

CAPACIDAD HEMOLÍTICA DE LA CEFALOSPORINA C

Hemolytic efficiency of cephalosporine C

Cárceles, C. M.; Escudero, E.; López, M. C

Cátedra de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Recibido: 23-1-91

Aceptado: 5-6-91

RESUMEN

Se ha estudiado la actividad hemolítica de la cefalosporina C sódica sobre eritrocitos de conejo «in vitro» en presencia de ClNa 0'093 M, encontrándose que esta sustancia prácticamente carece de capacidad hemolítica.

Asimismo se han determinado los valores de los coeficientes hemolíticos («i») y osmótico («g») para esta misma sustancia obteniéndose unos valores medios de 2'35 para «i» y 1'17 para «g».

Palabras Clave: Cefalosporina C sódica, capacidad hemolítica, coeficiente osmótico.

SUMMARY

We have studied the hemolytic activity of sodium cephalosporine-C on erythrocytes of rabbit «in vitro» in presence of sodium chloride 0.093 M. This compounds lacks practically any hemolytic activity.

We have also determined the values of the hemolytic (i) and osmotic (g) coefficients for this antibiotic, resulting a mean values of 2.35 for «i» and 1.17 for «g».

Keywords: Sodium cephalosporine c, hemolytic capacity, osmotic coefficient.

INTRODUCCIÓN

Las soluciones de fármacos destinadas a la administración parenteral y/o ocular deben ser isotónicas para disfrutar de la correspondiente

tolerancia, adaptándose a las condiciones de los fluidos orgánicos. Si se inyectan en vena cantidades muy pequeñas de líquido, apenas se produce dolor o irritación, aún cuando la solución no sea isotónica, pues se produce una rápida

dilución en la sangre. Por el contrario, la administración de algunos mililitros de una solución no isotónica provocará alteraciones hemáticas (VOIG, 1982).

Las soluciones hipotónicas pueden hacerse isotónicas mediante la adición de sales adecuadas, sin embargo ello no es posible con las soluciones hipertónicas (SOKOLOSKI, 1987).

Es un hecho conocido que las proteasas procedentes de granulocitos y macrófagos son responsables de los mecanismos de destrucción de los tejidos, incluyendo la artritis reumatoide (HARRIS, 1981). De acuerdo con ello los inhibidores específicos y selectivos de estas proteasas son llamados a ser potentes agentes antiinflamatorios útiles en el tratamiento de estados que dan lugar a la destrucción del tejido conjuntivo. Recientemente ha sido descubierto que las cefalosporinas sustituidas a altas concentraciones son potentes inhibidores de la elastasa neutrófila (MERCK & Co.)*, enzima que posee el más amplio espectro frente a sustratos naturales del tejido conjuntivo.

Sin embargo, la utilización de estos productos a elevadas concentraciones, supone la utilización de soluciones hipertónicas que podrían ocasionar variaciones osmóticas en la sangre; además de que estas sustancias pueden causar, por sí mismas, de forma ocasional anemia hemolítica (BANG y KAMMER, 1983). Por ello, el objetivo del presente trabajo es pues evaluar el posible riesgo que en el terreno hematológico podría suscitarse por el empleo de concentraciones de cefalosporina c comprendidas entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se han empleado 10 conejos comunes sanos, que no recibieron ningún producto medicamentoso desde 25 días antes del comienzo de la experiencia, a los que se extrajo 15 mL de sangre mediante punción cardíaca. La sangre extraída era desfibrinada inme-

diatamente mediante agitación suave con perlas de vidrio durante 10 min, período de tiempo suficiente para la desfibrinación y arteriolización de la sangre por aireación. En el desarrollo de toda la experiencia se utilizó siempre sangre fresca.

