An. Real Acad. Farm. 1979, 45: 259-278

Activación linfocitaria en presencia de inhibidores de prostaglandin-sintetasa

por

ISABEL BARASOAIN BLASCO y JOSE M.ª ROJO HERNANDEZ
Instituto de Inmunología y Biología Microbiana. C. S. I. C.
Velázquez, 144. Madrid-6

ABSTRACT

The effect of Indomethacin and some Indomethacin esters on humoral and cellular immune response in mice, and on T and B lymphocyte activation by mitogens has been studied. Indomethacin and its derivatives have been found to inhibit the antibody response to sheep erythrocytes when administered orally either four days before the antigen injection or daily beggining three days before immunization. Inhibition of antibody response by Indomethacin was dose-dependent. Antibody titers elicited against bacterial lipopolysaccharide were also diminshed in animals treated with Indomethacin. These drugs when added into cultures, induced an enhancement in the uptake of ^{3}H-thymidine into spleen cells stimulated with Concanavalin A without varying optimal Concanavalin A concentration or the kinetics of ^{3}H-thymidine uptake. However, they inhibited the response of B lymphocytes to polyclonal activation by bacterial lipopolysaccharides. In addition, responses of T and B lymphocytes to mitogens were inhibited when mice were treated «in vivo» with Indomethacin as compared to the controls. Antibody-independent cell mediated cytotoxicity was not affected by addition of Indomethacin «in vitro». One-way mixed lymphocyte reaction was enhanced in presence of all Indomethacin concentrations tested.

INTRODUCCIÓN

La respuesta a un antígeno supone, generalmente, la unión de éste al clon o clones linfocitarios específicos, a lo que sigue un proceso de proliferación y de diferenciación a estadíos celulares capaces de llevar a cabo mecanismos efectores de defensa. En la regulación de estos procesos juegan un papel importante los nucleotidos cíclicos (cAMP, cGMP) y aquellas moléculas capaces de hacer variar los niveles de nucleotidos cíclicos linfocitarios (sustancias adrenérgicas y colinérgicas, análogos a los nucleotidos cíclicos, prostaglandinas,

etc.). Entre ellas destacan las prostaglandinas como reguladores fisiológicos potenciales de la inmunidad, por ser las únicas entre las anteriormente mencionadas que son capaces de ser sintetizadas por todos los tipos celulares estudiados hasta el momento (1) y, naturalmente, por los linfocitos (2, 3).

Para estudiar los aspectos reguladores de las prostaglandinas sintetizadas *de novo* sobre distintas manifestaciones de la inmunidad creimos de interés utilizar con este objeto la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por antiinflamatorios no esteroides (4).

En el presente trabajo se estudia el efecto de inhibidores de prostaglandin-sintetasa (Indometacina y ésteres derivados) sobre la proliferación linfocitaria específica e inespecífica, y en varios sistemas efectores de la inmunidad. Para ello estudiaremos, en primer lugar, las variaciones en presencia de estos fármacos de la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos (un sistema que tiene la ventaja de inducir proliferación linfocitaria policlonal, por lo que los cambios metabólicos relacionados con la activación tienen lugar en un mayor número de células que en la activación por antígenos y son por ello estudiados más fácilmente). A continuación estudiaremos la activación de linfocitos por células alogeneicas y la lisis celular mediada por células inmunocompetentes, estudiando por último las modificaciones de la inmunorespuesta humoral primaria frente a antígenos timo-dependientes y timo-independientes.

Material y métodos

Animales de experimentación

Se han empleado ratones machos de 6 a 12 semanas de edad, de las siguientes razas: Albinos no cosanguíneos Swiss Ham/ICR, en las pruebas de respuesta humoral; ratones cosanguíneos C57B1/6 (H-2^b) y DBA/2 (H-2^d) para las pruebas de mitogénesis, y ratones cosanguíneos C3H (H-2^k) y DBA/2 para las pruebas de inmunidad celular.

Línea tumoral

El mastocitoma P815Y (H-2^d) se mantuvo en forma ascítica en ratones singeneicos DBA/2 transfiriéndolo periódicamente a nuevos animales.

Fármacos

Se han empleado Indometacina y diez ésteres derivados cuya fórmula ,toxicidad y actividad antiinflamatoria han sido descritos previamente (5).

La administración de los fármacos «in vivo» se realizó por vía oral suspendiéndolos a la concentración deseada en carboximetil celulosa al 1 por 100 en agua (0,2 ml de suspensión/ratón/día). La adición de la Indometacina y sus derivados a los cultivos de linfocitos «in vitro» se realizó diluyendo previamente los fármacos a distintas concentraciones en dimetilsulfóxido (Merck) y etanol absoluto (2:8 v/v). De esta solución se añadieron 10 µl a cada ml de cultivo celular. También se han empleado los siguientes antibióticos: Actinomicina D (Calbiochem), Mitomicina C (Kyowa), Bleomicina (Almirall) y Rifamicina SV (Lepetit).

