

Acción del Cloramfenicol sobre el embrión de pollo

por

Gloria Pacheco de Arauz* y Carlos Ma. Arauz Aguilar*

(Recibido para su publicación el 24 de octubre de 1975)

Abstract: The most important effects of Chloramphenicol in several groups of 72- and 96-hour-old chick embryos are: (a) inhibition of growth expressed by termination of stages of reached development and the compared mortality between the different groups; (b) appearance of macro- and microscopic hemorrhages of the parenchyma of organs and connective tissues; and, (c) absence of vascular continuity and the presence of immature red cells in the tissues. While these anomalies may not be caused by the drug, since they occur in the same percentages between the groups treated with chloramphenicol and those with distilled water, their severity could be attributed to the various concentrations of the drug.

Interesados en el mecanismo de acción de drogas teratógenas iniciamos este estudio con el Succinato de Cloramfenicol, Parke Davis, que seleccionamos por ser una droga de composición química conocida y amplio uso clínico. El efecto tóxico del cloramfenicol en el humano ha sido descrito ampliamente y los textos modernos de medicina lo citan entre las drogas que ocasionalmente pueden producir aplasias medulares (Cecil y Loeb, 1968) y púrpuras trombocitopénicas sintomáticas (Harrison y Adams, 1966). Aronson y Spiegelman (1961) demostraron la inhibición de la síntesis proteica del cloramfenicol a altas concentraciones en protoplastos de *Bacillus megaterium*; Herrmann (1963) en observaciones sobre la síntesis proteica en tejidos de embrión de pollo cultivados *in vitro*, menciona también la acción inhibidora del cloramfenicol sobre el aumento de nitrógeno proteico y la incorporación de glicina $1-C^{14}$.

En nuestro trabajo investigamos los efectos del cloramfenicol en el embrión de pollo *in ovo* a diferentes edades, esperando que a la dosis adecuada, los resultados podrían ser la detención del crecimiento debido a la inhibición de síntesis proteica y otros que pudiera considerarse específicos, pero que tomando en cuenta los efectos conocidos en el humano, sospechamos que serían sobre los centros hematopoyéticos.

* Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

Con lo anterior deseamos hacer notar que estamos estudiando el mecanismo de acción a diferentes niveles y aunque no se conoce el efecto teratógeno del cloramfenicol en embriones de pollo, los resultados preliminares parecen indicar que sí lo hay.

MATERIAL Y METODOS

Trabajamos con huevos fértiles de gallina Honegger (mezcla de White Leghorn con la raza Strange II) procedente de una granja comercial, una incubadora Petersime regulada a una temperatura de 37,5 a 38 C y a una humedad relativa de 80-86%, con rotación automática cada dos horas.

Los embriones eran de 72 a 96 horas de edad, que de acuerdo con los estudios de **Karnofsky** (1965), son los más sensibles a la acción de los diversos teratógenos y se determinó la dosis posiblemente teratógena que resultó ser entre 3 y 5 mg, escogiéndose la de 4 mg.

El Succinato de Cloramfenicol (Parke Davis) fue disuelto en agua destilada de uso comercial y se usó jeringas de tuberculina con agujas calibre 22. La cantidad a inyectar fue uniforme, de 0,16 cc de solvente o de solución de cloramfenicol en dosis única, este volumen es bien tolerado por el embrión. Se inyectó el cloramfenicol (o la solución) a través de la cámara de aire y el orificio se cerró con parafina. En el Cuadro 1 se ve la distribución de los embriones utilizados.

Todos los huevos incubados se observaron diariamente al ovoscópio para ver la viabilidad del embrión y los embriones muertos se fijaron en Bouin o en Carnoy si eran de edad temprana y en formalina al 10% si eran de mayor edad. Todos los embriones se clasificaron según los estadios de **Hamburger** (1951) y se observaron al microscopio estereoscópico. Algunos embriones cuyo estadio era menor al 30 se incluyeron en parafina y se cortaron en serie a 15 ó 20 μm , tiñéndose con hematoxilina-eosina.

Todos los grupos se dejaron llegar a la máxima sobrevivencia espontánea, así los embriones del grupo testigo en su mayoría llegaron a picar. Los resultados se sometieron a análisis estadísticos en el Departamento de Bioestadística de la Facultad de Medicina de El Salvador.

