



**SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y  
ESTUDIOS DE POSTGRADO  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

**EFECTO ANTIBACTERIANO DE ALGUNAS TETRACICLINAS  
SOBRE BACTERIAS FAGOCITADAS POR LEUCOCITOS  
POLIMORFONUCLEARES OBTENIDOS DE EXUDADO  
PERITONEAL DE CONEJO**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTADO POR  
IRMA ALICIA SALINAS GONZALEZ**

**MONTERREY, N. L., JULIO 15, 1987**

TM  
RS431  
.T4  
S2  
C.1



1080071415

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA  
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA MEDICA

"EFECTO ANTIBACTERIANO DE ALGUNAS TETRACICLINAS  
SOBRE BACTERIAS FAGOCITADAS POR LEUCOCITOS —  
POLIMORFONUCLEARES OBTENIDOS DE EXUDADO PERI —  
TONEAL DE CONEJO".

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTADO POR

IRMA ALICIA SALINAS GONZALEZ

MONTERREY, N.L. JULIO 15, 1987

TM  
RS431  
T4  
S2



El presente trabajo se llevó a cabo en el  
Depto. de Microbiología de la Facultad de  
Medicina de la U.A.N.L.

Bajo la asesoría del

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA

DEDICATORIA

A mis Padres:

Sr. Celedonio Salinas Garza.

Sra. Aurora González de Salinas.

A mis Hermanos:

José Humberto y Ma. Bertha

## AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor:

Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla.

A mis compañeros:

Q.F.B.M.C. Ma. Alicia Suárez Semour.

Q.C.B.M.C. Irma Consuelo Rositas Martínez.

Lic. Juan Manuel Russildi Garza.

Biol. Ernest Kohn Behn.

Srita. Nora Alicia García Martínez.

## I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCION-----	1
MATERIAL Y METODOS-----	16
RESULTADOS -----	22
DISCUSION-----	62
RESUMEN-----	70
BIBLIOGRAFIA-----	71

## INTRODUCCION

El tratamiento quimioterapéutico para resolver en enfermedades infecciosas, ha sido, y es uno de los campos más estudiados dentro de la Medicina, debido a que un buen tratamiento, un individuo puede recuperar su salud. Esto -- suena relativamente fácil, sin embargo, es muy complejo el estudio a nivel quimioterapéutico, ya que el comportamiento de un agente seleccionado para determinada especie microbiana, puede variar entre cepas de la misma especie y de una persona a otra.

Se sabe que en nuestro organismo existe un mecanismo de defensa inespecífico, de primera línea, que es la fagocitosis. Este proceso involucra células sanguíneas como leucocitos polimorfonucleares (P.M.N.) y macrófagos entre -- otras células, las cuales poseen en su interior una serie de sustancias con demostrada capacidad germicida (5,41). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que las células ya mencionadas fagocitan microorganismos y los elimina en su interior (3,13,16).

Cuando se administra un agente antimicrobiano a -- un paciente con alguna infección, éste disminuye el número de microorganismos por diferentes mecanismos inhibiendo --

la formación de la pared celular, actuando a nivel del DNA, sobre los ribosomas, etc, y entonces es fácilmente fagocitado y eliminado,

Sin embargo existen enfermedades como brucelosis, salmonelosis, tuberculosis, listeriosis, toxoplasmosis y legionelosis, entre otras; causadas por microorganismos que son capaces de sobrevivir, incluso algunas veces de multiplicarse, dentro del leucocito P.M.N. ó de los macrófagos (19,50). Esto hace difícil un tratamiento quimioterapéutico eficaz, porque existen pocos antibióticos que puedan penetrar a través de la membrana citoplasmática leucocitaria y actuar en el citoplasma de estas células.

Numerosos investigadores han estudiado diversos antibióticos para observar si penetran o no la membrana citoplasmática y si tienen capacidad de actuar dentro para eliminar el microorganismo fagocitado. Entre los antibióticos estudiados están por ejemplo, la penicilina G, cloranfenicol, estreptomina, rifampicina, gentamicina, eritromicina, y el grupo de las tetraciclinas como oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina, clorhidrato de tetraciclina, los cuales se emplean como tratamientos quimioterapéuticos para diversas enfermedades.

Una de las primeras investigaciones fue la de -- Mackaness en 1952 ( 32 ) quien enfatizaba que se requerían -- de 25  $\mu$ gr/ml de estreptomina por mililitro de medio de -- cultivo para frenar el crecimiento intracelular de Mycobacterium tuberculosis, mientras que los bacilos extracelulares requerían menos de 0.6  $\mu$ gr/ml.

Uno de los primeros intentos en estudiar el efecto de los antibióticos sobre Salmonella typhosa (sic) intracelular lo efectuaron Showacre y col, en 1961 ( 45) ellos -- sugirieron que la sobrevivencia intracelular de la bacteria podría deberse a alguna de las siguientes causas: a) el fracaso del antibiótico para penetrar la célula huésped, b) la inactivación intracelular del antibiótico, en caso de que -- atravesase la membrana del leucocito, c) los cambios estructurales o metabólicos que puede sufrir el microorganismo -- en el ámbito intracelular y hacerlo refractario a la acción del antibiótico, d) el antibiótico daña más fácil a la bacteria fuera del leucocito porque este le brinda condiciones favorables para sobrevivir, ya sean metabólicas o físicas. . Showacre y col. trabajaron con células de fibroblastos de ratón infectadas con Salmonella typhosa (sic) y puestas en -- contacto con antibióticos como penicilina G, estreptomina, cloranfenicol y sinematina B (cefalosporina N ó Penicilina N); para ir apreciando la alteración celular ellos utilizaron --

el microscopio de contraste de fase. En sus resultados, reportaron que la estreptomycin a una concentración de 20  $\mu$ gr/ml y el cloranfenicol a una de 10  $\mu$ gr/ml produjeron inhibición de la bacteria tanto intra como extracelularmente a las 3 horas de exposición; después de este tiempo empezaron a proliferar y a las 24 horas de incubación ya había muerte de la célula fibroblástica. En el caso de sinematina a una concentración de 20  $\mu$ gr/ml y penicilina con 100 U/ml se vió que hubo inhibición del crecimiento del bacilo extracelular, pero se formaron esferoplastos en el medio intracelular, se mantuvo esta forma y finalmente la célula morfa a las 19 horas de exposición.

Otro grupo de investigadores encabezados por - - Hopps en 1961 ( 26 ) hicieron algo semejante al de Showacre añadiendo, a los antibióticos ya probados, la clorotetraciclina y la kanamicina. Lo relevante de este trabajo fué -- el observar cambios morfológicos de las células utilizadas en este caso de fibroblastos de ratón y células HeLa en las - fases logarítmica y estacionaria de dos cepas de Salmonella typhosa (sic), expuestas a los antibióticos y concluyendo - que estos tuvieron un efecto letal mas rápido sobre la bacteria en la fase logarítmica que en la fase estacionaria.

Hay antibióticos que pueden dañar la célula huésped, por ejemplo polimixina B interacciona con la membrana celular de mamíferos, las tetraciclinas alteran funciones del leucocito como la quimiotaxis, y la rifampicina actúa a nivel de RNA polimerasa; debido a esto el grupo de Hoeprich (24) probó las interacciones de leucocitos de humanos inoculados con Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae (sic) y Escherichia coli expuestos a antibióticos como tetraciclinas, polimixina B y rifampicina, y reportó que la destrucción de las bacterias intracelulares fueron iguales cuando el leucocito actuó solo o bien en presencia de los antibióticos -- ensayados a dosis terapéuticas; y además, que el leucocito no sufrió alteraciones ya que conservó su capacidad bactericida.

Una de las discrepancias mas fuertes que existen -- es si la penicilina penetra o no al leucocito y si actúa o no -- sobre las bacterias intracelulares. Veale (51) usó penicilina sobre Neisseria gonorrhoeae y van den Broeck (49) sobre Staphylococcus aureus; ambas bacterias previamente fueron -- fagocitadas por leucocitos. En leucocitos conteniendo -- N. gonorrhoeae se vió que el antibiótico penetró y afectó la viabilidad bacteriana solo que a dosis mayores de las terapéuticas. En el caso de los leucocitos conteniendo S. aureus se ensayaron unos poniéndolos en presencia de suero y otros sin suero; y los resultados indicaron que cuando se ponía en contacto el leucocito solo con la bacteria, esto es, sin --

antibiótico ni suero no había muerte intracelular, por el contrario se aumentó el número de bacterias viables; y si se ponían en contacto las bacterias intracelulares con el antibiótico o el suero, por separado, se observó muerte intracelular y si se añadían juntos la muerte se incrementó.

Mendell (34) reportó resultados contradictorios a los de Showacre y Hops ya mencionados, él trabajó con leucocitos que habían fagocitado Staphylococcus aureus y, puestos en contacto con penicilina y rifampicina observó que éstos no penetraron la membrana del P.M.N. Mendell lo atribuyó entre otras cosas, a que el tiempo prolongado de exposición (20 hrs) utilizado por los investigadores pudo favorecer a que el antibiótico penetrara por pinocitosis.

Yoshida y col.(53) compararon la acción de la tetraciclina y minociclina sobre la Legionella pneumophila -- cepa Philadelphia-1, tanto in vitro con macrófagos peritoneales, como in vivo en cobayos; en sus resultados concluyeron que la minociclina y doxiciclina eran igual de efectivas in vitro, y la tetraciclina la menos efectiva; in vivo observaron que la minociclina era la mejor.

Otros investigadores que también estudiaron la capacidad de entrada del antibiótico en leucocitos, fueron Prokesch y Hand (38) ellos probaron 13 antibióticos diferentes y como célula utilizaron leucocitos P.M.N. humanos; encontraron por ejemplo que la penicilina y la cefalosporina - - fallaron al no entrar a la célula de una manera eficiente ya que lo hacían pobremente; otros antibióticos como etambutol, eritromicina y clindamicina sí penetraron fácilmente.

Solberg y col. (47 ) también estudiaron la cinética de penetración del antibiótico en el leucocito, ellos ensayaron con gentamicina y rifampicina sobre leucocitos con Staphylococcus aureus en su interior, y reportaron que la rifampicina era mas efectiva, quizá porque la gentamicina -- no penetró bien en la célula fagocítica y si lo hizo no actuó o las bacterias pudieron quedar protegidas por la célula fagocítica.

Uno de los trabajos que pone en duda los resultados de gentamicina obtenidos por Solberg, es el de - - Hand y King-Thompson (23 ) en el cual estudiaron el leucocito P.M.N. de humanos expuestos con Staphylococcus aureus y puesto en contacto con varios antibióticos; observaron - que la clindamicina y la eritromicina penetraron en el P.M.N. alcanzando altas concentraciones, la rifampi-

cina también penetró el P.M.N. debido a la solubilidad de lípidos; y la gentamicina y penicilina, reportó que penetraron pobremente aunque la gentamicina sí actuó dentro del P.M.N. y la penicilina no lo hizo.

Vosbeck y col. (52) encontraron datos similares a los de Solberg sobre la gentamicina, ellos ensayaron varios antibióticos sobre Staphylococcus aureus fagocitados por P.M.N. humanos y en sus resultados mencionaron que la rifampicina a bajas concentraciones tuvo una muy buena actividad intracelular, incluso un poco mejor que a nivel extracelular. Probaron también gentamicina, la cual vieron que es bactericida fuera de los P.M.N. pero dentro no lo mostraba, ni a altas concentraciones. La clindamicina y vancomicina, reportan en este trabajo, fueron igualmente activas dentro y fuera de la célula; la eritromicina fué activa intracelularmente a altas concentraciones; en cambio penicilina G, ampicilina y estreptomycin fueron inactivas intracelularmente.

Sánchez y col. (43) en su trabajo de evaluación de diversos agentes antimicrobianos sobre P.M.N. bovinos que habían fagocitado Staphylococcus aureus; reportaron que solo la oxitetraciclina a una concentración de 50  $\mu$ gr/ml y la rifampicina a 6.3  $\mu$ gr/ml actuaron intracelularmente causando la muerte de los microorganismos, otra de sus observaciones fué que la tetraciclina no actuaba intracelularmente.

Se han hecho estudios utilizando combinaciones -- de dos antibióticos simultáneamente sobre bacterias que han sido fagocitadas, para demostrar la acción sinérgica de dichos antibióticos. Al utilizarse simultáneamente estreptomina y penicilina (39) sobre Brucella abortus fagocitadas por células bovinas, se comprobó que si existía un efecto bactericida sobre la bacteria intracelular; también emplearon la combinación de tetraciclina y estreptomina; la tetraciclina sola a concentraciones de 0.5 µgr a 1.0 µgr/ml era bacteriostática dentro de la célula, pero al añadir 10 µgr/ml de estreptomina, tenía capacidad para actuar como bactericida.

Otra investigación sobre el sinergismo entre los antibióticos es la de Ariza y col (2), en la cual aportan datos sobre la combinación de doxiciclina y rifampicina comparada contra la tetraciclina y estreptomina utilizados para la terapia de brucelosis humana y se reportó que la -- combinación de doxiciclina y rifampicina era la mejor.

La calidad del leucocito juega un papel muy importante en la eliminación de microorganismos, tal como lo demostraron los resultados del efecto de rayos X sobre ratones, de los experimentos efectuados por Nelson y Becker (36).

Schaffer, Kucera y Spinck en 1963 (44) señalaron que los macrófagos peritoneales protegían a las brucelas fagocitadas de la acción de la estreptomycinina aún a concentraciones que excedían las 50,000  $\mu\text{gr/ml}$ . Alexander y Good (1) informaron que tanto Staphylococcus aureus como Pseudomonas aeruginosa una vez fagocitadas por leucocitos P.M.N. humanos quedan fuertemente protegidas de la acción antimicrobiana de penicilina G, ampicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina y tetraciclina entre otros antibióticos estudiados a concentraciones terapéuticas.

Solberg (46) en otro ensayo probó una mezcla de antibióticos formados por penicilina G a una concentración de 25 U/ml y estreptomycinina a 1000 U/ml; utilizados contra Staphylococcus aureus fagocitados por P.M.N. humanos, y en sus resultados reportó que las bacterias intracelulares permanecieron viables incluso después de 20 horas de exposición mientras que fuera de la célula morían el 99% de las bacterias en menos de 30 minutos, concluyendo que las bacterias quedan protegidas dentro de la célula; los mismos resultados se obtuvieron utilizando fenil butazona.

Existen estudios que han aportado conocimientos sobre la alteración de la capacidad bactericida del leucocito a consecuencia de dosis inadecuadas de los antibióticos, por ejemplo Glette y col ( 20 ) reportaron que a bajas concentraciones ( $< 10 \mu\text{gr/ml}$ ) de doxiciclina, oxitetraciclina y minociclina no alteraban la migración, la quimoluminiscencia ni la oxidación de la glucosa de los leucocitos; pero a altas concentraciones ( $> 10 \mu\text{gr/ml}$ ) de doxiciclina o de minociclina afectaron la quimoluminiscencia y la oxidación de la glucosa; además la doxiciclina alteró la migración; la oxitetraciclina no afectó al P.M.N. a concentraciones altas. También Daschner ( 12 ) en su reporte encontró resultados parecidos a estos.

Forsgren y Gnarpe ( 17 ) demostraron que la acción bactericida del suero era afectada al agregar las tetraciclinas ensayadas, no así las funciones del leucocito tales como la opsonización, la fagocitosis y la muerte intracelular.

Hay evidencias que las tetraciclinas pueden alterar la quimiotaxis leucocitaria, Martín y col ( 35 ) mencionan que las tetraciclinas a concentraciones terapéuticas habituales, deprimían la migración de leucocitos humanos -

in vitro. Se ensayó con voluntarios, a los cuales se les -- provocó una infección con Mycoplasma pneumoniae y posteriormente se les dió tetraciclina oral; al hacer el ensayo en el laboratorio observaron que los leucocitos de los pacientes mostraron disminución de la leucotaxis a concentraciones bajas (0.01 a 10  $\mu$ gr/ml), pero al ser estimulados estos leucocitos con concentraciones altas (30-300  $\mu$ gr/ml) se encontró que la producción de lactato por el leucocito se había elevado significativamente por la alta concentración.

Hay otros autores ( 18 ) que han observado exactamente lo contrario que reportaron Martin y col, ya que vieron que es a altas concentraciones de la tetraciclina cuando se inhibe la quimiotaxis del leucocito, por ejemplo Majeshi y Alexander ( 33 ) ensayaron concentraciones que -- iban desde 1  $\mu$ gr/ml hasta 1,000  $\mu$ gr/ml de diversas tetraciclinas y demostraron que a ésta última concentración la -- respuesta disminuía en un 87%.

En un intento por esclarecer el efecto tanto de -- agentes físicos como quimioterapéuticos sobre los leucocitos, Glette y col ( 21 ) hicieron un trabajo interesante -- en el que muestran el efecto de diversas tetraciclinas y -- la luz ultravioleta (U.V) al actuar simultáneamente sobre los leucocitos, observaron que en el caso de la doxiciclina (10  $\mu$ gr/ml) el consumo de oxígeno del leucocito aumentaba --

notoriamente, causándole un daño importante; en cambio el resto de las tetraciclinas probadas no produjeron este efecto.

Todos los trabajos ya mencionados muestran la importancia que tienen los antibióticos que son capaces de penetrar al leucocito infectado. Aún existen muchas dudas por aclarar sobre la cinética de penetración del antibiótico y si actúa o no dentro del fagocito, ó bien en que grado este pudiera resultar dañado en lugar de beneficiado.

Por la importancia que tienen las tetraciclinas para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos intracelulares como lo son micoplasmas, clamidias, rickettsias y algunas bacterias gram positivas y gram negativas; fueron seleccionadas para el diseño experimental de este trabajo. Estos antibióticos son de amplio uso a pesar de las opiniones encontradas que existen para su aplicación a nivel terapéutico (10,22), ya que si no se manejan correctamente con las dosis adecuadas, pueden traer consecuencias adversas para el paciente.

Las tetraciclinas, como se sabe, forman un grupo de antibióticos de amplio espectro, bacteriostático a nivel intracelular (6,15,27). Se descubrieron hacia 1948 siendo la aureomicina (llamada inicialmente duomicina y actualmente clorotetraciclina) la primera que se aisló, obtenién-

dose a partir de un cultivo de Streptomyces aureofaciens y usada por primera vez como complemento dietético en animales. Posteriormente se han aislado más tetraciclinas y se han utilizado como agentes quimioterapéuticos en enfermedades de humanos y animales (28).

Lo anterior lleva a preguntar si estos medicamentos realmente tienen un efecto positivo en la eliminación de bacterias intracelulares, por lo que se propone la Hipótesis de esta investigación: El grupo de las tetraciclinas, en particular oxitetraciclina y clorhidrato de tetraciclina, aumentan la capacidad del leucocito para matar a las bacterias.

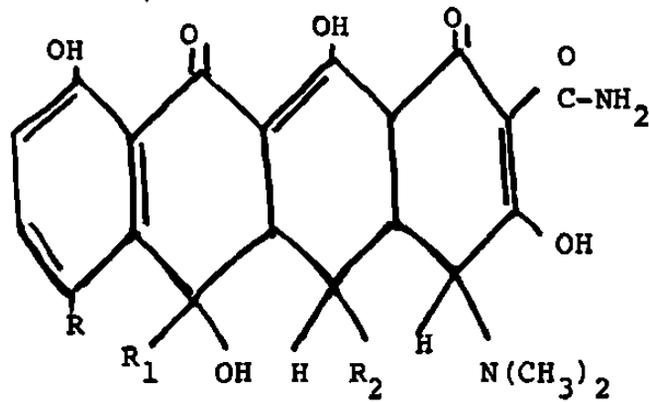
Para llevar a cabo la verificación de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la actividad antimicrobiana de las tetraciclinas sobre las bacterias que fueron fagocitadas por leucocitos P.M.N.
- 2) Comparar si entre las dos estructuras moleculares del antibiótico (clorhidrato de tetraciclina y oxitetraciclina), la actividad de muerte intracelular es diferente.

Las tetraciclinas seleccionadas para este proyecto fueron (figura 1): a) Clorhidrato de tetraciclina y b) Oxitetraciclina; por ser de uso frecuente, tanto a nivel terapéutico como en ensayos experimentales.

FIGURA 1

TETRACICLINAS



a) Clorhidrato de Tetraciclina:  $R=Cl, R_1=CH_3$   
(Introducida en 1948)  $R_2=H$   
Se obtiene de Streptomyces aureofaciens.

b) Oxitetraclina:  $R=H, R_1=CH_3, R_2=OH$   
(Introducida en 1950)  
Se obtiene de Streptomyces rimosus

Actúan en procariones a nivel de 30S del RNAt (en el aminoacil del RNAt) impidiendo la síntesis proteica.

## MATERIAL Y METODOS

Cepa bacteriana.- Se utilizó como bacteria patrón la cepa I-073 de la especie Salmonella enteritidis obtenida del cepario del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, U.A.N.L., la cual fue aislada a partir de un paciente. Esta cepa es una bacteria entérica (30), de residencia intracelular y patógena a nivel humano (27). Para demostrar su susceptibilidad a los antibióticos se efectuó la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.). En cada experimento se utilizaron cultivos de 18 horas de incubación a 37°C en caldo de soya tripticase (Difco).

Los antibióticos ensayados, clorhidrato de tetraciclina y oxitetraciclina, fueron de la Compañía Pfeizer de México.