Antígenos y mitógenos

Se han utilizado como antígenos eritrocitos de carnero (Llorente, S. A.), que, después de ser lavados tres veces con solución salina tamponada con fosfato 0,15 M pH 7,2 (PBS), fueron inyectados por vía intraperitoneal ($2{,}5 \times 10^8$ eritrocitos de carnero/ratón en 0,1 ml de PBS). También se ha empleado como antígeno el lipopolisacárido (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, inyectándose por vía intraperitoneal 30 µg de LPS/ratón en 0,1 ml de PBS.

Como mitógeno de linfocitos T se ha utilizado la Concanavalina A (Con A, Calbiochem, grado A), disuelta en PBS y esterilizada por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm previamente a su uso. Como mitógeno de linfocito B se han usado LPS de *Brucella melitensis* y *Escherichia coli* que, disueltos en PBS a 1 mg/ml, fueron esterilizados en baño de agua a 100° C durante una hora previamente a su utilización.

Activación de linfocitos por mitógenos

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Andersson y cols. (6) con algunas modificaciones. En aquellos experimentos en que se emplearon mitógenos de linfocitos B, el medio de cultivo carecía de suero fetal bovino y era tamponado con HEPES 10 mM (7).

Cultivo mixto de linfocitos

El ensayo se realizó de acuerdo con (8), empleando como población reaccionante esplenocitos de C3H y como población estimuladora esplenocitos de DBA/2 tratados con Mitomicina C. El medio de cultivo contenía siempre suero fetal bovino al 10 por 100 y 2-mercaptoetanol (3×10^{-5} M).

Citotoxicidad mediada por células

Se emplearon como células citotóxicas linfocitos de bazo de ratones C3H que habían sido inmunizados de 9 a 11 días antes con 25×10^6 células del mastocitoma P815Y por vía intraperitoneal. La capacidad citotóxica de las células se midió de acuerdo con el ensayo descrito en (9).

Determinación de títulos de anticuerpos y del número de células formadoras de anticuerpos

La inmunoprecipitación en gel de agarosa se realizó de acuerdo con la técnica descrita previamente en (10). La hemaglutinación y la sensibilización de eritrocitos para la hemaglutinación pasiva se realizó de acuerdo con (7).

La determinación del número de células formadoras de anticuerpos se realizó por el método de las placas de hemolisis en gel de agar de acuerdo con lo descrito por Bullock y Moller (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los inhibidores de prostaglandin-sintetasa sobre la proliferación linfocitaria policlonal

En este trabajo se han utilizado dos tipos de mitógenos: por un lado, Concanavalina A, mitógeno exclusivo de linfocitos T, y por otro, lipopolisacáridos de *B. melitensis* y de *E. coli*, cuya estimulación se ejerce sobre los linfocitos B. La transformación linfoblástica se midió haciendo recuento de la timidina tritiada incorporada al ADN celular.

Variaciones de la proliferación de linfocitos T

Iniciamos nuestro estudio observando el efecto de la Indometacina a distintas dosis sobre la mitogénesis por Concavalina A. En la figura 1 se observa que, si bien a concentraciones altas de mitógeno la Indometacina tiene un efecto inhibidor sobre la mitogénesis, a concentraciones óptimas de éste se observa una dosis-dependencia del efecto indometacínico. Así, a bajas concentraciones ($0{,}03$-$0{,}3 \times 10^{-6}$ M Indometacina) se produce una estimulación que desaparece e incluso se transforma en inhibición a medida que aumenta la

concentración del fármaco. Un efecto similar ha sido descrito por Webb y Jamieson (12) para la transformación blástica inducida por otro mitógeno de linfocitos T, la fitohemaglutinina, y para concentraciones de Indometacina ($0{,}1 \times 10^{-6}$ M) muy semejantes a aquellas con las que obtenemos un efecto estimulador de la transformación blástica por Convanavalina A ($0{,}03$-$0{,}3 \times 10^{-6}$ M). Como se puede apreciar, la acción estimulante de la Indometacina no afecta la concentración óptima de mitógeno. Tampoco modifica el momento de

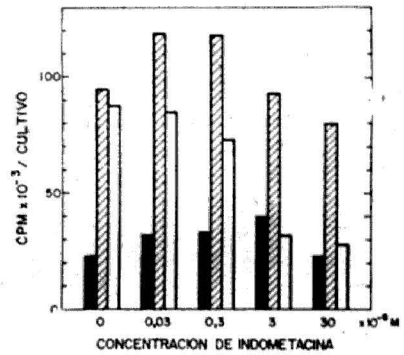

Fig. 1.—Efecto de la Indometacina sobre la proliferación de linfocitos inducida por Concanavalina A, medida como incorporación de timidina tritiada a los cultivos en el día + 3 de incubación. Los resultados se expresan como cpm netas (cpm netas = cpm en los cultivos con mitógeno — cpm en los cultivos sin mitógeno). (▬), 1 μg/ml Con A; (▥), 5 μg/ml Con A; (▭), 10 μg/ml Con A.