RESULTADOS

Los resultados más importantes fueron: inhibición del crecimiento, hemorragias visibles, macro- y microscópicamente y la presencia de anomalías. Cada uno de ellos se describe en detalle a continuación.

Inhibición del crecimiento: El porcentaje de mortalidad en el grupo testigo fue normal (Figs. 1 y 2) y la curva resultante podía esperarse por las descripciones hechas por algunos autores para ritmo de crecimiento (**Hamilton**, 1952).

Es evidente que hay una diferencia de mortalidad estadísticamente significativa entre el grupo testigo y los grupos de embriones de 72 y 96 horas inyectados con el solvente. Nosotros interpretamos este hecho en el sentido que el aumento de mortalidad en los grupos inyectados con el solvente puede deberse a causas traumáticas, y como la diferencia es mayor entre el grupo testigo y el de solvente en los embriones de 96 horas que entre el grupo testigo y el de solvente en los de 72 horas, esto nos hace pensar que hay otros factores que deben tomarse en consideración, entre ellos la edad y las estructuras que se estén formando en ese momento. Por

dificultades técnicas no se investigó si la muerte era debida a infección en ambos grupos.

Pensamos que la inhibición del crecimiento por el cloramfenicol llegó a ser total al causar la muerte en el 100% de casos de los grupos tratados y que puede expresarse en términos de estadios de desarrollo alcanzado y de mortalidad observada en los diversos grupos.

Las gráficas de mortalidad acumulativa enfatizan muy bien el fenómeno de acción de la droga. En la Figura 1 vemos que la separación entre las curvas solvente-cloramfenicol es progresivamente mayor a medida que el embrión avanza en su desarrollo.

El fenómeno que se observa en la Figura 2 es menor pues la separación entre las curvas solvente-cloramfenicol sólo se hace bien evidente del estadio 33 hasta el 41, alcanzando su máximo en los 38 y 39. Esto nos hace pensar de nuevo que la edad es factor determinante en el aumento de mortalidad en embriones de 96 horas tratados con el solvente y que hay otros factores que no podemos especificar al momento.

En el Cuadro 1 puede observarse la relación entre el número de embriones muertos y vivos de los diferentes grupos en cantidades absolutas y porcentajes relativos al total.

CUADRO 1

*Resultados absolutos y relativos de la inyección del solvente y de cloramfenicol en el vitelo de embriones de pollo de 72 y 96 horas de incubación **

Tratamiento	No. de huevos	Edad de incubación	Vivos	%	Muertos	%**
Grupo testigo	89	--	82	19,90	7	1,70
0,16 cc de solvente	83	72	61	14,80	22	5,34
4 mg cloramfenicol en 0,16 cc de solvente	83	72	0	0	83	20,14
0,16 cc de solvente	79	96	10	2,43	79	16,75
4 mg de cloramfenicol en 0,16 cc de solvente	78	96	0	0	78	18,93
Totales	412		153	37,13	259	62,86

* Los cálculos de X^2 efectuados igualmente entre los grupos inyectados con el solvente y los tratados con cloramfenicol a la edad respectiva dieron como resultado una diferencia significativa ya que siempre fue mayor que $X^2_{0,95} = 3,84$ (5% de confiabilidad estadística), lo que significa que la droga tiene una acción directa al detener el crecimiento y causar la muerte en ambas edades.

** Del total de 412 huevos.

Hemorragias: En los grupos tratados con el solvente se observó hemorragias en 2,40% de los embriones de 72 horas y en 7,59% en los de 96 horas. En los dos grupos tratados con cloramfenicol, se las observó en 56,16% de los de 72 horas y en 38,89% de los de 96 horas. Al examen macroscópico después del diagnóstico de muerte en los grupos tratados con la droga, el saco vitelino se veía pálido y los vasos vitelinos poco desarrollados, los vasos corioalantoideos se vieron igualmente atróficos. El embrión por el contrario se veía congestionado, su aspecto hemorrágico contrastaba notablemente con la palidez de las membranas. Las hemorragias fueron más evidentes a nivel del encéfalo, aunque se encontraban también en los mesonefros y miembros. Se veían algunos vasos de gran calibre dilatados y congestionados, como las venas cardinales anteriores, lo mismo que los atrios. Algunos embriones en los estadios 40 al 42 presentaron una prominencia en la región occipital. Al hacer la disección con el microscopio estereoscópico se encontró que los músculos cervicales posteriores estaban hemorrágicos (Hemorragia en capa).