Obtención del suero homólogo. Se obtuvo inocularando conejos con una suspensión de  $1 \times 10^6$  UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias) de la cepa en estudio, Salmonella enteritidis I-037, inactivada. Se efectuaron tres inoculaciones por vía intramuscular a intervalos de una semana, recolectando el suero y se obtuvieron títulos de anticuerpos superiores a 1:320.

Obtención de leucocitos polimorfonucleares (heterófilos) a partir de un exudado peritoneal de conejo. - -

Se usaron conejos de raza Nueva Zelanda, de 5 a 7 meses de edad y de un peso aproximado de 2.5 a 3 kgr., el alimento seleccionado fué uno libre de tetraciclina ("Conejitina" La Hacienda S.A. de C.V.).

Sometiéndoseles a un procedimiento semejante al de Cohn y otros investigadores (7,8) en donde se utiliza glucógeno ya que esta es una de las sustancias que se pueden utilizar como inductoras a nivel peritoneal de conejo, provocando la formación de un exudado rico en polimorfonucleares, llamados en este caso heterófilos; existen reportes (11) de experimentos en los cuales se obtuvieron hasta  $13 \times 10^6$  células P.M.N. por mililitro.

Se procedió de la forma siguiente: se introdujo al conejo, por vía peritoneal de 250 a 300 ml de solución salina estéril con glucógeno (1 mgr/ml) y se dejó transcurrir un lapso de aproximadamente 18 horas. Posteriormente se efectuó el lavado peritoneal para obtener el exudado, para esto se introdujo una aguja hipodérmica # 14 en la piel de la pared abdominal, en el tercio medio de una línea cuyos límites son la unión costo-esternal más baja y la articulación del pubis; y por el orificio de la aguja se introdujo un catéter previamente perforado para posteriormente ir añadiendo solución de Hanks (pH 7.4 y a 37°C) en cantidades de - -

20 a 30 ml., hasta completar alrededor de 200 ml; el exudado --  
obtenido se fué colocando en matraz siliconizado y que con--  
tenía heparina de sodio, éste se colocó en un baño de agua  
metabólico (Dubnoff Precision Scientific, Co.) a 37°C y con  
agitación suave y constante. Al exudado se le añadió suero --  
homólogo al 10%.

Una vez que se obtuvo el exudado peritoneal se --  
procedió a hacer los siguientes estudios:

- 1) Determinación de la cantidad de exudado obtenido (se  
midió directamente en el matraz graduado que se uti-  
lizó para depositar el exudado).
- 2) Recuento celular por conteo en la cámara de Neubauer,  
para posteriormente ajustar a la concentración de --  
 $1 \times 10^6$  leucocitos por mililitro, requerido para este --  
proyecto.
- 3) Determinación del porcentaje de P.M.N. existentes en el  
exudado. Esto se efectuó mediante un frotis teñido con --  
colorante de Wright, contando 100 leucocitos al micrós-  
copio para determinar cuantos eran P.M.N.
- 4) Pruebas de viabilidad:
  - a) Fagocitosis.- Para demostrar la capacidad que tie-  
ne un leucocito para fagocitar un cuerpo extraño --  
(por ejemplo: bacterias). El procedimiento, para --  
esta prueba fué el siguiente: se pusieron los leu-

citos P.M.N. ( $1 \times 10^6$ /ml) en solución de Hanks, - en un tubo de ensayo siliconizado, y se añadió la bacteria seleccionada (Salmonella enteritidis) en una proporción 1:10 (un leucocito por 10 bacterias), - se dejó incubar a 37°C en el baño de agua metabólico durante 30 minutos. Se hizo un frotis el cual se tiñó con Wright y se contaron los leucocitos obteniendo el porcentaje de las que fagocitaron (18, 29, 40).

- b) Exclusión de azul de tripano, - para demostrar la integridad de la membrana citoplasmática y la capacidad enzimática del leucocito. Se efectuó esta prueba colocando en un tubo de ensayo siliconizado, -- leucocitos (generalmente 3 gotas de una suspensión de leucocitos  $1 \times 10^6$ /ml) mas una gota de colorante de azul de tripano al 0.5% en buffer de fosfatos, -- se dejó incubar en un baño de agua metabólico a 37°C. durante 30 minutos. Se colocó una gota de esta mezcla entre un portaobjeto y cubreobjeto, para observarla al microscopio de contraste de fase, se contaron 100 leucocitos; se vió cuáles se tiñeron y cuáles no, reportándose solo el porcentaje de los no teñidos (48,52).

Desarrollo Experimental:

Una vez cumplidos los anteriores requisitos se --  
procedió a efectuar el experimento. Las células P.M.N. - --  
(heterófilos) diluidas en solución de Hanks a una concen--  
tración de  $1 \times 10^6$ /ml, se colocaron en un tubo de ensaye silico--  
nizado (tubo problema), se añadió el cultivo de Salmonella  
enteritidis en una proporción de 1:10 (10 bacterias por -  
leucocito) se dejó incubar a 37°C en el baño de agua en --  
agitación suave durante 30 a 40 minutos aproximadamente.  
Se centrifugó el tubo a 1085 Xg en una centrifuga Servall  
SS-34, durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante en el  
cual iban las bacterias no fagocitadas. Posteriormente se -  
pusieron en contacto los leucocitos que fagocitaron bacte--  
rias con el antibiótico a ensayar (oxitetraciclina ó clor--  
hidrato de tetraciclina) a una concentración de 6  $\mu$ gr/ml. --  
Se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 10, 30, 60 y 90 minutos,  
se filtraron en un multifiltrador (Universal Membrane, New.  
Brunswick) al que se le colocaron filtros millipore de 0.65  $\mu$   
de diámetro de poro, para separar los leucocitos y eliminar  
el antibiótico que no penetró. Los P.M.N. que fagocitaron a  
las bacterias quedaron retenidos en el filtro y se les some--  
tió a un tratamiento hipotónico, utilizando en este caso --  
agua destilada para lizarlos (24). Posteriormente se hicieron di--  
luciones y se inocularon en cajas de Petri con agar eosina  
azul de metileno (Difco), estas fueron incubadas a 37°C - -  
durante 24 horas; se contaron las colonias las cuales repre--  
sentaron a las bacterias que sobrevivieron.

Simultáneamente con el experimento problema se --  
llevaron dos testigos. A continuación se explica el contenido  
de cada uno de los tres tubos utilizados en los experimentos  
tos:

Tubo problema (Pb\*): Leucocitos P.M.N. , bacterias y antibio  
tico a ensayar.

Tubo Testigo 1 (T1\*); Leucocitos P.M.N. y bacterias. Este --  
testigo es para demostrar el efecto bactericida del leucocito  
sobre la bacteria y se procesó de la misma forma explicada  
anteriormente para el problema, solo que sin el antibio--  
tico.

Tubo Testigo 2 (T2\*):Bacterias y antibiotico a ensayar. Este  
testigo es para demostrar si el antibiotico actúa directamente  
sobre la bacteria. El proceso a seguir consistió en colocar  
en un tubo de ensaye la bacteria en estudio a una concentración  
de  $1 \times 10^7$  U.F.C./ml y el antibiotico a probar, se de--  
jó incubando a 37°C.en el baño de agua metabólico, tomándose  
muestras a los 0, 10, 30, 60 y 90 minutos, se practicaron diluciones  
las cuales se inocularon en cajas de petri con agar  
eosina azul de metileno (Difco), se incubaron a 37°C durante  
24 horas y se procedió a hacer la cuenta de colonias que representaron  
a las bacterias sobrevivientes.

(\*) Nota: Pb, T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> son las claves que se van a utilizar en .  
el resto de este escrito.

## RESULTADOS

Se seleccionaron aquellos conejos que mejor respondieron por su producción de leucocitos P.M.N. después de una inyección intraperitoneal de glucógeno (Sigma G 87751),

Se efectuaron alrededor de 20 experimentos con cada antibiótico, seleccionándose solo los resultados de 24 de ellos, por ser los más representativos; correspondiendo 12 experimentos para cada antibiótico ensayado.

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados de la obtención del exudado y las pruebas de viabilidad, practicados durante los experimentos con cada antibiótico.

Las cantidades de exudado fueron de un rango de 75 a 100 ml. en los resultados de la tabla 1, y de 70 a 90 ml. en los de la tabla 2; estas cifras concuerdan con los resultados de otros investigadores (11); estos exudados tuvieron siempre una gran cantidad de leucocitos, predominando fuertemente los P.M.N. Las pruebas de viabilidad seleccionadas fueron la fagocitosis y la exclusión de azul de tripano. Las cifras reportadas en las tablas para estos experimentos, fueron las esperadas ya que se considera un 90% ó más como cifra normal para estas pruebas (29.48), por lo tanto estos exudados por su calidad y cantidad leucocitaria resultaron idóneos para ser usados en este proyecto.

En el caso de la cepa patrón los resultados del C.M.I paracti- cada para detectar su susceptibilidad antimicrobiana, fueron para clorhidrato de tetraciclina de 0.625  $\mu$ gr/ml y para oxitetraciclina de 0.321  $\mu$ gr/ml.

TABLA 1  
CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

EXPERI- MENTO No.	CANTIDAD DE EXUDA OBTENIDO (ML) .	TOTAL - DE CELU LAS/ML.	% P.M.N	PRUEBAS DE VIABILIDAD	
				FAGOCITOSIS %	AZUL DE - - TRIPANO. %
1	95	$1.2 \times 10^6$	98	91	94
2	90	$1.0 \times 10^6$	94	97	95
3	95	$1.2 \times 10^6$	92	91	97
4	100	$2.5 \times 10^6$	88	91	98
5	85	$2.4 \times 10^6$	100	95	96
6	80	$2.0 \times 10^6$	98	90	99
7	95	$5.0 \times 10^6$	100	93	98
8	85	$2.1 \times 10^6$	98	94	97
9	95	$3.5 \times 10^6$	93	92	100
10	80	$2.2 \times 10^6$	96	100	96
11	80	$2.0 \times 10^6$	96	92	98
12	75	$4.0 \times 10^6$	95	93	98

TABLA 2  
OXITETRACICLINA

EXPERI- MENTO No.	CANTIDAD DE EXU-- DADO (ML)	TOTAL DE CELULAS POR ML.	% P.M.N.	PRUEBAS DE VIABILIDAD	
				FAGOCITOSIS %	AZUL DE TRIPANO %
1	85	$2.0 \times 10^6$	92	91	94
2	80	$2.0 \times 10^6$	91	91	94
3	95	$4.0 \times 10^6$	94	90	98
4	90	$5.2 \times 10^6$	93	92	100
5	70	$4.2 \times 10^6$	93	93	95
6	90	$11.0 \times 10^6$	97	92	96
7	90	$11.4 \times 10^6$	92	95	100
8	85	$1.0 \times 10^6$	94	91	100
9	85	$1.9 \times 10^6$	96	94	98
10	95	$4.2 \times 10^6$	93	91	100
11	75	$2.8 \times 10^6$	97	92	98
12	95	$2.8 \times 10^6$	94	90	96

Las cifras obtenidas de las cuentas viables, fueron graficadas; estas gráficas están comprendidas de la 1 a la 24 y muestran los resultados en forma individual para cada experimento. Cada una incluye el resultado del Pb,  $T_1$  y  $T_2$ .

En el caso de los experimentos ensayados con clorhidrato de tetraciclina, que comprenden los primeros doce; las gráficas 1,2,4,5,6, y 10 guardan semejanza en que la cifra correspondiente al Pb descendió hasta 0 en todos ellos a los 60 minutos, exceptuando en la gráfica 6 que fué hasta los 90 minutos en la 10 que fué a los 30 minutos. Casi sucedió lo mismo para el  $T_1$  en las gráficas ya mencionadas; - - excepto en la 2 y la 5 la cifra también llegó a 0 entre los 60 y 90 minutos; pero se puede observar que en el caso de - las gráficas 2 y 5 permaneció la cantidad prácticamente constante durante gran parte del experimento; en la 2 hubo un ligero aumento de la población a los 30 minutos para caer bruscamente a 0 a los 60 minutos; en la 5 permaneció constante hasta los 60 minutos para descender a 0 a los 90 minutos. - En las gráficas 1 y 4 el comportamiento de  $T_1$  fué muy parecido al Pb, solo que requirió de mayor tiempo. En la gráfica 6 el  $T_1$  disminuyó de manera importante durante los primeros 10 minutos y permaneció constante la cifra de bacterias en el resto del experimento; en la gráfica 10 el  $T_1$  se mantuvo constante durante todo el ensayo. El  $T_2$  para las gráficas

1 y 10 permaneció sin variación en toda la fase experimental, mientras que en el  $T_2$  de las 4,5 y 6 hubo una ligera disminución alrededor de los 30 minutos; y el  $T_2$ , de la 2 disminuyó a los 60 minutos.

En el caso de la gráfica 3 se aprecia que el Pb - tuvo un ligero pero continuo descenso de la viabilidad bacteriana durante todo el experimento; el  $T_1$  permaneció constante hasta los 60 minutos para descender a los 90 minutos; el  $T_2$  presenta algo parecido a  $T_1$  ya que permaneció constante durante los primeros 30 minutos para ir descendiendo el resto del tiempo.

En la gráfica 8, el Pb mantuvo su población bacteriana constante durante los primeros 60 minutos para descender casi un logaritmo a los 90 minutos; en el  $T_1$  hubo una pérdida de la viabilidad a los 10 minutos, permaneció constante la población hasta los 30 minutos y cayó gradualmente hasta casi 0 a los 90 minutos; el  $T_2$  permaneció constante hasta los 60 minutos para descender un logaritmo los 30 minutos restantes del experimento guardando una proporción semejante al Pb.

Las gráficas 7 y 11 muestran que en el Pb hubo -- pérdida bacteriana ligera a los 10 minutos; pero mientras -- que en la 7 la cantidad celular permaneció igual el resto -- del ensayo, en la 11 hubo muerte bacteriana en ligera pro--

porción en el lapso de 60 a 90 minutos. Para el  $T_1$  guardan similitud ambas gráficas ya que en los primeros 10 minutos hubo ligera disminución bacteriana y después permaneció la cantidad celular sin variación en todo el experimento; para  $T_2$  se pueden observar que permanecen constantes las cifras solo que en la 7 hubo ligera pérdida bacteriana en el lapso de 60 a 90 minutos y en la 11 en el mismo lapso de tiempo un ligero aumento en la población.

Las gráficas 9 y 12 muestran resultados semejantes en el caso de  $T_2$ . En la gráfica 9, el Pb y  $T_1$  se comportaron igual hasta los 10 minutos, después en el Pb hubo disminución hasta los 30 minutos, permaneció la población igual hasta los 60 minutos y luego presentó una caída importante el resto del tiempo; mientras que  $T_1$  fue cayendo paulatinamente durante todo el tiempo de experimento. En la gráfica 12 el Pb permaneció sin cambio hasta los 60 minutos y bajo en una muy ligera cantidad a los 90 minutos;  $T_1$  a los 10 minutos disminuyó ligeramente y en el resto del tiempo se mantuvo en esta cantidad. El  $T_2$  tuvo un comportamiento semejante en estos dos experimentos ya que fue disminuyendo la población gradualmente durante todo el tiempo en que se efectuó el experimento; en el caso del experimento 12 incluso muestra mayor muerte bacteriana que Pb y  $T_1$  aunque la diferencia fue muy pequeña.

Las gráficas comprendidas de la 13 a la 24 muestran los resultados de los 12 experimentos con oxitetraciclina.

En las gráficas 13,14 y 21 se observa que disminuyó la cantidad de las bacterias en la misma proporción -- tanto en el Pb como en el  $T_1$  solo que este último aumentó -- ligeramente durante los últimos 30 minutos del experimento; el Pb en el caso de la gráfica 13 cayó en forma brusca durante los primeros 10 minutos para permanecer constante -- el resto del tiempo; no así el Pb de la gráfica 21 en la -- que descendió paulatinamente de  $10^7$  a  $10^4$  durante los 90 -- minutos del experimento. El  $T_2$  se comportó diferente ya que en la gráfica 13 se aprecia que permaneció constante durante 60 minutos, para posteriormente disminuir la cantidad -- bacteriana hasta el final del experimento; en la gráfica -- 21 fue a la inversa ya que hubo disminución bacteriana durante los primeros 30 minutos para permanecer constante el resto del tiempo. En la gráfica 14 se muestra que hubo un comportamiento casi idéntico para Pb y  $T_1$ ; y el  $T_2$  se comportó -- muy semejante al de la gráfica 21 anteriormente explicado.

Al revisar las gráficas 17,18,19,22 y 24 se observa que en el Pb hubo una disminución de la viabilidad -- bacteriana desde los primeros 10 minutos del ensayo experimental, por ejemplo en el caso de las gráficas 18,19 y 22 la muerte bacteriana fue impresionante desde el inicio --

del experimento, en la 18 continuó disminuyendo ligeramente el resto del tiempo; en la 19 fué constante en los tiempos 10,30 y 60 minutos y aumentó un poco a los 90 minutos; en la gráfica 22 después de los 10 minutos aún continuó disminuyendo ligeramente hasta los 60 minutos y luego de nuevo tuvo otra brusca caída a los 90 minutos. En la 17 el Pb tuvo pérdida gradual en todo el ensayo; en la 24 el Pb fué semejante a la 17 solo que de los 60 a 90 minutos hubo un aumento en la población. En cuanto al  $T_1$  de estas gráficas se observa que en las 17,18,19 y 22 permaneció igual los primeros 30 minutos y posteriormente descendió la cantidad de bacterias de manera importante excepto la 17 que descendió poco el resto del tiempo; en el  $T_1$  de la gráfica 24 se ve que disminuyó de manera constante y gradual en todo el experimento. En el  $T_2$  de estas gráficas hubo muerte bacteriana aunque en cantidad y tiempos diferentes; en la 17 la disminución bacteriana fué muy poca pero constante en todo el tiempo; en la 18 es donde casi no hubo muerte celular ya que las cifras permanecieron constantes hasta los 60 minutos para disminuir un poco a los 90 minutos; en la gráfica 19 empezó a ceder la población a partir de los 10 minutos hasta los 60 minutos para continuar la misma cifra a los 90 minutos; en la 22 empezó a haber muerte celular a partir de los 30 minutos y siguió disminuyendo en los tiempos restantes; en el caso de la gráfica 24 desde el inicio mostró una constante muerte celular y se manifestó en todo el trayecto del experimento.

Las gráficas 15 y 23 guardan algo de similitud en lo que se refiere a  $T_1$  ya que después de los 30 minutos del experimento tuvieron un aumento de la población bacteriana, aunque al revisar con detalle las gráficas se ve que en la 15 casi no hubo muerte celular en  $T_1$ ; y en cambio en la 23, después de los 10 minutos tuvo una pérdida importante de -- células. El Pb en el caso de la 15 casi no sufrió variación ya que permaneció igual hasta los 60 minutos y hubo una ligera pérdida a los 90 minutos; en cambio en la 23 si hubo una muerte celular importante durante el transcurso del experimento. En  $T_2$  en ambos casos se aprecia que si hubo disminución; siendo constante durante los primeros 60 minutos en la gráfica 15, para después mantenerse sin cambio el resto del tiempo; en la gráfica 23 la muerte celular hubo -- desde los 10 hasta los 30 minutos y continuó con la misma cantidad el resto del tiempo.

En la gráfica 16 se observa que hubo un ligero -- aumento de la viabilidad durante los primeros 30 minutos y continuó la misma cantidad el resto del tiempo; en cambio - para  $T_1$  se observa lo contrario ya que hubo disminución muy ligera pero constante durante los primeros 30 minutos y posteriormente no hubo cambio. El  $T_2$  no sufrió cambio alguno - ya que se observa que la cantidad de bacterias permaneció - constante durante los 90 minutos del experimento.

En la gráfica 20 se aprecia que tanto el Pb como el  $T_1$  tuvieron pérdida importante de las células bacterianas, aunque fué a diferentes tiempos; en el Pb fué más - - rápido, ya que desde el inicio hasta los 30 minutos hubo - disminución, luego permaneció constante hasta los 60 minutos para caer repentinamente a los 90 minutos; el  $T_1$  empezó a disminuir desde los 10 minutos hasta los 30 minutos - en poca cantidad y a partir de este tiempo hasta los 60 minutos hubo una disminución importante en la viabilidad bacteriana, permaneciendo constante hasta los 90 minutos. En el caso de  $T_2$  permaneció sin alterarse la cantidad celular durante los primeros 30 minutos; luego descendió ligeramente los siguientes 30 minutos y permaneció con esta cantidad hasta los 90 minutos.

Se decidió obtener el porcentaje de la muerte celular (tablas 3 y 4) de los experimentos con cada antibiótico para comparar la muerte celular producida por estos - a diferentes tiempos. Los resultados de las tablas fueron graficados de acuerdo a los rangos de tiempos ensayados.

Dichas gráficas comprenden de la 25 a la 34 conteniendo cada una los 12 experimentos de cada antibiótico ensayado incluyendo sus testigos.

