

Efectos de la gentamicina sobre las células esplénicas de ratones

H. PAUSTE Y C. SILVA LEÓN

*Grupo de Inmunología.
Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
La Habana, Cuba*

Recibido: 5 de enero de 1976

ABSTRACT. C57BL/6 mice received gentamycin or vehicle during the primary immune response against sheep red blood cells. The high dose of gentamycin administered was toxic for the spleen cells and caused a reduction in the number of plaque forming cells the fourth day the immune response.

RESUMEN. Se suministró gentamicina a ratones C57BL/6, o el vehículo disolvente de la gentamicina, durante la respuesta primaria contra glóbulos rojos de carnero. La alta dosis de gentamicina que se empleó resultó tóxica para las células esplénicas y produjo una reducción en número de células formadoras de placas en el 4to. día de la respuesta inmunológica.

INTRODUCCION

La antibioticoterapia durante un proceso infeccioso puede tener consecuencias negativas sobre los mecanismos de defensa del individuo contra los microorganismos, por efecto directo sobre el sistema inmunológico o por alteraciones cuantitativas y cualitativas de los microorganismos como antígenos (*Planelles y Jaritnova, 1967*).

A partir de la década del 60 se vienen publicando numerosos trabajos experimentales y de hallazgos clínicos, donde se reportan efectos inmunodepresores de los antibióticos utilizados contra las infecciones; además de los efectos inmunodepresores de los antibióticos usados en el tratamiento contra las enfermedades neoplásicas. En conejos, ratas, ratones y en humanos se ha reportado efectos depresores de la respuesta inmunológica causados por el cloranfenicol y sus análogos, tanto de la síntesis

de anticuerpos como de la inmunidad mediada por células, en la respuesta primaria y en la respuesta secundaria (*Weisberger y cols., 1964; Schoemberg, 1967; Weisberger y Daniel, 1969; Petrescu y cols., 1972*). La adriamicina, tetraciclina, estreptomycin, etc.; producen perturbaciones en los mecanismos inmunológicos de defensa y de homeostasis del organismo (*Isaeta y cols., 1971; Sadoff y Eckberg, 1973; Watkins y Krueger, 1970*).

La gentamicina es un antibiótico del grupo de los aminoglicosídicos. Produce efectos nefrotóxicos y ototóxicos en los tratamientos prolongados y en los pacientes con disfunción renal previa; ambos efectos nocivos pueden hacerse irreversibles si no se suspende el tratamiento rápidamente cuando aparecen los primeros síntomas de toxicidad (*Cox, 1970; Hewitt 1974*).

Los mecanismos de acción de los antibióticos aminoglicosídicos como la estreptomycin, la dihidroestreptomycin, la neomicina, kanamicina, gentamicina, etc. sobre las bacterias han sido extensamente estudiados. Todos producen alteraciones similares de inhibición de la síntesis de proteínas por los ribosomas y alteraciones de la lectura del ARN-mensajero (*Gale y cols., 1972*).

En este trabajo comenzamos el estudio de los efectos de la gentamicina sobre la respuesta inmunológica y sobre los sistemas celulares que en ella intervienen, empleando animales de experimentación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones machos C57BL/6, cuyos pesos oscilaron entre 19 y 25 g. Los ratones fueron separados al azar en dos grupos: un grupo recibió diariamente 0,32 mg de sulfato de gentamicina por g de peso, repartidos en dos inyecciones, durante 4 días: al otro grupo se le suministró una cantidad equivalente en volumen del vehículo (disolvente) de la gentamicina. El vehículo está constituido por: Metil parabeno 1 80 mg; Propil parabeno 0,20 mg; Bisulfito de sodio 3,20 mg; EDTA 0,10 mg; Agua destilada CSP 1 ml.

Ambos grupos fueron inmunizados con $1,0 \times 10^8$ glóbulos rojos de carne-ro suspendidos en disolución Salina tamponada intraperitonealmente. Previamente se determinó que esta dosis producía la respuesta máxima de células productoras de placas de hemólisis al cuarto día de la estimulación.

