

# La fosfatidilcolina induce un aumento en la producción de interleucina-6 y mejora la supervivencia de ratas con sepsis neonatal por *Klebsiella pneumoniae*.

Javier Mancilla-Ramírez,\*\* Charles A Dinarello,\*\* José Ignacio Santos-Preciado\*\*\*

## Resumen

Las infecciones por bacterias gram negativas son una de las primeras causas de muerte en el recién nacido. La depuración de bacterias es deficiente en el neonato, situación que aumenta la susceptibilidad a las infecciones. En este estudio se logró mejorar el patrón de depuración de *Klebsiella pneumoniae* en ratas wistar recién nacidas inoculadas por vía IP con 800 mg/kg de fosfatidilcolina de soya (FC), en contraste con el grupo testigo inyectado con PBS ( $p < 0.05$ ). La supervivencia 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 FC, observándose además hematopoyesis extramedular de las series granulocíticas ( $p < 0.05$ ) y de megacariocitos ( $p < 0.01$ ) en el bazo de las ratas del grupo de FC. No se observaron cambios significativos en los depósitos de granulocitos en la médula ósea de ambos grupos. La mejoría de la supervivencia, los cambios leucocitarios y los focos de hematopoyesis extramedular, parecen asociarse al aumento en la producción de IL-6. Los resultados sugieren que la IL-6 participa en el mecanismo de protección; y que la FC induce en este modelo a septicemia experimental. La FC parece comportarse como un inmunomodulador inespecífico de la respuesta aguda a la infección bacteriana.

**Palabras clave:** Recién nacido; septicemia experimental; *Klebsiella pneumoniae*.

## Summary

Infections by gram-negative bacteria are one of the major causes of death in newborns. Bacterial clearance is deficient in septic neonates, which seems to increase their susceptibility to infections. In this study, we observed a significant improvement in clearance of *Klebsiella pneumoniae* in newborn wistar rats inoculated by intraperitoneal via with 800 mg/kg soybean phosphatidylcholine (PC), compared to the control group injected with PBS ( $p < 0.05$ ). The overall survival rate was improved ( $p < 0.05$ ) and the white blood cell counts showed a greater leukocytosis and neutrophilia during the peak of bacteremia in the PC treated animals. Circulating levels of interleukin-6 were greater in the PC group, which developed an intense splenic hematopoiesis of the granulocyte ( $p < 0.05$ ) and megakaryocyte series ( $p < 0.01$ ). No significant changes were observed in bone marrow granulocyte deposits in both study groups. The improvement in survival rate, the changes in leukocyte counts and the splenic hematopoiesis may be associated with the increased production of IL-6. These results suggest that IL-6 plays a role in the protection mechanism induced by PC in this experimental model of newborn septicemia. PC seems to be an immunomodulator of the acute response to gram-negative bacterial infection.

**Key words:** Newborn; experimental septicemia; phosphatidylcholine interleukin-6; *Klebsiella pneumoniae*

\* Facultad de Medicina Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco

\*\* New England Medical Center Hospitals, Tufts University, School of Medicine, Boston MA, E.U

\*\*\* Dirección de Investigación Hospital Infantil de México, México, D.F

Correspondencia y solicitudes de reprints: Coordinación de Investigación y Postgrado en Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Apartado Postal 2-130, Guadalajara, Jalisco 44280.

## Introducción

Las infecciones bacterianas sistémicas son una de las primeras causas de morbilidad y muerte en los recién nacidos (RN) y las bacterias gramnegativas son los principales agentes causales de septicemia neonatal.<sup>1,2</sup> 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 que parece contribuir en la predisposición del neonato a las infecciones por este agente.<sup>3</sup>

*K. pneumoniae* es una bacteria gramnegativa encapsulada; es una de las primeras causas de bacteriemias primarias en pacientes hospitalizados en todo el mundo<sup>4</sup> y de septicemia y meningitis en recién nacidos en México.<sup>1,2,5</sup> Al igual que las demás bacterias gramnegativas, contiene en su pared un lipopolisacárido o endotoxina, que 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, así como aumento en la síntesis de proteínas reactivas de fase aguda.<sup>6</sup> 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.<sup>7</sup> Entre más de 50 citocinas, 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.<sup>8</sup>

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.<sup>9</sup> La administración de FC aumenta la depuración retículoendotelial de partículas de carbono en ratones<sup>10</sup> y mejora la supervivencia de animales con infección experimental por *Staphylococcus*

*aureus*.<sup>11</sup> 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 latex o con bacterias muertas por calor.<sup>12,13</sup> Además, los macrófagos peritoneales de ratones inoculados con FC por vía i.p. se convierten en macrófagos activados,<sup>11</sup> los cuales son capaces de producir y liberar interleucina-1 a la circulación sistémica.<sup>7</sup> Los efectos de leucocitosis y neutrofilia que hemos observado en ratones<sup>9</sup> y en ratas<sup>14,15</sup> inoculados con FC podrían ser explicados por efecto de interleucina-1 (IL-1).

