

15
2-gj.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**EFFECTO in vivo DE FOSFATIDILCOLINA SOBRE
LAS ACTIVIDADES QUIMIOTACTICA, FAGOCITICA
Y BACTERICIDA DE LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES DE RATA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A I
CATALINA GAYOSSO VAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Javier Mancilla Ramírez
Dr. José I. Santos Preciado

México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1989



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.

INDICE

Contenido	Página
RESUMEN	
ABREVIATURAS	
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
OBJETIVOS.....	16
HIPOTESIS.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	18
RESULTADOS DE QUIMIOTAXIS.....	25
RESULTADOS DE OPSONOFAGOCITOSIS.....	33
DISCUSION.....	52
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS.....	58

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue determinar el efecto de la fosfatidilcolina (FC), sobre las actividades quimiotáctica, fagocítica y bactericida de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), vasculares y extravasculares, provenientes de un modelo animal. Se utilizaron ratas Wistar adultas de ambos sexos asignadas al azar en cuatro grupos, tratados de la siguiente manera: grupo I dosis única de FC en emulsión, vía intraperitoneal (ip), posteriormente se implantaron en el lomo de los animales dos esponjas de polivinilo impregnadas con solución balanceada de fosfatos (SBF). El grupo II fue testigo del I, su tratamiento fue similar al anterior, siendo el inóculo ip de SBF. Para el grupo III las esponjas se impregnaron de FC, el grupo IV fue control del III y para este las esponjas se impregnaron con SBF, a estos dos últimos grupos no se les inoculó ip. De los cuatro grupos se obtuvieron, los PMNs extravasculares de las esponjas, los PMNs vasculares se obtuvieron por el método de Boyum a partir de sangre periférica. Para medir la quimiotaxis (Qtx), ambos tipos de células se corrieron contra una mezcla de sueros de ratas, activada con zymosano-A ó contra Solución Balanceada de Hank según el método de Boyden. Se observó mayor Qtx de los PMNs provenientes de los animales tratados con FC en contraste a los de tratamiento con SBF, con significancia estadística ($p = 0.005$) para la Qtx de PMNs circulantes de tratamiento con FC vía ip y ($p = 0.002$) para la Qtx de PMNs extravasculares de tratamiento con FC en esponjas subcutáneas.

Por otra parte se realizaron pruebas de opsonofagocitosis en micropelotas, utilizándose la cepa de Klebsiella pneumoniae K-8, la cual se opsonizó con tres diferentes fuentes de opsoninas y posteriormente se enfrentó contra los PMNs previamente obtenidos de los cuatro grupos de animales. El efecto de la FC en estas pruebas se evaluó como el porcentaje de crecimiento bacteriano a los 60 y 120 minutos de incubación, también se probó el efecto de la FC in vitro adicionando el fosfolípido a la mezcla de incubación.

Los resultados mostraron incremento en la capacidad bactericida de los PMNs dependiendo de la vía de inoculación de la FC así como de la fuente de opsonización utilizada presentándose mejor efecto bactericida de los PMNs extravasculares, obtenidos de esponjas con FC y de los PMNs circulantes provenientes de tratamiento con FC ip, en tanto que el mejor efecto in vitro de la FC se observó sobre los PMNs circulantes, en los tres casos hay una relación con el efecto del suero hiperinmune empleado como fuente de opsoninas. En base a los resultados obtenidos se presentó el efecto esperado, lo cual puede dar pauta a una futura aplicación terapéutica coadyuvante de la FC a pacientes con infecciones graves.

ABREVIATURAS

Leucocitos Polimorfonucleares.....	PMNs
Fosfatidilcolina.....	FC
Vía intraperitoneal.....	ip
Vía subcutánea.....	sc
microlitro.....	ul
Lipopolisacárido capsular.....	LPS
Polisacárido capsular.....	PSC
Solución Balanceada de Fosfatos.....	SBF
Solución Balanceada de Hank.....	SBH
Caldo Soya Tripticaseína.....	CST
Agar Eosina Azul de Metileno.....	EAM
Unidades Formadoras de Colonias.....	UFC

INTRODUCCION :

Las infecciones bacterianas sistémicas que se manifiestan como septicemia constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en todos los hospitales del mundo [1].

En los países en vías de desarrollo, como México, la desnutrición y las enfermedades infecto-contagiosas son problemas de gran importancia [2]. En pacientes hospitalizados, sobre todo en las unidades de terapia intensiva, se presentan con frecuencia enfermedades graves que deterioran sus mecanismos de defensa y les hacen más susceptibles a las infecciones por microorganismos intrahospitalarios, los cuales presentan características de mayor virulencia y factores de resistencia a los antimicrobianos de mayor uso [3-5].

Los principales agentes que causan infecciones nosocomiales con septicemia son algunas enterobacterias, en primer lugar Escherichia coli y en segundo Klebsiella pneumoniae, esta última es también la bacteria más frecuente en infecciones respiratorias intrahospitalarias [6,7]. Las infecciones por Klebsiella pneumoniae afectan a pacientes con diversos problemas, incluyendo enfermos inmunocomprometidos, lesionados por quemaduras, enfermos con disfunción pulmonar y de manera particular a los neonatos [5]. La mortalidad en pacientes con bacteremia o neumonía por Klebsiella pneumoniae llega a ser de 25% a 50% [5,8].

Klebsiella pneumoniae posee una cápsula formada de cadenas repetitivas de unos pocos monosacáridos [9]. El polisacárido capsular le confiere la capacidad de evadir la fagocitosis que

efectúan las células fagocíticas del hospedero durante la respuesta inflamatoria a la infección [10].

Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) son las células fagocíticas que constituyen la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas agudas y son las primeras en acumularse en los sitios donde se producen reacciones inflamatorias [11,12,13]. Su función principal es fagocitar y destruir a los microorganismos infectantes, eventos que se relacionan en forma directa con la activación de su metabolismo celular oxidativo y en menor proporción con la participación de mecanismos microbicidas no oxidativos de los PMNs [13,14].

En las respuestas de activación funcional de los PMNs, la membrana celular desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de antígenos y opsoninas por receptores específicos, al sufrir modificaciones estructurales que permiten la emisión de señales secundarias o mensajes bioquímicos que son transmitidos al interior de la célula y que dan lugar a respuestas especiales, como la activación de los mecanismos microbicidas oxidativos y no oxidativos [15].

La membrana celular está constituida principalmente por fosfolípidos que tienen efectos reguladores en la movilidad de la membrana, en la exposición de receptores y en la capacidad de activación celular [16]. El fosfolípido que se encuentra en mayor proporción en la capa externa de la membrana celular es la fosfatidil-colina (FC); en cambio, en la capa interna predominan la fosfatidil-etanolamina y el fosfatidil-inositol [15-17].

El colesterol es otro de los principales componentes de la membrana celular y junto con los fosfolípidos influye en la regulación de las propiedades físicas y funcionales de la membrana. Las membranas ricas en colesterol poseen menor fluidez, lo cual afecta ciertas funciones celulares; por ejemplo, los macrófagos enriquecidos en colesterol muestran inhibición significativa de la fagocitosis [18]. En cambio, cuando se adiciona FC o su metabolito liso-fosfatidilcolina, aumenta la fagocitosis en macrófagos y PMNs [19,20].

En varios estudios experimentales se ha observado que al inocular FC por vía intraperitoneal (ip) en animales, se logra una mayor capacidad de depuración de bacterias [21,22] y de partículas de carbón [23], así como un incremento en la respuesta de PMNs circulantes a la infección aguda [21,22,24] y una mayor sobrevivencia de los animales con infección bacteriana experimental [21,25-27]. Estos hallazgos sugieren que la aplicación de FC puede mejorar la actividad fagocítica en los PMNs y macrófagos.

Es posible que con una inyección ip se pueda lograr una adecuada biodisponibilidad de FC exógena [28] y consecuentemente una activación celular inespecífica o su eventual incorporación a las membranas celulares de los fagocitos [16,18,20]. La finalidad de este trabajo es definir la relación de esos hallazgos con el efecto de la FC sobre la función quimiotáctica, la actividad fagocítica y la capacidad bactericida de los PMNs de ratas Wistar adultas inoculadas con este fosfolípido.

ANTECEDENTES :

Las células fagocíticas, principalmente PMNs y macrófagos, actúan sobre los microorganismos y otras partículas extrañas para que sean destruidos y removidos del hospedero. Los leucocitos PMNs constituyen la primera línea de defensa del organismo en contra de las infecciones bacterianas [11,12,29]. Estas células son producidas en la médula ósea por proliferación y diferenciación de células precursoras que descienden de un origen celular pluripotencial. Los PMNs se desarrollan y maduran en la secuencia de mieloblasto, promielocito, metamielocito, célula en banda y PMN maduro; son producidos en gran número y son las primeras células en llegar a los sitios de inflamación [30].

Los leucocitos PMNs se adhieren al endotelio vascular adyacente al lugar de la inflamación, tal acción está mediada por productos bacterianos, toxinas o mediadores solubles que son secretados por macrófagos y diversos tipos de células en respuesta a diversos estímulos inflamatorios; estos mediadores se unen a receptores sobre la membrana celular de los PMNs, modificando la disposición de microfilamentos y miofibrillas que promueven su adhesión al endotelio. Una vez adheridos se induce un proceso de vasodilatación por C_5a y C_3a , seguido de esto, los PMNs pueden pasar entre las uniones de las células endoteliales hacia el exterior de los vasos sanguíneos, proceso denominado diápedesis [30,31,32].

Después de atravesar la pared vascular, los PMNs tienden a acumularse en el sitio de inflamación, gracias a su capacidad de

desplazarse. El movimiento de los PMNs de manera multidireccional o al azar es denominado quimioquinesis y cuando ese fenómeno se produce en forma unidireccional o dirigida se le denomina quimiotaxis. La migración dirigida de los PMNs es consecuencia de un gradiente de concentración de sustancias químicas denominadas factores quimiotácticos [30,32,33]. La locomoción leucocitaria tiene un sistema de regulación quimiotáctica cuyos constituyentes se encuentran en el suero humano. Ellos son: el factor inactivador quimiotáctico, el factor inhibidor celular dirigido y el factor activador de leucocinesis [33].

Los agentes quimiotácticos pueden ser naturales o sintéticos y la fuente más importante de factores quimiotácticos in vivo es el sistema de complemento, del cual derivan el fragmento C3a, C5a, C567 y el factor Ba (fragmento derivado del factor B, que resulta de la acción del factor D). Otros mediadores quimiotácticos derivados del plasma incluyen al factor Hageman, calicreína, activador del plasminógeno y productos derivados de ambas vías del metabolismo del ácido araquidónico (AAQ), [31,33].

De los productos del AAQ por la vía de la lipoxigenasa, el leucotrieno B4 (LTB4) es el principal agente quimiotáctico y de la vía de la cicloxigenasa son quimiotácticos la prostaglandina E1 y los tromboxanos. También existen factores quimiotácticos que son productos solubles derivados de linfocitos, monocitos y PMNs, [33].