3  
63  
1

TABLA 3  
PORCENTAJE DE MUERTE BACTERIANA PRODUCIDA POR EL ANTIBIOTICO CLORIDRATO DE TETRACICLINA

Num Exp	0 a 10 minutos			10 a 30 minutos			30 a 50 minutos			50 a 90 minutos			0 a 90 minutos		
	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2
1	24.44	28.57	0.00	94.18	45.00	38.10	100.00	94.30	23.00	100.00	100.00	0.00	100.00	100.00	90.95
2	68.75	-26.60	0.00	71.00	-5.26	30.00	100.00	100.00	87.80	100.00	100.00	80.00	100.00	100.00	98.30
3	68.52	42.00	10.00	5.80	0.00	-5.56	53.70	0.00	81.20	92.80	92.00	63.30	99.20	94.90	94.50
4	90.77	76.90	0.00	93.00	35.30	17.00	100.00	85.50	81.90	100.00	100.00	33.30	100.00	100.00	90.00
5	99.60	50.00	33.30	20.00	-40.00	30.00	100.00	34.20	21.40	100.00	100.00	44.50	100.00	100.00	79.67
6	50.00	97.00	10.00	74.00	16.60	22.20	33.30	0.00	92.10	100.00	0.00	9.00	100.00	97.50	95.00
7	53.33	0.00	37.80	-28.50	25.00	1.15	0.00	0.00	14.20	11.10	0.00	56.90	46.50	25.00	77.88
8	4.55	86.60	6.67	26.50	0.00	0.00	8.33	73.30	50.00	90.00	53.10	90.60	93.70	98.30	93.87
9	0.00	0.00	57.00	74.00	83.00	4.98	4.17	56.40	72.50	90.40	40.50	47.20	97.80	95.60	94.20
10	45.30	-26.60	0.00	100.00	50.00	49.00	100.00	31.50	16.60	100.00	7.60	16.60	100.00	60.00	65.00
11	69.50	0.00	0.00	-10.70	13.30	7.25	3.23	23.00	1.56	71.60	0.00	-14.20	90.70	33.30	-4.35
12	0.00	28.50	30.00	-13.30	-7.50	28.50	1.47	4.60	7.14	49.20	7.30	5.00	43.30	32.10	86.40

TABLA 4  
PORCENTAJE DE MUERTE BACTERIANA PRODUCIDA POR EL ANTIBIOTICO QUINETRACICLINA

Num Exp	0 a 10 minutos			10 a 30 minutos			30 a 60 minutos			60 a 90 minutos			0 a 90 minutos		
	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2	Pb	T1	T2
1	59.00	0.00	0.00	0.01	99.30	0.60	-0.90	-63.89	23.00	0.01	-10.70	97.50	99.90	99.60	98.35
2	94.13	93.80	0.00	-2.70	53.80	95.70	84.40	45.56	24.03	-6.78	11.22	57.41	99.00	98.60	98.60
3	0.00	-42.80	45.50	3.33	46.20	28.57	1.72	-179.07	71.43	71.93	16.67	5.00	74.00	-78.50	89.40
4	-40.00	12.50	0.00	-35.70	23.90	0.00	-5.26	20.00	3.60	5.00	0.00	-5.00	-9.00	50.00	-5.30
5	79.50	0.00	0.00	40.91	0.00	61.76	91.35	65.77	57.69	100.00	36.92	54.55	100.00	60.90	89.45
6	99.80	0.00	0.00	34.50	0.00	0.00	38.90	78.00	0.00	9.07	97.37	74.00	99.70	97.80	74.00
7	99.95	0.00	0.00	0.00	0.00	93.20	7.41	56.60	64.71	-4.00	68.24	16.67	99.90	98.70	98.15
8	81.50	0.00	0.00	74.20	71.00	0.00	0.00	98.80	73.63	93.20	0.00	11.00	99.60	99.60	76.50
9	90.00	30.77	6.80	40.70	94.70	59.38	91.50	89.50	7.69	38.40	-63.67	41.67	99.60	97.30	93.00
10	98.20	0.00	0.00	40.90	0.00	0.00	32.60	97.40	90.00	100.00	36.52	28.00	100.00	98.30	92.80
11	59.00	0.00	0.00	-60.40	99.50	97.40	92.60	76.60	7.69	82.40	-104.00	16.60	99.90	96.80	96.00
12	68.70	88.50	87.10	71.11	67.70	33.33	91.00	-10.00	52.50	-71.40	0.00	80.60	99.50	95.90	96.60

Los rangos de tiempo, para observar la muerte bacteriana, fueron de 0 a 10 minutos, de 10 a 30 minutos, de 30 a 60 minutos, de 60 a 90 minutos, y también se graficó el rango de 0 a 90 minutos para abarcar desde la etapa inicial hasta el tiempo final y así poder obtener el porcentaje de muerte total.

Para facilitar la visualización de las gráficas y así poder comparar los resultados más fácilmente, fueron colocadas de manera simultánea por rango de tiempo de cada antibiótico.

Las cifras obtenidas de los porcentajes de muerte fueron agrupadas, de manera arbitraria, en los siguientes rangos:

Nula mortalidad	0%
Muy baja mortalidad	0.01 a 19.9%
Baja mortalidad	20 a 49.9%
Regular mortalidad	50 a 79.9%
Alta mortalidad	80 a 99.9%
Muerte total	100%

Las cifras negativas indicaron que en lugar de haber muerte bacteriana, se presentó multiplicación de las bacterias

Las gráficas 25 y 26 comprendieron el rango de 0 a 10 minutos de exposición con el antibiótico correspondiente

y las cifras de la muerte bacteriana en este tiempo están -  
incluidas en la tabla 5 (gráfica 25) y la tabla 6 (gráfica -  
26).

TABLA 5

Experimentos con clorhidrato de Tetraciclina 0 a 10 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	0	0	0
Alta Mortalidad	2	2	0
Regular Mortalidad	5	2	1
Baja Mortalidad	2	3	3
Muy Baja Mortalidad	1	0	3
Nula Mortalidad	2	3	5
Negativa	0	2	0

TABLA 6

Experimentos con Oxitetraciclina 0 a 10 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	0	0	0
Alta Mortalidad	9	2	1
Regular Mortalidad	1	1	0
Baja Mortalidad	0	1	1
Muy Baja Mortalidad	0	0	1
Nula Mortalidad	1	7	9
Negativa	1	1	0

Por los resultados arriba anotados, en el rango de 0 a 10 mi-  
nutos se observa que en el caso del Pb hubo una mayor mortalidad con -  
oxitetraciclina; en cambio en el T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> de ambos antibióticos la mor-  
talidad se presenta menor que el Pb del antibiótico respectivo.

Las gráficas 27 y 28 muestran los resultados de la exposición en el rango de 10 a 30 minutos. Las cifras de muerte bacteriana están incluidas en las tabla 7 (gráfica 27) y tabla 8 (gráfica 28).

TABLA 7

Experimentos con Clorhidrato de Tetraciclina 10 a 30 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	1	0	0
Alta Mortalidad	2	1	0
Regular Mortalidad	3	1	0
Baja Mortalidad	2	3	6
Muy Baja Mortalidad	1	2	4
Nula Mortalidad	0	2	1
Negativa	3	3	1

TABLA 8

Experimentos con Oxitetraciclina 10 a 30 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	0	0	0
Alta Mortalidad	0	3	3
Regular Mortalidad	2	3	2
Baja Mortalidad	4	2	2
Muy Baja Mortalidad	2	0	0
Nula Mortalidad	1	4	5
Negativa	3	0	0

En este rango se puede observar que el Pb del clorhidrato de tetraciclina tuvo, en proporción, mayor muerte que el de oxitetraciclina; no así en T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> donde se observan mayores cifras de mortalidad en oxitetraciclinas que con el clorhidrato de tetraciclina.

Las gráficas 29 y 30 incluyen los resultados que se obtuvieron en el rango de 30 a 60 minutos de exposición, y las cifras de muerte bacteriana están incluidas en la tabla 9 (gráfica 29) y tabla 10 (gráfica 30).

TABLA 9

Experimentos con Clohidrato de Tetraciclina 30 a 60 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	5	1	0
Alta Mortalidad	0	2	4
Regular Mortalidad	1	2	1
Baja Mortalidad	1	3	3
Muy Baja Mortalidad	4	1	4
Nula Mortalidad	1	3	0
Negativa	0	0	0

TABLA 10

Experimentos con Oxitetraciclina 30 a 60 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	0	0	0
Alta Mortalidad	5	4	1
Regular Mortalidad	0	3	5
Baja Mortalidad	2	2	2
Muy Baja Mortalidad	2	0	2
Nula Mortalidad	1	0	2
Negativa	2	3	0

En este rango se puede apreciar, que hubo mayor mortalidad en el Pb de clohidrato de tetraciclina que con oxitetraciclina; en cuanto a T<sub>1</sub> aunque con oxitetraciclina hubo más cifras de alta mortalidad que

con clohidrato, manifestó desarrollo microbiano en tres experimentos - en uno de ellos de manera notable (-179.07%); en T<sub>2</sub> se observa que la mortalidad fué más alta con clohidrato de tetraciclina.

En las gráficas 31 y 32 se encuentran graficados los datos obtenidos en el rango de 60 a 90 minutos de exposición con los antibióticos, y las cifras de muerte bacteriana están incluidas en las - - tablas 11 (gráfica 31) y tabla 12 (gráfica 32).

TABLA 11

Experimentos con Clohidrato de Tetraciclina 60 a 90 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	6	4	0
Alta Mortalidad	3	1	2
Regular Mortalidad	1	1	2
Baja Mortalidad	1	1	3
Muy Baja Mortalidad	1	2	3
Nula Mortalidad	0	3	1
Negativa	0	0	1

TABLA 12

Experimentos con Oxitetraciclina 60 a 90 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	2	0	0
Alta Mortalidad	2	1	1
Regular Mortalidad	1	1	3
Baja Mortalidad	1	2	3
Muy Baja Mortalidad	3	2	4
Nula Mortalidad	0	3	0
Negativa	3	3	1

En este rango de exposición se observó que el Pb de clorhidrato de tetraciclina tuvo mayores porcentajes de muerte que el de -- oxitetraciclina; igual sucedió con T<sub>1</sub>, además en oxitetraciclina se presentaron tres casos de aumento de la población en uno de ellos con poco más de 100% de aumento; en T<sub>2</sub> las cifras son semejantes para ambos antibióticos.

Las gráficas 33 y 34 corresponden al rango de 0 a 90 minutos; esto es, el total del tiempo de exposición con el antibiótico y las cifras de muerte están incluidas en la tabla 13 (gráfica 33) y tabla 14 (gráfica 34).

TABLA 13

Experimentos con Clorhidrato de Tetraciclina 0 a 90 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Total	6	4	0
Alta Mortalidad	4	4	8
Regular Mortalidad	0	1	3
Baja Mortalidad	2	3	0
Muy Baja Mortalidad	0	0	0
Nula Mortalidad	0	0	0
Negativa	0	0	1

TABLA 14

Experimentos con Oxitetraciclinas 0 a 90 minutos			
	Pb	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Muerte Totalidad	2	0	0
Alta Mortalidad	*8	10	9
Regular Mortalidad	1	1	2
Baja Mortalidad	0	0	0
Muy Baja Mortalidad	0	0	0
Nula Mortalidad	0	0	0
Negativa	1	1	1

\* Cabe aclarar que aquí se incluyen cifras de 99.97% que para fines prácticos equivale a 100%

En este rango de 0 a 90 minutos (rango total) se puede observar que en cuanto al Pb están casi iguales las cifras para ambos antibióticos con la aclaración que en caso de oxitetraciclina hubo multiplicación.

En  $T_1$  se aprecia mayor mortalidad con la oxitetraciclina que con el clorhidrato de tetraciclina con la excepción de un caso de oxitetraciclina en el cual hubo multiplicación, en cuanto a  $T_2$  los resultados fueron similares para ambos antibióticos presentando cada uno un caso de multiplicación.

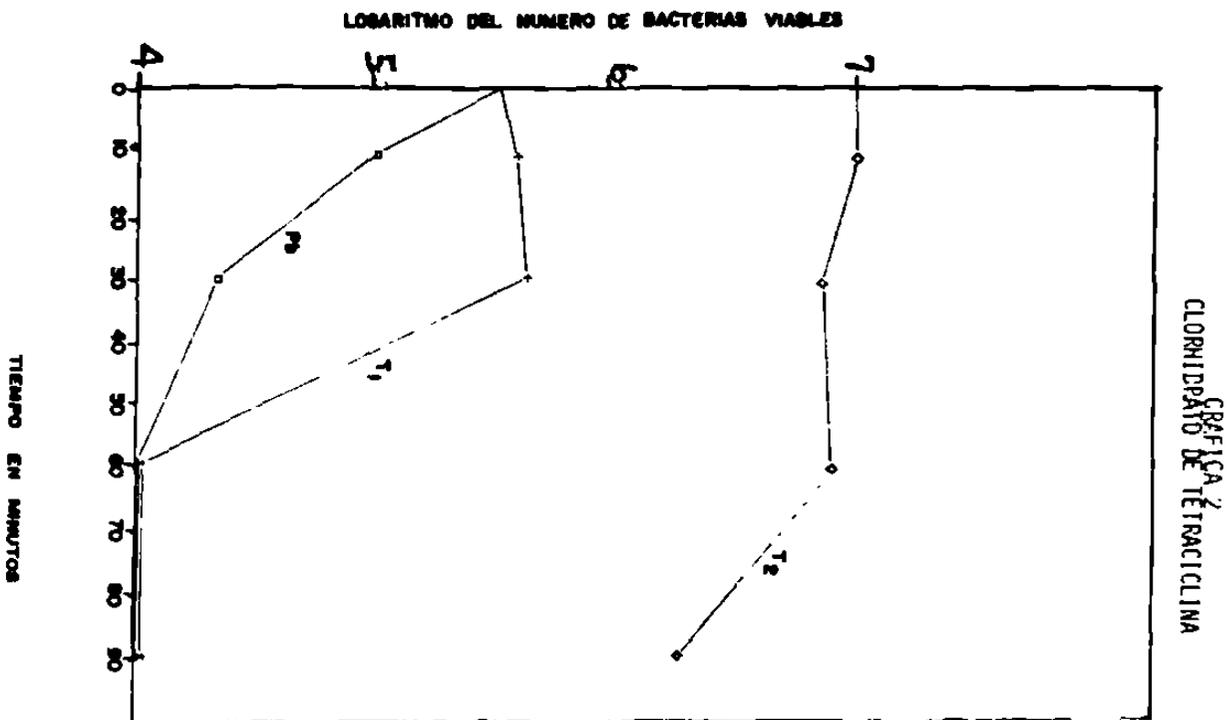
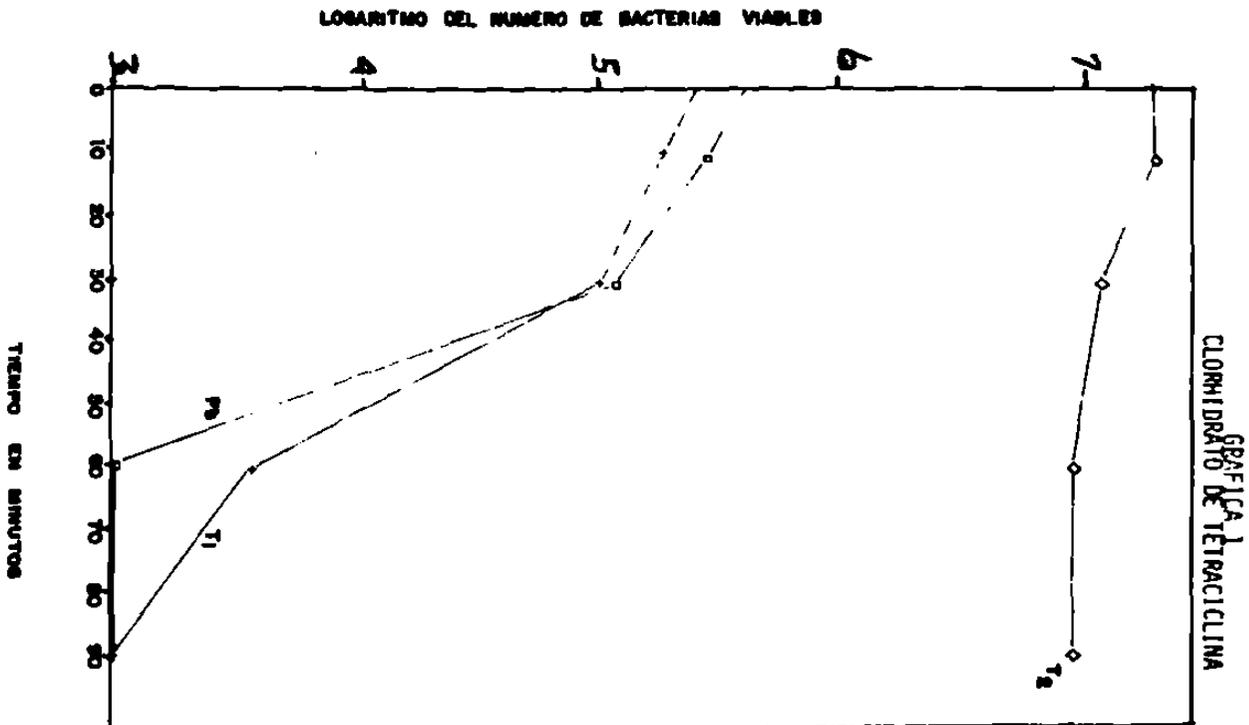
Comparando de manera global, los resultados de las tablas 3 y 4 (gráficas 25 a la 34) indican, el caso del clorhidrato de tetraciclina, que durante el transcurso de la fase de experimentación, en cada rango de tiempo el Pb fué aumentando de manera importante su porcentaje de muerte; los  $T_1$  y  $T_2$  también aumentaron el porcentaje aunque  $T_1$  lo hizo en mayor proporción que  $T_2$  y ambos en menor proporción que el Pb. En cuanto a oxitetraciclina el Pb en el rango inicial (0 a 10 minutos) tuvo un muy importante porcentaje de muerte en 9 casos; luego disminuyó la mortalidad en el siguiente rango de tiempo; para volver a incrementarse la muerte bacteriana, en algunos casos, durante el resto del tiempo. Los  $T_1$  y  $T_2$  de la oxitetraciclina tuvieron al inicio casi nula mortalidad pero fueron aumentando conforme pasó el tiempo. Comparando ambos antibióticos, los Pb de la oxitetraciclina en

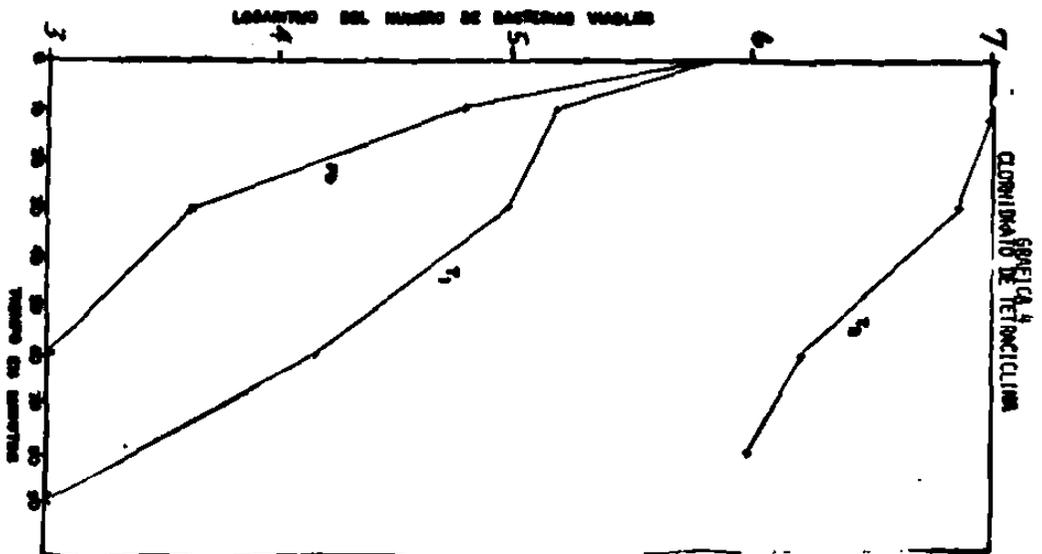
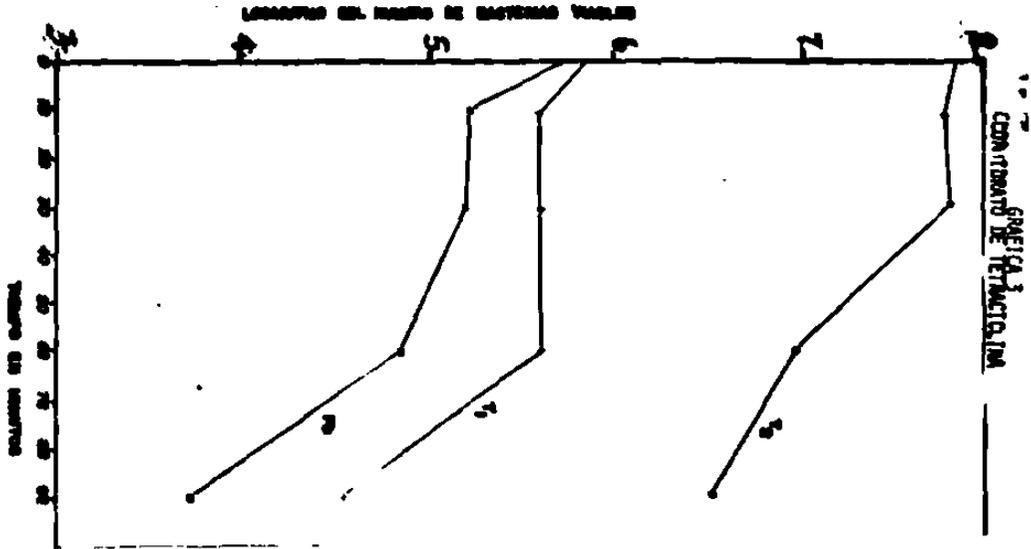
el tiempo inicial (0 a 10 minutos) tuvieron más cifras de elevada mortalidad que las Pb del clorhidrato, pero al ir aumentando el tiempo de exposición el clorhidrato fue aumentando el porcentaje de muerte en mayor proporción que la oxitetraciclina; los resultados de los testigos  $T_1$  y  $T_2$  indican que en ambos antibióticos el resultado de porcentaje de muerte fue muy bajo o nulo al inicio, pero se fue incrementando durante el transcurso del tiempo, en especial en el  $T_1$  con clorhidrato donde se aprecian cifras de muerte total.