máxima incorporación de timidina tritiada a los cultivos, efecto lógico si admitimos que la Indometacina puede actuar inhibiendo la síntesis de prostaglandinas por parte de una población de linfocitos T supresores (12) y no actúa directamente sobre la capacidad activante de la Concanavalina A. Varios tipos de prostaglandinas son conocidos como inhibidores de la transformación blástica de linfocitos por fitohemaglutiniana (13, 14); su acción se debe posiblemente a que alteran los niveles de AMP cíclico celular hasta concentraciones inhibitorias o en momentos no adecuados. En este sentido, aunque se han observado incrementos en los niveles de AMP cíclico

asociados al comienzo de la activación por mitógenos, el efecto de los agentes que incrementan los niveles de AMP cíclico sobre la mitogénesis parecen estar condicionados por el momento y tiempo de su adición y por la concentración utilizada (13, 14, 15). El resto de los fármacos estudiados (fig. 2) repiten, con algunas diferencias, el comportamiento indicado para la Indometacina, aunque algunos de ellos posean mayor capacidad estimulante, supresora o ambas simultáneamente; o bien posean estas propiedades a concentraciones distintas de las encontradas para la Indometacina.

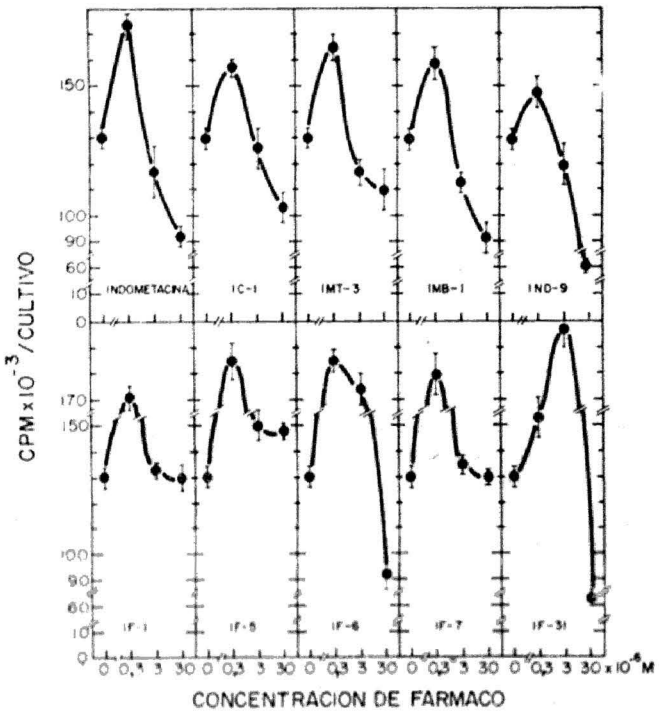

Fig. 2.—Efecto de la Indometacina y sus derivados, a varias concentraciones, sobre la proliferación de linfocitos inducida por Concanavalina A a 5 μg/ml. Resultados expresados como cpm netas/cultivo.

La respuesta a Concanavalina A de linfocitos de bazo procedentes de animales tratados con Indometacina (5 mg/kg/día durante cuatro días consecutivos) se ve seriamente disminuida respecto a los linfocitos procedentes de animales no tratados (tabla I), a diferencia de lo observado cuando añadimos la Indometacina o sus derivados «in vitro». Sin embargo otros autores, empleando linfocitos humanos, han observado que el tratamiento con Aspirina (16) o Indometacina (17) no afecta a la activación de los linfocitos por fitohemaglutinina. Estos resultados contrapuestos pueden deberse a diferencias en el mitógeno y el modelo experimental usado (hombre y ratón), así como a un menor efecto del tratamiento «in vivo» en el caso de Aspirina (18) o a las dosis de Indometacina empleadas (muy por debajo de las utilizadas en clínica) en el segundo caso (17).

TABLA I

Efecto del tratamiento "in vivo" con Indometacina sobre la activación de linfocitos inducida por Con A.

FARMACO (*)	INCORPORACIÓN DE ^{3}H-TIMIDINA (CPM/CULTIVO) (**)			
	Sin mitógeno	Con A (1 μ g/ml)	CPM netas	% de respuesta
—	11753	111674	99921	100
Indometacina 1 μ g/ml «in vitro»	12714	136988	124274	124
Indometacina «in vivo»	5312	56609	51397	51
Indometacina «in vivo» + Indometacina 1 μ g/ml «in vitro»	4351	40923	36572	36

(*) De superior a inferior, las líneas horizontales corresponden a los siguientes grupos: 1.º, lifocitos de animales normales; 2.º, los mismos linfocitos en presencia de Indometacina (1 μg/ml) añadida al comienzo de los cultivos; 3.º, linfocitos de animales tratados con la Indometacina (4 días por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día), y 4.º, linfocitos de animales tratados con Indometacina cultivados en presencia de 1 μg/ml de Indometacina.

(**) Cultivos recogidos a las 72 horas de incubación.

Variaciones de la proliferación de linfocitos B

En experimentos previos con lipopolisacárido de *B. melitensis*, observamos que —para idénticas condiciones de medio a las utilizadas en los experimentos con Concanavalina A— había una incorporación inespecífica de timidina tritiada muy elevada que interfería con la acción mitogénica del lipopolisacárido. Por esta razón, y de acuerdo con lo expuesto por Coutinho y cols. (19), empleamos en los experimentos siguientes medio de cultivo sin suero fetal bovino.