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

## Material y métodos

**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 por ciento), palmítico (12.8 por ciento), oléico (10.6 por ciento) y linoléico (6.5 por ciento). La FC 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,<sup>16</sup> con una cinética de crecimiento que alcanza la fase logarítmica en dos horas y media. Se cultivó en caldo de soya tripticasa (CST) durante 12 hrs 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  $1 \times 10^9$  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.

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 mg/kg de peso corporal.<sup>17</sup> 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 DL 50 de *K. pneumoniae* ( $1.36 \times 10^7$  UFC).<sup>16</sup>

Sobrevida. La sobrevivencia de los animales a 21 días se determinó en dos grupos paralelos de 78 ratas wistar RN inoculadas ip con FC y 40 ratas inoculadas ip con PBS. Ambos grupos fueron infectados con DL 100 de *K. pneumoniae* ( $1 \times 10^8$  UFC) por vía sc.

Depuración bacteriana. Se sacrificaron por hipercapnia y dislocación cervical a seis animales de cada grupo en diferentes intervalos: tiempo cero, tres, seis, doce y veinticuatro, posteriormente y cada veinticuatro horas, hasta las 144 horas de haber inoculado la bacteria. Se obtuvo la mayor cantidad posible de sangre por punción cardíaca y se tomaron muestras por expresión del fémur derecho. Se extrajeron los pulmones, el hígado y el bazo, en condiciones de esterilidad; se lavaron en PBS estéril y se pesaron por separado en una balanza analítica. Cada uno de los órganos se trituró y se homogenizó en 5 ml de agua bidestilada estéril mediante pistones de teflón con un rotor eléctrico de control manual. Se sembraron muestras de 10 ml de sangre y 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° por 18 horas, para determinar la cantidad de bacterias viables. Los resultados indicaron que cada uno de los órganos cultivados mostraron un índice de UFC/mL de sangre o UFC/gramo de peso.

Respuesta leucocitaria. Se determinaron cuentas totales de leucocitos en la muestra 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 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 teñieron con Wright y se conta-

ron 400 células a 100x para determinar el porcentaje de granulocitos y sus precursores en médula ósea. Para su análisis se agruparon dos compartimientos de depósito medular: proliferativo y de reserva. El primero está constituido por mieloblastos, promielocito y mielocitos, en tanto que el de reserva consiste en el grupo de metamielocitos, neutrófilos en banda y PMN.<sup>18,19</sup> 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 respuesta a 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 IL-1<sup>20</sup> y la línea de hibridoma B9.9 que lo hace en respuesta IL-6.<sup>21</sup> Las células fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementando con 5 por ciento de suero fetal de ternera (SFT) (Hyclone, Logan, UT); las D10S se cultivaron durante seis días y las B9.9 durante tres días. Las células se ajustaron a  $1 \times 10^4$  en 200  $\mu$ l de RPMI 1640, suplementando con L-glutamina 2 mM HEPES de 10 mM, 2-mercaptoetanol 50 nM y SFT al 2.5 por ciento, en microplacas de 96 pozos de fondo plano, y se incubaron por 72 horas 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-1B recombinante para la línea D10S, o de IL-6 recombinante para B9.9. Durante las últimas 4 horas de incubación, se adicionaron 250  $\mu$ g/ml del colorante vital MTT (Sigma Co., St. Louis, MO) a cada pozo, según el método colorimétrico descrito por Mosmann.<sup>22</sup> El medio de cultivo fue removido por succión y se adicionaron 100  $\mu$ 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  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]timidina por pozo, las células fueron cosechadas, colocadas en líquido de centelleo, y la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina, se midió en

un contador de emisión beta. Se observó una estrecha correlación entre el método colorimétrico y el de incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron en unidades por ml, tomando como unidad, a la concentración de interleucina que produjo el 50% de la proliferación celular máxima.<sup>21</sup>

**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 DL50 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 por ciento, 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, de acuerdo al número de focos de hematopoyesis observados. Al investigador que hizo la observación microscópica de las muestras no se le informó a qué animales correspondían. Se hizo un promedio de las muestras de los animales infectados de cada grupo y se comparó con las observaciones individuales en los animales infectados con *K pneumoniae*.