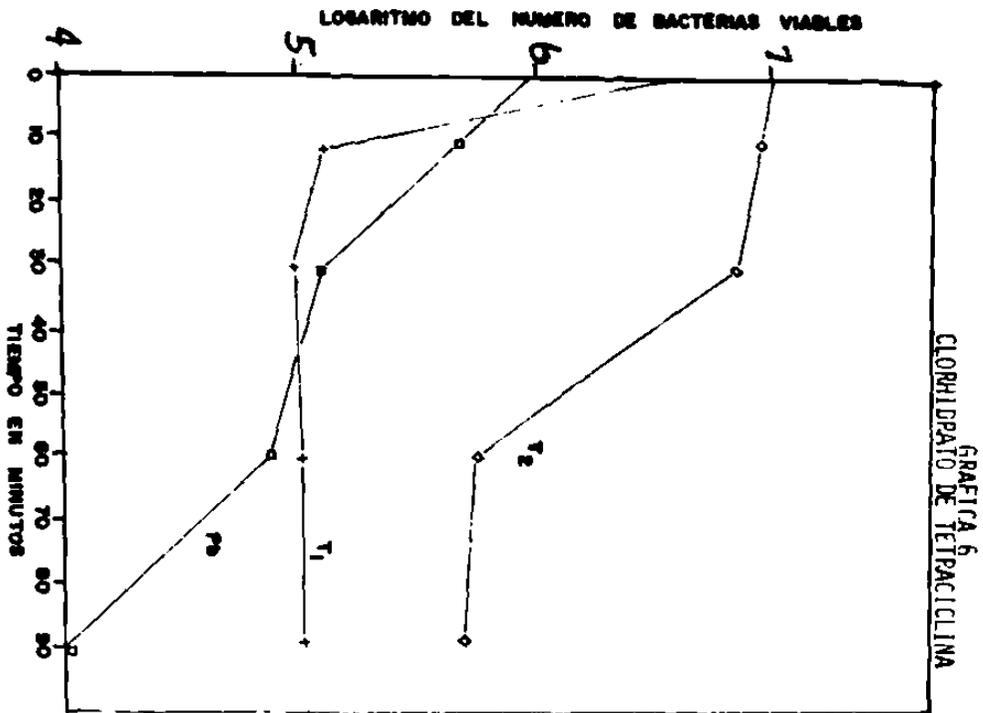
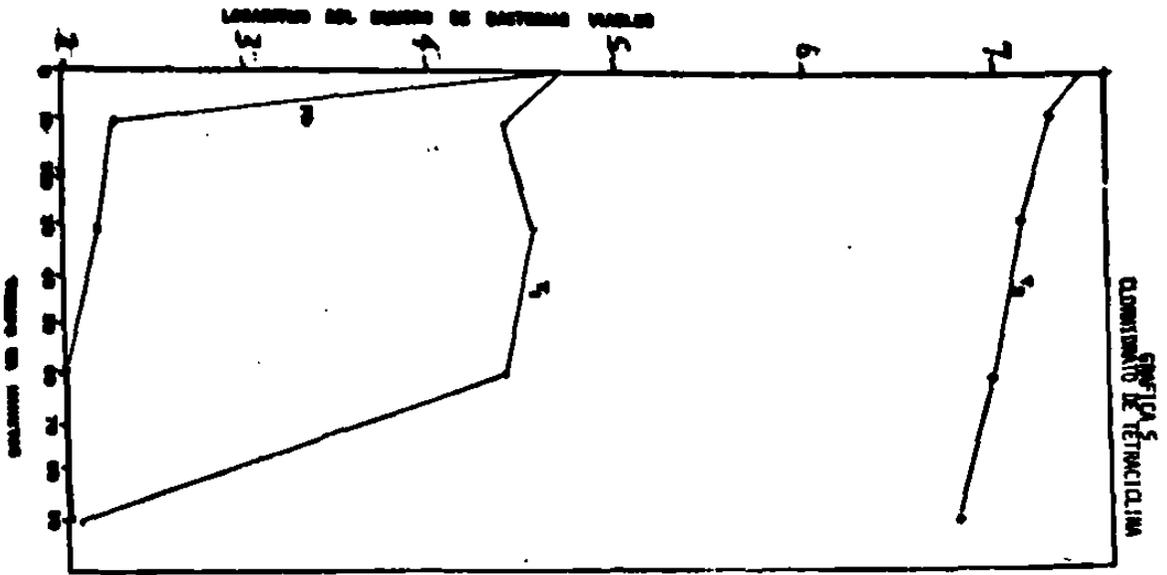
También se observan casos, en ambos antibióticos, de multiplicación bacteriana, siendo en mayor proporción con oxitetraciclina (17 casos de incremento) que con el clorhidrato de tetraciclina (10 casos de incremento). Además hay que señalar que los mayores porcentajes de incremento se dieron con oxitetraciclina.

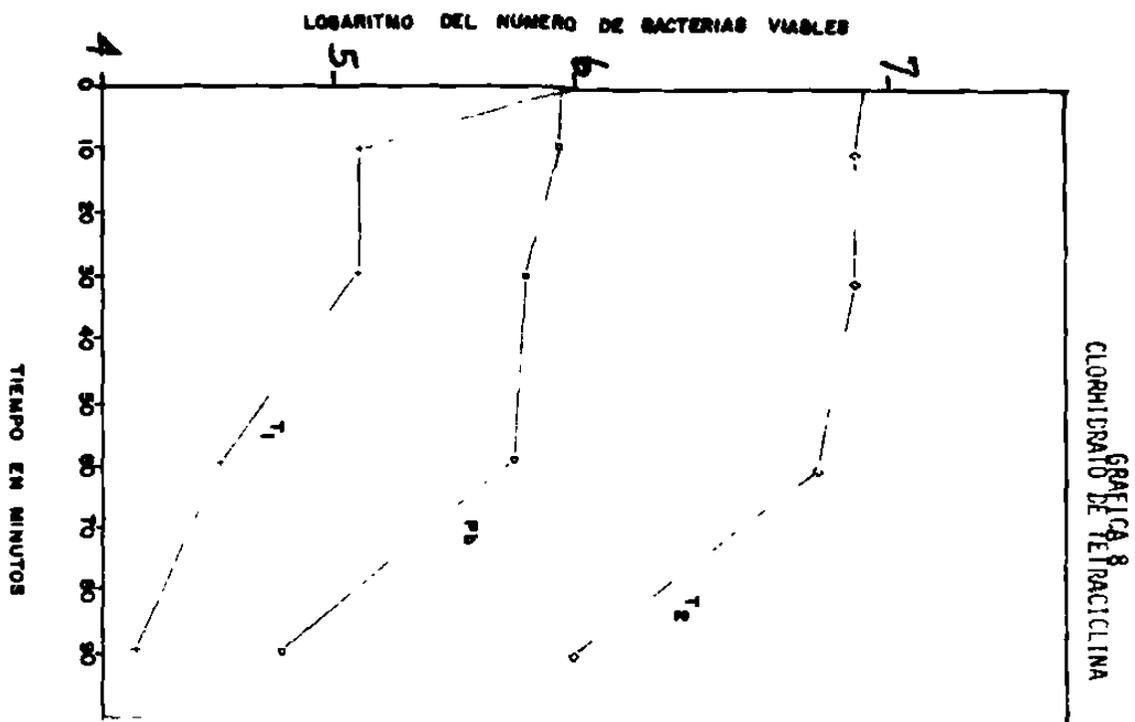
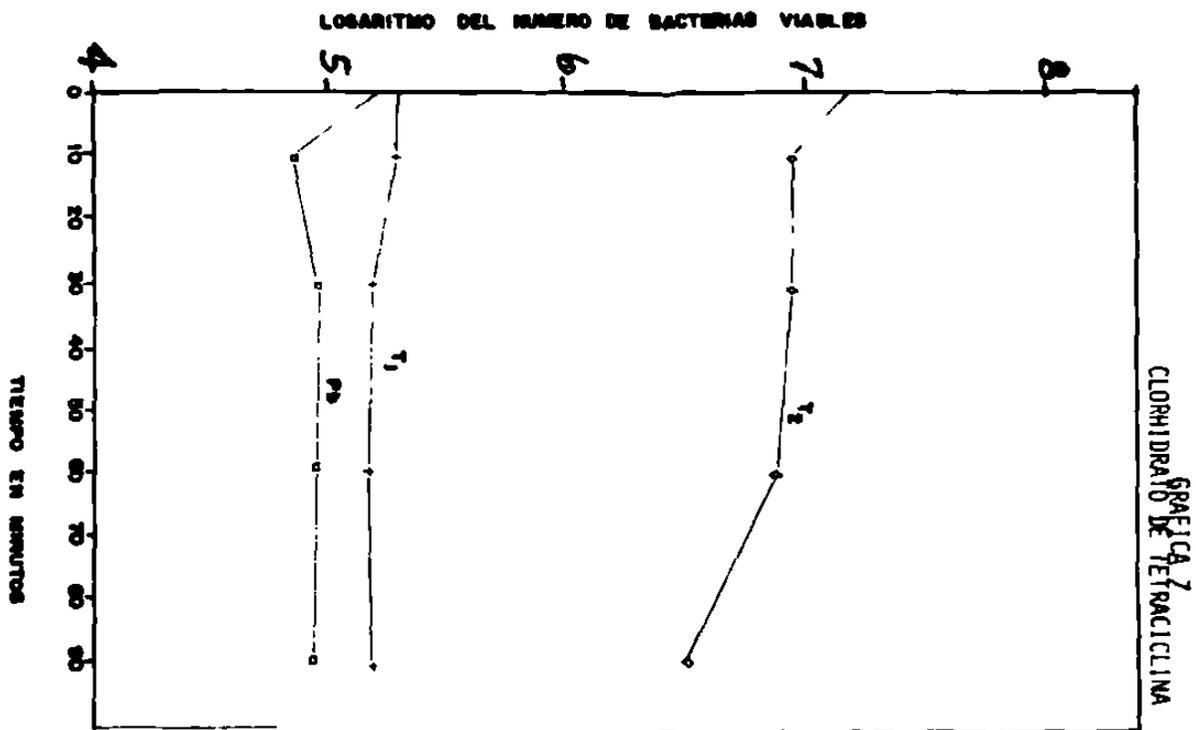
En las tablas 15 y 16 se muestran las cifras de la media, la mediana, el mínimo y el máximo para los experimentos con ambos antibióticos. Los datos se encuentran agrupados como Pb,  $T_1$ ,  $T_2$ , a los tiempos 0, 10, 30, 60 y 90 minutos por ejemplo, de los 12 experimentos del Pb con el clorhidrato de tetraciclina al tiempo 0 se obtuvo la medida, la mediana, el mínimo y el máximo; lo mismo se hizo con el resto de los Pb,  $T_1$  y  $T_2$  de cada antibiótico.

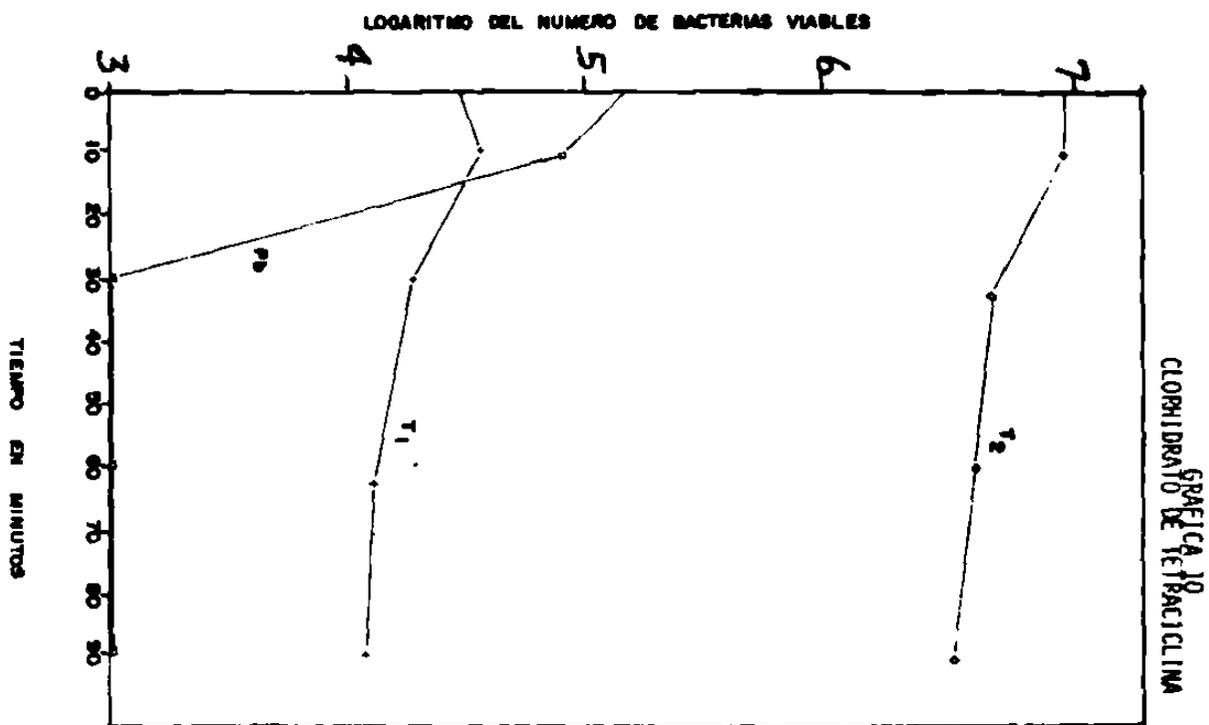
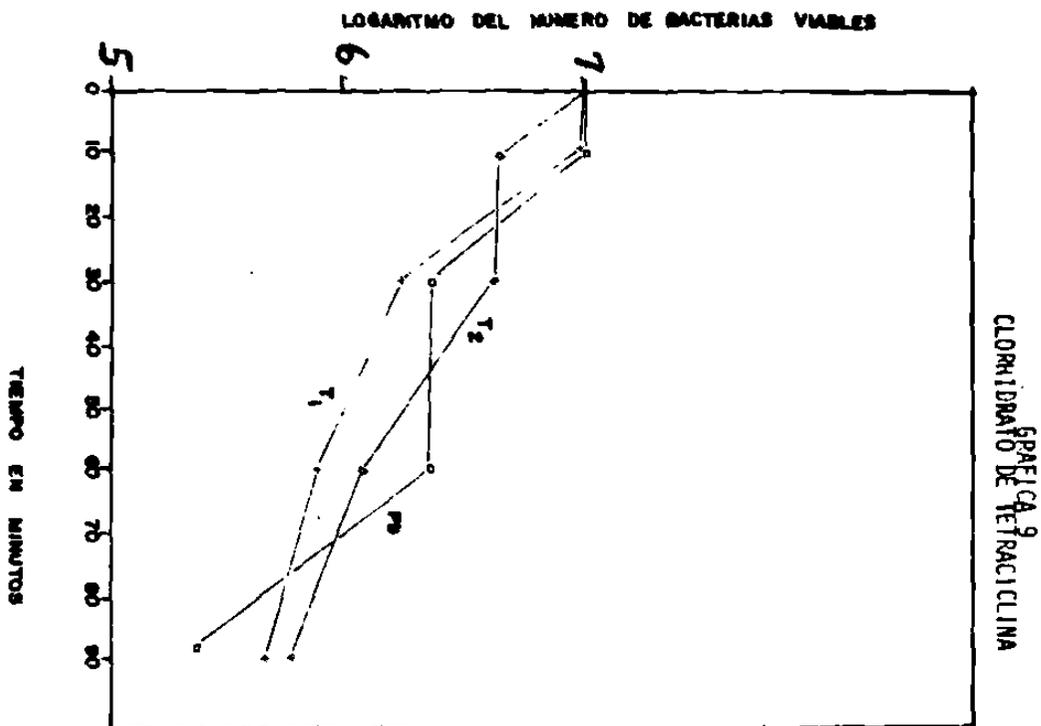
Estos datos muestran que hubo una gran variación en los experimentos ya que, por ejemplo, en el Pb a 90 minutos de exposición con oxitetraciclina tuvo un mínimo de 0 y un máximo de  $1,6 \times 10^5$  mientras que el Pb a los 60 minutos de exposición con oxitetraciclina tuvo un mínimo de  $7 \times 10^3$  y un máximo de  $1,8 \times 10^6$ . Lo mismo sucedió en el caso de la media y la mediana, como se puede ver en el T<sub>1</sub> a los 10 minutos con clorhidrato de tetraciclina tuvo una media de  $1,4 \times 10^6$  y una mediana de  $4,3 \times 10^5$  y en el T<sub>1</sub> a los 10 minutos con oxitetraciclina tuvo una media de  $2,5 \times 10^7$  y una mediana de  $2,3 \times 10^7$ .

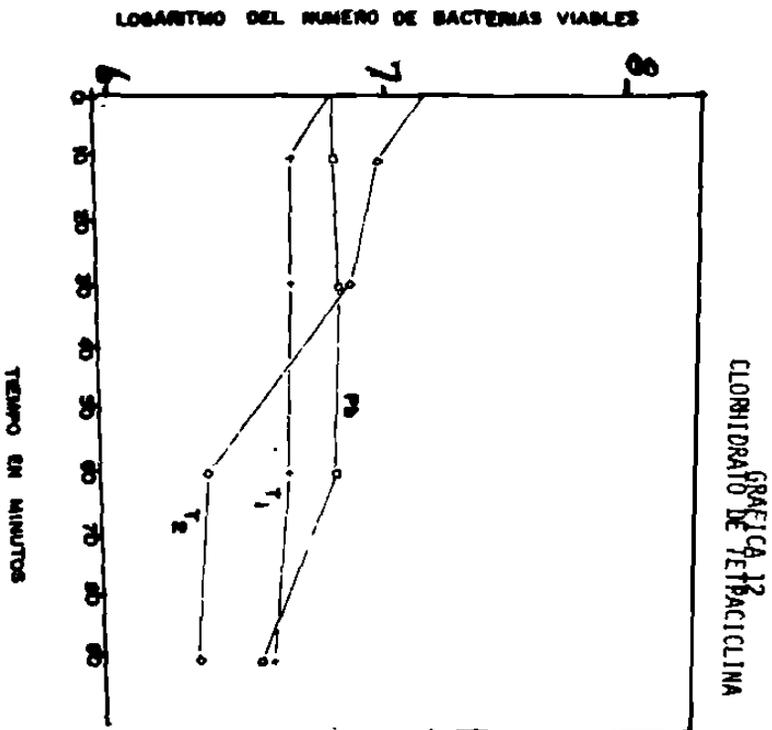
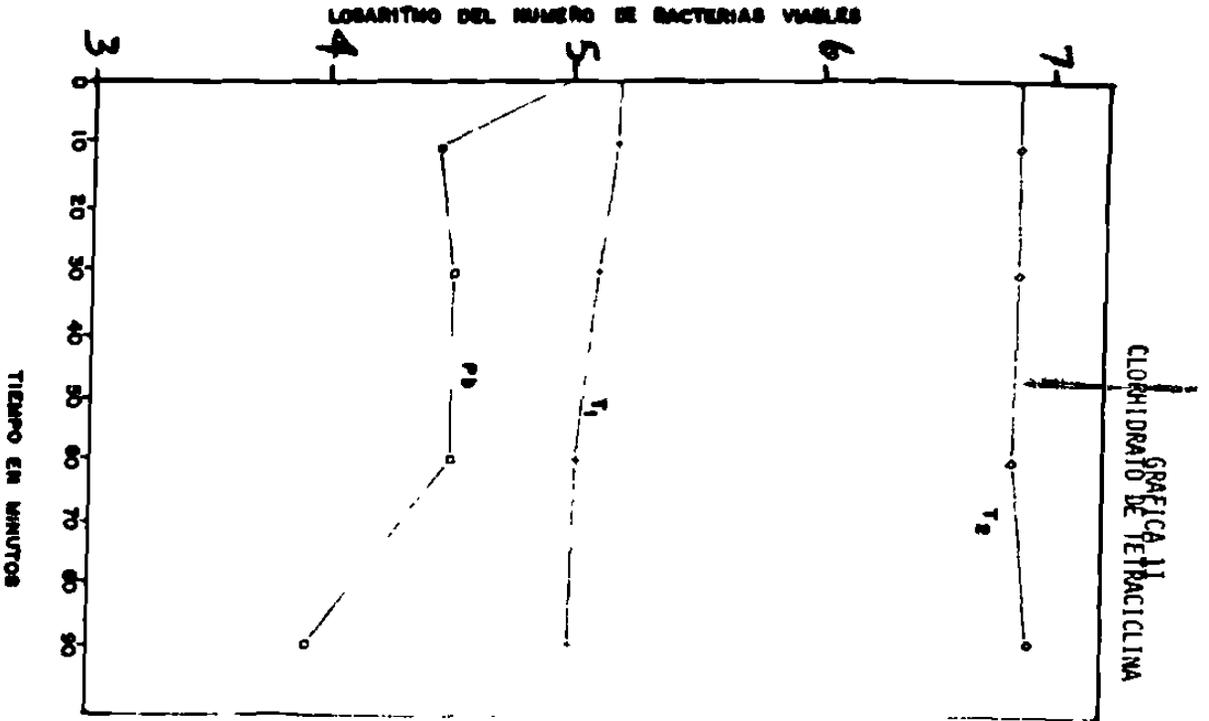