Ciertos productos de tejidos, bacterias y virus contienen enzimas capaces de romper C3 y C5, con lo cual inducen la

producción de factores quimiotácticos derivados del complemento. Existen agentes quimiotácticos exógenos sintéticos que pertenecen a un grupo de oligopéptidos N-formilados de estructura análoga a los factores quimiotácticos bacterianos. Estos oligopéptidos, como el N-formil-leucil-fenilalanina, son usados con frecuencia en estudios experimentales de quimiotaxis [33,35,34].

Los agentes quimiotácticos interactúan con receptores leucocitarios, constituidos por macromoléculas específicas presentes en la superficie externa de la membrana celular [15,35,36]. Los PMNs presentan receptores de baja y alta afinidad para oligopéptidos quimiotácticos; esos estados de afinidad son, en parte, inter-convertibles [35,36,37]. De la interacción del agente quimiotáctico y el receptor se deriva una serie de eventos bioquímicos celulares coordinados que incluyen la activación de una esterasa, del metabolismo del AAQ y del ciclo de la hexosa-monofosfato; se produce flujo de iones de sodio, potasio y calcio; se altera la polaridad de la membrana; se incrementa la capacidad de adherencia y se presenta la migración quimiotáctica, seguida de la producción de iones superóxido y secreción del contenido lisosomal de los PMNs [32-35,36,37,38].

Los PMNs en movimiento tienen características morfológicas específicas durante la emisión de pseudópodos, cuyo borde conductor está libre de gránulos, mientras que el borde rezagado o urópodo presenta delgadas fibrillas que se adhieren al sustrato. El borde conductor de los pseudópodos se llena de microfilamentos de actina que se extienden como una fina capa

submembranosa alrededor de la célula y luego reaparecen como haces densos en el urópodo. Los microfilamentos proporcionan el sostén estructural de la célula, junto con la proteína miosina, que unida a la actina y a la gelsolina es capaz de contraerse y proporcionar así la fuerza dinámica para el desplazamiento celular. También hay microtúbulos que forman parte del citoesqueleto, el cual da consistencia a la célula, pero no interviene en su movilidad [30].

Las dosis bajas de factores quimiotácticos y los receptores de alta afinidad condicionan las funciones quimiotácticas, con polarización direccional, rearrreglo del citoesqueleto y locomoción estimulada. En contraste, la interacción con receptores de baja afinidad requiere de dosis 10 a 50 veces más altas de los agentes quimiotácticos para activar la secreción de enzimas lisosomales e inducir el mecanismo oxidativo microbicida en los leucocitos PMNs [35,36,37].

La presentación de receptores, la actividad enzimática y el transporte de metabolitos están afectados por las propiedades dinámicas de la membrana, cuya organización molecular consta de una bicapa de fosfolípidos en la que se hallan inmersos el colesterol y diversos tipos de proteínas químicamente activas. Los fosfolípidos se encuentran distribuidos asimétricamente en la membrana, de manera que en la capa externa hay principalmente fosfatidilcolina y en la interna se encuentra mayor cantidad de fosfatidiletanolamina [15,16,17].

Los fosfolípidos y el colesterol se encuentran en cantidades aproximadamente iguales; los primeros proporcionan a la célula un

cáriter anfipático mediante la porción apolar o hidrofóbica de sus dos cadenas de ácidos grasos y la porción polar o hidrofílica de un grupo cabeza constituido por un ácido fosfatídico enlazado a un residuo que puede ser colina, etanolamina, serina o inositol [16]. Al ser metilados, los fosfolípidos sufren translocaciones que le dan a la bicapa membranal la capacidad de moverse lateral y verticalmente, dotando a la célula de una matriz fluida. El colesterol, debido a su estructura química, proporciona cierta rigidez y hace a la membrana menos flexible e incluso menos permeable [15,16,17].

La funcionalidad de las moléculas membranales de los PMNs es indispensable para llevar a cabo la fagocitosis, su función principal. La fagocitosis de los microorganismos y en general de los agentes extraños al hospedero, se favorece cuando existe una opsonización previa de las partículas, proceso que las vuelve más susceptibles de ser reconocidas y fagocitadas [30].

La opsonización consiste en un recubrimiento de las partículas o microorganismos por factores del suero conocidos como opsoninas, que son anticuerpos y factores del complemento, principalmente inmunoglobulinas IgG1, IgG3 y de clase IgM, así como el factor C3b de complemento. Las opsoninas depositadas sobre la superficie de las partículas son reconocidas por receptores específicos de las células fagocíticas [29,30].

Una vez opsonizada la partícula a fagocitar, se inicia el proceso de ingestión por una extensión citoplasmática alrededor de la partícula que da lugar a la formación de una vacuola

fagocítica o fagosoma [30,37] . Después de la ingestión, la destrucción o muerte del agente fagocitado es efectuada por las células fagocíticas, lo cual implica la activación de sus mecanismos oxidativo y no oxidativo [30,34,37].

Cuando un microorganismo es fagocitado por un PMN, se realiza la fusión de gránulos azurófilos (también llamados gránulos primarios) y específicos (también llamados gránulos secundarios), presentes en el citoplasma del fagocito, estos actúan como lisosomas fusionándose con el fagosoma para formar el fagolisosoma y se libera el contenido enzimático de los gránulos azurófilos (mieloperoxidasa, lisozima, elastasa, proteinasa 3, N-acetil alfa-glucosamina, catepsina B, catepsina D, catepsina G, beta-glucuronidasa, beta-glicerofosfato, alfa-monosidasa y proteínas catiónicas) y de los gránulos específicos (lisozima, colágenasa, lactoferrina, proteína unida a vitamina B12, fosfolipasa A2, histaminasa y citocromo B). La acción altamente microbicida de estas sustancias provoca la muerte del microorganismo por un mecanismo no oxidativo [38,39,40].

La eficacia de la actividad microbicida de los PMNs depende en mayor parte de su metabolismo oxidativo, con la formación de productos altamente reactivos de oxígeno: iones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH^-) y singletes de oxígeno (O^1). Estos productos de reacción involucran un aumento en el consumo de oxígeno, en el flujo de glucosa por la vía de la hexosa-monofosfato y la emisión de fotones [41]. El fenómeno del metabolismo oxidativo se inicia

con la activación de un sistema de flavoenzimas asociadas a membrana, conocido como NADPH-oxidasa, que cataliza la reducción de O_2 a ión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), usando al NADPH como donador de un electrón. Dos moléculas de superóxido se combinan en presencia de la enzima superóxido-dismutasa para formar H_2O_2 [30,32,42].

La mieloperoxidasa participa en este mecanismo oxidativo a nivel de la vacuola fagocítica, donde en presencia de H_2O_2 y de haluros cataliza la reducción microbicida [29,31]. El superóxido que escapa de la vacuola fagocítica es reducido por el H_2O_2 rápidamente mediante la superóxido-dismutasa. El H_2O_2 citoplasmático es detoxificado por las enzimas glutathion-peroxidasa, glutathion-reductasa y catalasa. Tanto el sistema NADPH-oxidasa, como los sistemas de glutathion generan $NADP^+$ durante su actividad. Este $NADP^+$ es convertido de nuevo a NADPH por la vía de la hexosa-monofosfato [30,41,42].

Los PMNs son capaces de producir la muerte de diversos microorganismos, entre ellos bacterias gram-positivas y gram-negativas, mediante los mecanismos microbicidas mencionados; sin embargo, las bacterias encapsuladas tienen la capacidad de evadir la fagocitosis [10] y tienden a producir infecciones más graves y difíciles de eliminar que las causadas por bacterias sin cápsula. Uno de los microorganismos encapsulados de mayor importancia clínica es Klebsiella pneumoniae, considerado como un patógeno oportunista, que se identifica con frecuencia como causa de infecciones nosocomiales con morbilidad y mortalidad altas [5-8,43].

Klebsiella pneumoniae es un bacilo gram-negativo, de la familia Enterobacteriaceae. Por sus propiedades bioquímicas se le considera aerobio o anaerobio facultativo y presenta las siguientes reacciones: lactosa (+), Voges-Proskauer (+), glucosa (+), manitol (+), indol (-), citratos (+), ornitina (↔), ácido sulfhídrico (-), arabinosa (+), inositol (+), sacarosa (+), rojo de metilo (-), ureasa (+, lenta), gelatina (-), malonato (+) y lisina (+). [44].

Con base en estas propiedades bioquímicas, Cowan y cols [9], en 1960, propusieron cinco especies de Klebsiella: K. aerogenes, K. edwardsii, K. pneumoniae, K. ozaenae y K. rhinoscleromatis. En 1974, Buchanan y Gibbons definieron tres especies: K. pneumoniae, K. ozaenae y K. rhinoscleromatis. Finalmente, en 180 aislamientos de Klebsiella y utilizando 99 pruebas bioquímicas, Noemura y cols en 1979, concluyeron que K. pneumoniae incluye a las especies K. aerogenes, K. edwardsii y K. pneumoniae, descritas previamente por Cowan, [9.45].

La pared celular de Klebsiella consta de tres capas: la membrana citoplasmática, una capa de peptidoglican que mantiene la rigidez y da forma a la bacteria, y la membrana externa, que está compuesta por un complejo de lipopolisacárido (LPS), fosfolípidos y proteínas. El LPS constituye el antígeno somático O, conformado por tres regiones: la región I es la más externa y está formada por unidades repetitivas de oligosacáridos, la parte intermedia o región II es un oligosacárido llamado CORE, que expresa la antigenicidad R; la parte más interna o región III es el lípido A, el cual une por interacción hidrofóbica a las

lipoproteínas de la membrana celular externa de la bacteria.

Klebsiella se caracteriza por un polisacárido capsular externo (PSC) de grosor variable, el cual da un aspecto mucoso brillante y consistencia viscosa a las colonias crecidas en placas de agar [9,45]. El PSC constituye el antígeno K, un determinante de gran importancia, en cuya estructura primaria se identifican unidades repetitivas de unos pocos monosacáridos [9].

El efecto antifagocítico del PSC puede estar condicionado por su carga electrostática [10] o por interacciones complejas entre la superficie celular de la bacteria y la vía alterna de complemento. La interacción del PSC y la proteína H inhibidora del complemento resulta en el depósito del complejo H-C3b, antes de que se active C3b Bb P en la superficie de la bacteria y bloquea la amplificación de la unión de factores del complemento. Este fenómeno favorece la resistencia del microorganismo a la opsonización y en ausencia de anticuerpos tampoco se activa la vía clásica, lo cual disminuye efectivamente la fagocitosis de la bacteria [10].

A pesar de los mecanismos antifagocíticos de las bacterias encapsuladas, se ha observado mejoría de la respuesta fagocítica de PMNs y macrófagos retados con tales bacterias en presencia de FC [18,19]. Este fosfolípido se encuentra en forma natural en el cerebro, hígado, plasma y otros tejidos y es un componente principal de todas las membranas celulares de los animales mamíferos [15,18,46]. La interacción entre los fosfolípidos y el colesterol influye sobre las propiedades físicas y funcionales de

las membranas naturales y artificiales, dotándolas de fluidez, flexibilidad, resistencia y una relativa permeabilidad a moléculas muy polares [16,18].