Una vez fijadas las condiciones experimentales del ensayo, estudiamos el efecto de la Indometacina a distintas dosis sobre la mitogénesis inducida por diversas concentraciones de LPS de *E. coli* (fig. 3). Se puede apreciar claramente que en este caso no se observa ningún tipo de efecto estimulante para ninguna de las concentraciones de Indometacina y lipopolisacárido empleadas; sí aparece, en

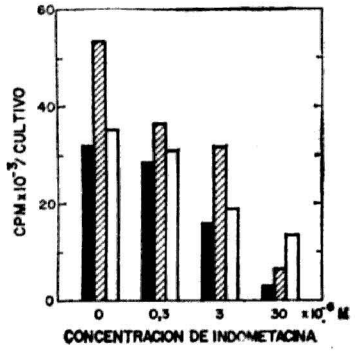

Fig. 3.—Efecto de la Indometacina sobre la proliferación de linfocitos inducida por lipopolisacárido de *E. coli*, medida como incorporación de timidina tritiada a los cultivos en el día + 3 de incubación. Los resultados se expresan como cpm netas/cultivo. Estimulación inducida con 1 μg/ml (▬). 10 μ/ml (▥) o 50 μg/ml de LPS (▭).

cambio, una clara inhibición de la incorporación de timidina tritiada a los cultivos, que se hace mayor a medida que aumenta la dosis de Indometacina, independientemente de la concentración del lipopolisacárido presente. Las datos obtenidos usando LPS de *B. melitensis*, a la concentración de 100 μg/ml, y diversos derivados de Indometacina (fig. 4), son concordantes, a este respecto, con los obtenidos con lipopolisacárido de *E. coli* para la Indometacina. El efecto inhibidor de la Indometacina en estos ensayos —como el efecto estimulador observado en cultivos activados por Concanavalina A— no es debido a la distinta composición del medio de cultivo empleado en uno y otro caso, ya que la Indometacina incrementa la incorporación de timidina tritiada a cultivos de linfocitos estimulados por concentraciones óptimas de Concanavalina A tanto en un medio con suero

fetal bovino (fig. 1) como en un medio sin él. También la activación por LPS de linfocitos de bazo de animales tratados «in vivo» con Indometacina es menor que la activación de linfocitos normales (ta-

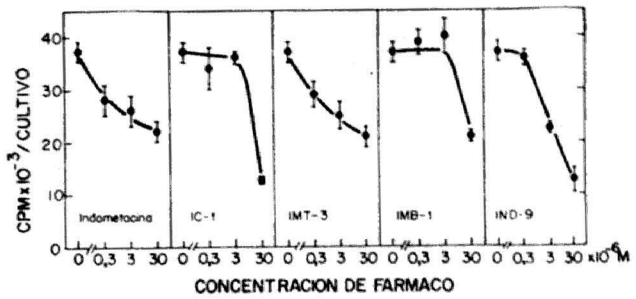

Fig. 4.—Efecto de la Indometacina y varios derivados de Indometacina sobre la transformación blástica de linfocitos inducida por lipopolisacárido de *B. melitensis* a 100 μg/ml. Los cultivos fueron recogidos 48 horas después de iniciados. Los resultados se expresan como cpm netas/cultivo.

TABLA II

Efecto del tratamiento "in vivo" con Indometacina sobre la activación de linfocitos inducida por LPS.

FARMACO (*)	INCORPORACIÓN DE ³H-TIMIDINA (CPM/CULTIVO) (**)			
	Sin mitógeno	LPS (1 μ g/ml)	CPM netas	% de respuesta
—	11752	72828	61073	100
Indometacina 1 μ g/ml «in vitro»	12714	55470	42756	70
Indometacina «in vivo»	5312	52802	47590	78
Indometacina «in vivo» + Indometacina 1 μ g/ml «in vitro»	4351	43191	38840	63

(*) De superior a inferior, las líneas horizontales corresponden a los siguientes grupos: 1.º, linfocitos de animales normales; 2.º, los mismos linfocitos en presencia de Indometacina (1 μg/ml) desde el comienzo de los cultivos; 3.º, linfocitos de animales tratados con Indometacina (4 días por vía oral a una dosis de 5 mg/kg/día), y 4.º, linfocitos de animales tratados con Indometacina cultivados en presencia de 1 μg/ml de Indometacina

(**) Cultivos recogidos a las 72 horas de incubación.

bla II). De nuestros resultados se deduce que la Indometacina y sus derivados actúan como inhibidores de la función de los linfocitos B en todas las condiciones experimentales empleadas.