Al examen de los cortes en serie de embriones menores coloreados con hematoxilina-eosina, el fenómeno de hemorragia fue más notorio (Fig. 3). Las venas cardinales de la cabeza pueden verse dilatadas y los tejidos inundados de células inmaduras, lo mismo que los vasos de otros órganos como hígado (Fig. 5), mesonefros, paredes del cuerpo, etc. En el endotelio de algunos vasos se encontró una falta de continuidad (Fig. 4) en todos los embriones examinados al microscopio. En los tejidos conectivos, además de células mesenquimatosas, se ven otras células similares

CUADRO 2

Frecuencia de anomalías encontradas en embriones de pollo de 72 y 96 horas inyectados con solvente y cloramfenicol

Tratamiento	Edad Horas del Embrión	Embriones normales	%	Embriones anormales	%	Total	%
Grupo Testigo	--	79	19,18	10	2,42	89	21,60
Solvente	72	51	12,38	32	7,76	83	20,14
Cloramfenicol	72	57	13,83	26	6,31	83	20,14
Solvente	96	55	13,35	24	5,83	79	19,18
Cloramfenicol	96	50	12,13	28	6,80	78	18,93
Totales		295	70,87	120	29,12	412	99,99

a las contenidas en los vasos sanguíneos por lo que creemos que se trata de glóbulos rojos en vías de maduración. La hemorragia tisular fue bien notoria en la mayoría de los casos. **Romanoff** (1960) dice que la presencia de glóbulos rojos en los tejidos debe considerarse anormal. Nosotros, sin embargo, encontramos en los tejidos algunas células que nos parecieron precursoras de los eritrocitos en embriones sanos del grupo testigo, cortados para comparar con los sujetos al tratamiento. Las hemorra-

gias tan grandes como las encontradas en los embriones tratados con la droga son totalmente anormales.

En los cortes en serie los tejidos del sistema nervioso central, hígado, epitelio de tubo digestivo, etc., presentaban evidencias de necrosis celular. Un ejemplo de esta destrucción de tejidos se observa en la Figura 6. Este embrión se sacrificó cuando ya presentaba signos de próxima muerte para investigar si la necrosis que habíamos visto en los órganos era o no un fenómeno post-mortem. Hay además vacuolización en los tejidos que van perdiendo la estructura normal y esta se hizo más evidente en los tejidos de sostén del tronco de la mayoría de los embriones.

Anomalías: en el Cuadro 2 se ve la frecuencia de anomalías en cantidades absolutas y relativas, y en el 3, los diferentes tipos de ellas en cada uno de los grupos. Los cálculos χ^2 entre el grupo testigo y los de 72 y 96 horas inyectados con el solvente demuestran una diferencia significativa. La diferencia de frecuencia entre grupos tratados con el solvente y con el cloramfenicol es mínima y no tiene valor estadístico (Cuadro 2). Pensamos que el factor traumático común a ambos grupos puede ser la causa determinante de la frecuencia similar de anomalías.

Llama la atención la diferencia en el tipo de anomalías entre los grupos del solvente y los tratados con cloramfenicol. En los primeros grupos las anomalías dominantes son de los miembros (Cuadro 3).

CUADRO 3

Diferentes clases de anomalías encontradas en embriones de pollo vivos y muertos tratados con solvente y con cloramfenicol

Anomalías	Embriones testigo	Solvente		Cloramfenicol		Total embriones anormales	% *
		72 hrs.	96 hrs.	72 hrs.	96 hrs.		
Torsión anormal de cuello y tronco		5	7	15	4	31	25,83
Anomalías de los miembros	8	22	14	4	3	51	42,5
Dehiscencia de la pared anterior	1	1	1	2	21	26	21,66
Edema		2		3		5	4,17
Micromelia	1					1	0,83
Enanismo		1				1	0,83
Anomalías del pico		1	2	2		5	4,16
Totales	10	32	24	26	28	120	99,99

* Del total de 120 huevos.

En ambos grupos de embriones tratados se encontraron torsiones anormales en el cuello y en el tronco (Fig. 7), siendo más frecuentes en los de 72 horas tratados con cloramfenicol.