Las membranas ricas en colesterol poseen menor fluidez y los macrófagos enriquecidos con colesterol muestran una inhibición significativa de la fagocitosis [18]. En cambio, al adicionar FC o su metabolito lisofosfatidilcolina, se incrementa la actividad de fagocitosis en los macrófagos y PMNs [20].

En modelos animales de infección experimental, se ha observado que al administrar FC por vía intraperitoneal (ip), se produce mejoría de la sobrevida hasta un 80% de los ratones infectados con una dosis letal de Staphylococcus aureus; sin embargo, FC no tiene efecto microbicida in vitro contra la misma cepa de Staphylococcus, por lo cual se ha propuesto que la FC actúa como un estimulante de la respuesta fagocítica de macrófagos in vivo [20]. En apoyo a esta hipótesis, se ha reportado que la FC induce un incremento en la depuración de partículas de carbón en ratones [22].

En ratas RN infectadas con estreptococos del grupo B, Santos y cols [26] observaron también un efecto protector con la administración ip de FC. Estudios recientes de Mancilla y cols [23], reportan una respuesta de neutrofilia en ratones NIH inoculados con FC ip. Esa respuesta fue mucho más significativa 24 horas después de retar con una dosis letal media de Klebsiella pneumoniae a ratas Wistar adultas previamente tratadas con FC, en contraste con la respuesta leucocitaria habitual de ratas no

tratadas [21,24].

Tanto en ratas adultas [21,24] y en ratas RN [27] infectadas con Klebsiella pneumoniae, se ha observado mejoría en la sobrevivencia de los animales con la administración ip de FC. Además, se ha logrado producir un efecto protector sinérgico mediante la administración de FC y suero de rata conteniendo anticuerpos anticapsulares específicos, mejorando aún más el porcentaje de sobrevivencia de ratas infectadas con Klebsiella pneumoniae [27]. La depuración de bacterias también fue mejor en los animales tratados con FC, lo cual sugiere la posibilidad de que las células fagocíticas de las ratas inoculadas con FC mejoran sus actividad fagocítica y su capacidad bactericida por un mecanismo de estimulación inespecífica o por modificaciones directas de las membranas celulares de los macrófagos y PMNs [18,47].

En el presente trabajo se evalúan las modificaciones de la capacidad funcional de PMNs circulantes, así como la de PMNs extra-vasculares, obtenidos ambos de ratas Wistar adultas tratadas con FC o con una solución inerte como control. Se estudió el efecto de FC sobre la movilidad al azar de los PMNs (quimocinesis) y el movimiento dirigido (quimiotaxis). Para evaluar la capacidad fagocítica y bactericida de los PMNs, se utilizó Klebsiella pneumoniae opsonizada con tres tipos diferentes de suero de rata.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Las infecciones bacterianas continúan siendo una causa elevada de morbilidad y mortalidad. En este tipo de infecciones, la primera línea de defensa del hospedero son los PMNs, cuyas funciones pueden ser modificadas por la utilización celular de la FC exógena. Este trabajo investiga el efecto de FC sobre la función quimiotáctica, la actividad fagocítica y la capacidad bactericida de PMNs de ratas, tanto a nivel sistémico como a nivel local para conocer la diferencia del efecto causado por FC. La finalidad principal es lograr un conocimiento que contribuya a establecer en el futuro una aplicación clínica de la FC como estimulante de la respuesta fagocítica en pacientes con infecciones bacterianas graves.

O B J E T I V O S :

1). Evaluar la actividad quimioquinética y quimiotáctica de PMNs intravasculares y extravasculares de ratas Wistar adultas tratadas con FC de manera sistémica (ip) o local (sc).

2). Evaluar la actividad fagocítica y la capacidad bactericida de PMNs circulantes y extravasculares de ratas adultas tratadas con FC por vía sistémica o local.

H I P O T E S I S :

Las actividades quimiotáctica, fagocítica y bactericida de leucocitos PMNs vasculares y extravasculares de ratas adultas mejoran al administrar FC exógena por vía sistémica o local a los animales.

MATERIAL Y METODOS :

Para determinar el efecto de FC en las actividades funcionales de leucocitos PMNs de ratas adultas se utilizaron las pruebas de quimiotaxis y opsonofagocitosis.

a). **FOSFATIDILCOLINA:** Se utilizó una preparación de FC 95, purificada de soya (SIGMA), la cual se disolvió en cloroformo, se dejó evaporar por 24 a 48 horas y se emulsificó en solución balanceada de fosfatos (SBF) a pH 7.2, bajo condiciones de estricta esterilidad [23].

b). **BACTERIA:** Se utilizó una cepa de Klebsiella pneumoniae de serotipo capsular K-8, aislada de una epidemia de sepsis neonatal en el Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social y tipificada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Para ajustar la bacteria se hizo un cultivo nocturno en caldo soya tripticaseína (CST) a 37 °C; después se sembró una muestra de 1 ml en 10 ml de CST, que se incubó a 37 °C durante dos horas y 30 minutos, para alcanzar la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria [47].

El cultivo se centrifugó a 7,500 rpm (2,500 xG) durante 30 minutos y se lavó dos veces con SBF estéril a pH 7.2. Finalmente, por nefelometría de McFarland [48] y espectrofotometría a 540 nm de longitud de onda (Coleman M-6/20), se ajustó la concentración a 1×10^6 UFC/ml. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se verificaron mediante siembras en agar eosina azul de metileno (EAM), contando las UFC en las placas después de 18 horas de incubación a 37 °C.

c). **SUEROS: Suero Normal:** De un grupo de 30 ratas Wistar adultas de ambos sexos, se extrajeron aproximadamente 3 ml de sangre de cada animal por medio de punción cardiaca, utilizando como anticoagulante 10 U de heparina por ml. Todas las muestras se colectaron en un tubo, el cual se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta la retracción del coágulo; se removió éste y el tubo se centrifugó por 15 minutos a 2,500 rpm (800 xG) en una centrifuga refrigerada (Sorvall) a 4°C. El suero se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Suero Normal Adsorbido: Todo el suero normal fue adsorbido con Klebsiella pneumoniae K-8 inactivada previamente por calor a 121°C y a 15 libras de presión por 15 minutos. La bacteria inactivada, en una concentración de 1×10^9 UFC/ml, se mezcló en una proporción de 1 ml por cada 3 ml de suero; se mantuvo en agitación suave y constante por un lapso de 2 horas a 4°C. se centrifugó a 7,500 rpm (2,500 xG) durante 30 minutos y se obtuvo el sobrenadante, el cual se filtró con una membrana (Millipore) con poros de 0.45 micras (um) de diámetro. Una parte de este suero fue almacenada a -20°C en alícuotas de 0.5 ml.

Suero Adsorbido y Descomplementado: Una parte del suero adsorbido se calentó a una temperatura de 56°C durante 30 minutos, a fin de inactivar los factores de la vía clásica y de la vía alterna del complemento, exceptuando C₃ y C₅. También se almacenó en alícuotas de 0.5 ml hasta su utilización.

Suero Inmune: Se obtuvo de un grupo de 20 ratas Wistar adultas

inmunizadas previamente con Klebsiella pneumoniae K-8 inactivada por calor. Estos animales fueron inoculados por vía subcutánea (sc) con 100 microlitros (ul) de una suspensión de 1×10^8 UFC/ml. se aplicaron refuerzos los días 3.7 y 14 y cuatro días después se obtuvo sangre por punción cardiaca y se separó el suero, el cual se almacenó en alícuotas de 0.5 ml a -20° C hasta ser utilizado.

d). ANIMALES: Se utilizaron ratas Wistar adultas de ambos sexos, de 6 a 8 semanas de edad, con peso de 150 g a 200 g y se distribuyeron en cuatro grupos de 5 a 7 animales cada uno. A las ratas del grupo I se les inoculó por vía intraperitoneal (ip), una emulsión de FC en dosis única de 800 mg por kg de peso y 38 horas después se les implantaron en el lomo, a nivel de la fascia muscular, dos esponjas de polivinilo (Unipoint Inc.) de 1 cm de diámetro y 0.5 cm de espesor, con peso promedio de 22 ± 2 mg. Las esponjas fueron impregnadas con 50 ul de SBF estéril a pH 7.2. Los animales del grupo II, que sirvieron como testigo, fueron inoculados por vía ip con 1 ml de SBF a pH 7.2 y se les implantaron las esponjas de la misma manera que al grupo I. Las ratas de ambos grupos fueron sacrificadas a las 56 horas de haber sido inoculadas, es decir, 18 horas después de haber sido implantadas las esponjas. [49].

A los animales del grupo III se les colocaron en el lomo dos esponjas impregnadas con 5 mg de FC y a las ratas del grupo IV, consideradas como control del grupo III, se les colocaron dos esponjas impregnadas con 50 ul de SBF a pH 7.2. Los animales de estos dos grupos no fueron inoculados por vía ip y se sacrificaron a las 18 horas de haberles implantado las esponjas.

e). **LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES:** De los cuatro grupos de animales se obtuvieron PMNs circulantes de sangre periférica y los PMNs extra-vasculares de las esponjas [49]. Los PMNs intra-vasculares se obtuvieron de sangre extraída de las ratas por punción cardiaca; se separaron por gradientes de densidades de centrifugación con ficoll-hypaque y sedimentación con dextrán, según la técnica de Boyum [50], los eritrocitos remanentes se lizaron con solución salina estéril al 0.2% y al 1.6% en forma alterna y el botón de PMNs se resuspendió en solución balanceada de Hank (SBH). Los PMNs extra-vasculares se obtuvieron de las esponjas de polivinilo implantadas; cada esponja se colocó en tubos estériles con 0.5 ml de SBH y se exprimió suavemente hasta remover el líquido con su contenido de PMNs [49].

f) **EVALUACION CELULAR:** El rendimiento de células PMNs se determinó por cuentas en microscopio óptico (Zeiss) a 40x en una cámara de Neubauer y se ajustaron en SBH a una concentración de 1×10^6 PMNs/ml. La viabilidad celular se determinó por el porcentaje de PMNs que presentaron exclusión del colorante vital azul de tripano al 0.3% en solución NaCl 0.85% y la pureza se observó utilizando solución de Turk.

g). **ENSAYO DE QUIMIOTAXIS:** Para esta prueba se utilizó una microcámara de Boyden de 48 pozos (Neuroprobe) con membranas de nitrocelulosa con poros de 3 μ m de diámetro (Nucleopore). Los PMNs de sangre periférica o de las esponjas se ajustaron a 2×10^6 por ml de SBH. Como agente quimiotáctico se utilizó una mezcla de suero normal de rata activado con zymosano-A (Sigma) y para medir

la migración al azar se utilizó SBH como attractante.

La cámara de Boyden consta de dos compartimentos separados por un empaque de silicón; la parte inferior de la cámara tiene 48 pozos de 3.18 mm de diámetro con capacidad de 40 ul y en la parte superior hay 48 orificios de 70 ul de volumen; las dos partes de la cámara se unen y se fijan con seis tornillos.

