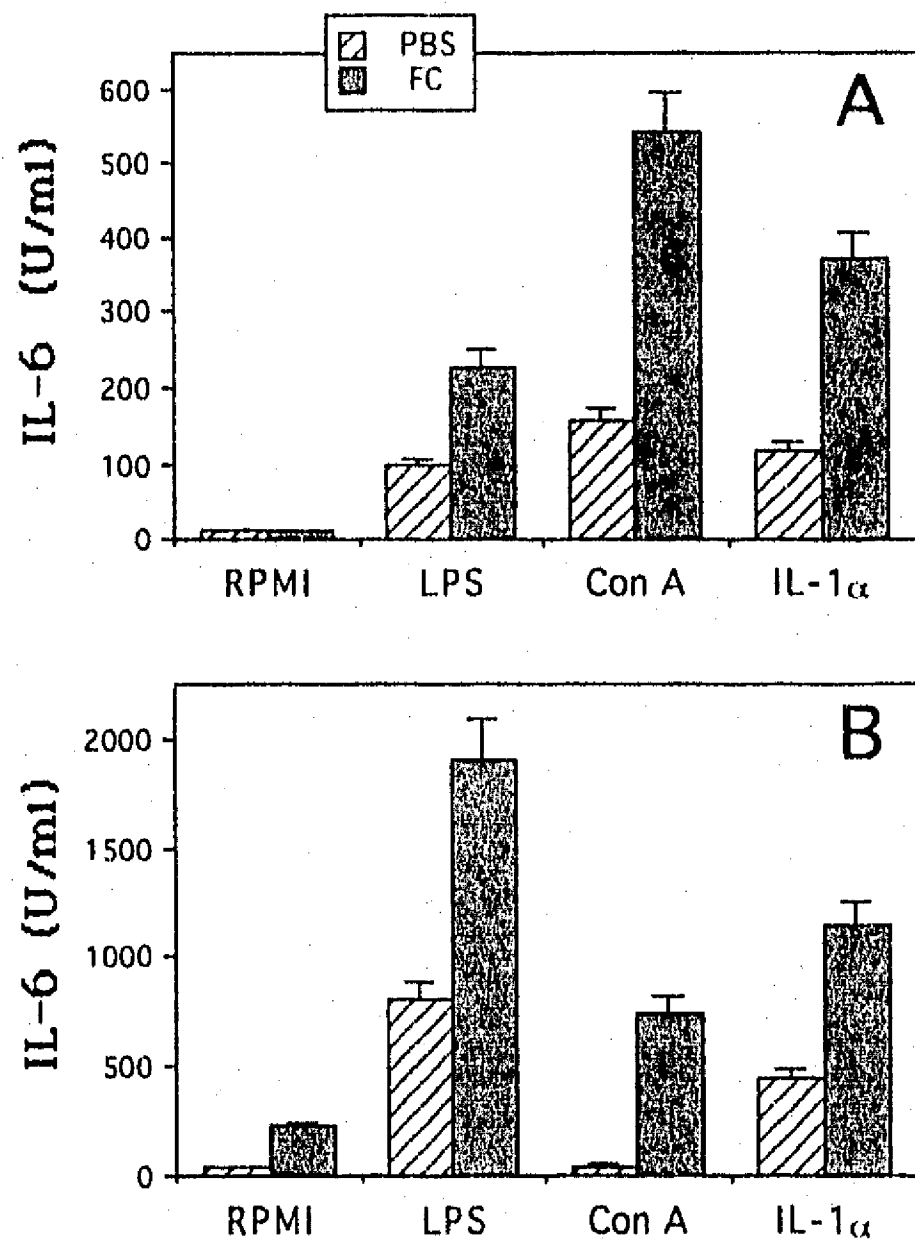


Fig. 7. La producción *in vitro* de IL-6 en respuesta a LPS, concanavalina A (Con A) y a IL-1 α fue mayor en las células que procedían de las ratas RN inoculadas con FC por vía ip ($p < 0.001$). En todos los casos, las células de los animales tratados con FC fueron capaces de duplicar o triplicar su producción de IL-6. Las células esplénicas (B) produjeron más IL-6 que las peritoneales (A), especialmente como respuesta al estímulo con LPS.