Las anomalías de los miembros fueron las siguientes: flexión de los dedos de las patas, que pudo verse también en embriones que nacieron vivos, miembros posteriores en extensión marcada y en algunos casos los dedos en posiciones anormales. Se encontró dehiscencia de la pared anterior del tronco y abdomen en diferentes etapas del desarrollo, principalmente en los embriones de 96 horas inyectadas con cloramfenicol (Figs. 7, 8, 9). La dehiscencia abarcó solamente la parte derivada del mesodermo lateral y era en algunos casos parcial, reduciéndose a ectopía cordis o total y en este caso el corazón, esófago, la molleja, intestinos, hígado y partes del mesonefros quedaban expuestos. El septum transversum, sin embargo, se encontró bien formado con excepción de la porción derivada de los pliegues laterales de las paredes del cuerpo.

Las otras anomalías mencionadas se encontraban sólo en pocos casos y no las consideramos importantes desde el punto de vista de especificidad ni estadístico.

CONCLUSIONES

La inhibición del crecimiento como una acción directa de la droga, nos la explicamos por su acción sobre las membranas vitelinas, cuyas funciones son esencialmente de intercambio respiratorio y de hematopoyesis y que interfiriendo en esta última evitaría el desarrollo normal. Estos resultados nos recuerdan el papel que juega el cloramfenicol como un bloqueador de la síntesis proteica al reemplazar o desplazar los aminoácidos (Gale, 1958).

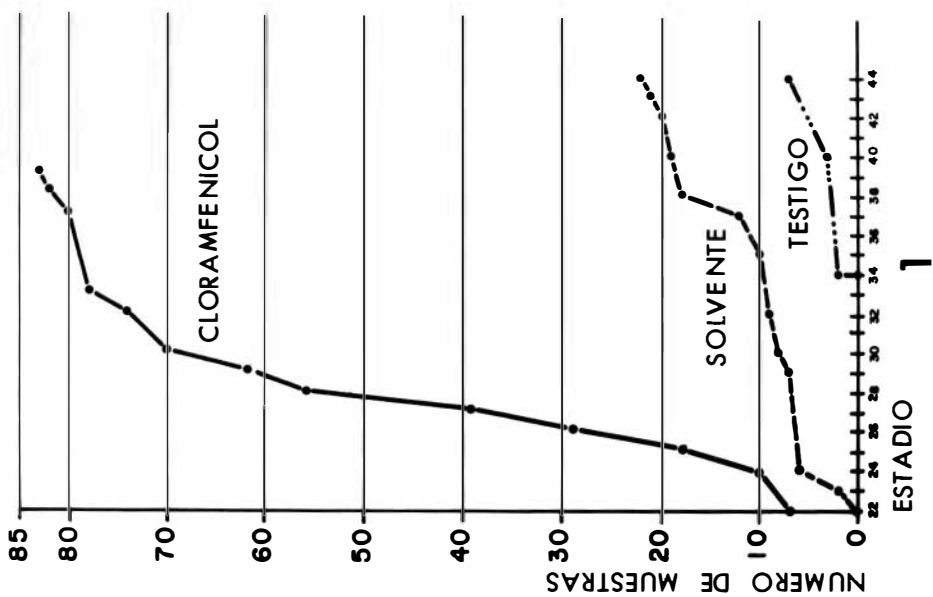
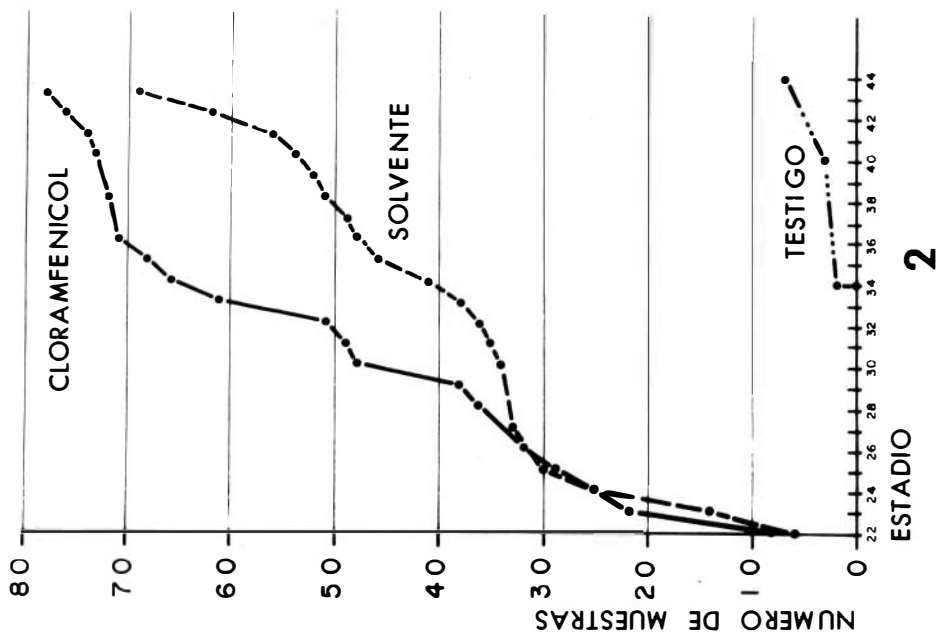
En el embrión de pollo el saco vitelino es el principal centro hematopoyético (Romanoff, 1960) en las primeras dos semanas. Si recordamos los efectos descritos en el humano (Cecil y Loeb, 1968) la acción de la droga traería como consecuencia una aplasia de estos centros con la disminución de células rojas, y también de trombocitos, que son los que en el embrión de pollo desempeñan la función de plaquetas (Lucas y Jamroz, 1961) y cuya disminución sería la responsable de los fenómenos hemorrágicos descritos. El aspecto de trombosis que puede verse dentro de los vasos sanguíneos podría ser la causa final de la muerte del embrión.