Para llevar a cabo el ensayo se ajustó el volumen de una micropipeta, de manera que al llenar los pozos se formase un pequeño menisco positivo; el volumen necesario fue de aproximadamente 40 ul. En la parte inferior de la cámara se colocó el agente quimiotáctico (suero de rata activado) o el control (SBH), después se colocó la membrana de nitrocelulosa humedecida en solución de Gey balanceada con hepes y adicionada con albúmina al 1% (NaCl 135 mM, KCl 4.5 mM, MgCl 1.3 mM, CaCl 1.5 mM, Hepes 10 mM, dextrosa 0.1 % y albúmina al 1%); se colocó el empaque y la parte superior de la cámara y se ajustaron los tornillos. Los pozos superiores fueron llenados con 70 ul de la suspensión de PMNs ajustada en SBH a 2×10^6 por ml y se incubó la cámara a 37°C durante 60 minutos; una vez transcurrido ese tiempo, la cámara se invirtió para eliminar el volumen residual de los pozos superiores y se retiró la membrana, la cual se fijó con etanol-agua 1:1 y se tiñó para hacer las lecturas de la migración celular.

Tinción: Después de haber fijado la membrana se lavó con agua caliente durante 10 minutos, se pasó a una caja de Petri con hematoxilina y se dejó teñir durante 8 minutos. La membrana se

lavó nuevamente con agua caliente durante 10 minutos.

Decoloración: Después de la tinción, la membrana se pasó a una caja de Petri con HCl al 0.5% por espacio de 10 a 15 segundos, después se pasó por etanol durante 10 a 15 segundos más. Se efectuó otro lavado en agua caliente por 10 minutos.

tinción de contraste: SE colocó la membrana en otra caja de Petri con cromatrope 3R al 2%, se dejó teñir durante 30 minutos y enseguida se lavó por 5 minutos en agua caliente.

Deshidratación: Una vez teñida, se procedió a deshidratar la membrana, pasándola sucesivamente por etanol durante 3 minutos, propanol 3 minutos, propanol-xilol 1:1 por 3 minutos y xilol 3 minutos. Finalmente, la membrana se colocó en un porta-objetos con resina histológica (Sigma), con la cara que contiene las células hacia abajo y se cubrió cuidadosamente con un cubre-objetos, evitando la formación de burbujas.

Lectura: Se realizó según el método de Zygmound y Hirsch [51], midiendo la distancia del punto donde se observó la mayor cantidad de células, hasta donde hubieron al menos cinco PMNs. Las lecturas de cada muestra fueron por triplicado, utilizando para medir la distancia de migración el tornillo micrométrico de un microscopio óptico (Zeiss) a 40x y se reportó el promedio de los valores en micras.

h). ENSAYO DE OPSONOFAGOCITOSIS:

Opsonización: Un volumen de 0.1 ml de Klebsiella pneumoniae ajustada en SBF a 1×10^9 UFC/ml, se opsonizó con 0.9 ml de los

sueros inmune, adsorbido y descomplementado, respectivamente. Las tres diferentes mezclas se incubaron por 30 minutos a 37°C, manteniéndolas en agitación suave y constante. Las bacterias ya opsonizadas se ajustaron en SBF a una concentración final de 1×10^6 UFC/ml.

Fagocitosis: Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo cóncavo (Microtiter Dynatech); en cada pozo se colocaron 50 ul de PMNs intra- o extra-vasculares (0.5×10^5) y la bacteria opsonizada con cada uno de los tres sueros ajustada a 1×10^5 según las UFC obtenidas en un cultivo de control en placas de agar EAM (UFC inicial), con la finalidad de establecer una relación PMN:bacteria de 1:2, finalmente, se adicionó SBH hasta completar un volumen de 100 ul por pozo [52]. La microplaca, con todas las muestras por triplicado, se incubó a 37°C en agitación continua y a los 60 y 120 minutos se tomaron muestras de 10 ul de cada pozo, diluyeron en 90 ul de agua destilada estéril, se homogeneizaron por agitación vigorosa con un vórtex (Super-Mixer) y se sembraron 10 ul en placas de EAM. Después de incubar a 37°C durante 18 horas, se contaron las UFC en placa (UFC final), para reportar el porcentaje de crecimiento bacteriano por pozo utilizando la siguiente fórmula, [53].

$$\% \text{ de crecimiento bacteriano} = (\text{UFC inicial} / \text{UFC final}) \times 100.$$

i). **ANALISIS ESTADISTICO:** Para definir las diferencias entre los diversos grupos en los ensayos de quimiotaxis, se aplicó la prueba t de Student [54] y para analizar los resultados de los ensayos de opsonofagocitosis se utilizó la prueba U de Mann-Whitney [57].

RESULTADOS

SUEROS: En los tres tipos de sueros utilizados se determinaron los títulos de anticuerpos IgG específicos contra el polisacárido capsular de Klebsiella pneumoniae K-8 mediante el método de ELISA. Los resultados de absorbancia por espectrofotometría a 490 nm fueron: a) suero adsorbido = 0; b) suero adsorbido y descomplementado = 0.010; c) suero inmune = 0.115.

PMNs: Los procedimientos de obtención de PMNs circulantes y extra-vasculares mostraron rendimientos promedio de 4.39×10^6 células por ml de sangre periférica y 4.16×10^6 células por ml del líquido removido de las esponjas. La pureza de las células correspondió a un 93.77% de PMNs en las muestras obtenidas de sangre periférica y tratadas por el método de Boyum [54], en tanto que el 93.88% de las células obtenidas de las esponjas fueron PMNs. La viabilidad promedio fue de 97.35% en los PMNs circulantes y de 98.25% en los PMNs extra-vasculares.

QUIMIOTAXIS: En los ensayos de migración celular de los PMNs se evaluó la quimocinesis en los aspectos de migración al azar, migración dirigida y la quimiotaxis como índice de la diferencia entre la migración dirigida y la migración al azar. Los resultados se muestran en los Cuadros 1 y 2 y en las Fig. 1 a 6.

En la Fig. 1 se puede apreciar que la migración al azar de los PMNs circulantes y de los PMNs extra-vasculares fue mayor en las ratas inoculadas con SEF por vía ip (grupo II), en contraste con las inoculadas con FC (grupo I). Estos resultados se presentan como promedios en el Cuadro 1. En cambio, tanto en los

PMNs circulantes como en los PMNs extra-vasculares, se observó una mayor migración al azar cuando se administró FC de manera local (grupo III), a diferencia de lo observado con los PMNs de las ratas del grupo IV. Fig. 2.

La administración de SBF por vía ip (grupo II) o de FC en las esponjas (grupo III) tuvieron un efecto de mayor capacidad migratoria en los PMNs extra-vasculares, comparada con la migración de los PMNs de sangre periférica. Cuando los PMNs extra-vasculares fueron obtenidos de las ratas del grupo III, se observó un incremento de la migración al azar, de 7.5 um a 49.4 um, con una diferencia significativa ($p = 0.0041$). Cuadro 2.

QUIMIOKINESIS Y QUIMIOKINESIS DE POLIMORFONUCLEARES DE RATAS
WISTAR TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA (FC) O CON SOLUCION
BALANCEADA DE FOSFATOS (SBF) POR VIA INTRAPERITONEAL.

		M I G R A C I O N (um)					
PMN	*	AL AZAR		DIRIGIDA		DIRIGIDA-AZAR	
		SBF	FC	SBF	FC	SBF	FC
	n:	4	4	4	4	4	4
CIRCULANTES	\bar{X} :	49.2	30.2	122.4	153.3	73.2	123.2 ^a
(SANGRE	DE:	27.5	16.6	33.9	21.2	32.1	16.5
PERIFERICA)	EE:	15.9	9.6	19.6	12.4	16.5	9.5
	n:	4	4	4	4	4	4
EXTRAVASCULARES	\bar{X} :	70.9	38.4	113.8	102.2	42.9	63.7
(ESPONJAS	DE:	35.0	19.0	38.2	18.2	39.9	35.5
SUBCUTANEAS)	EE:	20.2	10.9	22.0	27.8	23.0	21.2

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación
estándar EE = error estándar.

* = tratamiento de los animales con: FC ó SBF utilizada como
control.

a: p = 0.05 significancia estadística.

CUADRO 1

QUIMIOKINESIS Y QUIMIOTAXIS DE POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR
TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA (FC) O CON SOLUCION BALANCEADA DE
FOSFATOS (SBF) EN ESPONJAS SUBCUTANEAS

PMNs	M I G R A C I O N (um)						
		AL AZAR		DIRIGIDA		DIRIGIDA-AZAR	
	*	SBF	FC	SBF	FC	SBF	FC
CIRCULANTES (SANGRE PERIFERICA)	n:	4	4	4	4	4	4
	\bar{X} :	19.7	30.6	75.1	58.6	55.3	29.7
	DE:	13.4	13.7	30.8	20.1	29.3	22.9
	EE:	7.7	7.9	17.8	11.6	17.0	13.0
EXTRAVASCULARES (ESPONJA SUBCUTANEA)	n:	4	4	4	4	4	4
	\bar{X} :	7.5	49.4 ^a	16.3	144.9 ^b	8.8	95.6 ^c
	DE:	4.6	15.4	6.3	16.8	4.0	18.1
	EE:	2.6	8.9	3.7	9.7	2.3	10.4

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación estándar EE = error estándar.

* = tratamiento de los animales, con: FC ó con SBF utilizada como control.

a: p = 0.0041, b: p = 0.0001, c: p = 0.0002, significancias estadísticas.

CUADRO 2

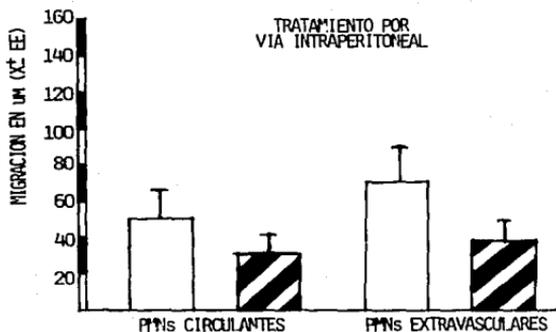


Fig. 1

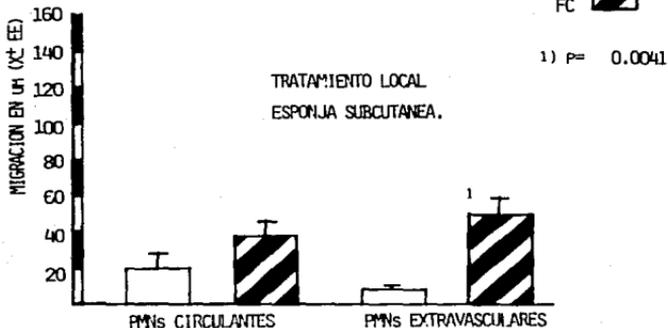


Fig. 2

Fig. 1 y 2. MIGRACION AL AZAR DE POLIMORFONUCELARES (PMNs) DE RATAS WISTAR TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA (FC) O SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS (SBF).