Se probaron varias dosis de glóbulos rojos de carnero entre 5.0×10^6 y 5.0×10^9 . Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical al tercero, cuarto y octavo día de la administración del antígeno y se les extrajo el bazo para el estudio de las células productoras de placas de hemólisis directa contra glóbulos rojos de carnero (*Cunningham y Zeenberg, 1968*).

Las cámaras para las placas de hemólisis en medio líquido se construyeron con dos portaobjetos separados por cinta adherente por las dos caras y se sellaron con parafina derretida, después de ser llenadas con la suspensión de células esplénicas y glóbulos rojos de carnero. Como medio de cultivo se empleó Parker tamponado con TRIS-HCl y suero de cobayo fresco. La incubación se realizó durante 90 minutos a 37°C . Las placas de hemólisis fueron contadas en un "lector de microfilmes" con un aumento de 6,5 veces. El número de placas de hemólisis se expresó en relación al número total de células en la suspensión sin hacer consideraciones relativas a la viabilidad.

Se determinó la viabilidad de las células esplénicas de dos grupos de 9 ratones cada uno, los cuales recibieron glóbulos rojos, gentamicina o vehículos disolvente en igual forma que la ya descrita. Se contó el número de células vivas y muertas después de incubarlas en medio con azul de tripano al 0.3% durante 5 minutos, a 37°C .

La comparación de los resultados entre los grupos de ratones tratados con antibiótico y los controles que recibieron el vehículo disolvente se realizó mediante el test t de Student. Los valores obtenidos en las placas de hemólisis se transformaron en logaritmos. Para las comparaciones de las viabilidades los valores en por ciento se transformaron en arco sen \sqrt{P} , expresados en radianes.

RESULTADOS

En el tercer día de la respuesta se estudiaron 5 ratones de cada grupo.

La media del número de placas de hemólisis por 10^6 células esplénicas de los animales tratados con gentamicina fue de 17 placas y la media de los tratados con vehículo fue de 40 placas. Las medias de estos dos grupos no difirieron significativamente.

Los valores del cuarto día de la respuesta se hallaron a partir de los resultados obtenidos con 11 ratones en cada grupo de tratamiento. La

media alcanzada por los animales que recibieron antibiótico fue de 426 placas por 10^6 células esplénicas; la media obtenida con los ratones inyectados con vehículo fue de 736 placas. Esta diferencia resultó ser significativa ($p < 0.01$). Al octavo día las medias fueron de 175 placas en el caso de los ratones que recibieron gentamicina y de 163 en el grupo de ratones tratados con el vehículo disolvente. La pequeña diferencia entre las medias no es significativa y los resultados obtenidos con los animales estudiados simultáneamente fueron muy similares (Tabla I).

TABLA I

Placa de hemólisis/10⁶ Cel. esplénicas

GENTAMICINA			VEHICULO		
3er. día	4to. día	8vo. día	3er. día	4to. día	8vo. día
7	215	175	17	942	167
8	305	151	38	760	121
21	279	360	123	515	382
32	256	123	34	787	162
33	593	163	36	578	188
	893	102		949	123
	794	155		896	171
	333			611	
	696			811	
	616			617	
	297			787	
$\bar{X} = 17$	$\bar{X} = 426$	$\bar{X} = 175$	$\bar{X} = 40$	$\bar{X} = 736$	$\bar{X} = 163$

Al determinar la viabilidad de las suspensiones de las células esplénicas, al cuarto día de la estimulación antigénica, se encontró un menor número de células vivas en los bazos procedentes de los ratones que recibieron gentamicina que en sus controles con vehículo. Las viabilidades promedios fueron de 67% para el tratamiento con antibiótico y de 80.7% para los controles (Tabla II). Esta diferencia resultó ser significativa, ($p < 0.001$).