Al objeto de contrastar la técnica experimental y determinar el volumen óptimo a emplear en las condiciones de trabajo, se han hallado las absorbancias a distintos volúmenes de sangre; (concretamente se han realizado 5 series de 9 volúmenes de sangre distintos 0'025, 0'050, 0'075, 0'100, 0'125, 0'150, 0'175, 0'200, 0'225 mL) completando a 10 mL con agua destilada para obtener una hemólisis total.

De cada uno de los tubos se tomaba 1 mL de líquido sobrenadante y se realizaba la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 2000 a 540 nm, longitud de onda donde se obtiene el máximo más característico de la oxihemoglobina en el espectro visible (DANIEL y ALBERTY, 1975).

La representación gráfica de las densidades ópticas o absorbancias en función de los volúmenes de sangre empleados nos da una línea recta cuyo coeficiente de regresión ($r = 0'9968$ y $r^2_{100} = 99'36$) es altamente significativo ($p < 0'001$), cumpliéndose satisfactoriamente la ley de Lambert-Beer en todo el intervalo.

Con la ecuación obtenida, que relaciona el volumen de sangre con la absorbancia, pudimos observar que el volumen óptimo de sangre a utilizar en nuestra experiencia es de 0'129 mL, ya que corresponde a la hemólisis total y al valor 1 de absorbancia, por lo que el cálculo resulta extraordinariamente cómodo.

El método seguido para la determinación del grado de hemólisis de los eritrocitos en las diversas soluciones ha sido en líneas básicas el descrito por HUNTER (1940), aunque empleando el volumen de sangre que hemos considerado anteriormente. Este método consiste en colocar 10 mL de la disolución problema, por duplicado, en dos tubos de ensayo; se adicionan 0'129 mL de sangre desfibrinada y aireada, se

taponan los tubos y se agitan suavemente para lograr una homogeneidad completa. Tras ello, los tubos se trasladan a un baño a $37(\pm 0.5)$ °C durante 45 minutos. Al finalizar este período se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos, se recoge el líquido sobrenadante y se procede a su lectura de absorbancia a 540 nm frente a un blanco de solución salina al 8 por mil, sin cefalosporina C sódica, que era sometido a idéntica manipulación. El cálculo del porcentaje de hemólisis se hace dividiendo el valor medio de la lectura de absorbancia de la disolución problema por la absorbancia correspondiente a la disolución concreta de sangre en agua destilada y multiplicando este cociente por 100.

Para estudiar el poder hemolítico de la cefalosporina C se realizaron 5 series de 10 concentraciones distintas (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 130 mg/mL) con sus blancos, sin cefalosporina C sódica, correspondientes.

La determinación del coeficiente del van't Hoff o coeficiente isotónico (i) de la cefalosporina C sódica, se ha realizado empleando el método de GROSICKI y HUSA (1954), evitándose el error debido a la variable fragilidad globular mediante comparación de la hemólisis en una solución dada con la hemólisis en cloruro sódico.

Se realizaron, al igual que en el experimento anterior, 5 series de 10 concentraciones distintas de este compuesto (0.5, 1, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 30, 40 mg/mL) en agua destilada con sus respectivos blancos.

RESULTADOS

Con los valores de absorbancia obtenidos en las cinco series de cefalosporina C sódica en solución salina, hemos obtenido los porcentajes

CUADRO I
PORCENTAJES MEDIOS DE HEMÓLISIS, CON SUS CORRESPONDIENTES ESTADÍSTICOS, OBTENIDOS PARA LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CEFALOSPORINA C SÓDICA EN SOLUCIÓN SALINA AL 8 POR MIL

CONCENTRACIÓN DE CEFALOSPORINA C	% MEDIO DE HEMOLISIS	S. \bar{X} .	C.V.
5 mg/mL	1.36	0.1208	0.1987
10 mg/mL	0.44	0.1327	0.6742
20 mg/mL	1.56	0.1320	0.1476
30 mg/mL	1.68	0.1113	0.1476
40 mg/mL	2.06	0.1691	0.1482
50 mg/mL	2.54	0.1631	0.1436
60 mg/mL	2.80	0.2702	0.2158
70 mg/mL	3.50	0.1871	0.1195
100 mg/mL	4.12	0.1393	0.0756
130 mg/mL	4.62	0.6000	0.0581

Temperatura = 37 °C Tiempo de incubación = 45 minutos.

de hemólisis medios que aparecen en el Cuadro 1, junto con sus estadísticos.