En las Fig. 3 y 4 se presentan los resultados de la migración dirigida de PMNs hacia un quimioattractante constituido por suero normal de rata activado con zymosano-A. Los promedios obtenidos son mayores que los de la migración al azar, observándose en la Fig. 3 que la FC administrada por vía ip (grupo I) indujo un mayor efecto migratorio en los PMNs de sangre periférica que en los extra-vasculares; en cambio, los PMNs extra-vasculares de las ratas del grupo II migraron más que los PMNs circulantes.

En la Fig. 4 se puede apreciar un gran aumento en la migración dirigida de los PMNs extra-vasculares ($p = 0.0001$), cuyos promedios se presentan en el Cuadro 2. Este incremento en la migración de PMNs extra-vasculares fue mayor en el grupo III que en el grupo IV; en cambio, la migración de los PMNs circulantes fue menor en el grupo III que en el grupo IV.

En las Fig. 5 y 6 se muestran las diferencias entre la migración dirigida y la migración al azar. El mayor efecto sobre la migración quimiotáctica de los PMNs circulantes se presentó en el grupo I, en contraste con el grupo II ($p = 0.005$): los valores correspondientes se muestran en el Cuadro 1. La quimiotaxis también fue mejor en los PMNs extra-vasculares del grupo III que en los del grupo IV ($p = 0.0002$). Cuadro 2.

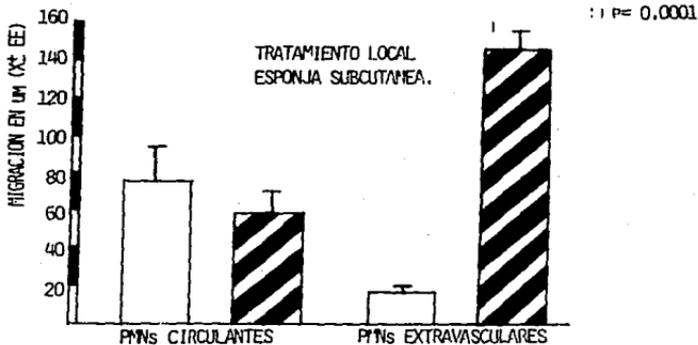
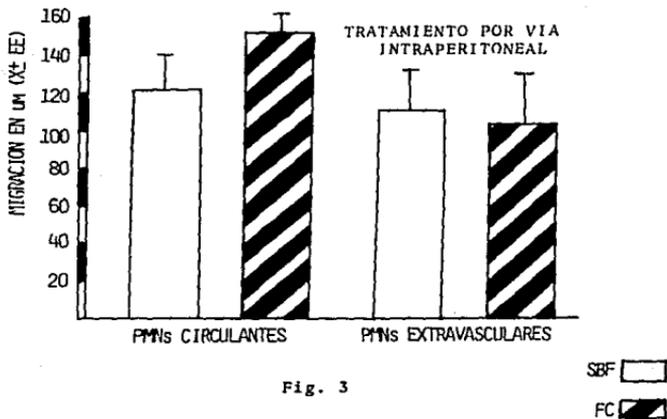


Fig. 3 y 4. MIGRACION DIRIGIDA DE POLIMORFONUCLEARES (PMNs) DE RATAS WISTAR TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA (FC) O CON SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS (SBF).

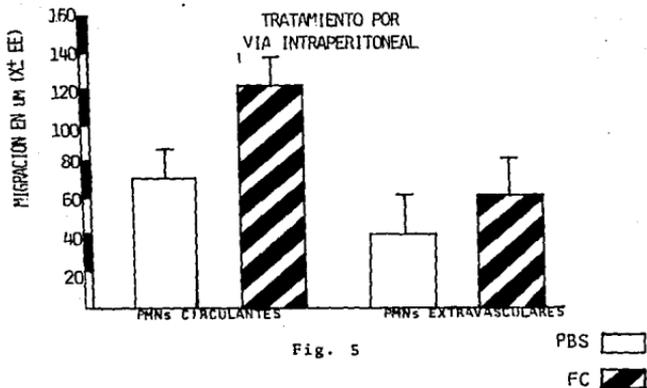


Fig. 5



Fig. 6

Fig. 5 y 6. QUIMIOTAXIS DE POLIMORFONUCLEARES (PMNs) DE RATAS WISTAR TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA (FC) O CON SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS (SBF).

OPSONOFAGOCITOSIS: Se observaron diferencias en el desarrollo de Klebsiella pneumoniae enfrentada con PMNs de rata, según la vía de inóculo empleada para administrar FC o SBF. En general, hubo menor crecimiento bacteriano cuando se usaron PMNs circulantes de las ratas de los grupos I y II o PMNs extra-vasculares de los animales de los grupos III y IV. El crecimiento de la bacteria también fue menor cuando se utilizó como fuente de opsoninas al suero inmune de rata.

En las Fig. 7 y 8 se presenta el crecimiento de Klebsiella pneumoniae a los 60 y a los 120 minutos de haber sido enfrentada con PMNs de los grupos testigo II y IV. Sólo se observaron diferencias significativas cuando se utilizaron PMNs extra-vasculares; el crecimiento bacteriano generalmente fue menor en el grupo II y cuando se utilizó suero inmune como fuente de opsoninas. Estos resultados se muestran en los Cuadros 3 y 4.

CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA Y ENFRENTADA
 CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR ADULTAS TRATADAS CON
 SOLUCION DE FOSFATOS POR VIA INTRAPERITONEAL.

		CRECIMIENTO BACTERIANO (% UFC)					
PMNs	OPSONIZACION	SUERO SIN COMPLEMENTO		SUERO ADSORBIDO		SUERO INMUNE	
	INCUBACION:	60'	120'	60'	120'	60'	120'
	n:	6	6	6	6	6	6
CIRCULANTES (SANGRE PERIFERICA)	\bar{X} :	91.0	134.2	80.8	111.2	70.8	94.5
	DE:	64.4	103.2	53.1	91.1	39.4	69.6
	EE:	28.6	46.1	23.3	40.7	17.6	31.1
EXTRAVASCULARES (ESPONJA SUBCUTANEA)	n:	6	6	6	6	6	6
	\bar{X} :	107.3	122.2	87.4	94.8	71.4	80.8
	DE:	66.8	62.5	39.6	65.7	34.0	53.6
	EE:	29.9	27.9	17.7	29.4	15.2	23.9

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación estándar EE = error estándar.

CUADRO 3

CRECIMIENTO DE Klebsiella pneumoniae K-8 OPSONIZADA Y ENFRENTADA CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR ADULTAS TRATADAS CON SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS EN ESPONJAS SUBCUTANEAS.

PMNs	OPSONIZACION INCUBACION	CRECIMIENTO BACTERIANO (% UFC)					
		SUERO SIN COMPLEMENTO		SUERO ADSORBIDO		SUERO INMUNE	
		60'	120'	60'	120'	60'	120'
	n:	7	7	7	7	7	7
CIRCULANTES	\bar{X} :	176.1	225.8	180.6	235.5	145.5	174.1
(SANGRE PERIFERICA)	DE:	142.1	215.2	72.0	182.0	58.1	94.3
	EE:	58.0	87.8	29.4	74.3	26.0	42.2
	n:	7	7	7	7	7	7
EXTRAVASCULARES	\bar{X} :	148.5	179.6	180.3	172.1	179.6	160.6
(ESPONJA SUBCUTANEA)	DE:	100.6	134.2	77.1	76.3	108.0	71.5
	EE:	41.1	54.8	31.5	31.1	48.3	32.0

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación estándar
EE = error estándar.

CUADRO 4

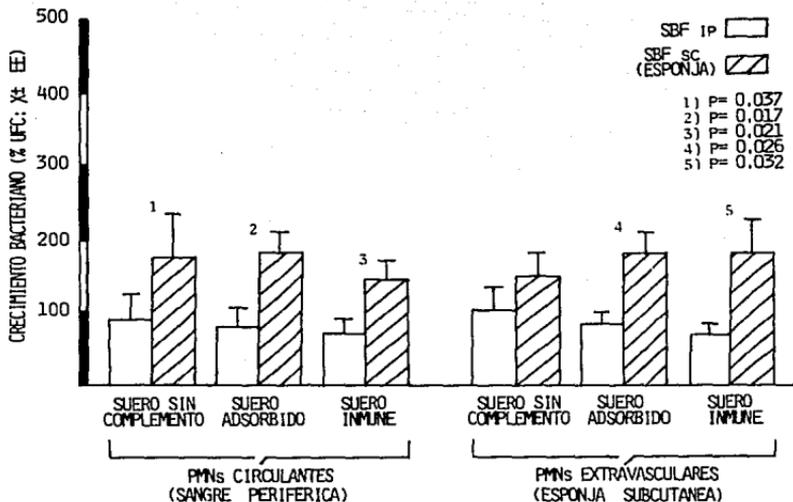


Fig. 7. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 60 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR TRATADAS CON SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS.

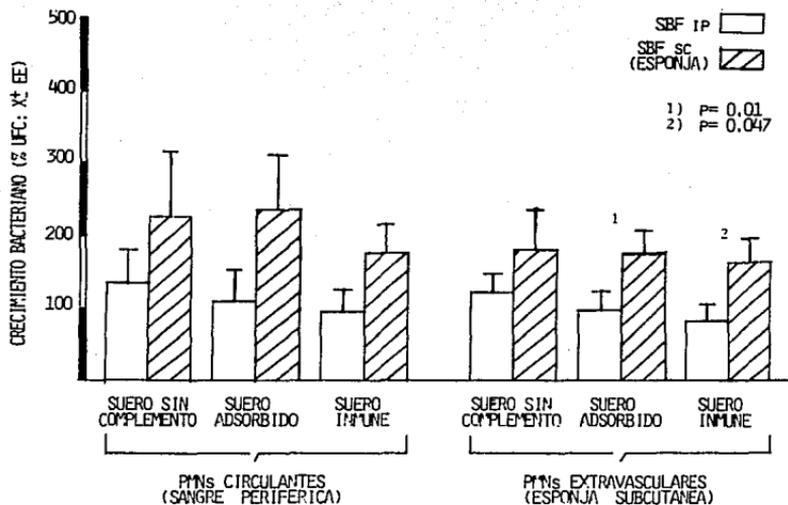


Fig. 8. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 120 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR TRATADAS CON SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS.

Las diferencias de crecimiento bacteriano cuando se retaron PMNs de los grupos con FC I y III se pueden apreciar en las Fig. 9 y 10. Cuando se utilizaron PMNs circulantes del grupo I hubo menor crecimiento de Klebsiella pneumoniae, en comparación con los PMNs circulantes del grupo III. Al retar a los PMNs extra-vasculares se observó menor desarrollo bacteriano cuando provenían del grupo III, sobre todo si la bacteria se opsonizó con suero inmune de rata. Las diferencias fueron significativas cuando se opsonizó a la bacteria con suero adsorbido o con suero inmune, como se puede observar en los Cuadros 5 y 6.

La opsonización de Klebsiella pneumoniae con suero inmune se asoció a menor crecimiento bacteriano cuando se utilizaron PMNs extra-vasculares de los grupos I y III; sin embargo, estos resultados no llegaron a ser estadísticamente significativos.

CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA Y ENFRENTADA
 CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR ADULTAS TRATADAS CON
 FOSFATIDILCOLINA POR VIA INTRAPERITONEAL.

PMNs	OPSONIZACION INCUBACION	CRECIMIENTO BACTERIANO (% UFC)					
		SUERO SIN COMPLEMENTO		SUERO ADSORBIDO		SUERO INMUNE	
		60'	120'	60'	120'	60'	120'
	n:	6	6	6	6	6	6
CIRCULANTES (SANGRE PERIFERICA)	\bar{X} :	59.1	88.8	56.0	48.0	42.2	43.4
	DE:	27.4	69.4	24.9	41.7	32.8	37.3
	EE:	12.2	31.0	11.1	18.6	14.7	16.7
	n:	6	6	6	6	6	6
CIRCULANTES (ESPONJA SUBCUTANEA)	\bar{X} :	67.0	71.2	59.7	55.4	54.0	48.0
	DE:	31.1	57.7	23.0	52.8	36.0	50.0
	EE:	13.9	25.8	10.3	23.6	16.1	22.4

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación estándar EE = error estándar.

CUADRO 5

CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA Y ENFRENTADA
 CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR ADULTAS TRATADAS CON
 FOSFATIDILCOLINA EN ESPONJAS SUBCUTANEAS.

PMNS	OPSONIZACION INCUBACION	CRECIMIENTO BACTERIANO (% UFC)					
		SUERO SIN COMPLEMENTO		SUERO ADSORBIDO		SUERO INMUNE	
		60'	120'	60'	120'	60'	120'
	n:	5	5	6	6	5	5
CIRCULANTES	\bar{X} :	259.7	316.8	259.0	310.6	288.4	336.1
(SANGRE PERIFERICA)	DE:	276.6	247.9	244.7	232.8	258.2	237.2
	EE:	138.3	123.9	109.4	104.1	129.1	118.6
	n:	5	5	5	5	5	5
EXTRAVASCULARES	\bar{X} :	124.7	171.0	124.8	166.8	89.1	117.0
(ESPONJA SUBCUTANEA)	DE:	42.4	76.5	38.0	78.1	33.6	58.2
	EE:	21.2	38.2	17.0	34.9	15.0	26.0

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación
 estándar EE = error estándar.

CUADRO 6

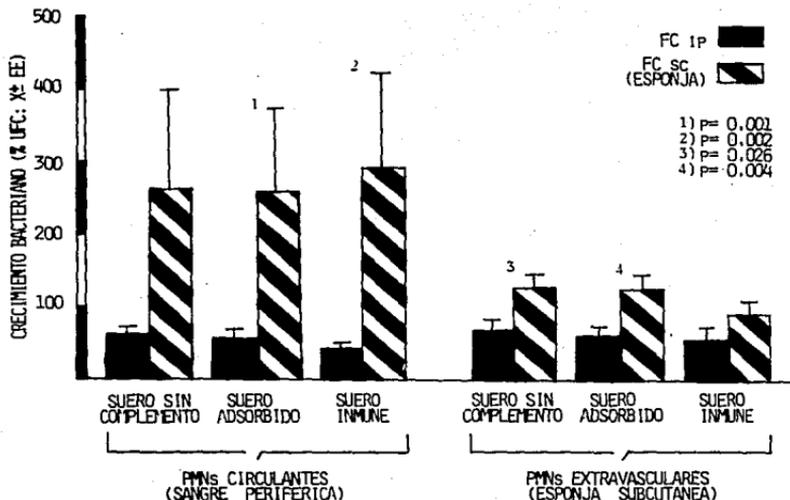


Fig. 9. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-6 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 60 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WIGTAR TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA.

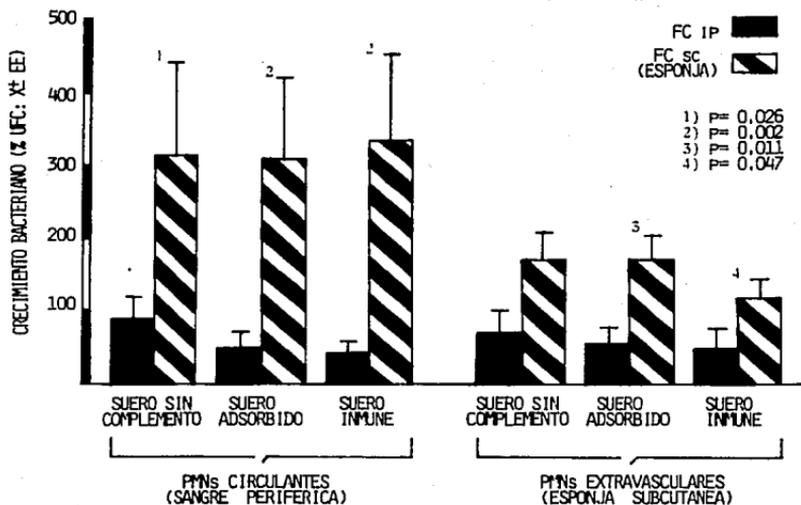


Fig. 10. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 120 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR TRATADAS CON FOSFATIDILCOLINA.

En la Fig. 11 se presenta el crecimiento de Klebsiella pneumoniae a los 60 minutos de incubación con PMNs de los grupos I y II, observándose un mayor efecto bactericida en los PMNs circulantes y en los extra-vasculares del grupo I, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. El menor crecimiento bacteriano se observó después de haber opsonizado a la bacteria con suero inmune. El crecimiento bacteriano a los 120 minutos tuvo el mismo patrón de comportamiento (Fig. 12), con los porcentajes que se pueden ver en los Cuadros 4 y 5.

En las Fig. 13 y 14 se presentan los porcentajes de crecimiento de la bacteria enfrentada por 60 y 120 minutos con PMNs de los grupos III y IV. El mayor efecto bactericida se observó con los PMNs circulantes del grupo IV y con los PMNs extra-vasculares del grupo III, con una diferencia significativa cuando la bacteria fue opsonizada con suero inmune. La Fig. 14 muestra menor crecimiento bacteriano al enfrentar los PMNs extra-vasculares de los grupos III y IV, siendo aún menor en el grupo III. Cuadros 3 y 4.

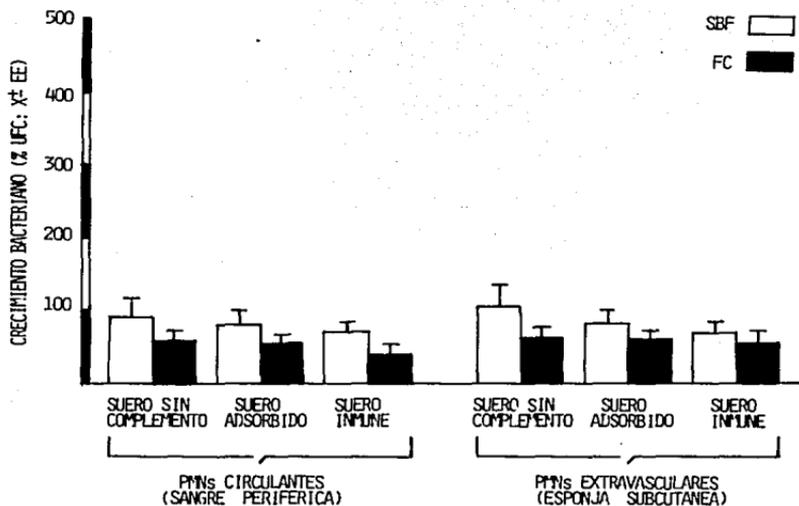


Fig. 11, CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 60 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR INOCULADA POR VIA INTRAPERITONEAL, CON FOSFATIDILCOLINA O SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS

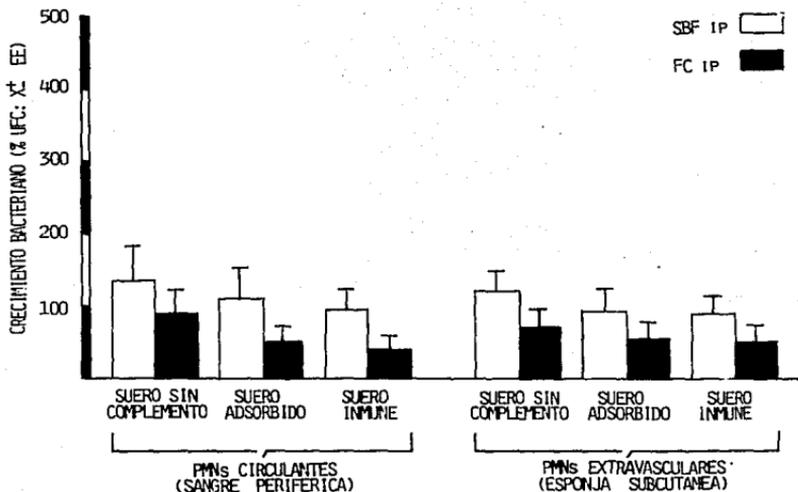


Fig. 12. CRECIMIENTO *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONISADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 120 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR INOCULADAS POR VIA INTRAPERITONEAL, CON FOSFATIDILCOLINA O SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS.

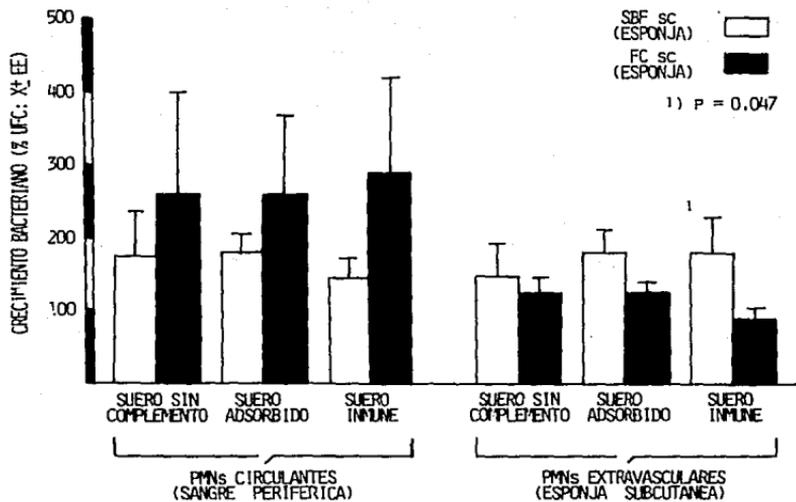


Fig. 13. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 60 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR CON TRATAMIENTO LOCAL, CON FOSFTIDILCOLINA O SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS.