TABLA II

Test de viabilidad con azul de tripán. Por ciento de células esplénicas vivas

GENTAMICINA	VEHICULO
65%	80%
75	73
67	78
68	86
57	87
60	75
67	70
76	92
67	81
$\bar{X} = 67\%$	$\bar{X} = 80.7\%$

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La disminución en el número de células productoras de anticuerpo contra los glóbulos rojos de carnero que se encontró en el cuarto día de la respuesta primaria de los ratones inyectados con gentamicina puede ser debida a: un efecto depresor de la gentamicina sobre la síntesis de inmunoglobulinas; la acción tóxica del antibiótico sobre las células esplénicas por la dosis elevada que se empleó y por modificación de los glóbulos rojos de carnero como antígeno o por el aumento de la fagocitosis y destrucción, con la consiguiente disminución del antígeno disponible.

Como la dosis empleada fue entre 4 y 20 veces superior a las dosis extremas empleadas en el tratamiento contra las infecciones, aunque 5 veces inferior a la dosis letal media descrita por Fujisawwa y cols., (1974), ratones blancos de 20 g de peso (dosis única), el resultado encontrado en esta experiencia puede deberse a un efecto tóxico del antibiótico sobre las células esplénicas.

A elevadas concentraciones quizás el efecto tóxico no se limite al riñón y al aparato auditivo, sino que afecte también otros sistemas celulares.

El hecho de haber encontrado una disminución de la viabilidad entre los animales que recibieron gentamicina, inclina a pensar que a esta concentración el antibiótico ejerce una acción tóxica sobre el bazo, inhibiendo la síntesis proteica en general o interfiriendo otros mecanismos vitales. Al hacer la corrección del número de células vivas en las suspensiones de trabajo, en tres ratones tratados con gentamicina y tres tratados con el vehículo, se produjo una equiparación del número de placas de hemólisis de los dos grupos (Tabla III).

TABLA III

Corrección del número de placas de hemólisis teniendo en cuenta la viabilidad

	% cels. vivas	Placas/10 ⁶ cels.	Placas/10 ⁶ cels. vivas
GENTAMICINA	67	696	1550
	76	616	1066
	67	297	650
VEHICULO	70	611	1246
	92	811	959
	81	617	940

Este resultado está a favor de que la disminución en el número de placas de hemólisis se produce por muerte celular y que no son más sensibles las células que se encuentran sintetizando anticuerpos como producto de una estimulación antigénica primaria que el resto de las células esplénicas. Para confirmar esta suposición es necesario aumentar el número de animales en los cuales se haga la corrección para el número de células vivas y trabajar con distintas dosis del antibiótico, fundamentalmente dosis más bajas, y explorar el efecto del antibiótico durante la respuesta secundaria. Es necesario resaltar que en ninguno de los ratones que recibieron la gentamicina, ni en los ratones empleados en otras experiencias con dosis similares, se ha observado trastornos del equilibrio, ni otros trastornos ostensibles por simple inspección del animal vivo.

En un pequeño grupo de ratones tratados con dosis subletales de gentamicina se encontró una disminución de los megacariocitos del bazo y la

disminución del peso del órgano en relación al peso corporal, con índice esplénico de Simonsen inferior a la unidad.

En cuanto a la tercera explicación añadiremos que se ha encontrado que los macrófagos peritoneales al destruir los glóbulos rojos del carnero, administrados por ésta vía y en dependencia de la dosis de glóbulos empleada, disminuyen la cantidad de antígeno disponible y por lo tanto la respuesta de síntesis de anticuerpo se reduce (*Perkins y Makinodan, 1965; Perkins, 1970*).

Adam y cols., (1971) encontraron una estimulación de la fagocitosis y de la capacidad bactericida de los macrófagos peritoneales de ratones tratados in vitro con gentamicina. El aumento de la fagocitosis y del catabolismo también pueden estar determinados por la modificación del antígeno causada por el antibiótico (*Planelles y Jaritonova, 1967*). En un grupo de ratones inyectados con gentamicina se encontró aumento de la hemocateresis esplénica con relación a los ratones usados como controles (*Sanabria y Pauste*).