Efecto de los inhibidores de prostaglandin-sintetasa sobre la inmunorespuesta celular

La reacción mixta de linfocitos, método que ha sido empleado por nosotros para estudiar el efecto de la Indometacina sobre la respuesta inmunitaria celular, se ve modificada —al igual que la inmunorespuesta humoral— por una serie de agentes que afectan al metabolismo de los nucleotidos cíclicos. Kook y Trainin (8) han observado que la incorporación de timidina tritiada al ADN de los linfocitos T responsables de la reacción proliferativa frente a linfocitos alogeneicos aumenta o disminuye por la presencia en el medio de agentes que incrementan de diversos modos los niveles de AMP cíclico; entre ellos cabe citar el dibutiril-AMP cíclico, la teofilina y la hormona tímica, dependiendo su acción tanto de la dosis empleada como de la pauta de administración. Así, análogos del AMP cíclico, como el dibutiril-AMP cíclico, inhiben la incorporación de timidina tritiada a los cultivos si están presentes en el medio desde el comienzo de los mismos. No es, por tanto, extraño que la inhibición de prostaglandinas por Indometacina produzca incrementos en la incorporación de timidina en los cultivos de células inmunocompetentes; este efecto ha sido el observado por nosotros en una reacción mixta «unidireccional» de linfocitos (fig. 5) y coincide en este punto con el efecto descrito por Webb y Osheroff (2) para una reacción mixta «bidireccional» de linfocitos, pese a que la concentración de Indometacina empleada por estos autores (5×10^{-9} M) es mucho menor que cualquiera de las empleadas por nosotros $0{,}3\text{-}30 \times 10^{-6}$ M). Este efecto estimulador pudiera ser debido, como hemos mencionado anteriormente, a que la Indometacina actúe inhibiendo la síntesis de prostaglandinas llevada a cabo por una subpoblación de linfocitos T supresores, que regularían de este modo los mecanismos inmunitarios (2).

El segundo tipo de experiencias, en relación con la inmunidad celular, se refieren al efecto de la Indometacina y el IBM-1 sobre la citotoxicidad mediada por linfocitos T sensibilizados e independiente de anticuerpos y complemento, utilizando esplenocitos de animales inmunizados con células alogenéicas. En este sistema de ensayo, todos los agentes que incrementan los niveles de AMP cíclico celular —y entre ellos las prostaglandinas— inhiben la actividad citotóxica de las células sensibilizadas (20). Por tanto, si las prostaglandinas sintetizadas por las células durante el proceso citolítico tuvieran alguna influencia significativa sobre el mismo, el efecto esperado sería que en presencia de Indometacina e IMB-1 durante la incubación del

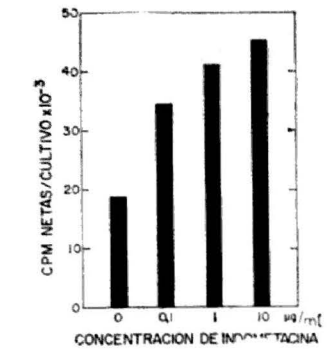

Fig. 5.—Efecto de la Indometacina a distintas concentraciones sobre la incorporación de timidina tritiada a cultivos mixtos de linfocitos. Datos obtenidos en el día 4 después de iniciado el cultivo (1 µg/ml de Indometacina = 3×10^{-6} M).

sistema celular reaccionante se produciría un incremento en la reacción citotóxica. Este efecto ha sido descrito en otros sistemas semejantes empleando linfocitos humanos, cuando las células sensibilizan-

TABLA III

Efecto de los antiinflamatorios no esteroides sobre la citotoxicidad mediada por células.

Concentración de fármaco	% Citotoxicidad específica (*)	
	Exp. 1 + Indometacina	Exp. 2 + IMB-1
0	53	45
6×10^{-6} M	55	44,5
60×10^{-6} M	53	40

(*) Determinada a las 6 horas de ensayo.

tes (o células blanco) sintetizan prostaglandinas como mecanismo defensivo (21). Nuestros resultados (tabla III) parecen indicar que el efecto de la Indometacina y el IBM-1 es prácticamente inapreciable a dosis bajas, y sólo a dosis elevadas (20 µg/ml, equivalente a 60 × × 10^{-6} M) se observa una ligera inhibición de la citotoxicidad celular. Sin embargo, este efecto, así como el efecto claramente inhibidor observado por otros autores a dosis aún mayores (22), puede deberse a una actividad de la Indometacina sobre procesos distintos de la síntesis de prostaglandinas (p. ej. la fosforilación oxidativa), que es probable cuando se emplean concentraciones altas de este fármaco (23). Por tanto, las prostaglandinas sintetizadas *de novo* por las células implicadas en el proceso citolítico no parecen tener un papel importante durante el mismo.

Variaciones de la inmunorespuesta humoral por tratamiento con inhibidores de prostaglandin-sintetasa

Se estudió en primer lugar la inmunorespuesta primaria humoral frente a eritrocitos de carnero en anticuerpos y en número de células formadoras de anticuerpos. Para ello se compararon las respuestas de ratones control con las de ratones tratados los tres días anteriores y el mismo día de la inyección de antígeno con Indometacina o sus derivados a dosis molares equivalentes a 4 mg/kg/día de Indometacina. En los animales no tratados se obtiene una respuesta de anticuerpos circulantes que presenta dos máximos: uno alrededor del día 5 después de la inyección de antígeno y otro alrededor del día 9. El máximo número de células formadoras de anticuerpos IgM se produce el cuarto día después de la inmunización. En los animales tratados con fármacos antiinflamatorios hemos podido comprobar una modificación en la respuesta al antígeno que es variable según el compuesto de que se trate y que se traduce en una reducción del título de hemaglutinación y del número de células formadoras de anticuerpos (tabla IV), así como en desplazamientos del primer máximo de anticuerpos. Empleando el mismo modelo experimental con distintas dosis de Indometacina hemos comprobado que la inmunosupresión observada es dosis-dependiente (tabla V). En experiencias posteriores, comparamos la acción de estos fármacos antiinflamatorios con la de determinados antibióticos cuya acción inmunosupresora es suficientemente conocida, como la Actinomicina D o la Mitomicina C (24, 25). Con este objeto tratamos diferentes grupos de ratones con Indometacina, IMB-1 e IMT-3 diariamente con dosis molares equivalentes a 4 mg/kg/día de Indometacina a lo largo de todos los días de respuesta inmunológica comenzando tres días antes