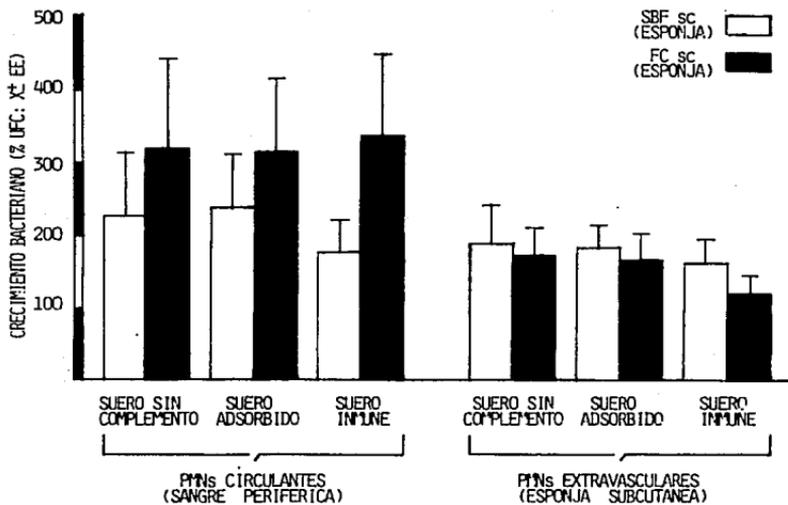


Fig. 14, CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 120 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR CON TRATAMIENTO LOCAL, CON FOSFATIDILCOLINA O SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS.

El crecimiento de Klebsiella pneumoniae enfrentada con PMNs extra-vasculares del grupo IV o con PMNs circulantes obtenidos de ratas sin ningún tratamiento previo, disminuyó al adicionar FC al ensayo in vitro (Fig. 15 y 16). Esta diferencia en la capacidad bactericida de los PMNs con FC adicionada in vitro fue estadísticamente significativo cuando la bacteria se opsonizó con suero inmune.

En general, se presentó un mejor efecto in vitro de la FC sobre los PMNs circulantes en comparación a los PMNs extra-vasculares, tanto a los 60 como a los 120 minutos de incubación con la bacteria, aumentando el efecto cuando la bacteria había sido opsonizada con suero inmune. Cuadros 3 y 7.

CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA Y ENFRENTADA CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS WISTAR ADULTAS, EN PRESENCIA DE FOSFATIDILCOLINA *in vitro*.

CRECIMIENTO BACTERIANO (% UFC)								
PMNs	OPSONIZACION INCUBACION	SUERO SIN COMPLEMENTO		SUERO ADSORBIDO		SUERO INMUNE		
		60'	120'	60'	120'	60'	120'	
		n ¹	7	7	7	7	7	7
CIRCULANTES (SANGRE PERIFERICA)		\bar{X} :	152.2	218.1	165.3	143.4	102.6	136.3
		DE:	117.3	292.0	105.3	88.2	84.3	103.5
		EE:	47.9	119.2	42.9	36.0	37.7	46.3
		n ¹	7	7	7	7	7	7
EXTRAVASCULARES (ESPONJA SUBCUTANEA)		\bar{X} :	188.8	219.9	178.6	189.5	129.4	163.3
		DE:	178.9	169.9	116.6	93.5	64.2	60.7
		EE:	73.0	69.4	48.1	97.2	28.7	27.1

n = número de muestras \bar{X} = media aritmética DE = desviación estándar EE = error estándar.

CUADRO 7

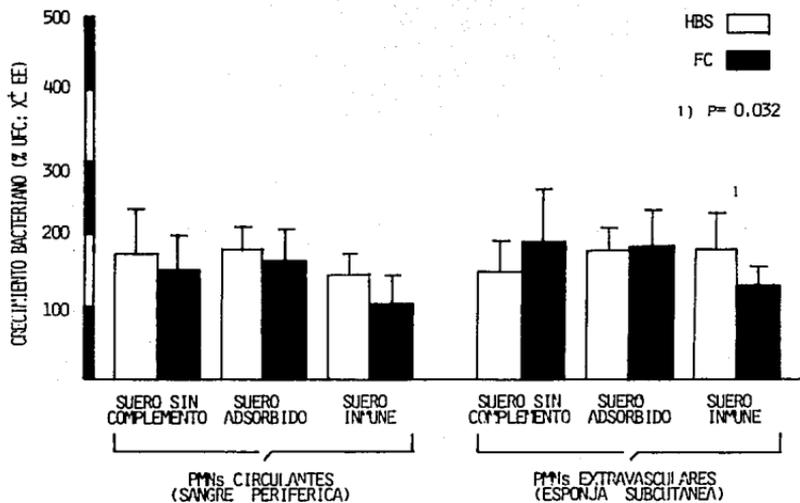


Fig. 15. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 60 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS Wistar EN PRESENCIA DE FOSFATIDILCOLINA O SOLUCION BALANCEADA DE HANK.

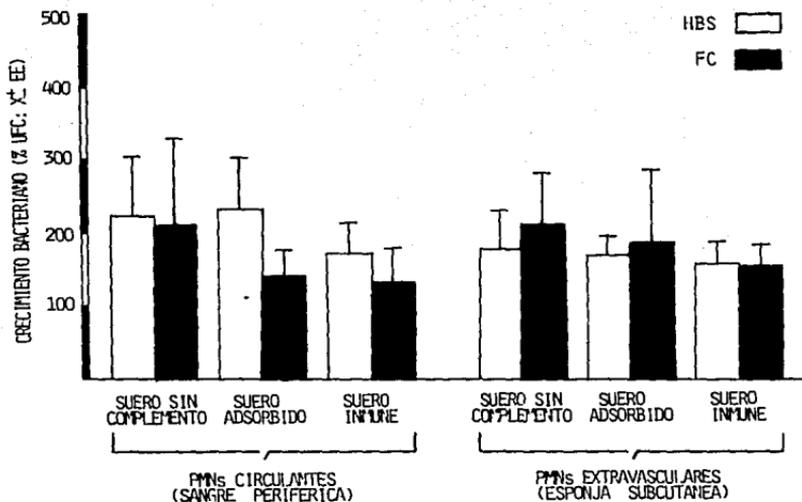


Fig. 16. CRECIMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae* K-8 OPSONIZADA CON TRES DIFERENTES FUENTES Y ENFRENTADA POR 120 MINUTOS CON POLIMORFONUCLEARES DE RATAS Wistar EN PRESENCIA DE FOSFATIDILCOLINA O SOLUCION BALANCEADA DE HANK.

DISCUSION :

La susceptibilidad del hospedero a las infecciones por bacterias encapsuladas, como Klebsiella pneumoniae, se incrementa ante la resistencia de estos microorganismos a los antimicrobianos comunes, en especial cuando se trata de infecciones intrahospitalarias [5-8]. La capacidad fagocítica de los PMNs interviene como un factor fundamental en la respuesta inflamatoria aguda a este tipo de infecciones bacterianas [11,12].

Algunos estudios han sugerido que FC puede mejorar la fagocitosis de PMNs y macrófagos [19,20] y al utilizar FC en ratones infectados con Staphylococcus aureus, se ha observado un efecto protector [18], lo cual ha sido reportado también en ratas RN con sepsis experimental por estreptococo del grupo B, tipo III [26]. En ratas adultas [21-27] y en ratas RN [56] se ha logrado mejorar la sobrevida a la infección por Klebsiella pneumoniae al administrar por vía ip FC (800 mg/kg) [21,23].

En este estudio hemos evaluado la actividad de PMNs circulantes y extra-vasculares de ratas adultas tratadas por vía sistémica o local con FC. Estudios preliminares de Mancilla y cols [24] ya han sugerido que la FC mejora la capacidad fagocítica de los PMNs de ratas adultas, determinada por pruebas de quimioluminiscencia y de reducción de nitroazul de tetrazolio [58]. En este trabajo, además de evaluar la capacidad fagocítica mediante pruebas de opsonofagocitosis, también se evaluó el

efecto de la FC sobre la capacidad migratoria de los PMNs de ratas adultas, obtenidos de sangre periférica y de una fuente extra-vascular confiable [49]. Nuestros resultados apoyan las observaciones de otros autores acerca de los efectos de FC [19,22,25].

La afinidad y la actividad funcional de los receptores de la membrana celular de los PMNs pueden ser modificadas farmacológicamente [35]. Al probar el efecto de la FC sobre la capacidad migratoria de los PMNs, observamos un incremento de la quimioquinesis y quimiotaxis de PMNs circulantes y extra-vasculares obtenidos de ratas con aplicación sistémica y local de FC. Estos resultados sugieren que la migración de los PMNs mejora por la exposición a FC, lo cual puede ser de gran importancia para mejorar la respuesta del hospedero a las infecciones bacterianas [29,33,35].

La actividad migratoria de los PMNs en presencia de FC puede mejorar por una interacción más directa entre el fosfolípido exógeno y la membrana celular, si es que de algún modo la FC se integra a la membrana y modifica la relación fosfolípidos-colesterol, ya que esto incrementaría la fluidez de la membrana al reducir su viscosidad y favorecería su movilidad [16]. A mayor cantidad de fosfolípidos se presenta mayor frecuencia de translocaciones de éstos, incrementándose la movilidad de la bicapa de la membrana y es posible que se produzca una mayor exposición de receptores de alta o baja afinidad para el agente quimiotáctico [35,36], mayor facilidad de polarización morfológica y rearrreglo del citoesqueleto [34-36], que

resultarían en una mejor locomoción celular de los PMNs y mayor capacidad fagocítica.

Los PMNs de las ratas tratadas con FC presentaron en promedio mayor efecto bactericida en comparación a los PMNs obtenidos de los grupos testigo. Este efecto fue diferente según la vía de administración empleada y fue mejorado por una fuente adecuada de opsoninas. La capacidad bactericida de los PMNs fue facilitada al utilizar una adecuada fuente de anticuerpos y complemento, efectuando la opsonización de la bacteria con suero inmune o suero adsorbido, que fueron en general las muestras que presentaron menor crecimiento bacteriano, en tanto que las bacterias opsonizadas con el suero adsorbido y descomplementado presentaron mayor desarrollo, tanto a los 60 como a los 120 minutos de incubación con PMNs en los ensayos de opsonofagocitosis.

Estos hallazgos son compatibles con la importancia de los factores del complemento y la presencia de anticuerpos específicos para el proceso de opsonización que favorece la fagocitosis de las bacterias por los fagocitos PMNs [56]. Además es sobresaliente la observación de que la FC produce un efecto sinérgico con una adecuada opsonización, facilitando la fagocitosis y muerte de Klebsiella pneumoniae, tanto en una acción sistémica sobre PMNs circulantes, como en un efecto local sobre PMNs extra-vasculares.

De acuerdo a nuestros resultados, la administración de FC presentó el efecto que se esperaba, observándose varias

modificaciones según el tipo de suero utilizado para opsonizar, la vía de administración de FC a las ratas y la fuente de obtención de los PMNs. Definitivamente, consideramos que este estudio estimula a continuar con esta línea de investigación, con la finalidad de lograr en el futuro una aplicación clínica de la FC como medida terapéutica coadyuvante en pacientes con infecciones bacterianas graves.