**Análisis estadístico.** Se analizaron las curvas de sobrevida por el método de Kaplan-Meier y se establecieron diferencias mediante la prueba de Wilcoxon. 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 retículoendotelial de bacterias, los niveles de IL-1 y de IL-6 y la hematopoyesis extramedular, se contrastaron mediante pruebas de varianza múltiple, considerando significativo un nivel alfa de 0.05.<sup>23,24</sup>

## Resultados

La FC mejora la sobrevida 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 por ciento) de las 40 ratas del grupo testigo que recibió PBS sobrevivieron; mientras que en el grupo que recibió FC, sobrevivieron 19 (24.4 por ciento) de los 78 animales infectados. Esta diferencia fue significativa a un nivel de  $p < 0.05$  (Cuadro I).

**Cuadro I. 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)*

\*  $P < 0.05$

La 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 el hígado ( $p < 0.01$ ) y en los pulmones ( $p < 0.05$ ) (Figura 1).

La 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 leucocitosis temprana a las 3 horas post-infección, regresando a los valores basales y cayendo gradualmente en leucopenia que fue más notable a las 72 horas. En cambio las ratas del grupo FC presentaron leucocitosis menos temprana a las 12 horas, discreta leucopenia a las 48 horas y recuperación más rápida que la del grupo control (Figura 2A). Las cuentas diferenciales mostraron que estos cambios fueron debidos principalmente a las 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 horas del reto con la bacteria, se acompañó de una respuesta de neutrofilia evidente en el grupo tratado con FC (Figura. 2B).

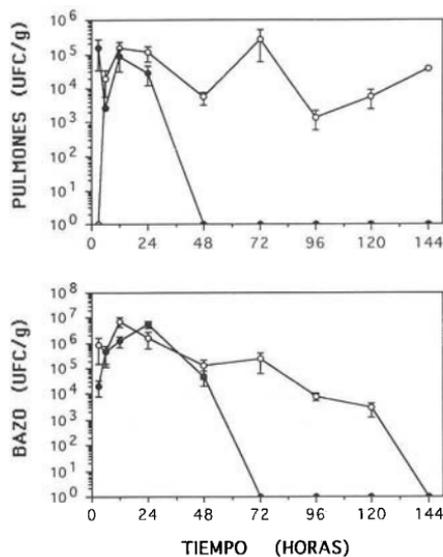
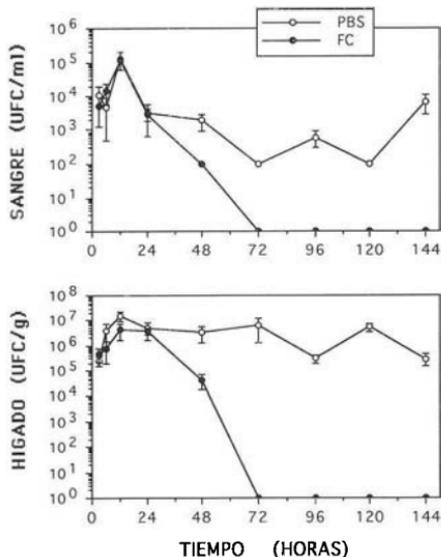


Figura 1 El mayor grado de bacteremia se observó a las 12 horas de inoculada la bacteria en ambos grupos de estudio. En el grupo tratado con FC los hemocultivos fueron negativos a partir de las 72 horas del reto con una *D*<sub>50</sub> de *Klebsiella pneumoniae*. Los cultivos en hígado, pulmones y bazo 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 ( $p < 0.05$ ).

La 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 experimental, pero no se observaron diferencias entre los dos grupos de estudio (Cuadro II). 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.

La 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 Figura 3A muestra que los dos grupos de animales con septicemia presentaban más de 12,000 U/ml

de IL-1 a las 12 horas 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 considerablemente en el grupo tratado con FC, alcanzando niveles dos veces más altos que en el grupo testigo que recibió PBS antes de la infección experimental (Figura 3B).