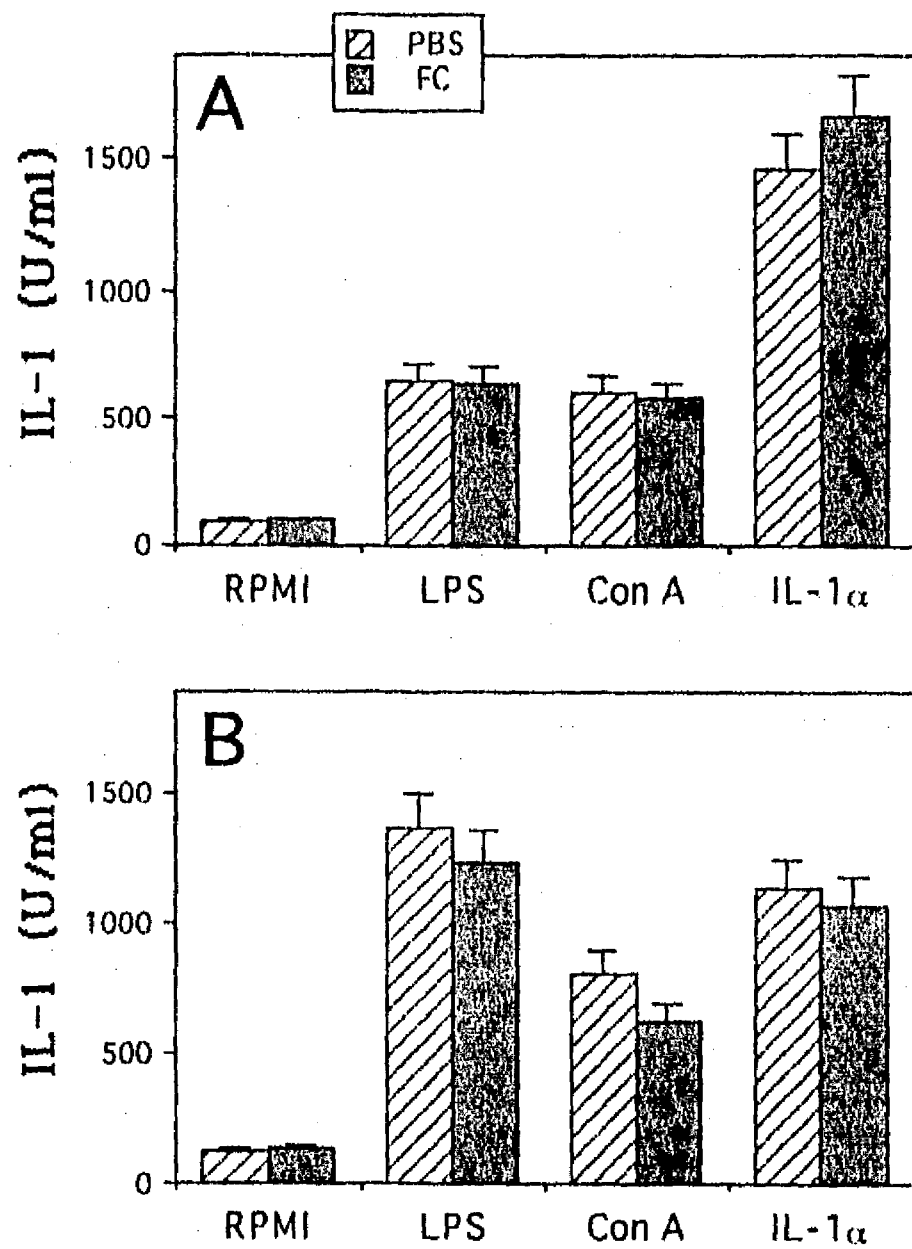


Fig. 8. La producción de IL-1 por células peritoneales (A) y esplénicas (B) en respuesta a los estímulos utilizados fue similar en los dos grupos de estudio. La FC no modificó la producción de IL-1. Además, la capacidad de las células peritoneales para responder a IL-1 α fue algo mayor que la de las células del bazo.