de la inyección del antígeno (eritrocitos de carnero); otros grupos recibieron o Actinomicina D (0,4 mg/kg) o Bleomicina (34 mg/kg) en una inyección intraperitoneal simultánea a la del antígeno; o bien Mitomicina C, administrada dos días consecutivos mediante inyección intraperitoneal y empezando simultáneamente a la inyección de antígeno con una dosis de 1,25 mg/kg/día; por último, otro grupo recibió intraperitonealmente Rifamicina todos los días que duró el ensayo a una dosis de 10 mg/kg/día, comenzando el mismo día de la inmunización.

TABLA IV

Efecto del tratamiento con Indometacina y sus derivados sobre el número de células formadoras de anticuerpos y el título de anticuerpos circulantes.

Tratamiento (*)	Total de respuesta (**)	% de respuesta (**)	Total de respuesta (***)	% de respuesta (***
Control	635	100	11788	100
Indometacina	389	61	4531	38
IMB-1	176	28	2831	24
IMT-3	175	28	6014	51
IC-1	48	8	4687	40
IND-9	340	53	6433	55
IF-1	299	47	4593	39
IF-5	153	24	5858	50
IF-6	243	38	8376	71
IF-7	238	37	7922	67
IF-9	215	34	7605	64
IF-31	557	88	8535	72

(*) Los fármacos fueron administrados a dosis equivalentes a 4 mg/kg/día de Indometacina durante los 3 días anteriores y el mismo día de inmunización con eritrocitos de carnero.

(**) Fue determinado, en los días 3, 4, 5 y 6 tras la inmunización con eritrocitos de carnero, el número de células formadoras de anticuerpos IgM (placas directas de hemolisis)/10^6 células de bazo. Los datos expuestos son la suma de las cifras obtenidas en los días estudiados.

(***) En los días 4 al 11 tras la inmunización se determinaron los títulos de hemaglutinación de los sueros de animales inmunizados con eritrocitos de carnero. Suma de las cifras obtenidas en los días estudiados.

TABLA V

Efecto del tratamiento con Indometacina a distintas dosis sobre la respuesta frente a eritrocitos de carnero.

Tratamiento (*)	CFA (**)	%	Título de hemaglutinación (***)	%
—	1139	100	1060	100
Indometacina (2 mg/kg/día)	719	63	820	77
Indometacina (4 mg/kg/día)	710	62	720	67
Indometacina (8 mg/kg/día)	132	11	560	52

(*) La Indometacina fue administrada a las dosis indicadas los tres días anteriores y el mismo día de inyección del antígeno.

(**) CFA: células formadoras de anticuerpos/10^6 células de bazo. Suma de los días 4 y 5 después de la inyección de antígeno.

(***) Suma de los títulos obtenidos los días 4 y 5 tras la inyección de antígeno.

Los resultados obtenidos con tratamiento continuado con Indometacina y sus derivados son semejantes a los obtenidos anteriormente con el tratamiento durante cuatro días, aunque parecen producirse desplazamientos del primer máximo más acentuados. También se puede observar que, a las dosis y pauta de tratamiento empleados, se consiguen efectos comparables, y en ciertos casos superiores a las conseguidas con algunos de estos antibióticos. La menor inmunosupresión, tanto en número de células formadoras de anticuerpos como en título de hemaglutinación, se observó en los animales tratados con Bleomicina, dato que concuerda con trabajos anteriores (26).

Por los datos obtenidos cabría inferir que la Indometacina, al impedir la síntesis de prostaglandinas, evita una elevación de los niveles de AMP cíclico que podría ser esencial para el desarrollo normal de la respuesta inmunitaria. En este sentido, son interesantes los resultados obtenidos por Yamamoto y Webb (27), Osheroff y cols. (28) y Webb y Osheroff (2). De los datos expuestos por estos autores se puede concluir que: a) la inyección de una sustancia antigénica en el ratón produce un incremento en los niveles de AMP cíclico en los órganos linfoides, especialmente en los primeros momentos tras la inmunización; b) este aumento es paralelo a un aumento en los niveles de prostaglandinas en los mismos órganos; y c) la desaparición del aumento de niveles de prostaglandinas por

TABLA VI

Efecto del tratamiento con antiinflamatorios no esteroides y distintos antibióticos sobre el número de células formadoras de anticuerpos y el título de anticuerpos.