En todos los experimentos llevados a cabo, se ha tenido especial cuidado con el pH de las disoluciones a estudiar, ya que la concentración isotónica debe depender de alguna manera del pH de la disolución. Así, SETNIKAR y TOMELCOU (1959) observaron que el volumen celular aumenta en las disoluciones ácidas y disminuye en las alcalinas, aunque se mantuviera constante la concentración de cationes (155 mEq/l de Na), por lo que deducen que la presión osmótica de los eritrocitos aumenta en contacto con disoluciones ácidas y disminuye cuando las disoluciones tienen carácter básico.

En nuestras disoluciones el pH no ha descendido nunca de 6'9, manteniéndose en valores próximos en todo momento a los fisiológicos.

El coeficiente de van't Hoff (*i*) puede definirse como la relación entre el efecto coligativo producido por una molalidad dada y el efecto observado de la misma molalidad de un no-electrolito (MORRIS, 1982). El coeficiente osmótico (*g*), se define como la relación de una propiedad coligativa observada, a la que debería ser si la disolución fuese completa (MARTÍN, 1983). La ecuación que relaciona el coeficiente osmótico «*g*» con el de van't Hoff «*i*» es la siguiente:

$$g = i/r \quad (1)$$

donde *r* es el número de iones de un peso-fórmula cualquiera.

Los términos «*i*» y «*g*», empleados de esta forma para electrolitos y no-electrolitos en disolución, indican el grado de disociación.

A efectos prácticos, el cálculo del valor de «*i*» se realiza fácilmente si conocemos la concentración de cloruro sódico y la de cualquier otro compuesto que produzca el mismo grado de hemólisis mediante la siguiente ecuación:

Se determinan los grados de hemólisis producidos por diferentes concentraciones de cloruro sódico a 37°C y los grados de hemólisis producidos por diferentes concentraciones del compuesto en agua a la misma temperatura. Se leen en las respectivas curvas las concentraciones en gr/100mL de cloruro sódico y del compuesto que producen el 25, 50, 75% de hemólisis, y los valores obtenidos se sustituyen en la ecuación anterior, obteniéndose los correspondientes valores de «*i*» para la sustancia problema. Este procedimiento implica el conocimiento del coeficiente isotónico para el cloruro sódico a la temperatura de experimento, que en nuestro caso, y tras el consiguiente estudio, adoptó el valor de 1'86 (ecuación 1) para los tres porcentajes de hemólisis (25, 50, 75%) valor que coincide con el calculado por HUSA y ADAMS (1954) para una temperatura de 25°C. Para ello se realizó un experimento hemolítico con cloruro sódico en el intervalo de concentraciones de 0'36 a 0'54% p/v, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, excepto que para cada prueba se emplearon 4 tubos de cada concentración, dos que se mantuvieron a 25°C durante 45 min. y otros dos que se mantuvieron a 37°C durante el mismo tiempo. Los tubos mantenidos a 25°C fueron considerados como patrones de factor «*i*» conocido (HUSA y ADAMS, 1954).

Los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo para la determinación de tanto por ciento de hemólisis en la curva hipotónica de cloruro sódico, así como los obtenidos cuando la cefalosporina C sódica se encuentra disuelta en agua destilada en el intervalo de las concentraciones de trabajo, aparecen en el Cuadro 2.

Las concentraciones de cloruro sódico leídas de la curva hemolítica hipotónica, que causan un 25, 50 y un 75% de hemólisis y las

$$\frac{(\text{«i» del ClNa}) \times (\text{gr de ClNa/100 mL})}{\text{Peso molecular del ClNa}} = \frac{(\text{«i» otro compuesto}) \times (\text{gr otro compuesto /100mL})}{\text{Peso molecular del otro compuesto}} \quad (2)$$

concentraciones de cefalosporina C sódica que causan el mismo grado de hemólisis en disolución acuosa, aparecen en el Cuadro 3.