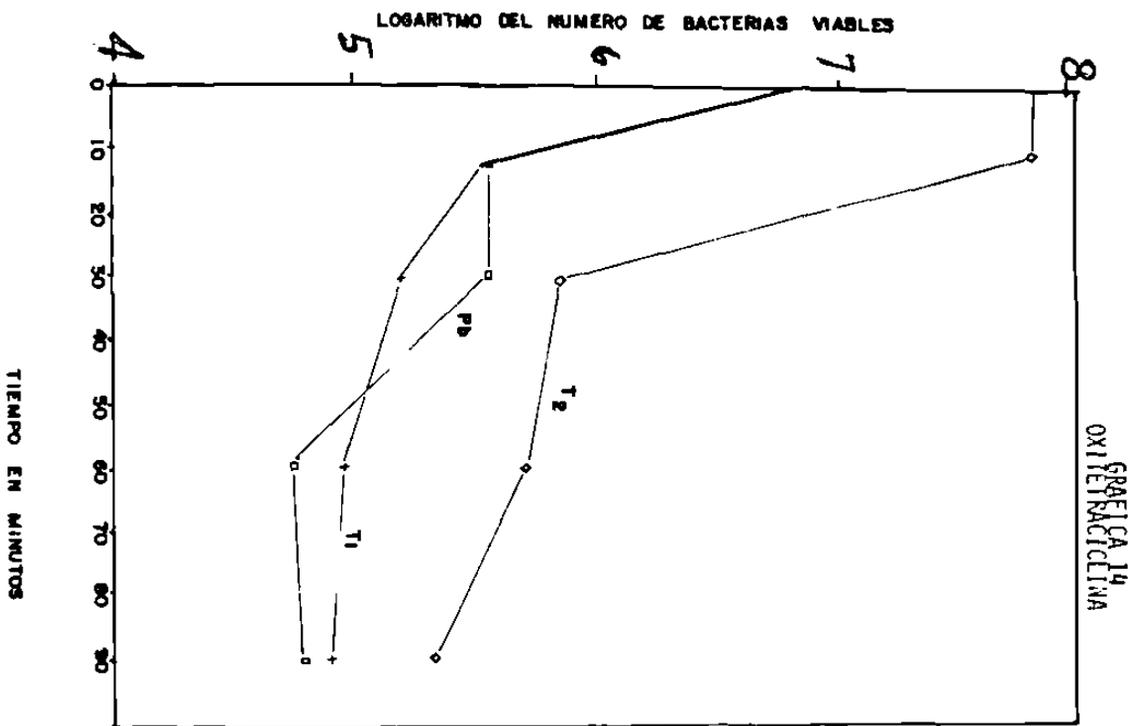
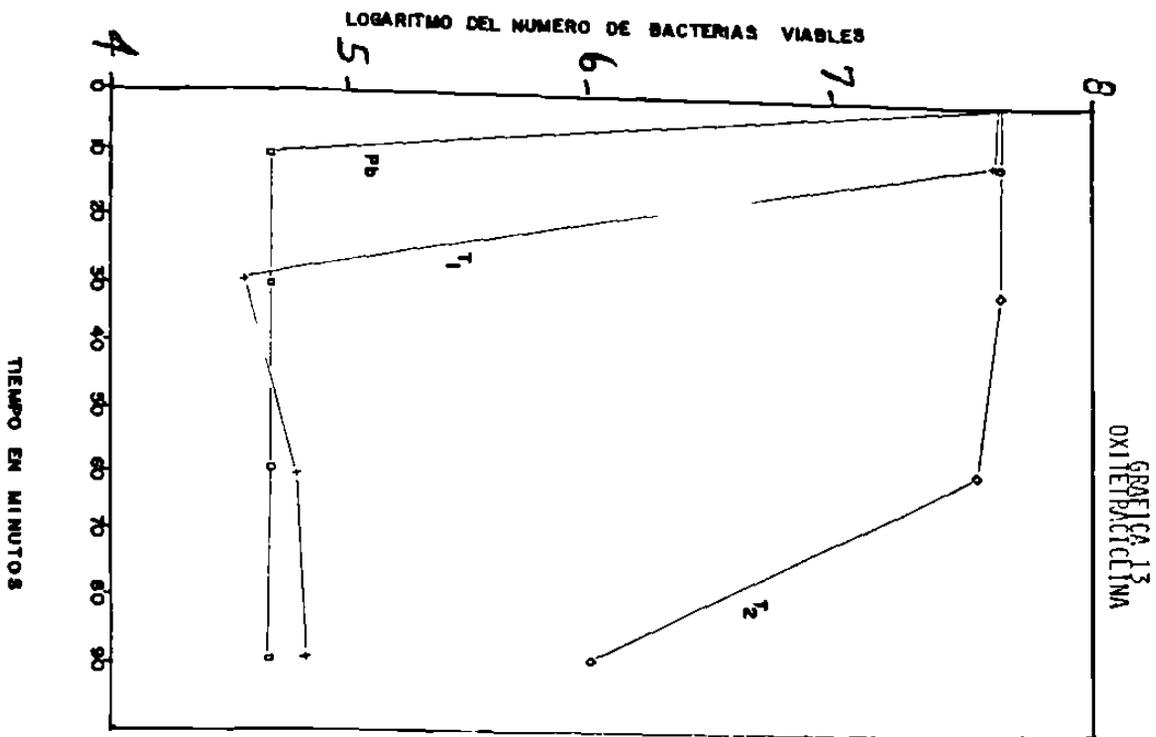


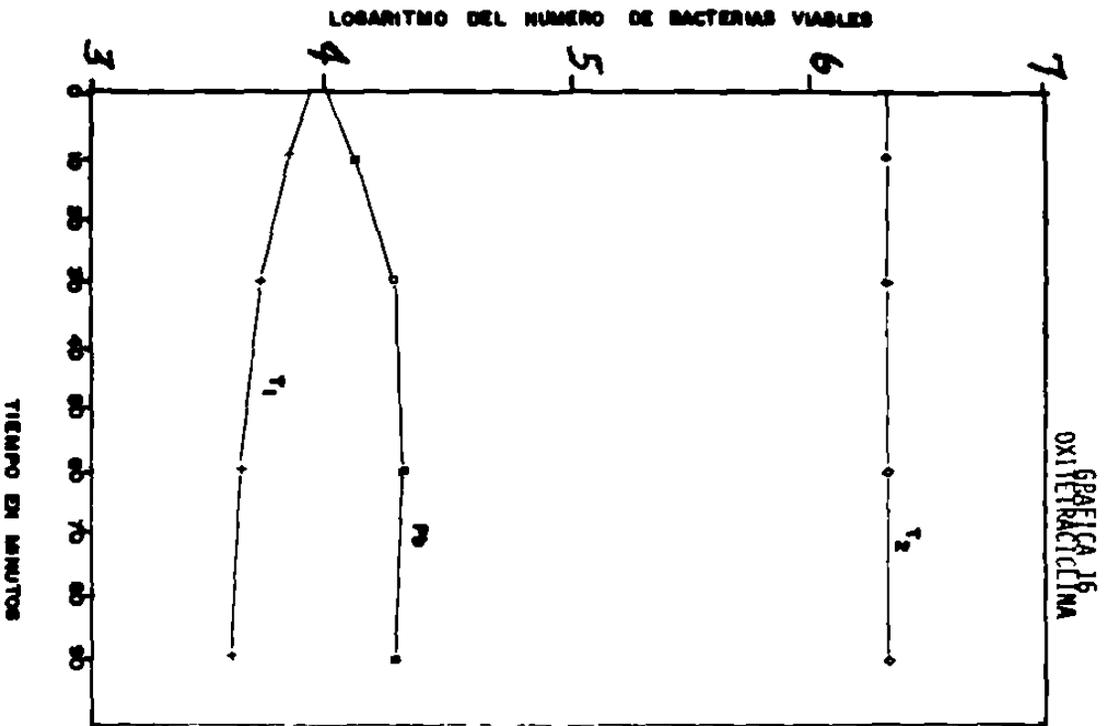
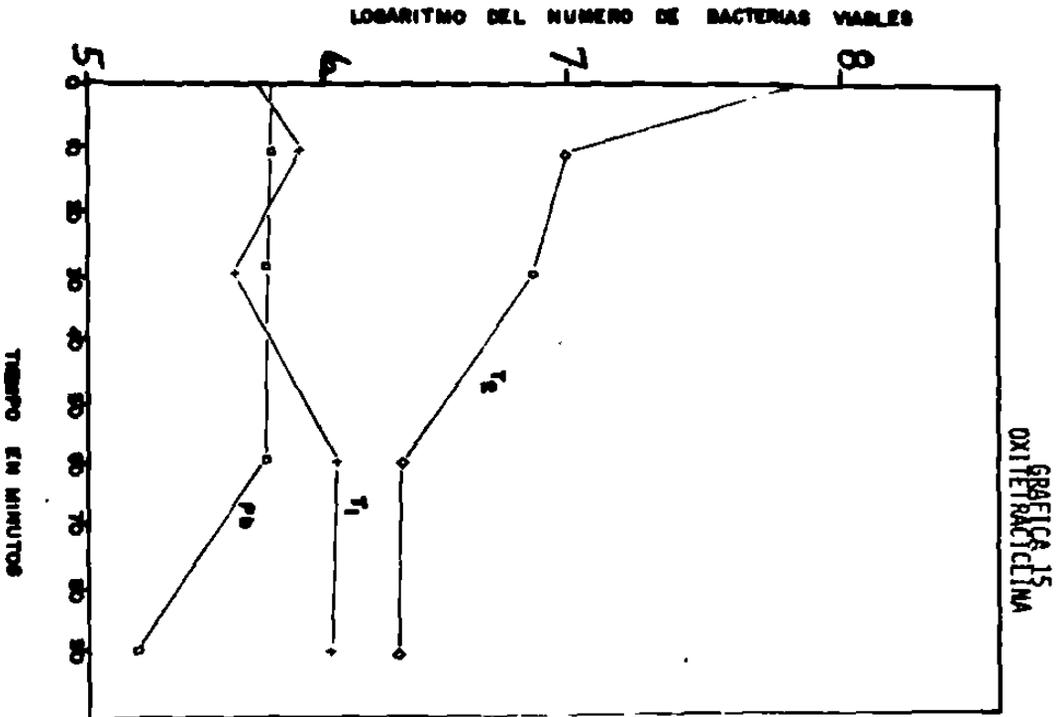


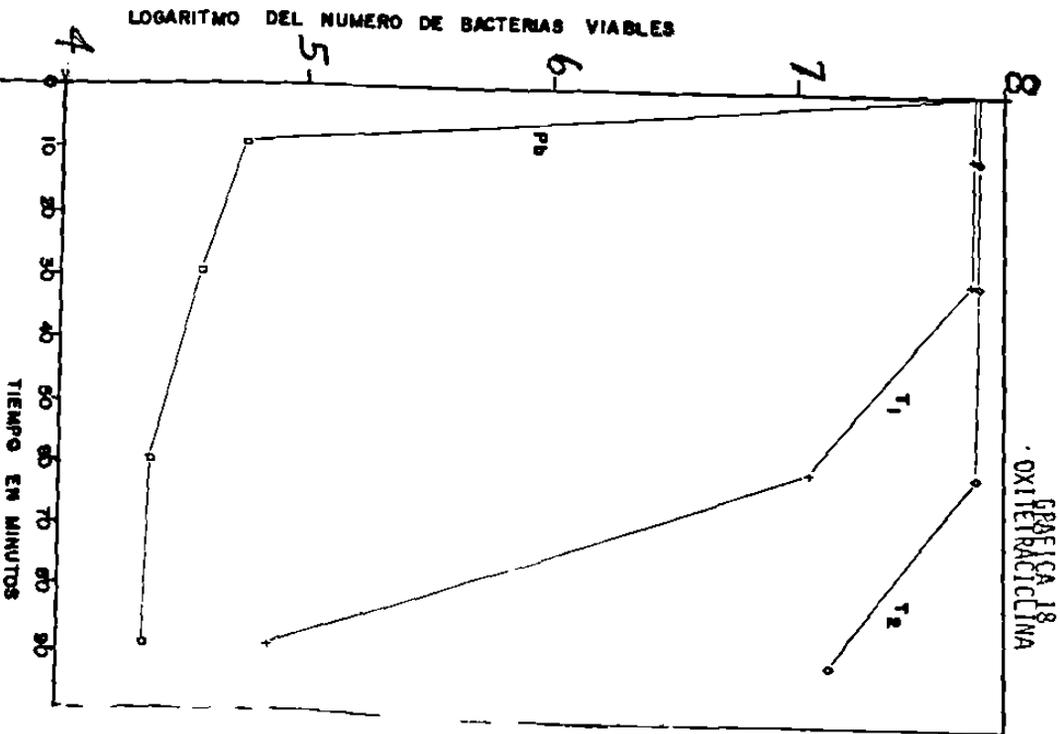
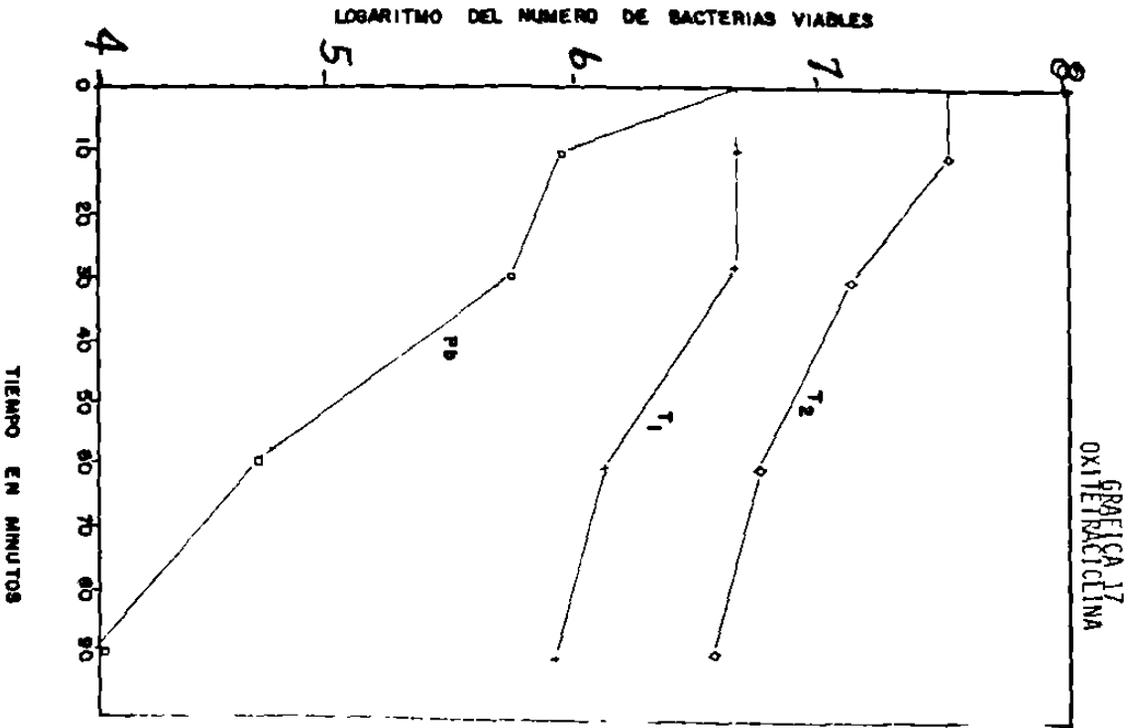


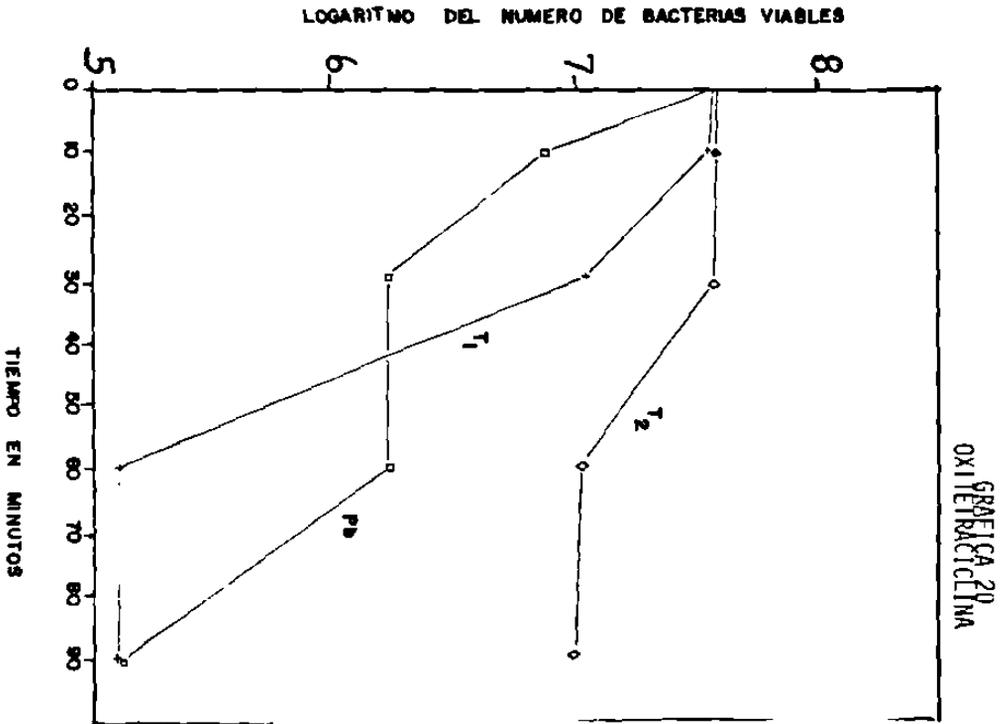
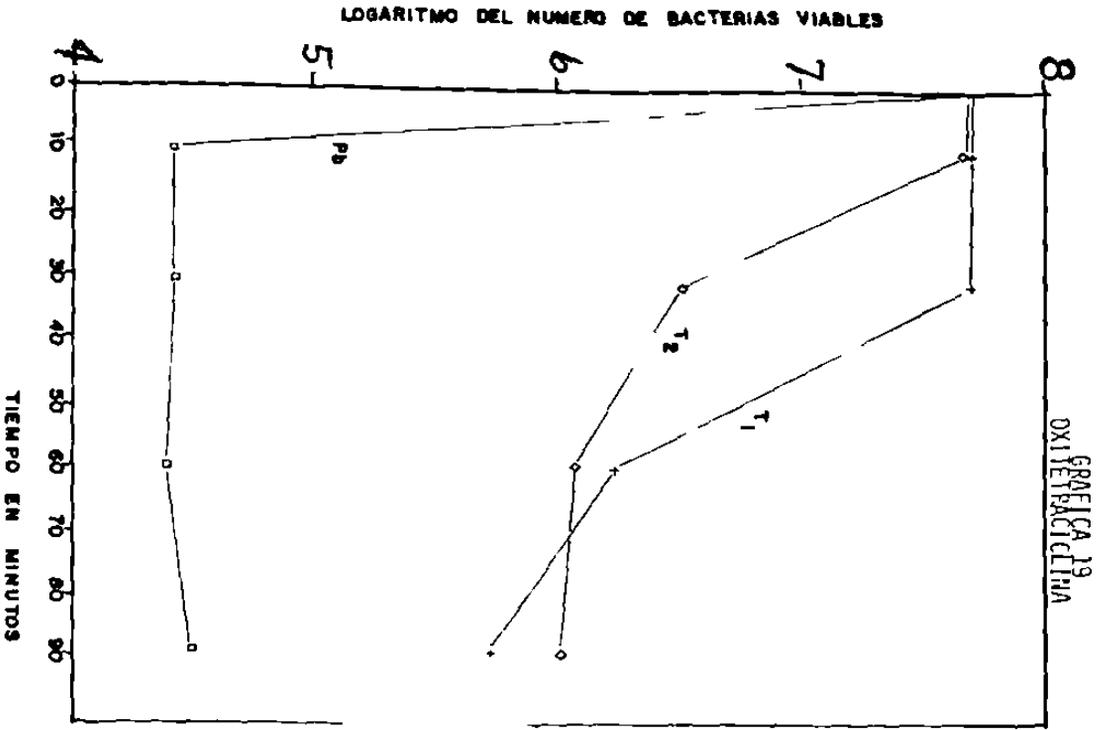