Tratamiento (*)	Total de respuesta (**)	% de respuesta (**)	Total de respuesta (***)	% de respuesta (***)
Control	1298	100	6790	100
Indometacina	503	37	2685	39
IMB-1	512	38	2710	40
IMT-3	555	42	3710	54
Actinomicina D	89	7	3555	52
Mitomicina C	572	44	2575	37
Rifamicina SV	344	26	1720	25
Bleomicina	885	68	4760	70

(*) Tratamiento con antiinflamatorios y antibióticos de acuerdo con lo expuesto en el texto.

(**) En los días 3, 4, 5 y 6 tras la inmunización con eritrocitos de carnero se determinó el número de células formadoras de anticuerpos/10^6 células de bazo. Suma de los datos en los días estudiados.

(***) En los días 4 al 11 tras la inmunización se determinaron los títulos de hemaglutinación de los sueros de animales inmunizados con eritrocitos de carnero. Suma de los títulos obtenidos en los días estudiados.

la acción de la Indometacina lleva implícita la desaparición del aumento en los niveles de AMP cíclico. Asimismo, parece haberse comprobado que el aumento en los niveles de prostaglandinas sólo se podía atribuir parcialmente a la actividad fágica de los macrófagos. El estudio llevado a cabo a continuación sobre la respuesta «in vivo» e «in vitro» frente a eritrocitos de carnero, empleando Indometacina para conocer el significado funcional de los cambios en los niveles de prostaglandinas, tuvo como resultado que los animales o cultivos

tratados con Indometacina presentaban un aumento cuantitativo en la respuesta al antígeno. Más recientemente, los mismos autores han obtenido resultados coincidentes con los nuestros, en el sentido de que, al menos en determinadas condiciones, la Indometacina inhibe la respuesta humoral «in vivo» frente a eritrocitos de carnero (29). Otros autores (17) han encontrado asimismo incrementos en la respuesta secundaria de anticuerpos en voluntarios humanos tratados con Indometacina respecta a los individuos no tratados. Las principales objeciones que se pueden hacer a los trabajos últimamente mencionados son las siguientes: 1) las dosis de Indometacina empleadas por estos autores «in vivo», administradas con la misma pauta, se han revelado (en experimentos llevados a cabo por nosotros) como muy tóxicas y, en todo caso, no producen estimulación de la respuesta de anticuerpos frente a eritrocitos de carnero. 2) el tratamiento «in vivo» con Indometacina, independientemente de su posible acción sobre la producción de prostaglandinas por una población de linfocitos T supresores (2), tiene un efecto inhibidor sobre la respuesta de las células B, ya que inhibe la respuesta a antígenos T-independientes «in vivo» (tabla VII) e «in vitro» (30).

TABLA VII

Efecto de Indometacina sobre la respuesta primaria a LPS de "P. aeruginosa" en ratón.

Tratamiento (*)	Método de determinación de anticuerpos	Total de respuesta (**)	% de respuesta
—	Hemaglutinación	660	100
Indometacina	Indirecta	380	57
—	Inmunoprecipitación	13	100
Indometacina		4	30

(*) El tratamiento con Indometacina se llevó a cabo por vía oral durante los tres días anteriores y el mismo día de la inyección de antígeno a una dosis de 4 mg/kg/día.

(**) Suma de los títulos obtenidos en los días 2, 5 y 10 después de la inmunización.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han estudiado, mediante fármacos antiinflamatorios, inhibidores de prostaglandin-sintetasa, los efectos reguladores de las prostaglandinas sobre la respuesta inmunitaria humoral y celular y sobre la respuesta proliferativa de linfocitos a sustancias mitogénicas. De este modo se han podido observar efectos colaterales que pueden surgir del tratamiento con este tipo de fármacos sobre la inmunidad.

Con este objeto, los tratamientos de animales «in vivo» se realizaron administrando Indometacina y varios ésteres derivados en dosis equivalentes a las utilizadas en clínica, mientras que en los ensayos realizados en cultivos celulares «in vitro» se emplearon concentraciones de cada fármaco similares a las que se encuentran en el plasma de individuos tratados con Indometacina.

De los resultados expuestos se pueden concluir los siguientes puntos:

1.º Los inhibidores de prostaglandin-sintetasa, empleados a determinadas concentraciones, son capaces de incrementar la proliferación de linfocitos T inducida por Concanavalina A, mientras que a otras tienen un efecto inhibidor.

La Indometacina no modifica ni la concentración óptima de mitógeno ni el momento de máxima incorporación de timidina tritiada a los cultivos. Otros antiinflamatorios no esteroides derivados de la Indometacina tienen, con ligeras variaciones, los mismos efectos que ésta sobre la transformación blástica del infocitos por Concanavalina A. Por otra parte, la activación de los linfocitos procedentes de animales tratados con Indometacina inducida por Concanavalina A es mucho menor que la activación de linfocitos procedentes de animales normales. En los cultivos de linfocitos de animales tratados con Indometacina, la adición de este fármaco a los cultivos no incrementa la estimulación inducida por Con A, sino que la inhibe más profundamente.