Los valores de «i» se han determinado apli-

cando la ecuación 2 para los tres porcentajes de hemólisis, que se reflejan en el Cuadro 4.

Los valores de los coeficientes osmóticos «g», calculados a partir de los valores de los

CUADRO 2
PORCENTAJES MEDIOS DE HEMÓLISIS, CON SUS CORRESPONDIENTES ESTADÍSTICOS, OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACIÓN DE CLNA Y CEFALOSPORINA C SÓDICA EN AGUA DESTILADA

CONCENTRACIÓN	% MEDIO DE HEMÓLISIS	C.V.
<i>ClNa (% p/v)</i>		
0'36	100	—
0'38	75 ± 0'32	9'43.10 ⁻³
0'40	50 ± 0'84	0'0374
0'42	40 ± 0'45	0'0251
0'44	25 ± 0'73	0'0654
0'46	18 ± 0'81	0'0989
0'48	12 ± 0'63	0'1178
0'54	3 ± 0'80	0'6389
<i>Cefalos.(mg/mL)</i>		
0'5	100	—
1'0	99'2 ± 0'37	8'43.10 ⁻³
5'0	82'0 ± 0'71	0'0193
10'0	73'2 ± 0'07	0'0326
12'5	63'0 ± 0'84	0'0297
15'0	53'2 ± 0'49	0'0206
17'5	49'8 ± 0'20	8'43.10 ⁻³
20'0	39'6 ± 0'60	0'0339
30'0	7'8 ± 0'37	0'1073
40'0	0'0	—

CUADRO 3
CONCENTRACIONES DE CLNA (% P/V) Y DE CEFALOSPORINA C SÓDICA (MG/ML) EN DISOLUCIÓN ACUOSA QUE CAUSAN EL 25, 50 Y 75% DE HEMÓLISIS

	PORCENTAJE DE HEMÓLISIS		
	25	50	75
ClNa0'44	0'40	0'38
Cefalosporina C	24'60	16'60	8'50

CUADRO 4
VALORES DE LOS COEFICIENTES HEMOLÍTICO (I) Y OSMÓTICO (G) DE
LA CEFALOSPORINA C SÓDICA PARA EL 25, 50 Y 75% DE HEMÓLISIS

	PORCENTAJE DE HEMÓLISIS			
	25	50	75	MEDIA
Valor de «i»	1'4544	1'9593	3'6352	2'3496
Valor de «g»	0'7272	0'9796	1'8176	1'1748

coeficientes hemolíticos «i» de la cefalosporina C sódica, aplicando la ecuación 1, se muestran en el Cuadro 4.

DISCUSIÓN

La cefalosporina C sódica, tras observar los resultados obtenidos (Cuadro 1), carece en la práctica de actividad hemolítica sobre los eritrocitos de conejo «in vitro», ya que a concentraciones elevadas, como es 130 mg/mL tan sólo se obtiene un 4'6 % de hemólisis, lo cual no es significativo al compararlo con los reportados por SIERRA (1971) para los tres primeros términos de la serie de las isoxazoilpenicilinas.

Podemos esperar con alta probabilidad que se obtendrá idéntico resultado «in vivo», habida cuenta que las condiciones de ensayo han sido a temperatura y pH muy próximos a los fisiológicos.