CONCLUSIONES:

- a). FC induce un efecto que incrementa la quimioquinesis de PMNs de rata. El incremento de la quimioquinesis es parcial y está influenciado por la vía de administración de la FC y la localización vascular o extra-vascular de los PMNs.
- b). FC indujo un incremento en la quimioquinesis de los PMNs extra-vasculares obtenidos de esponjas cuando la aplicación de FC fue local, es decir en la misma esponja.
- c). La quimiotaxis de los PMNs fue ampliamente incrementada al administrar FC. El mayor efecto quimiotáctico se observó en los PMNs circulantes obtenidos de ratas inoculadas con FC por vía ip, mientras que la mayor migración quimiotáctica de PMNs extra-vasculares se presentó cuando fueron obtenidos de ratas con aplicación local de FC en las esponjas.
- d). La administración de FC se asoció con un aumento en la capacidad fagocítica de PMNs de ratas adultas. Este efecto fue dependiente de la vía de inóculo de la FC, así como de la fuente de anticuerpos y complemento (opsoninas) utilizada para opsonizar a la bacteria.
- e). Se observó mayor capacidad bactericida en los PMNs circulantes obtenidos de ratas con FC ip y en los PMNs extra-vasculares de esponjas con FC, lo cual mejoró aún más cuando fueron enfrentados con bacterias opsonizadas con suero inmune.
- f.) La administración ip de FC se asoció con menor crecimiento

bacteriano al enfrentar los PMNs circulantes con Klebsiella pneumoniae, mientras que los PMNs extra-vasculares tuvieron mayor efecto bactericida cuando provenian de las esponjas con FC. Estos resultados mejoraron también al opsonizar las bacterias con suero inmune.

g). Al adicionar FC in vitro se produjo un mayor efecto bactericida en los PMNs circulantes de rata, pero no en los extra-vasculares. Este efecto también fue mejor cuando se utilizó suero inmune de rata para opsonizar a la bacteria.

REFERENCIAS:

1. Maki DG: Nosocomial bacteremia: an epidemiologic overview. Am J Med 1981; 70:719-732.
2. Larracilla JA, Vargas RR, Peñalosa JS, García MM, Dellman CA: Septicemias nosocomiales. Bol Med Hosp Infant Mex 1982; 39:806-811.
3. Markowitz SM, Veazey JM Jr, Macrina FL, Mayhall CG, Lamb VA: Sequential outbreaks of infection due to Klebsiella pneumoniae in a neonatal care unit: implication of a conjugative R plasmid. J Infect Dis 1980; 142:106-112.
4. Casewell MW, Phillips I: Aspects of the plasmid-mediated antibiotics resistance and epidemiology of Klebsiella species. Am J Med 1981; 70:459-462.
5. Cryz SJ, Furer E Jr, Germanier R: Safety and immunogenicity of Klebsiella pneumoniae K-1 capsular polysaccharide vaccine in humans. J Infect Dis 1985; 151:665-671.
6. Pollack M: Significance of circulating capsular antigen in Klebsiella infections. Infect Immun 1976; 13:1543-1548.
7. Murcia A and Rubin SJ: Reproducibility of an indirect immunofluorescent-antibody technique for capsular serotyping of Klebsiella pneumoniae. J Clin Microbiol 1979; 9:208-213.
8. Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Colver DH, Hughes JM: The epidemiology of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae. Infection Control 1985; 6:68-74.
9. Orskov I, Orskov F: Serotyping of Klebsiella En: Methods in Microbiology. London: Academic Press, 1984: 143-164.
10. Kasper DL: Bacterial capsule - Old dogmas and new tricks. J Infect Dis 1986; 153:407-415.
11. Marsh JC, Boggs DR, Cartwright GE, Wintrobe MM: Neutrophil kinetics in acute infection. J Clin Invest 1967; 46:1943-1953.
12. Mallesh HL, Gallin JI: Neutrophils in human diseases. N Engl J Med 1987; 317:684-694.
13. Solberg CO: Infections in immunocompromised host. Scand J Infect Dis 1980; 24(suppl):36-43.
14. Wilson ME, Genco RJ, Snyderman R: The phagocytic cell. Rev Infect Dis 1985; 7:387-389.
15. Hirata F, Axelrod J: Phospholipids methylation and biological signal transmission. Science 1980; 209:1082-1090.
16. Bretscher MS: Moléculas de la membrana celular. Investigación

y Ciencia (México) 1985; 111:66-75.

17. Becker EL: Leukocyte stimulation: receptor membrane and metabolic events. Fed Proc 1986; 45:2148-2150.

18. Dianzani MU, Torrielli MV, Canuto RA, Garcea R, and Feo F: The influence of enrichment with cholesterol on the phagocytic activity of rat macrophages. J Pathol 1976; 118:193-199.

19. Rivnay B, Globerson A, Shinitzky M: Perturbation of lymphocyte response to concanavaline A by exogenous cholesterol and lecithin. Eur J Immunol 1978; 8:185-189.

20. Elsbach P, van den Berg JW, van den Bosch, van Dannea LLM: Metabolism of phospholipid by polymorphonuclear leukocyte. Biochem Biophys Acta 1965; 106:338-341.

21. Mancilla J, Nurko S, Garcia MP, Mejia JS, Santos JI: Respuesta de leucocitos modificada por fosfatidilcolina en sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae. Memorias de las I Jornadas Médicas de Residentes del Hospital Infantil de México. México, 1987: Resumen 5.

22. 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.

23. Mancilla J, Nurko S, Garcia MP, Mejia JS, Santos JI: Modificaciones leucocitarias por fosfatidilcolina en un modelo animal. Bol Med Hosp Infant Mex 1986; 43:713.

24. Mancilla J, Nurko S, Garcia MP, Mejia JS, Santos JI: Efecto de fosfatidilcolina en la respuesta leucocitaria en sepsis experimental por Klebsiella pneumoniae K-8. Memorias del 3rd Panamerican Congress of Infectious Disease and Chemotherapy. Puerto Rico, 1986: Resumen V-11.

25. Sower MC, Tsuchiya Y, Nutini LG: The prophylactic effect of phosphatidylcholine on Staphylococcus aureus infections in swiss albino mice. IRCS Med Sci 1981; 9:459.

26. Santos JI, Cortiella JJ, Zeisel SH, Vitale JJ: Phosphatidylcholine (FC) in the treatment of experimental type III group B Streptococcus infections. Pediatr Res 1984.

27. Mancilla J, Santos JI, Vitale JJ: Phosphatidylcholine increases circulating PMNs and improves survival of rats during experimental Klebsiella pneumoniae sepsis. Pediatr Res 1988.

28. Zeisel H: Lecithin in health and diseases. Ent Szuhaj B, List eds: Lecithins. Washington DC: American Oil Chemists Society, 1985: 323-345.

29. Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of

bacterial by human neutrophils. Blood 1986; 68:708-71130. Bell JB, Douglas SD: Phagocyte functions and defects. A ten-year update. Pediatr Ann 1987; 16:379-385.

30. Bell JB and Douglas SD: Phagocyte functions and defects. A ten-year update. Pediatr Ann 1987; 16: 379-385.

31. Miller ME: Chemotaxis function in the human neonate: humoral and cellular aspects. Pediatr Res 1971; 5:487-492.31.

32. Drutz DJ y Mills J. Inmunidad e Infección, En:Fudenberg HH,Stites DP, Stobo JD, Wells JV. Inmunología Básica y Clínica,4a ed.México: El Manual Moderno, 1983:221-230.

33. Maderazo EG, Ward PA: Leukocyte chemotaxis, En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds: Manual of clinical laboratory immunology, 3rd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986: 290-294.

34. Becker EL: Chemotaxis: J Allergy Clin Immunol 1980; 66:97-105

35. Snyderman R: Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on leukocytes. Fed Proc 1984; 43:2743-2748.

36. Snyderman R: Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Rev Infect Dis 1985; 7:390-394.

37. Wilson ME, Genco RJ, Snyderman R: The phagocytic cell. Rev Infect Dis 1985; 7:387-389.36.

38. Cohen HJ, Chovanec ME, Takahashi K, Whitin JC: Activation of human granulocytes by arachidonic acids: its use and limitations for investigating granulocyte function. Blood 1986; 67:1103-1109.

39. Fallon J and Gallin JI: Neutrophil granules in health and disease. J. Allergy Clin Immunol 1986;77:653-662.

40. Bainton DF: Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. J Cell Biol 1973; 58:249-264.

41. Allen RC, Yevich SJ, Orth RW, Stelle RH: The superoxide anion and single molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte. Biochem Biophys Res Commun 1974; 60:909-917.

42. William AJ, Cole PJ: The onset of polymorphonuclear leukocyte membrane-stimulated-metabolic activity. Immunology 1981;43:733-739.

43. Beagley ST: Habitat association of Klebsiella species. Infection Control 1985; 6:52-58.

44. Dowell VR, Giono CS: Diferenciación de las especies de la tribu Klebsiellae. En: Curso de actualización, papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de infecciones oportunistas e intrahospitalaria, Manual de Laboratorio. Departamento de Ecología Humana 1984: 66.
45. Ewing WH: The genus Klebsiella. En: Identification of enterobacteriaceae, 4th ed. Amsterdam: Elsevier ed, 1986: 374-378.
46. Blusztajn JK, Ziesel SH, Wurtman RJ: Synthesis of lecithin (phosphatidylcholine) from phosphatidyl-ethanolamine in bovine brain. Brain Res 1979; 179:319-327.
47. Mancilla-Ramírez J: Depuración reticuloendotelial de Klebsiella pneumoniae en un modelo animal. Tesis de Maestría. Hospital Infantil de México. UNAM, 1988.
48. Paik G: McFarland nephelometer. En: Branson D, Ed: Methods in clinical bacteriology. Illinois: American Society for Microbiology, 1980: 106 y 219.
49. Arbo A, Mejía J, Mancilla J, Santos JI: Estudio funcional de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) intra y extravasculares en sepsis experimental. Memorias de las I Jornadas Médicas de Residentes del Hospital Infantil de México, 1987: Resumen.
50. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21(suppl 97):77-89.
51. Zygmound SH, Hirsch JC: Leukocyte locomotion and chemotaxis. J Exp Med 1973; 137:384-410.
52. Speer CP, Gahr M, Wieland M and Eber S: Phagocytosis-associated in neonatal monocyte-derived macrophages. Pediatric Research 1988; 24:213-216.
53. Castellanos CC: Actividad protectora de inmunoglobulina intravenosa, pH 4.25, en sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae.
54. Downie NM, Heath RW: Contraste de hipótesis. Diferencia de medias. En: Métodos estadísticos aplicados. México: Harla. 1973: 182-203.
55. Siegel S: Probabilidades asociadas con valores pequeños. Prueba U de Mann-Whitney. En: Estadística no paramétrica. México: Trillas, 1985: 305-306.
56. Mancilla J, Nurko S, Castellanos C Santos JI: Efectividad terapéutica de inmunoglobulina intravenosa pH 4.25 en sepsis neonatal experimental por Klebsiella pneumoniae. Bol Med Hosp Infant Mex 1989; (En prensa).

57. Mancilla J, Mejia JS, Arbo A, Santos JI: Mejoria de la actividad fagocitica y capacidad bactericida de PMNs intra- y extra-vasculares de rata por efecto local y sistémico de fosfatidilcolina. (Comunicación personal, 1988).