El aumento de anomalías y de la mortalidad (Cuadro 1) en los grupos inyectados con el solvente, lo atribuimos al traumatismo causado por la inyección a ciegas. El aumento de mortalidad, mayor todavía en los embriones de 96 horas inyectadas con el solvente, nos lo explicamos porque estando el embrión más grande, fácilmente pudo dañarse un vaso de mayor calibre, o el embrión mismo, produciéndose así la muerte. La cantidad de solvente inyectado en el vitelo es muy pequeña y pensamos que no podría producir cambios osmóticos o químicos notables.

Al parecer hay una especificidad de la droga en la dehiscencia de la pared anterior del tórax y abdomen en embriones de 96 horas; la acción tendría que ser especialmente sobre el mesodermo lateral que es el responsable (Straus y Rawles, 1953) de la formación de dicha pared.

Fig. 1. Curva de mortalidad acumulada en embriones de pollo de 72 horas tratados con 4 mg de cloramfenicol, con el solvente y sin tratamiento (grupo testigo).

Fig. 2. Curva de mortalidad acumulada en embriones de pollo de 96 horas tratados con 4 mg de cloramfenicol, con el solvente y sin tratamiento (grupo testigo).



RESUMEN

Los hallazgos más importantes de los efectos del cloramfenicol sobre embriones de pollo de 72 a 96 horas, comparados con grupos de las mismas edades inyectados con el solvente (agua bidestilada) y un grupo testigo son: (a) la inhibición del crecimiento expresada en términos de estadios del desarrollo alcanzado y la mortalidad observada, comparada en los diversos grupos; (b) la presencia de hemorragias macro- y microscópicas en el parénquima de los órganos y tejidos conectivos; y (c) se comprueba falta de continuidad en los endotelios vasculares y la presencia de células rojas inmaduras en los tejidos. La cantidad de anomalías aparentemente no fue producida específicamente por la droga, en vista de que hay el mismo porcentaje en los grupos inyectados con el solvente y en los inyectados con la droga. Se observan sin embargo diferencias notables en la clase de anomalías encontradas, explicándose tal diferencia solamente trayendo a cuentas la acción del cloramfenicol.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sociedad Pro Educación Médica de El Salvador y al Sr. Julián Otero Roel por el financiamiento del proyecto; a la Sra. María Mayela García de Zambrano en las labores editoriales.

REFERENCIAS

Aronson, P., & S. Spiegelman

1961. Protein and ribonucleid acid synthesis in a chloramphenicol-inhibited system. *Biochim. Biophys. Acta*, 53: 70-83.

Cecil, R. L., & R. F. Loeb

1968. *Tratado de medicina interna*. Editorial Interamericana S. A. México.

Gale, E. F.

1958. *The mode of action of Chloramphenicol*. Ciba Foundation symposium on amino acids and peptides with antimetabolic activity, p. 19-34.

Hamburger, V. E.