**CUADRO II. Depósitos medulares de granulocitos en ratas recién nacidas con septicemia por *Klebsiella pneumoniae*.**

Compartimento*	PBS (Testigo)	Fosfatidilcolina
<b>De reserva</b>		
Preinfección	45.3 ± 4.7	41.5 ± 5.6
Postinfección	40.1 ± 4.4	39.8 ± 3.7
<b>Proliferativo</b>		
Preinfección	39.8 ± 6.7	40.6 ± 4.7
Postinfección	41.7 ± 3.1	42.6 ± 2.9

\* Granulocitos: Promedio ± D.E.

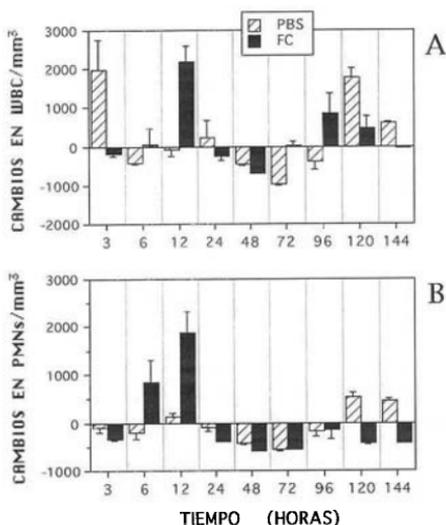


Figura 2. Los animales tratados con FC presentaron un pico de leucocitosis que coincidió con el pico de bacteremia a las 12 horas y sólo mostraron discreta leucopenia a las 48 horas (A). Además, el grupo de FC mostró una elevación de las cuentas de leucocitos PMNs, coincidiendo con el momento de mayor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

La 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 ser 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 (Figura 4A) y de megacariocitos (Figura 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 la proliferación reactiva de folículos T y B (Figuras 5y6). 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.

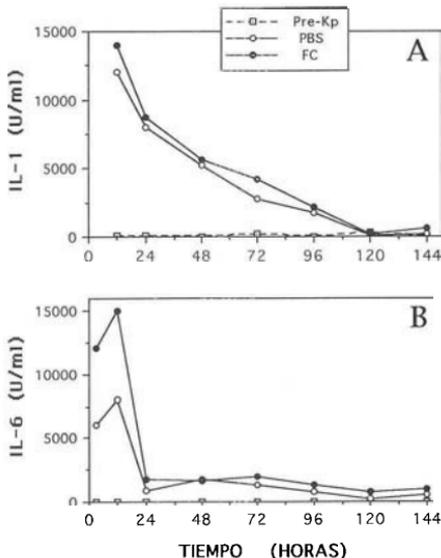


Figura 3. Los niveles circulantes de interleucina-1 se elevaron en la misma proporción en los dos grupos de estudio, pero no aumentaron en un grupo de ratas no infectadas (A). En cambio, interleucina-6 se elevó más en el grupo FC que en el testigo PBS durante la fase de mayor bacteremia (B), para regresar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

## Discusión

La función principal del sistema mononuclear fagocítico (SMF), es depurar la sangre y los tejidos de partículas y sustancias extrañas al organismo. El SMF está constituido por los macrófagos de diferentes tejidos y los monocitos de sangre periférica.<sup>3</sup> Los macrófagos que realizan actividades de depuración y fagocitosis, se localizan principalmente en hígado, pulmones, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos.<sup>25</sup> Estos órganos han sido conocidos tradicionalmente como componentes del sistema reticuloendotelial. En estudios previos, hemos observado que la depuración reticuloendotelial de *K. pneumoniae* en ratas wistar recién nacidas, es deficiente cuando se compara con el patrón observado en ratas adultas. 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.<sup>26</sup> 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 que indica una mayor susceptibilidad de éstas a la infección por *K. pneumoniae*.