2.º La Indometacina inhibe la proliferación de linfocitos B inducida por lipopolisacáridos bacterianos a cualquiera de las concentraciones empleadas, incluso a aquellas que producen estimulación de la incorporación de timidina tritiada cuando se emplea Concanavalina A como mitógeno. Otros Indometacin-derivados poseen efectos similares sobre este sistema. De igual modo, se ve disminuida la respuesta mitogénica a lipopolisacárido en linfocitos procedentes de animales tratados «in vivo» con Indometacina, aunque la inhibición no es tan profunda como en el caso de los linfocitos activados por Concanavalina A.

3.º La Indometacina es capaz de incrementar la incorporación de timidina tritiada a cultivos mixtos de linfocitos «de una dirección». Sin embargo, los inhibidores de prostaglandin-sintetasa ensayados no ejercen un efecto destacable sobre la citotoxicidad mediada por células.

4.º La respuesta humoral frente a un antígeno timo-dependiente, medida como título de anticuerpos en sangre y número de células formadoras de anticuerpos, se ven disminuidos por tratamiento con Indometacina y sus derivados considerando tanto los máximos relativos como el total de la respuesta. La inmunosupresión producida por tratamiento con Indometacina es dosis-dependiente. Tanto la Indometacina como varios ésteres de Indometacina, a la dosis y pauta de tratamiento empleados, producen una inmunosupresión comparable a la obtenida con distintos antibióticos de efecto inmunosupresor conocido. La respuesta de anticuerpos frente a antígenos timo-independientes también se ve disminuida por tratamiento «in vivo» con inhibidores de prostaglandin-sintetasa.

Bibliografía

(1) Vane, J. R. (1974). *Prostaglandin Synthetase Inhibitors*. Robinson, H. J. y Vane, J. R., eds., p. 155. Raven Press, New York.

(2) Webb, D. R. y Osheroff, P. L. (1976). «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 73, 1300.

(3) Ferraris, V. A. y De Rubertis, F. R. (1974). «J. Clin. Invest.», 54, 378.

(4) Vane, J. R. (1976). «J. Allergy Clin. Immunol.», 58, 691.

(5) Barasoain, I., Rojo, J. M., Sunkel, C. y Portolés, A. (1978). «Int. J. Clin. Pharmacol.», 16, 285.

(6) Anderson, J., Moller, G. y Sjoberg, O. (1972). «Cell. Immunol.», 4, 881.

(7) Barasoain, I., Alonso, M. L., Rojo, J. M., Ronda, E. y Portolés, A. «Curr. Microbiol.» (en prensa).

(8) Kook, A. I. y Trainin, N. (1975). «J. Immunol.», 115, 8.

(9) Brunner, K. T., Mauel, J., Rudolf, H. y Chapuis, B. (1970). «Immunology», 18, 501.

(10) Ouchterlony, O. (1958). «Acta Path. Microbiol. Scand.», 26, 507.

(11) Bullock, W. W. y Moller, E. (1972). Eur. J. Immunol.», 2, 514.

(12) Webb, D. R. y Jamieson, A. T. (1976). «Cell. Immunol.», 24, 45.

(13) Smith, J. W., Steiner, A. L. y Parker, C. W. (1971). «J. Clin. Invest.», 50, 442.

(14) Stockman, G. D. y Mumford, D. M. (1974). «Exp. Hematol.», 2, 65.

(15) Wang, T., Sheppard, J. R. y Foker, J. E. (1978). «Science», 201, 155.

(16) Smith, M. J., Hoth, M. y Davis, K. (1975). «Ann. Intern. Med.», 83, 509.

(17) Goodwin, J. S., Selinger, D. S., Messner, R. P. y Reed, W. P. (1978) «Infect. Immun.», 19, 480.

(18) Rojo, J. M., Barasoain, I. y Portolés, A. «Proc. I Mediterranean Congr. Chemoth.» (en prensa).

(19) Coutinho, A., Moller, G., Andersson, J. y Bullock, W. W. (1973). «Eur. J. Immunol.», 3, 299.

(20) Henney, C. S. (1973). «Transplant. Rev.», 17, 37.

(21) Droller, M. J., Schneider, M. U. y Perlmann, P. (1978). «Cell. Immunol.», 39, 165.

(22) Winchurch, R. A., Foschi, G. V. y Walz, D. T. (1974). «Res. J. Reticuloendothel. Soc.», 15, 112.

(23) Ferreira, S. H. y Vane, J. R. (1974). «Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.», 14, 57.

(24) Hanna, M. G. y Wust, C. J. (1965). «Lab. Invest.», 14, 272.

(25) Gerebtzoff, A., Lambert, P. H. y Miescher, P. A. (1972). «Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.», 12, 287.

(26) Yamaki, H., Tanaka, N. y Umezawa, H. (1969). «J. Antibiot.», XXII, 315.

(27) Yamamoto, I. y Webb, D. R. (1975). «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 72, 2320.

(28) Osheroff, P. L., Webb, D. R. y Paulsrud, J. (1975). «Biochem. Biophys. Res. Comm.», 66, 425.

(29) Webb, D. R. y Nowowiejski, I. (1977). «Cell. Immunol.», 33, 1.

(30) Zimecki, M. y Webb, D. R. (1976). «J. Immunol.», 117, 2158.