No se encontró diferencia en el número de células que sintetizan hemolisina en el octavo día, entre los ratones tratados con gentamicina o con vehículo.

El antibiótico se suministró hasta dos días después de administrado el antígeno; seis días después el antibiótico ha sido completamente eliminado y el bazo podría recuperar sus funciones normales.

Para que al octavo día la respuesta sea igual en ambos grupos es necesario que el antibiótico no influya sobre la cantidad y la calidad de los glóbulos rojos de carnero como antígeno o que en este día la síntesis de anticuerpos hemolíticos varíe menos que el cuarto día dentro de un determinado rango de dosis de glóbulos rojos.

REFERENCIAS

- ADAM D., PHILIPP P. AND BELAHRODSKY B. H. Studies on the influence of hostdefence mechanisms on the antimicrobial effect of chemotherapeutic agents. Effect of antibiotics on phagocytosis of mouse-peritoneal macrophase in vitro. *Arztl. Forsch.* 25, 181, 1971.
- Cox E. C. A review on properties and uses of gentamicin. *Med. Clin. North Am.* 54, 1305, 1970.

- CUNNINGHAM A. J. AND ZENBERG A. S. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology* 14, 599, 1968.
- FUJISAWA K. I., HOSHIYA T. AND KAWAZUCHI H. Aminoglycoside antibiotics. VII. Acute toxicity of aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiotics*, 27, 677, 1974.
- GALE E. F., CUNDIFFE E., REYNOLDS P. E., RICHMOND M. H. AND WARING M. J. The Molecular Basis of Antibiotics Action. 290-305, J. Wiley, New York, 1972.
- HEWITT W. L. Gentamicin: toxicity in perspective. *Postgrad. Med. J.* 50, (suppl 7), 55, 1974.
- ISAETA A. M., INTINI C. AND SOLDATI M. On the immunodepressive action of adriomycin. *Experientia (Basel)* 27, 202, 1971.
- PERKINS E. H. AND MAKINODAN T. The suppressive role of mouse peritoneal phagocytes in agglutinin response. *J. Immunol.*, 94, 765, 1965.
- PERKINS E. H. Digestion of antigen by peritoneal macrophages. Mononuclear Phagocytes. 562, Ed. Van Furth, London, 1970.
- PETRESCU D., MARA G. AND VERONESE M. Humoral antibody production following primary and secondary immunization in rabbits treated with thiamphenicol and chloramphenicol. *Chemotherapy* 17, 200, 1972.
- PLANELLES J. Y JARITONOVA A. Modificación del curso del proceso infeccioso a consecuencia de la depresión de las reacciones inmunológicas provocadas por los antibióticos. Nocividad de los Antibióticos. 388. Ed. MIR. Moscú, 1967.
- SADOFF L. AND ECKBERG T. Lymphoepithelioma after long-term tetracycline for acne. *Lancet* I, 675, 1973.
- SANABRIA J. Y PAUSTE H. Gentamicina y morfología esplénica en ratones. *Revistas CNIC, Ciencias Biológicas* (en publicación).
- SCHOEMBERG M. D. Differentiation and functional expression of potential antibody producing cells in the presence of chloramphenicol. *J. Cell. Biol.* 32, 401, 1967.
- WATKINS A. AND KRUEGER R. G. Antibody synthesis in vitro: The antigenic reactivity of antibodies coliphage MS-2 synthesized in presence and absence of streptomycin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 135, 750, 1970.
- WEISBERGER A. S., DANIEL T. M. AND HOFFMAN A. Suppression of antibody synthesis and prolongation of homograft survival by chloramphenicol. *J. Exp. Med.* 120, 183, 1964.
- WEISBERGER A. S. AND DANIEL T. M. Suppression of antibody synthesis by chloramphenicol analogs. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 131, 570, 1969.