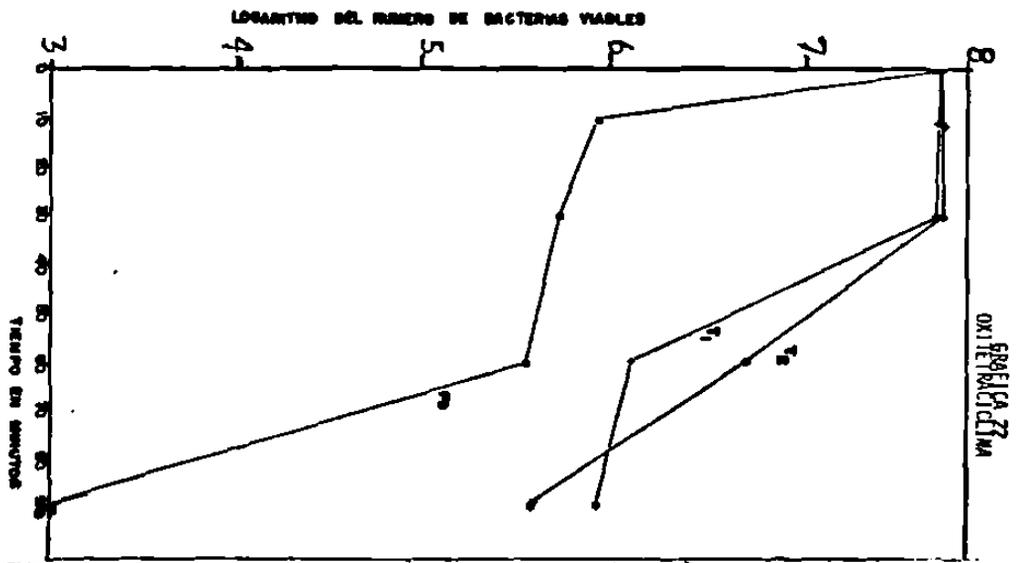
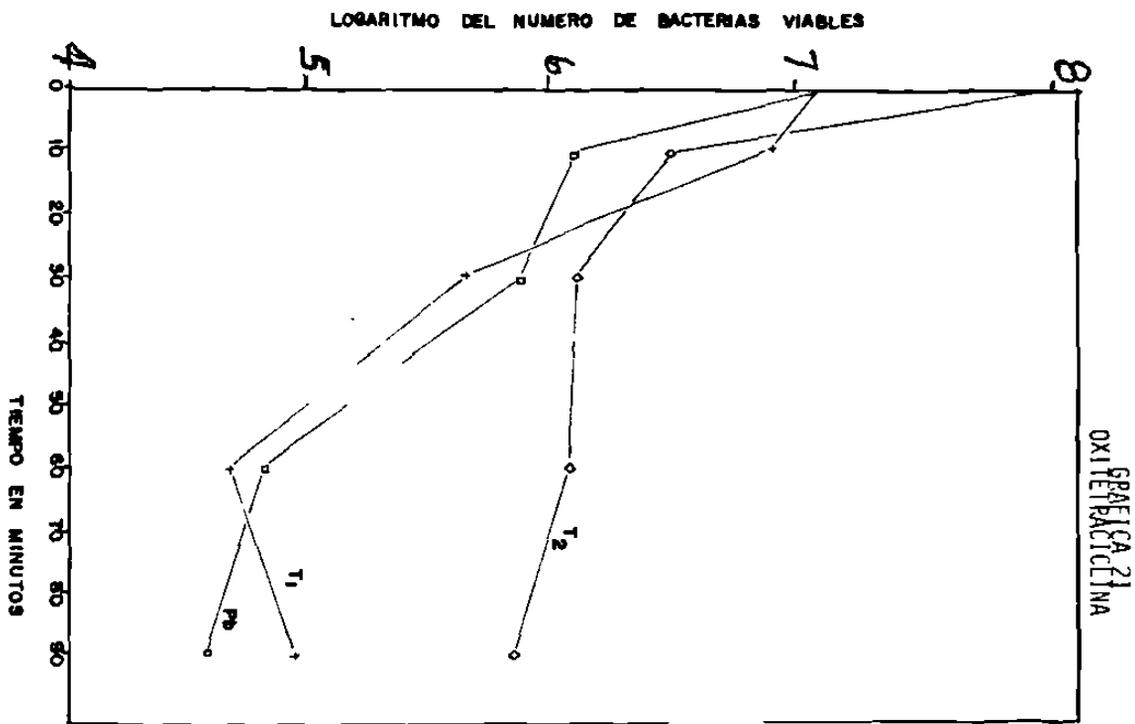


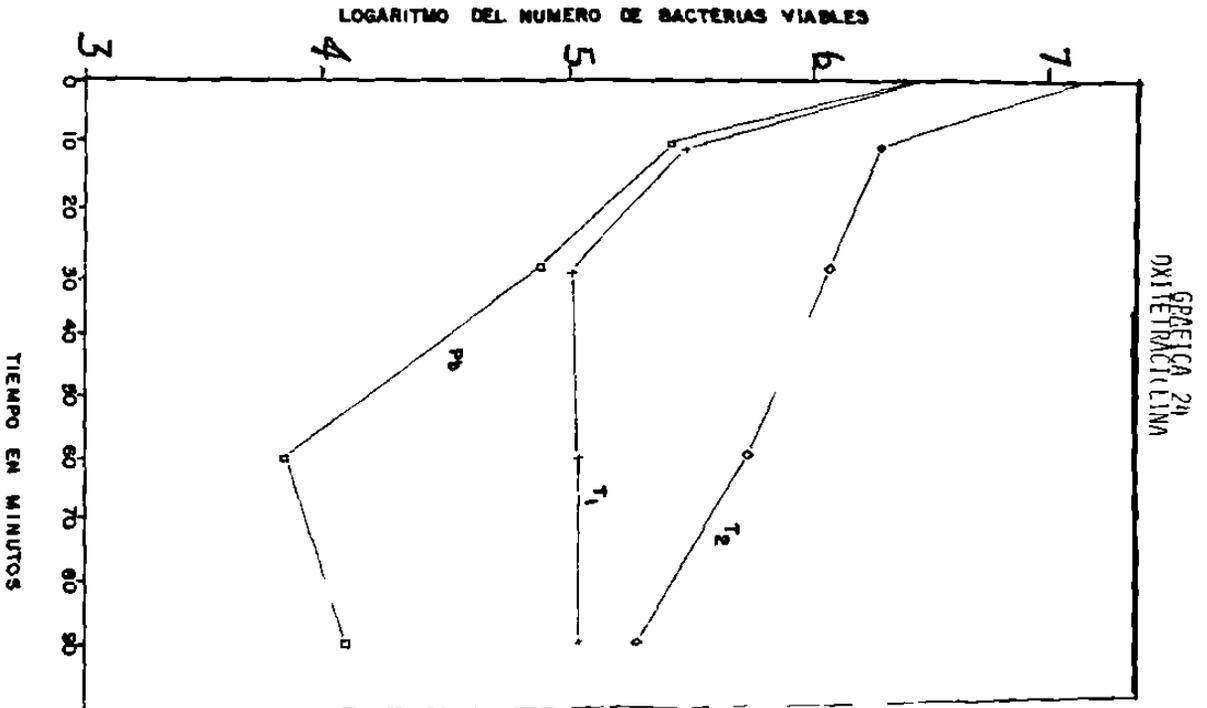
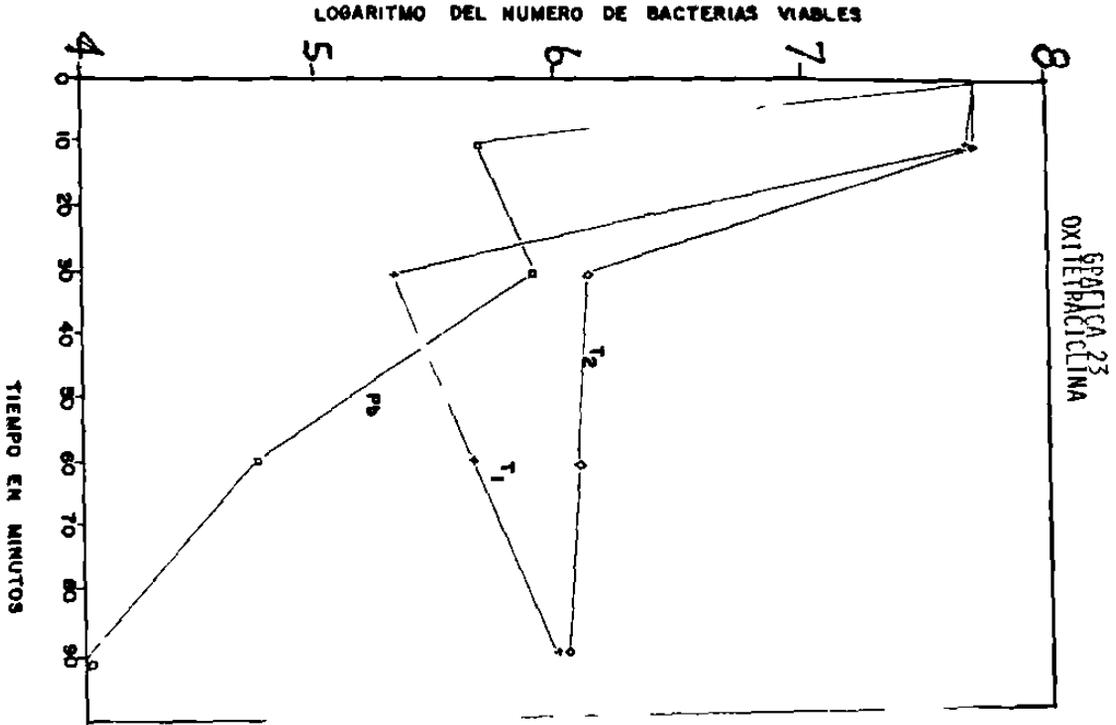






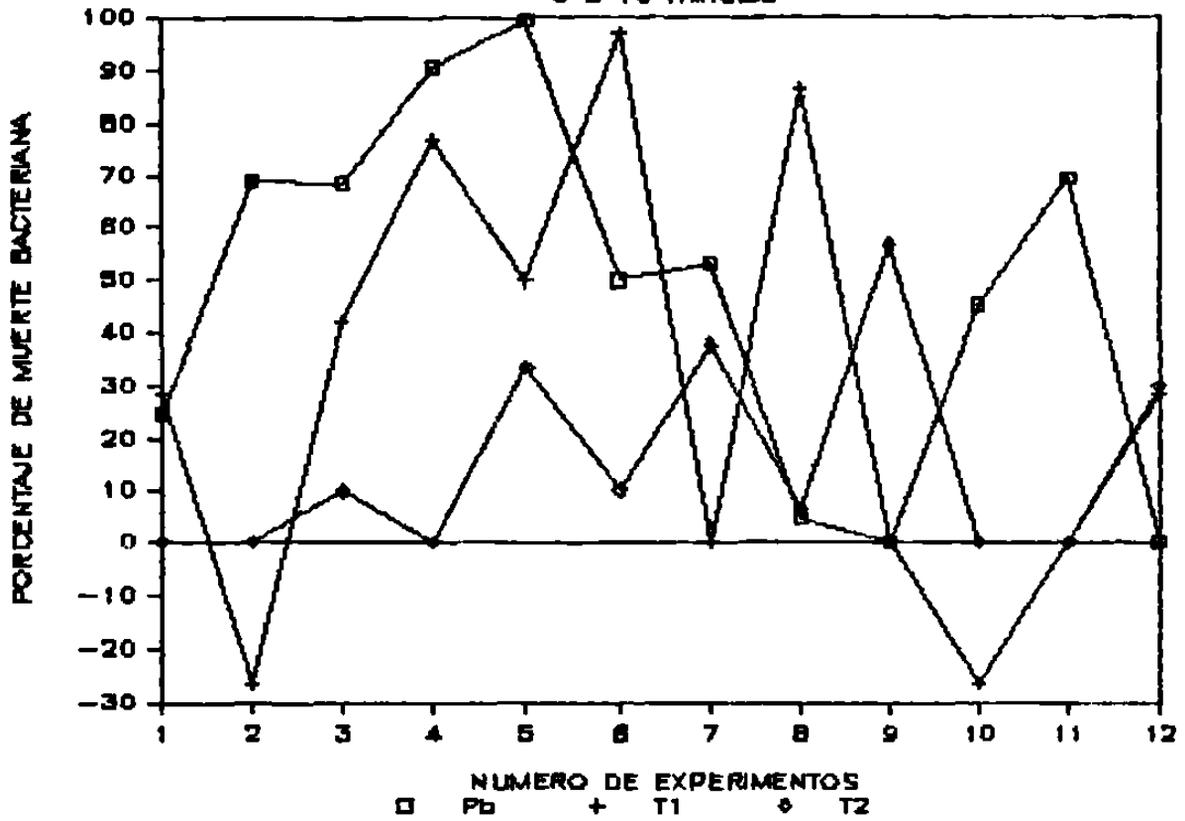






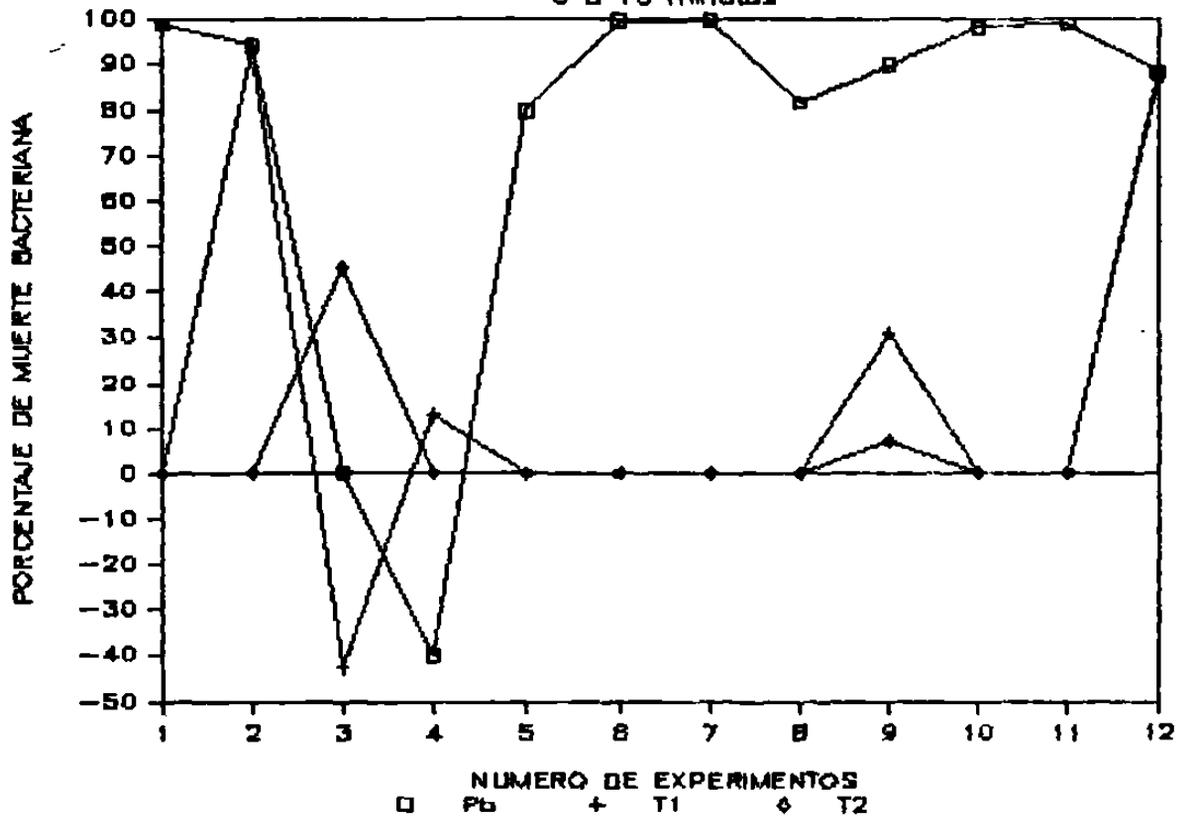
# GRAFICA 25 ANTIBIOTICO CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

0 a 10 minutos



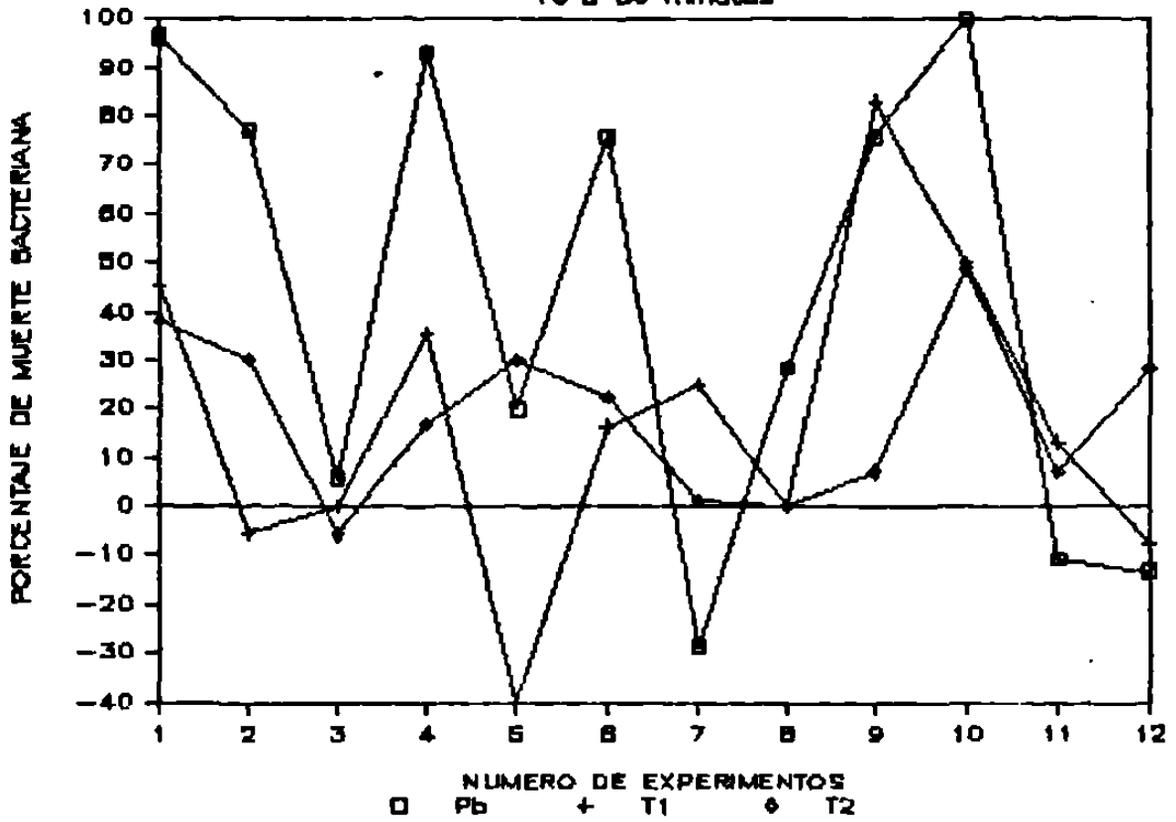
# GRAFICA 26 ANTIBIOTICO OXITETRACICLINA

0 a 10 minutos



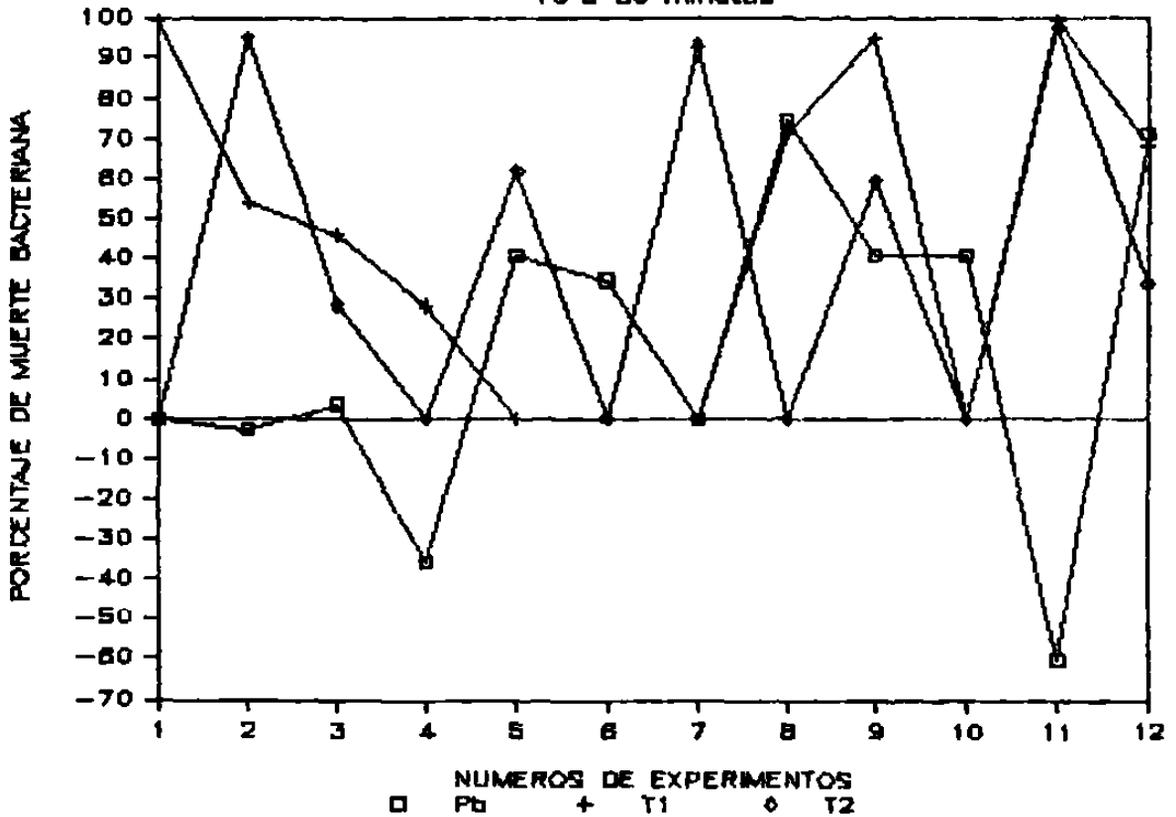
# GRAFICA 27 ANTIBIOTICO CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