Al observar los porcentajes de hemólisis producidos a distintas concentraciones de cefalosporina C sódica en agua destilada (Cuadro 2) se observa que al aumentar las segundas disminuyen los primeros. Efectivamente el estudio estadístico mediante regresión por mínimos cuadrados nos indica que existe una alta correlación ($p < 0'001$) entre la concentración del compuesto y el porcentaje de hemólisis, ya que obtenemos un coeficiente de correlación «r» de Pearson de 0'9985 y un coeficiente de determinación del 99'10%. Existe, por tanto, una rela-

ción lineal entre estas variables, cuyas expresiones matemáticas son:

$$\% \text{ de hemólisis} = -3'0809 \cdot \text{concentración(mg/mL)} + 101'2277$$

$$\text{Concentración(mg/mL)} = -0'3217 \cdot \% \text{ de hemólisis} + 32'6770$$

Los valores de «i», determinados por el método hemolítico, dependen parcialmente de las propiedades de la sustancia para la que se determina dicho valor y de la permeabilidad del eritrocito a dicha sustancia. El empleo de cloruro sódico como patrón de referencia elimina cualquier dificultad de reproductividad de los factores biológicos implicados.

Los términos «i» y «g» usados a lo largo de este trabajo indican el grado de disociación. Los términos hemolíticos «i» y los valores isosmóticos «g» tienen el especial significado de ser una medida de la actividad hemolítica; es decir, un valor más elevado de «i» para una determinada sustancia indica que ésta proporciona una mayor protección contra la hemólisis de los eritrocitos que otra sustancia con el mismo número de iones que peso-fórmula, con el valor de «i» más bajo. Esto mismo es aplicable para los valores de «g».

En nuestro caso hemos obtenido un valor medio de «i» de 2'35, que es muy semejante al valor máximo esperado según la ley límite de Debey-Huckel (DANIELS y ALBERTY, 1975) que sería de 2. Igual ocurre con el valor medio de «g» que con un valor de 1'17 se acerca mucho al valor máximo de 1 esperado para este parámetro.

Nuestros valores son menores a los reportados por SIERRA (1971), para una serie de penicilinas semisintéticas, que oscilan entre 4'78 a 4'6 para «i», y entre 2'64 y 2'53 para «g». Por otra parte nuestros resultados nos dan valores superiores a 1'86 (valor de «i» para el cloruro sódico) lo que nos indica que la cefalosporina C sódica presenta una buena protección contra la hemólisis de eritrocitos de conejo, contribuyendo este soluto a la tonicidad de las disoluciones acuosas.

BIBLIOGRAFÍA

- BANG, N. U. y KAMMER, R. B. (1983): Hematologic complications associated with β -lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 5: 380-393.
- DANIELS, F. y ALBERTY, R. A. (1975): *Physical Chemistry* 4th ed. Wiley. New York.
- GROSICKI, T. S. y HUSA, W. S. (1954): *J. Am. Pharm. Ass. ed.*, 43: 632-636.
- HARRIS, E. D. Jr. (1981): Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Textbook of Rheumatology*. KELLY, W. N., HARRIS, E. D., RUDDY, S. & SLEDGE, C. B. (eds.) WB Saunder. Philadelphia.
- HUNTER, F. T. (1940): The coefficients isosmotic solutions of the sodium chloride. *J. clin. Invest.*, 19: 691.
- HUSA, W. J. y ADAMS, J. R. (1954): Reductive role of glutathione in the hemolysis generate by antimicrobial agents. *J. American Pharm. Ass.*, 33: 329.
- MARTIN, A. N. (dir.) (1983): *Physical Pharmacy*. Lea & Febiger. Philadelphia.
- MORRIS, J. G. (1982): *Fisicoquímica para biólogos*. Ed. Reverté S.A. Barcelona.
- SETNIKAR, I. y TOMELCOU, O. (1959): *J. Am. Pharm. Sci. ed.* 48: 628-633.
- SIERRA DE CASTRO, M. (1971): Actividad hemolítica y secuencia estructural de las series alfa-amil-oxialquil e isoxazolil-penicilina. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de León.
- SOKOLOSKI, TH. D. (1987): Soluciones y equilibrio de fases. En: *Remington Farmacia*. GENNARO, A. R. dir. 17.^a ed. Panamericana. Buenos Aires.