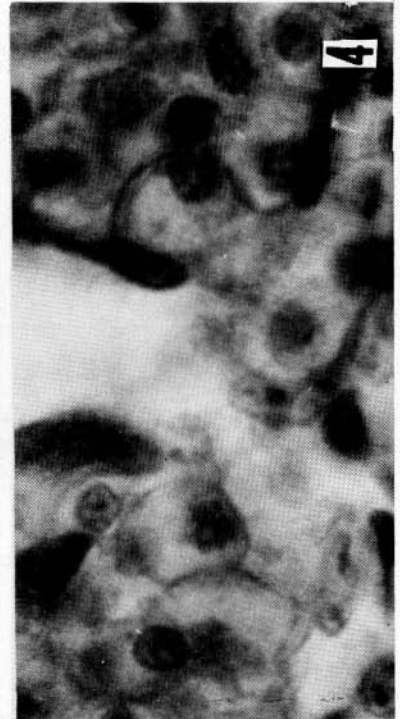
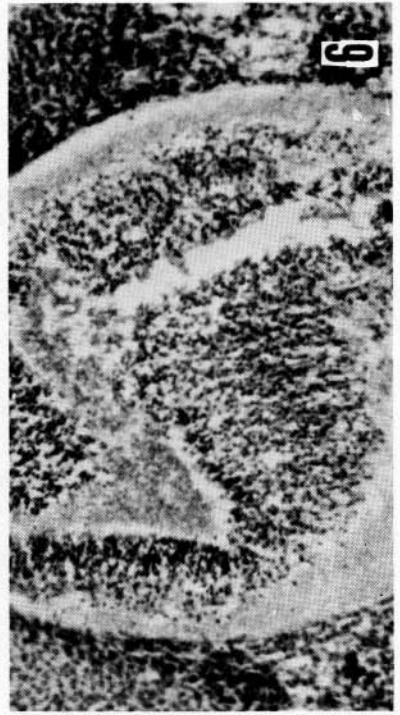
1962. *A manual of experimental embryology*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Fig. 3. Embrión de pollo de 72 horas en el estadio 28 de Hamburger tratado con cloramfenicol y cortado en serie cuando los signos de próxima muerte eran evidentes. A nivel del telencéfalo pueden observarse los vasos sanguíneos dilatados, en uno pequeño de la izquierda se ve en la pared una solución de continuidad. Se ven células rojas inmaduras invadiendo los tejidos que rodean los vasos (100 X).

Fig. 4. El pequeño vaso de la izquierda en la figura anterior a mayor detalle (1000 X) para poner en evidencia la solución de continuidad en el endotelio del vaso.

Fig. 5. Lóbulo derecho del hígado del mismo embrión de la Figura 3. Puede verse la congestión sanguínea y algunos cordones de células hepáticas todavía reconocibles (63 X).

Fig. 6. Pérdida de la estructura normal y necrosis en el sistema nervioso central (100X) en el mismo embrión de la Figura 3.



Hamilton, H.

1952. *Lillie's development of the chick. An introduction to embryology*. Holt Rinehart and Winston, N. Y.

Harrison, T. R., & R. Adams

1966. *Principles of internal medicine*. The Blakiston Division. New York.

Herrman, H.

1963. Quantitative studies of protein synthesis in some embryonic tissues, p. 85-118. *In* M. Locke (ed.) *Cytodifferentiation and macromolecular synthesis*. Academic Press, New York.

Karnofsky, D. A.

1965. Mechanims of action of certain growth-inhibiting drugs, p. 185-194. *In* J. G. Wilson & J. Warkany (eds.), *Teratology*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Lucas, A., & C. Jamroz

1961. *Atlas of avian hematology*. U. S. Department of Agriculture, Washington.

Romanoff, A.

1960. *The avian embryo. Structural and functional development*. Macmillan N. Y.

Straus, W., & M. Rawles

1953. An experimental study of the origin of the trunk musculature and ribs in the chick. *Amer. J. Anat.*, 92: 471-509.

Fig. 7. Embriones de pollo de 72 horas tratados con cloramfenicol. El de la izquierda muestra una torsión anormal y el de la derecha una dehiscencia de la pared anterior.

Fig. 8. Embrión de pollo de 96 horas tratado con cloramfenicol. Puede verse dehiscencia completa de la pared anterior.

Fig. 9. Embrión de pollo de 96 horas tratado con cloramfenicol. Puede verse dehiscencia parcial de la pared anterior.