10 a 30 minutos



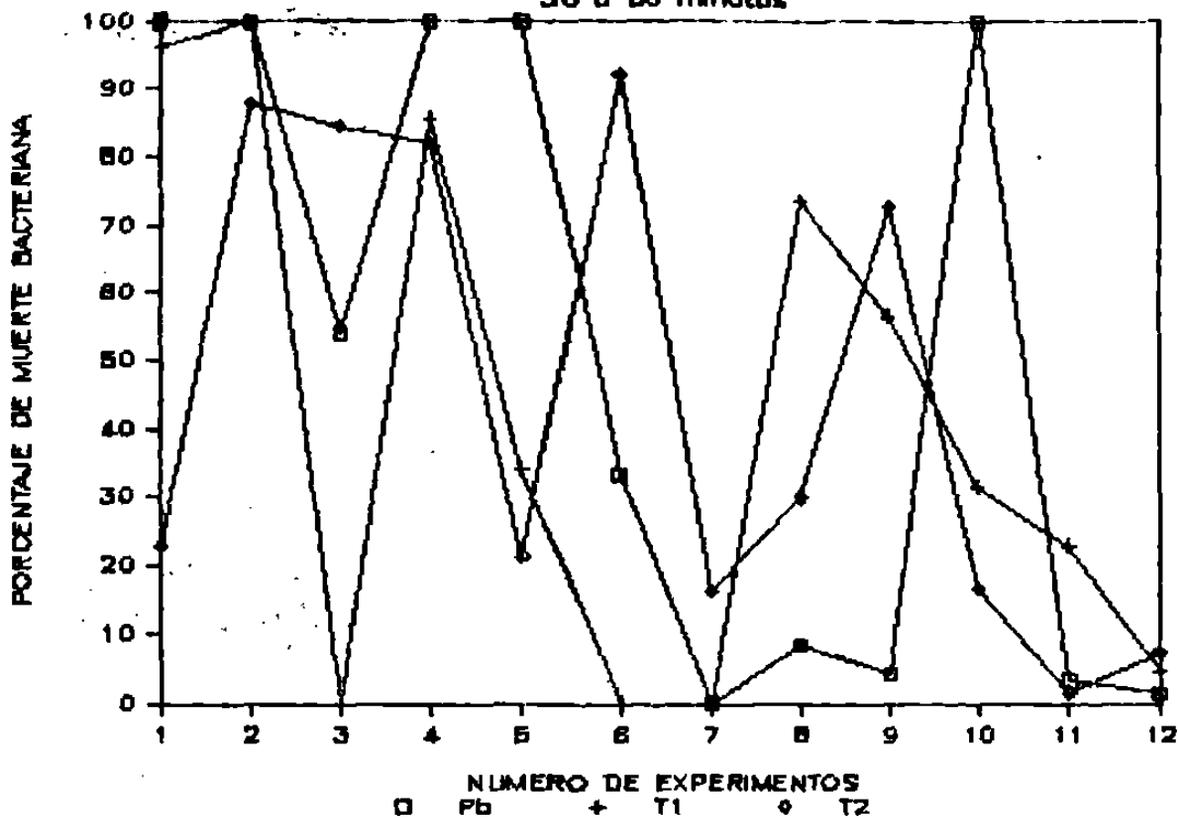
# GRAFICA 28 ANTIBIOTICO OXITETRACICLINA

10 a 30 minutos



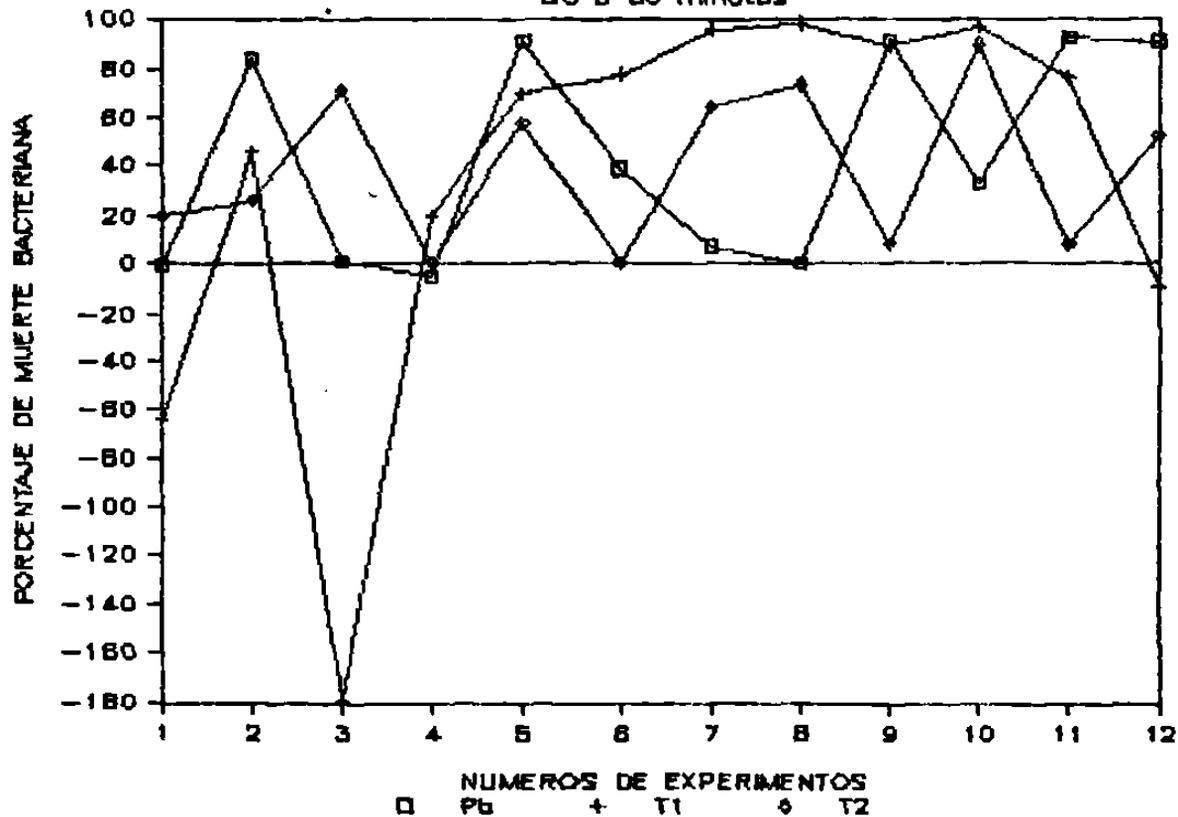
# GRAFICA 29 ANTIBIOTICO CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

30 a 60 minutos



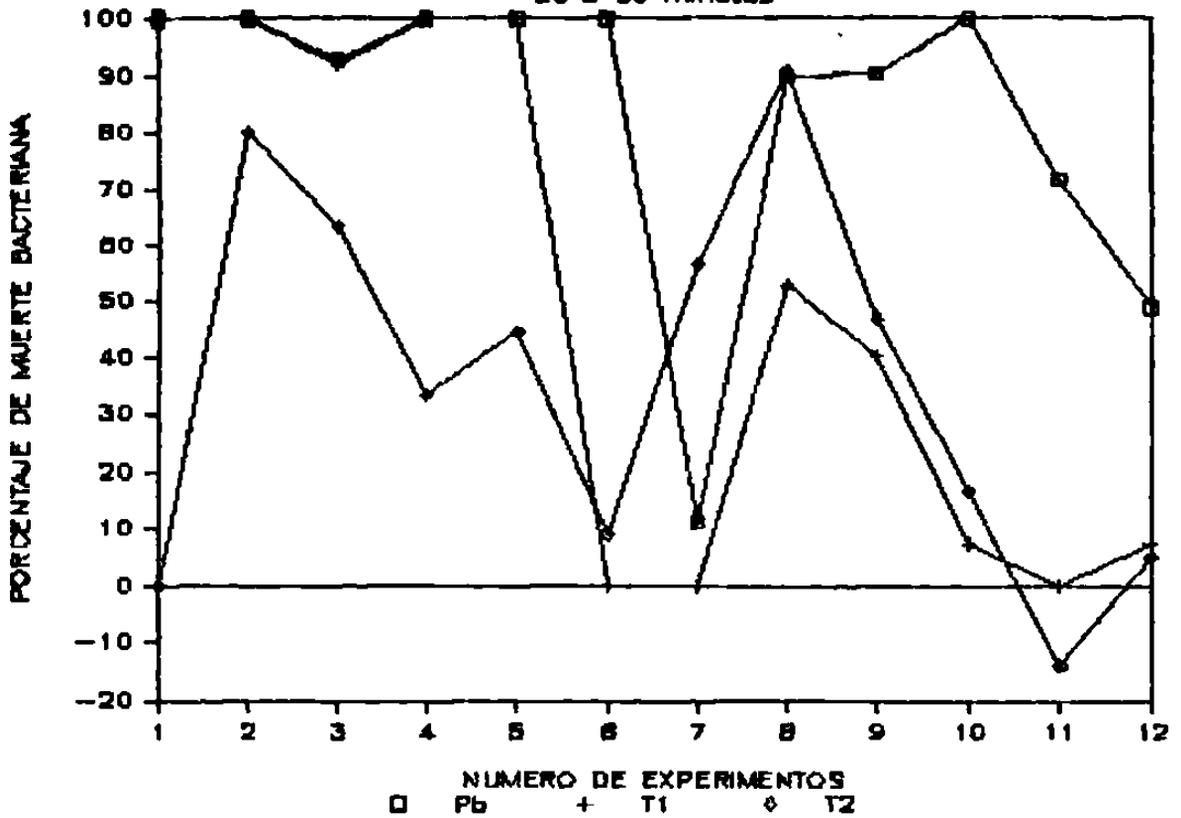
# GRAFICA 30 ANTIBIOTICO OXITETRACICLINA

30 a 60 minutos



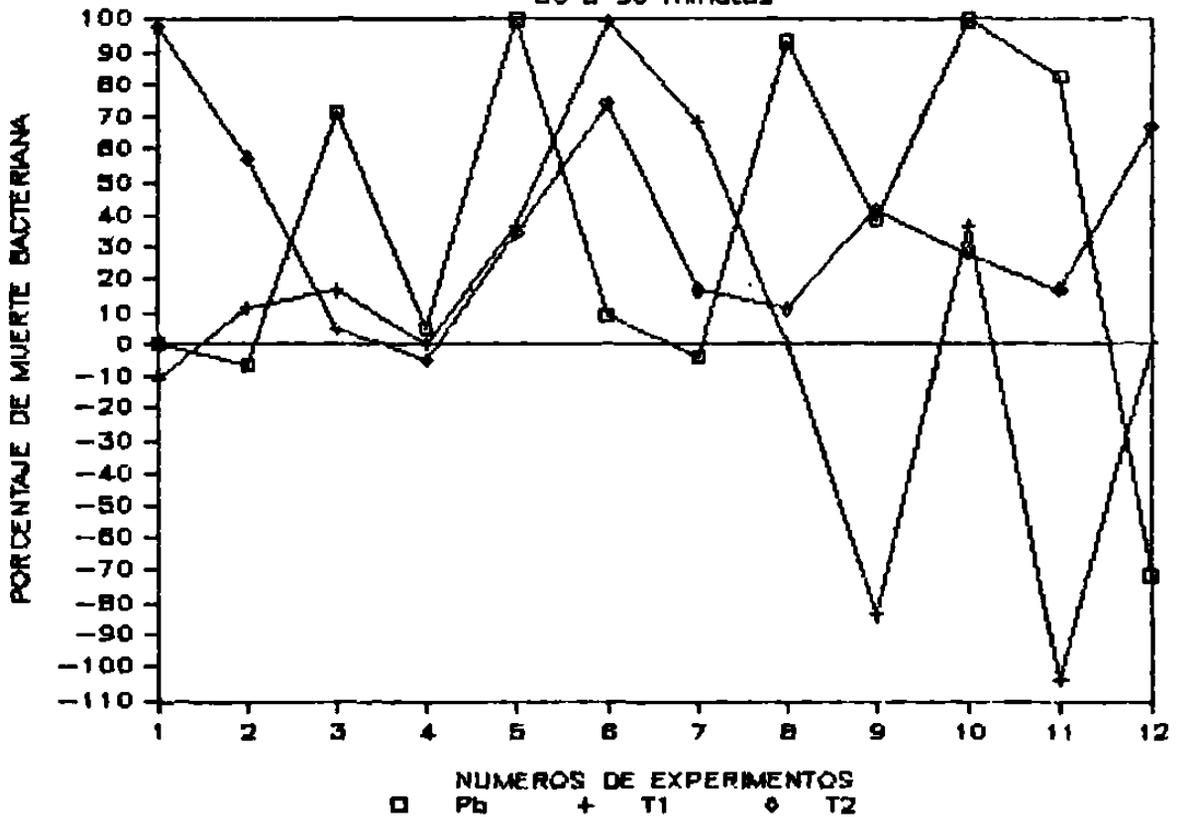
# GRAFICA 31 ANTIBIOTICO CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

80 a 90 minutos

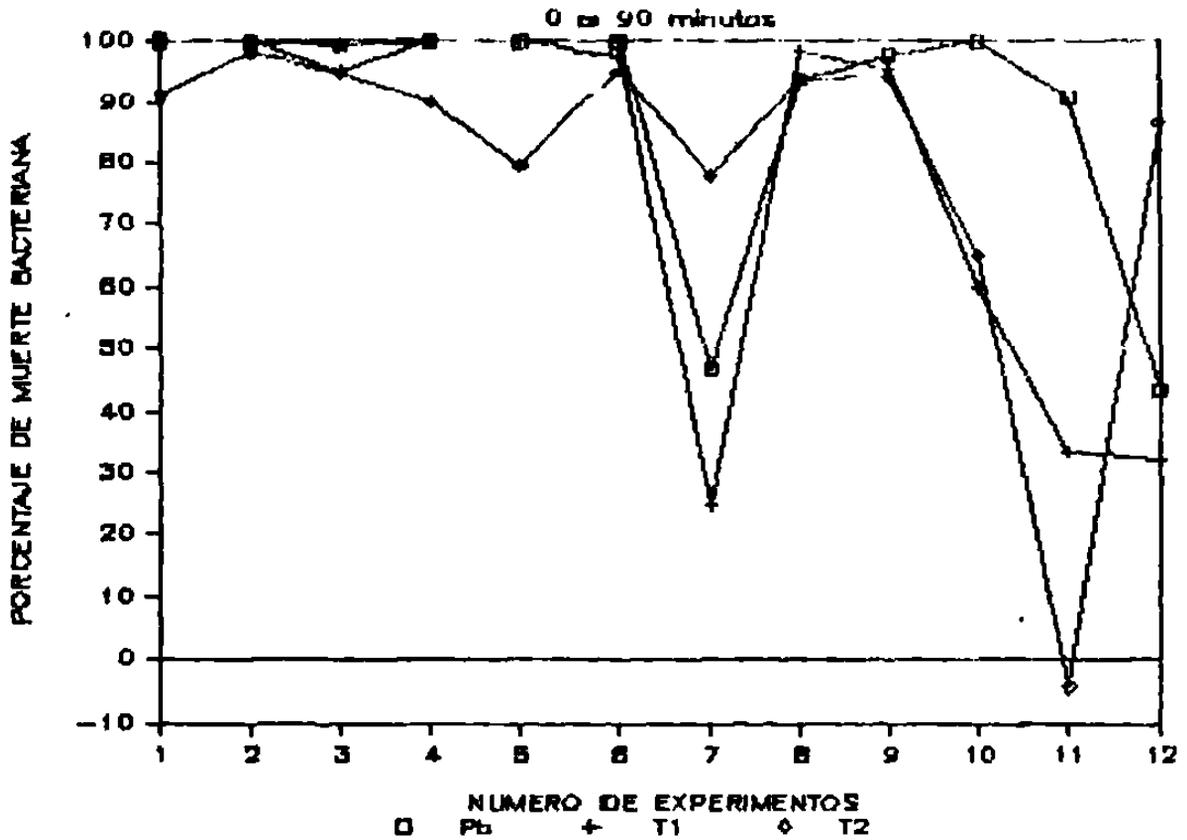


# GRAFICA 32 ANTIBIOTICO OXITETRACICLINA

80 a 90 minutos



### GRAFICA 33 ANTIBIOTICO CLORHIDRATO DE TETRACICLINA



### GRAFICA 34 ANTIBIOTICO OXITETRACICLINA

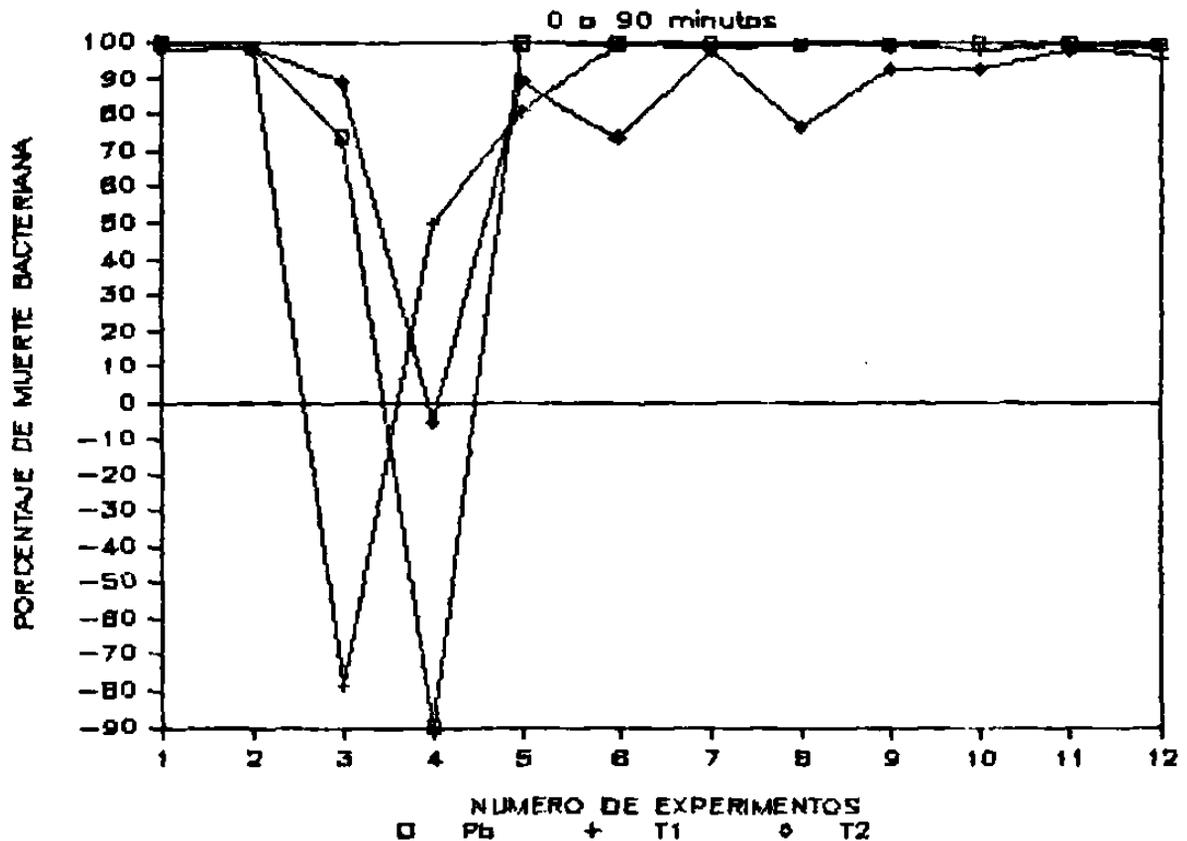


TABLA 15  
CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
Pb 0	$1.2 \times 10^6$	$4.9 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^7$
Pb 10	$1.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^5$	$2 \times 10^2$	$1 \times 10^7$
Pb 30	$3.4 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	0	$2.4 \times 10^6$
Pb 60	$3.1 \times 10^5$	$5.2 \times 10^4$	0	$2.3 \times 10^6$
Pb 90	$5.9 \times 10^5$	$2.6 \times 10^3$	0	$3.4 \times 10^5$
T <sub>1</sub> 0	$1.4 \times 10^6$	$4.3 \times 10^5$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^7$
T <sub>1</sub> 10	$1.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$	$2.5 \times 10^4$	$1 \times 10^7$
T <sub>1</sub> 30	$3.0 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$1.9 \times 10^4$	$1.7 \times 10^6$
T <sub>1</sub> 60	$2.4 \times 10^5$	$6.6 \times 10^4$	0	$1.4 \times 10^6$
T <sub>1</sub> 90	$1.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^4$	0	$4.4 \times 10^5$
T <sub>2</sub> 0	$1.7 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$	$6.9 \times 10^6$	$6 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 10	$1.4 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$4.3 \times 10^3$	$5.4 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 30	$1.2 \times 10^7$	$7.6 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$5.7 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 60	$5.2 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$5.5 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 90	$3.1 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$	$1.0 \times 10^7$

TABLA 16  
OXITETRACICLINA

	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
Pb 0	$3.03 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7$	$1.0 \times 10^4$	$5 \times 10^7$
Pb 10	$9.9 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$	$7 \times 10^6$
Pb 30	$4.6 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	$1.9 \times 10^4$	$1.8 \times 10^6$
Pb 60	$2.5 \times 10^5$	$5.2 \times 10^4$	$7 \times 10^3$	$1.8 \times 10^6$
Pb 90	$4.3 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	0	$1.6 \times 10^5$
T <sub>1</sub> 0	$2.6 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$8 \times 10^3$	$5 \times 10^7$
T <sub>1</sub> 10	$2.5 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$	$7 \times 10^3$	$5 \times 10^7$
T <sub>1</sub> 30	$1.3 \times 10^7$	$4.5 \times 10^5$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^7$
T <sub>1</sub> 60	$1.4 \times 10^6$	$1.2 \times 10^5$	$4 \times 10^3$	$1.1 \times 10^7$
T <sub>1</sub> 90	$3.1 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$4 \times 10^3$	$1 \times 10^6$
T <sub>2</sub> 0	$3.1 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$2 \times 10^6$	$5 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 10	$2.9 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$1.8 \times 10^6$	$5 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 30	$1.8 \times 10^7$	$5.2 \times 10^6$	$7.3 \times 10^6$	$5 \times 10^7$
T <sub>2</sub> 60	$9.9 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$5.4 \times 10^5$	$5 \times 10^6$
T <sub>2</sub> 90	$3.1 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$1.9 \times 10^5$	$1.3 \times 10^7$

## DISCUSION

En los resultados obtenidos con los dos antibióticos se presentaron desde casos alentadores, en los cuales hubo muerte bacteriana intracelular, hasta resultados que indicaron que el antibiótico pudo favorecer el crecimiento bacteriano dentro del leucocito. En los datos de las tablas 15 y 16 se muestran las cifras de la media, la mediana y los mínimos y máximos; y es aquí cuando se aprecia mejor la gran variabilidad que se presentó en muchos de los casos. Debido a esta gran gama de resultados obtenidos no fué posible, -- por desgracia, aplicar ninguna prueba estadística que avale la validéz y significancia de este estudio.