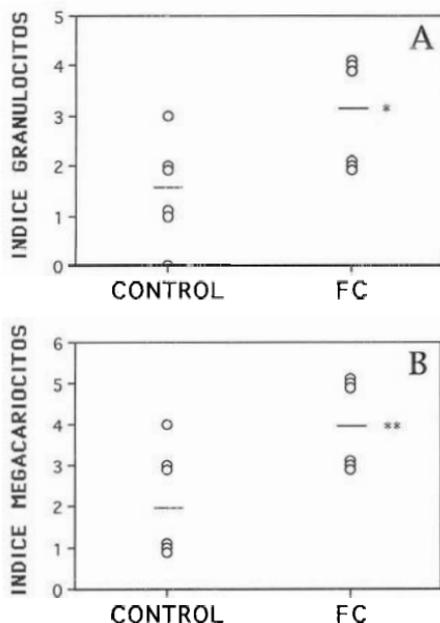


Figura 4. El índice de focos de hematopoyesis de granulocitos y megacariocitos en el bazo de los animales infectados se incrementó en contraste con el de las ratas no infectadas (Índice=1). Los focos de hematopoyesis extramedular fueron más abundantes en el grupo que recibió FC, tanto en la serie de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

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.<sup>11</sup> Kappes y cols.<sup>10</sup> y por nosotros

mismos.<sup>14,15,17</sup> 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, destacándose 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 extramedular, 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.

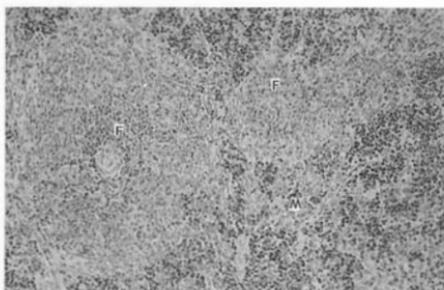


Figura 5. Se aprecia hiperplasia reactiva de folículos linfoides B y T y numerosos megacariocitos en este corte de bazo de una rata del grupo FC, tres días después de la infección con *K. pneumoniae*. Tinción con hematoxilina y eosina. 300x.

Estos 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 del 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

te caracterizada, es producida por células mononucleares y células endoteliales principalmente.<sup>27</sup> Entre sus múltiples efectos biológicos IL-6 induce en los hepatocitos la producción de proteínas reactivas de fase aguda.<sup>28</sup> Es un factor pirógeno endógeno, al igual que IL-1, aunque menos potente que ésta;<sup>29</sup> actúa como un factor de maduración de linfocitos B estimulando la producción de IgG;<sup>30</sup> Junto con IL-1 induce la proliferación de linfocitos T,<sup>31</sup> y actúa como estimulante de la hematopoyesis,<sup>32,33</sup> especialmente de los megacariocitos, dando lugar a las plaquetas en ratones y primates.<sup>34,35</sup> Tiene también la peculiaridad de actuar como una señal negativa para la producción de IL-1.<sup>21</sup>

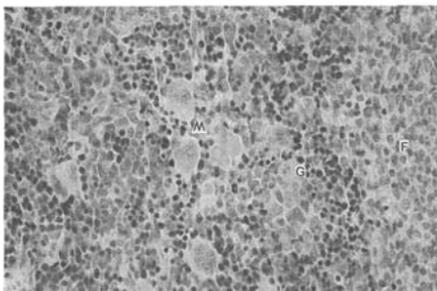


Figura 6. En este acercamiento se aprecian mejor los focos de hematopoyesis de granulocitos y megacariocitos en el bazo de una rata tratada con FC e infectada con *K. pneumoniae*. Tinción con hematoxilina y eosina. 400x.

En conclusión, observamos diversos efectos en la administración de FC en este modelo de infección neonatal experimental; la sobrevivencia de los animales mejora, lo cual parece relacionarse con diversos cambios atribuibles a la elevación de IL-6 circulante; 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 de IL-6. De manera adicional, el efecto regulador que IL-6 tiene sobre la producción de IL-1,<sup>21</sup> podría estar limitando los efectos indeseables de la hiperproducción de esta citocina que se observa en respuesta a la infección sistémica por bacterias gramnegativas.<sup>36</sup> Tales efectos de IL-1 y que son sinérgicos con los de TNF, incluyen la inducción de choque séptico y caquexia, los cuales ocasionan a la muerte a un gran porcentaje de

pacientes.<sup>8,36</sup> 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 IL-1, recientemente descrito,<sup>37</sup> 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.<sup>38</sup>

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.

## Agradecimientos

A la doctora Lourdes Cabrera, del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez por su ayuda en el proceso e interpretación de las muestras histológicas, a la QFB Pilar García Roca, por su excelente asistencia técnica en este estudio.