Sin embargo, los resultados de porcentaje de muerte obtenidos de cada rango de tiempo y del rango total señalan datos importantes que deben ser discutidos; por ejemplo el hecho de que en el rango inicial (0 a 10 minutos) hubo mayor muerte bacteriana con oxitetraciclina que con clorhidrato de tetraciclina, indica que el antibiótico penetró en el leucocito; y que fué más efectiva la oxitetraciclina que el clorhidrato, pero al transcurrir el resto del tiempo tuvo mayor efecto éste último antibiótico indicando con esto que conservó por mayor tiempo su efecto, aunque hay que aclarar que ninguno de los dos antibióticos produjo la muerte total en todos los casos. Estos datos coinciden con los de Alexander y

Good (1) quienes mostraron que antibióticos como oxitetraciclina y tetraciclina no fueron capaces de eliminar a bacterias intracelulares, además, pusieron en duda si penetraron en cantidad suficiente en el leucocito.

En  $T_1$  el cual solamente contenía el leucocito con la bacteria, sirvió para mostrar si en verdad la muerte bacteriana fué producida por el antibiótico o por mecanismos germicidas propios del leucocito. De acuerdo a los resultados del tiempo inicial (0 a 10 minutos) se puede apreciar que el efecto del antibiótico fué el que redujo a la población bacteriana, ya que el  $T_1$  en ambos antibióticos la muerte bacteriana fué muy baja, a veces nula, e incluso llegó a presentar aumento celular. Conforme avanzó el tiempo fueron presentándose incrementos de muerte en ambos casos, pero en forma -- más notoria el  $T_1$  del clorhidrato de tetraciclina. Aunque -- aparentemente hubo mayor muerte bacteriana en los  $T_1$  de oxitetraciclina, la diferencia entre los  $T_1$  de los dos antibióticos no es muy notoria, y se puede deducir que si hubo actividad germicida en el leucocito.

Los resultados de  $T_2$  indicaron que inicialmente; -- para ambos casos, la muerte celular fué baja o nula, a excepción de un caso con oxitetraciclina que mostró mortalidad muy alta; en los siguientes rangos de tiempo la mortalidad -- fué incrementándose en forma paulatina para ambos casos, -- aunque no igual que en los de  $T_1$ . En el resultado del rango

total se aprecia que casi no hubo diferencia para ambos antibióticos o si acaso, ligeramente mayor los porcentajes de muerte para clorhidrato. Esto indica que el antibiótico sí actuó fuera de la célula causando muerte bacteriana; y si se comparan  $T_1$  y  $T_2$  el primero tuvo mayores porcentajes de muerte debido a la capacidad enzimática que posee el leucocito para eliminar microorganismos.

De acuerdo a los valores que se aprecian en las tablas 3 y 4 se puede hacer una comparación, entre los porcentajes de muerte bacteriana del rango total (0 a 90 minutos), entre el Pb, el  $T_1$  y el  $T_2$  y discutir si la muerte fue por el efecto del antibiótico o bien por la actividad enzimática generada del leucocito. En el experimento número uno de clorhidrato de tetraciclina, se observa que se produjo 100% de muerte bacteriana para Pb y  $T_1$  y 90.95% de muerte bacteriana para  $T_2$ ; de acuerdo a estos datos se puede concluir que la actividad lisosomal fue la que contribuyó a la eliminación bacteriana ya que el antibiótico por si solo únicamente inactivó el 90.95% de bacterias como lo demuestra el  $T_2$ . Resultados semejantes a estos se presentaron en los experimentos 2, 4 y 5 de clorhidrato de tetraciclina y en los experimentos 1, 6, 8, 9 y 11 de oxitetraciclina, en los cuales se aprecia que el antibiótico por si solo destruyó una cantidad menor de bacterias.

Otro ejemplo es cuando el Pb tiene un mayor porcentaje de muerte que el  $T_1$  como sucedió en los experimentos 3,6,7,9,10,11 y 12 del clorhidrato de tetraciclina y en los experimentos 2,5,7,10 y 12, de oxitetraciclina; aquí lo que se puede concluir es que la presencia del antibiótico contribuyó a aumentar la muerte bacteriana; en cuanto a  $T_2$  se ve que la muerte bacteriana es menor en todos los experimentos mencionados a excepción del experimento 2 del clorhidrato el cual fue ~~prácticamente~~ igual al  $T_1$  lo que indica que la actividad lisosomal en este caso fue poca o nula. En el experimento 7 del clorhidrato de tetraciclina la muerte bacteriana -- fue mayor en  $T_2$  que Pb y  $T_1$  indicando con esto que las bacterias pudieran haber quedado protegidas dentro del leucocito.

En el experimento 8 del clorhidrato de tetraciclina se aprecia el mismo porcentaje de muerte para el Pb y el  $T_2$ , fueron menores que el  $T_1$ , ya que este presentó mayor muerte celular, quizá porque en este caso si hubo actividad lisosomal.

En el experimento 3 de oxitetraciclina sucedió un fenómeno interesante ya que hubo mayor muerte bacteriana en el  $T_2$  que en Pb; en cambio en el  $T_1$  hubo multiplicación bacteriana, aquí se puede discutir que la muerte que se presentó en el Pb fue causada por el antibiótico y no por la actividad lisosomal; y que el leucocito favoreció el desarrollo microbiano.

En el experimento 4 con oxitetraciclina, el Pb y el T<sub>2</sub> presentaron desarrollo bacteriano indicando que en presencia del antibiótico hubo crecimiento; tal vez por ser bacteriostático su efectividad fué por muy poco tiempo; el T<sub>1</sub> presentó el 50% de muerte bacteriana debido probablemente a la actividad germicida del leucocito,

Los resultados anteriormente discutidos señalan una gran variabilidad; que cada experimento se comportó de manera diferente, y la mayoría de las veces no fué posible reproducir con exactitud los resultados. Las explicaciones que se puede dar a estos resultados aquí discutidos son:

- 1.<sup>a</sup> Que el antibiótico, en el caso de Pb del clorhidrato de tetraciclina ayudó a aumentar la eliminación de bacterias.
- 2.<sup>a</sup> En el caso de oxitetraciclina, indica claramente que fué el leucocito, con su capacidad germicida, el que eliminó a los microorganismos y no el antibiótico -- que solo actuó por muy poco tiempo, aunque hay que aclarar que en ése rango (0 a 10 minutos) eliminó -- en 10 casos a una gran cantidad de microorganismos.
- 3.<sup>a</sup> En los casos de sobrevivencia y multiplicación bacteriana, el leucocito pudo haber protegido, en lugar de atacar, y favorecer este desarrollo microbiano como lo demostraron los estudios de Holmes (25), Schaffer (44) y Solberg (46).

4. En el caso de testigo 2, se mostró la efectividad del antibiótico a nivel extracelular, o sea actuando el antibiótico directamente sobre la bacteria. Ya se mencionó que las tetraciclinas son bacteriostáticas, estas pueden inhibir el desarrollo bacteriano solo durante un tiempo, y después se puede presentar un incremento en la población bacteriana.

Partiendo de estas deducciones se puede intentar contestar a los dos objetivos planteados en este proyecto; en el primer objetivo se puede mencionar que la actividad de las dos tetraciclinas en el ambiente intracelular si fueron capaces de actuar sobre las bacterias aunque su efecto varió en el transcurso del tiempo, y en el segundo objetivo se puede contestar que sí hubo diferencia en cuanto a las dos tetraciclinas ya que el clorhidrato de tetraciclinas mantuvo su efecto por más tiempo que la oxitetraciclina; y con esto podemos afirmar en la hipótesis, que el antibiótico al penetrar al leucocito que en su interior contiene bacterias, favoreció la muerte intracelular; aclarando nuevamente que no los eliminó en todos los casos, solo disminuyó su cantidad.

El estudio de la penetración de antibióticos en leucocitos con microorganismos intracelulares es un campo difícil de manejar y más aún de entender. ¿Por qué es difícil?. El simple hecho de trabajar con células vivas, en

este caso leucocitos P.M.N., lo hace difícil por varios motivos, por ejemplo el encontrar animales de laboratorio que respondan adecuadamente para producir exudados, el obtener los leucocitos y mantenerlos durante la etapa experimental en condiciones óptimas de viabilidad. Al superar estos problemas se da un gran paso en el propósito de la investigación.

Los leucocitos P.M.N. (heterófilos) usados en este proyecto, han demostrado que también poseen la mayor parte de las sustancias germicidas encontradas en los P.M.N. humanos. Asimismo se han estudiado las diferencias que pudieran existir entre los heterófilos de la sangre y del exudado peritoneal de conejo (4,42), encontrándose que no hay diferencias entre ambos, excepto la fosfatodiesterasa alcalina que está en mayor proporción en los leucocitos peritoneales (7 a 1) que en los de la sangre.

En bacterias de residencia intracelular como Salmonella enteritidis, al igual que otros microorganismos intracelulares, se desconoce por qué no hay eliminación intracelular, aunque se sabe que no hay unión fagosoma-lisosoma (31,37) y, por lo tanto, esto los hace capaces de sobrevivir en el leucocito por tiempo prolongado (14). Al usar antibióticos se ha visto que no todos penetran a las células y si llegan a penetrar a veces no son muy

efectivos a pesar de que en el medio externo si sean capaces de matar microorganismos; las causas que originan esto se desconoce, aunque como ya se mencionó, hay quienes opinan -- (44, 46) que las bacterias intracelulares quedan protegidas de la acción del antibiótico.

Los resultados obtenidos en este proyecto quizá puedan servir para comparar los ya obtenidos por otros investigadores, en cuanto a la efectividad del antibiótico en el ámbito intracelular. No hay que olvidar que existe gran controversia en esta área de investigación. Por otro lado, hay que alzar que todo se efectuó in vitro; y que in vivo pudieran esperarse resultados completamente diferentes, ya que aquí actuaría la respuesta inmune específica del huésped (9), y con los estudios recientes que se han efectuado, se sabe que juega un papel muy importante en la resolución de enfermedades producidas por este tipo de microorganismos.

Se efectuó este proyecto para comparar la efectividad del clorhidrato de tetraciclina y la oxitetraciclina sobre Salmonella enteritidis fagocitada por leucocitos P.M.N. de conejos. Los leucocitos se obtuvieron por inducción de glucógeno en el peritoneo de conejo y se les practicaron pruebas de viabilidad como fagocitosis y azul de tripano.

Posteriormente los P.M.N. se pusieron en contacto con la bacteria a ensayar, durante 30 a 40 minutos, después se añadió el antibiótico correspondiente a una concentración de 6  $\mu$ gr/ml y se expusieron a tiempos 0, 10, 30, 60 y 90 minutos.

Los resultados indicaron que el clorhidrato de tetraciclina actuó durante casi todo el tiempo del experimento; en cambio la oxitetraciclina actuó más eficientemente durante el rango de 0 a 10 minutos de exposición. En el rango total se observó que tuvieron porcentajes de muerte similares a excepción de un caso de oxitetraciclina en el cual hubo desarrollo microbiano. El  $T_1$  (leucocito y bacterias sin antibiótico) de la oxitetraciclina tuvo mayores porcentajes de muerte que el  $T_1$  del clorhidrato de tetraciclina, aunque en un experimento hubo crecimiento bacteriano. El  $T_2$  (bacteria y antibiótico) tuvo porcentajes de muerte similar en ambos antibióticos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander, J.W. and Good, R.A.- Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. J. Lab. Clin. Med, 1968; 71:971-983.
- 2.- Ariza, J. et al.- Comparative trial of rifampin - - - doxycycline versus tetracycline-streptomycin in the - therapy of human brucellosis. Antimicrob. Agents Chemother. 1985; 28:548-551.
- 3.- Babior, B.M. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J. Med. 1978;298:659-668.
- 4.- Baggiolini, M.; Hirsch, J.G. and Duve, C. Further biochemical and morphological studies of granule fractions from rabbit heterophil leukocytes. J.Cell. Biol. 1970; 45: -- 586-597.
- 5.- Bellanti, J.A. Inmunología, 3a. Ed. México, D.F. Interamericana. 1986. 662 p.
- 6.- Bryant, M.C. Antibióticos y su control mediante el laboratorio. México, D.F. El manual moderno 1976. 125 p.
- 7.- Cohn, Z.A and Hirsch, J.G. The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorpho-- nuclear leukocytes. J. Exp. Med. 1960; 112:983-1004

- 8.-Cohn, Z.A. and Morse, S.I.- Functional and ~~metabolic~~ properties of polimorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 1960; 111:667-687.
- 9.-Collins, F. M.; Mackaness, G.B. and Blanden, R.V. Infection .. Immunity in experimental salmonellosis. J. Exp. Med. 1966; 124:601-619.
- 10.-Committee on Drugs: Requiem for tetracyclines. Pedia- -- trics. 1975; 55:142-143.
- 11.-Cutts. J.H. Cell Separation Methods in Hematology. -- New York and London. Academic Press Inc, 1970, 228 p.
- 12.-Daschner, F.D. Leading article. Antibiotics and host defen- ce with special reference to phagocytosis human polymorpho- nuclear leukocytes. J. Antimicrob. Chemother. 1985; 16: - - 135-141.
- 13.-De Chatelet L.R. Oxidative bactericidal mechanisms of poly- morphonuclear leukocytes. J. Infect. Dis. 1975; 131: 295-303.
- 14.-Druilhet, R.E. and Sobek, J.M. Starvation survival of - - Salmonella enteritidis. J. Bacteriol, 1976; 125: 119-124.
- 15.-Duval, J. y Soussy, C.J.-Manual de Antibioterapia. Barcelona. Toray Masson. 1980. 186 p.

- 16.-Elsbach, P.- On the interaction between phagocytes and microorganism. N. Engl. J. Med. 1975; 289: 846-852.
- 17.-Forsgren, A. and Gnarpe. H.- Tetracyclines and host defense mechanisms. Antimicrob. Agents. Chemother. 1973; 3:711-715
- 18.-Forsgren, A.; Schemling, D. and Quie, P.G.- Effect of tetracycline on the phagocytic function of human leukocytes. - - J. Infect. Dis. 1974; 130: 412-415.
- 19.-Gadebusch, H.H. Phagocytes and cellular immunity. Florida. CRC Press Inc. 1979. 164 p.
- 20.-Glette, J. et al.- Influence of tetracyclines on human - - polymorphonuclear leukocyte function. Antimicrob. Agents Chemother. 1984; 25: 354-357.
- 21.-Glette, J. et al.- Effect of tetracyclines and U.V light - - on oxygen consumption by human leukocytes. Antimicrob. - - Agents Chemother. 1984; 26: 489-492.
- 22.-Goebel, C.W.- Letter: A comment on "requiem for tetracyclines" Pediatrics. 1976; 57: 279-298.
- 23.-Hand, W.L. and King-Thompson, N.L.- Contrasts between - - phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. Antimicrob. Agents. Chemother. 1986; - - 29: 135-140.

- 24.-Hoeprich, P.D, and Martin, C.H.- Effect of tetracycline, --  
polymyxin B and rifampin on phagocytosis. Clin. Pharmacol.  
Ther. 1970; 11: 418-422.
- 25.-Holmes, B; Quie, P.G. et al. Protection of phagocytized --  
bacteria from the killing action of antibiotics. Nature --  
(London). 1966; 210: 1131-1132.
- 26.-Hopps, H.E. et al.- Effect of antibiotics on intracellular  
Salmonella typhosa. J. Immunol. 1961; 87: 162-174.
- 27.-Jawetz, E; Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. Microbiología  
Médica. 11a Ed. México, D.F. El Manual Moderno 1985. 588 p.
- 28.-Jukes, T.H. Some historical notes on chlorotetracycline. -  
Rev. Infect. Dis. 1985; 7: 702-707.
- 29.-Kossach, R.E. et al.- Diminished neutrophil oxidative - --  
metabolism after phagocytosis of virulent Salmonella typhi  
Infect. Immun. 1981; 31: 674-678.
- 30.-Krieg, N.R. and Holt, J.G. (Ed). Bergey's Manual of Systematic  
Bacteriol. Vol. I Baltimore/London Williams and --  
Wilkins . 1984. 964 p.
- 31.-López, R.y Sánchez J.- Aspectos de la relación huésped parásito  
en brucelosis. Infectología. 1986; 6: 499-507.
- 32.-Mackness, G.B. The action of drugs on intracellular tubercle  
bacille. J.Pathol.Bacteriol. 1952; 64: 429-446.

- 33.- Majeski, J.A. and Alexander, J.W.- Evaluation of tetracycline in the neutrophil chemotactic response. J. Lab. Clin. Med. 1977; 90: 259-265.
- 34.- Mandell, G.L.- Interaction of intraleukocytic bacteria -- and antibiotics. J. Clin. Invest. 1973; 52: 1673-1679.
- 35.- Martin, R.R. et al.- Effects of tetracycline on leukotaxis. J. Infect. Dis. 1970; 129: 110-116.
- 36.- Nelson, E.L. and Becher, J.R.- The effect of whole-body X radiation on the bactericidal activity of phagocytic cells. J. Infect. Dis. 1959; 104:13-23.
- 37.- Porras, M.- Legionella (segunda de tres partes). Infectologia. 1986; 6: 339-348.
- 38.- Prokesch, R.C. and Hand, W.L.- Antibiotic entry into -- human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents, -- Chemother. 1982; 21: 373-380.
- 39.- Richardson, M. and Holt, J.N.- Synergistic action of streptomycin with other antibiotics on intracellular Brucella abortus in vitro. J. Bacteriol. 1962; 84: 638-646.
- 40.- Rodríguez, M.A. Microbiología Médica. Monterrey, N.L. 1983. 258p.
- 41.- Root, R.K. and Cohen, M.S. The microbicidal mechanisms of human -- neutrophils and eosinophils. Rev. Infect. Dis. 1981; 3: 565-598.

- 42.- Rousch, P.G. and More, T.G. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: a phylogenetic comparison. *Blood*. -- 1975; 40: 913-919.
- 43.- Sánchez, M.S.; Ford, Ch.W. and Yancey Jr. R.J.- Evaluation of antibacterial agents in a high-volumen bovine polymorphonuclear neutrophil Staphylococcus aureus intracellular - - - killing assay. *Antimicrob. Agents.Chemother.* 1986; 29: - -- 634-638.
- 44.- Schaffer, J.M; Kucera C. J. and Spink, W.W. The protection of intracellular *Brucella* against therapeutic agents and the bactericidal action of serum. *J. Exp. Med.* 1953; 97: 77-91.
- 45.- Showacre, J.L. et al.- Effects of antibiotics on intracellular Salmonella typhosa. *J. Immunol.* 1961; 87: 153-161.
- 46.- Solberg, C.O. Protection of phagocytized bacteria against antibiotics. *Acta. Med. scand.* 1972; 191: 383-387.
- 47.- Solberg, C.O. et al.- Penetration of antibiotics in to human leukocytes and dermal suction blisters. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5(Suppl. 3): 468-473.
- 48.- Takamori, K. and Yamashita, T. Biochemical properties of - - polymorphonuclear neutrophils. from venous blood and peritoneal exudates of rabbits. *Infect. Immun.* 1980; 29: 395-400.

- 49.-van den Broek, P.J; Buys, L.F. and Mattie, H.- Effect of -  
penicillin G on Staphylococcus aureus phagocytosed by --  
human monocytes. J. Infect. Dis. 1986; 153: 586-592.
- 50.-van Furth, R. Phagocytic Cells in the defense againts in--  
fection: introduction. Rev. Infect. Dis. 1980; 2:104-128.
- 51.-Veale, D.R; Finch, H. and Smith, H. Penetration of peneci--  
llin into human phagocytes containing Neisseria gonorrhoeae.  
intracelular survival and growth at optimum concentrations  
of antibiotic. J. Gen. Microb. 1976; 95: 353-363.
- 52.-Vosbeck, K; James, P.R. and Zimmermann, W.- Antibiotic - -  
action on phagocytosed bacterial measured by a new method  
for determining viable bacteria. Antimicrob. Agents. - --  
Chemother. 1984; 25: 735-741.
- 53.-Yoshida, S. et al.- Effects of tetracyclines on experimental  
Legionella pneumophila infection in guinea pigs.J. Antimi-  
crob. Chemother. 1985; 16: 199-204.