## Referencias

- Martínez-Limón AJ, Mancilla-Ramírez J, Santos-Preciado JI. Sepsis neonatal: Experiencia 1980-1985 del Hospital Infantil de México. Bol Méd Hosp Infant México 1989; 46:77.
- Mancilla-Ramírez J, Sánchez-Saucedo LU. Septicemia neonatal: diferencias entre recién nacidos a término y de pretérmino. Bol Med Hosp Infant México 1990; 47:227.
- Quie, PG. Antimicrobial defenses in the neonate, Semin Perinatol 1990; 14(Supl):2.
- Montgomery JZ, Ota JK. Klebsiella Bacteremia. Arch Intern Med 1980; 140:525.
- Vargas A, Escobedo E, Mercado A. Epidemiología de las bacteremias en una unidad de cuidado intensivo neonatal. Bol Med Hosp Infant México 1985; 42:306.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. New concepts on the pathogenesis of fever, Rev Infect Dis 1988; 10: 168.
- Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. Adv Immunol 1989; 44:153.
- 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.
- Mancilla J, Nurko S, García MP, Mejía JS, Santos JI. Modificaciones leucocitarias por fosfatidil-colina en un modelo animal. Bol Med Hosp Infant México 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 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.
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 la respuesta leucocitaria por *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, UNAM. México, 1987.
16. **Mancilla-Ramírez J, Nurko-Shein S, Castellanos-Cruz X, Santos-Preciado JI.** Efectividad terapéutica de inmunoglobulina intravenosa pH 4.25 en sepsis neonatal experimental por *Klebsiella pneumoniae*, *Bol Méd Hosp Infant Méx* 1989; 46:89.
17. **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.
18. **Christensen RD, Bradley PP, Rothstein G.** The leukocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. *J Pediatr* 1981; 98:101.
19. **Christensen RD, Mcfarlane 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.
20. **Orencole SF, Dinarello CA.** Characterization of a subclone (D10S) of the D10.G4.1 helper T-cell line which proliferates to attomolar concentrations of interleukin-1 in the absence of mitogens. *Citokine* 1989; 1:14.
21. **Schindler R, Mancilla J, Endress S, Ghobani R, Clark SC, Dinarello Ca.** Correlations and interactions in the production of IL-6, IL-1 and TNF by human blood mononuclear cell:IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75:40.
22. **Mosmann, T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth* 1983; 65:55.
23. **Downie NM, Heath RW.** Métodos estadísticos aplicados, 3a, ed. México: Harla, 1973: 212.
24. **Siegel S.** Estadística no paramétrica, 2a. ed México: Trillas, 1972:121.
25. **Benacerraf B, Biozzi G, Halpern BN, Stiffel C.** Physiology of phagocytosis of particles by R.E.S. En Halpern BN, Benacerraf B, Delafresnayre JF, eds: *Physiopathology of the reticulo-endothelial system.* Blackwell Scientific Publ. Oxford 1957:52.
26. **Mancilla-Ramírez J.** Depuración reticuloendotelial de *Klebsiella pneumoniae* en un modelo animal. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. UNAM. México, 1988.
27. **Kishimoto T.** The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74:1.
28. **Gauldie J, Richards C, Harnish D, LansporPM, Baumann H.** Interferon b2/B-cell stimulatory factor type 2 share 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.
29. **Dinarello CA, Cannon JG, Mancilla J, Bishai I, Lees J, Coceani F.** Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E\* in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res* 1991; 562:199.
30. **Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al.** Complementary DNA for a novel interleukin (BSF-) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324:73.
31. **Helle M, Boeije L, Aarden LA.** IL-6 is an intermediate in IL-1 induced thymocyte proliferation. *J Immunol* 1989; 142:4335.
32. **Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Hle 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.
33. **Gardner JD, Liechty KW, Christensen RD.** Effects on interleukin-6 of fetal hematopoietic progenitors. *Blood* 1990; 75:2150.
34. **Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, et al.** Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 1989; 74:1241.
35. **Asano S, Okano A, Osawa K, et al.** In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood* 1990; 75:1602.
36. **Dinarello CA.** The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J. Infect Dis* 1991; 163:1177.
37. **Hannun CH; Wilcox CJ, Arend WP, et al.** Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990; 343:336.
38. **Mancilla J, García P, Dinarello CA.** Interleukin-1 receptor antagonist can either reduce or enhance the lethality of *Klebsiella pneumoniae* sepsis in newborn rats. *Infect Immunology* 1993; (En prensa).