ESTUDIO COMPARATIVO EXPERIMENTAL DE ALGUNOS SULFAMIDADOS Y DEL ACIDO PARA-AMINOBENZOICO (*)

por MARTA RIVAS DE BUENO (**)
Médico Veterinario.
Auxiliar de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Veterinarias.

Los franceses crearon, como variedad de las sulfonamidas, para uso clínico, la p-p'-diaminodifenilsulfona di-acetilada. Este cuerpo químico fué vendido con el nombre de "Rodilone" y se recomendaba para infecciones de carácter piógeno. En los "Anales del Instituto Pasteur" (*9*) aparece un trabajo en que se demuestra que la p-p'-diaminodifenilsulfona sin acetilizar, tiene acción protectora en la tuberculosis experimental con *Mycobacterium tuberculosis avian*. Más tarde, Feldman, Hinshaw y Moses (*3*), demuestran que la Promina, o sea, la p-p'-diaminodifenilsulfona N-N' dextrosa sulfonato, tiene acción protectora en la infección experimental en cuyes con *Mycobacterium tuberculosis human*. Desde este momento han aparecido numerosos trabajos comprobando las experiencias de Feldman y colaboradores y la posible aplicación de dicho preparado en la clínica humana contra la tuberculosis. Su elevada toxicidad para el hombre en la forma prolongada en que debe ser aplicada, ha inducido a estudiar otros derivados de este tipo, cuyo índice quimioterapéutico sea más favorable. El Laboratorio Experimental de Tuberculosis del Hospital San José, que actualmente trabaja en modificaciones en la fórmula, que pudieran servir para este objeto, tiene el mayor interés en aclarar los mecanismos de acción de este preparado. Co-

---

* Trabajo realizado en el Instituto de Investigaciones Veterinarias y en el Laboratorio Clínico y Experimental del Hospital San José. Recibido para su publicación el 30 de Octubre de 1944.

(**) Agradezco al Dr. Humberto Viveros, Jefe del Laboratorio Experimental del Hospital San José, al primer Ayudante de dicho Laboratorio, señor Germán Bueno y a la señorita Julia Barrios, por su valiosa cooperación. Agradezco también al Prof. Dr. Zacarías Gómez, por su eficaz ayuda.

mo la Promina fué vendida por la "Casa Parke Davis" de Estados Unidos, para uso en clínica humana en infecciones de carácter piógeno, el problema toma dos aspectos: mecanismos de acción del medicamento frente a los piógenos y mecanismo de acción del medicamento frente a los tres tipos de *Mycobacterium tuberculosis.*

El aclarar un problema de esta naturaleza sólo puede ser intentado por numerosos experimentos, planteados en distintas etapas y desde distintos puntos de vista. Con respecto al primer punto, mecanismo de acción frente a los piógenos, podemos anotar los siguientes datos bibliográficos que se refieren a los sulfamidados en general: Hay diversas teorías para explicar el mecanismo de acción de estas drogas. Según la teoría anticatalasa, los sulfamidados obrarían inhibiendo a la catalasa; pero esta teoría ha sido descartada al comprobar que la hidroxilaminobencenosulfonamida (cuerpo que se cree formado en el organismo a partir de la sulfanilamida) carece de esta propiedad inhibidora que posee el cloruro de hidroxilamina. (*5*). También se ha pensado que estos medicamentos actuarían aumentando el mecanismo natural de defensas del organismo. Al medir el índice opsónico en personas y animales tratados con estas drogas, se vió que este no aumentaba (*10*). Por esto la explicación fué rechazada, aunque nos cabe la reserva de que en experiencias de otros autores (*10*), en lauchas infectadas intraperitonealmente con neumococos o estreptococos, los animales tratados con drogas de este tipo presentaban en el pus peritoneal un muy elevado número de bacterias fagocitadas en comparación con los animales que no habían recibido medicamento.

Frente al problema de que los sulfamidados no actuaban *in vitro,* en medios de cultivo corrientes, en las mismas concentraciones en que *in vivo* tienen eficacia, se hizo el estudio de estos medios nutritivos para averiguar qué fracciones podrían tener la particularidad de inhibir a la droga. Se comprobó que en los medios de cultivo pobres (*5*) estas drogas tenían acción, siempre que la bacteria pudiera multiplicarse en ellos. Continuando estos estudios, Stamp (*12*) hizo un extracto de estreptococos que inhibía la acción de la sulfanilamida acción que él la interpretó como debida a un factor nutritivo que el extracto contenía que era antagónico a la acción de la sulfanilamida. Concurría a esta suposición el hecho que si la sulfanilamida era agregada a un medio pobre que no permitiera multiplicarse a la bacteria, no tenía acción desinfectante, es decir, no destruía a los gérmenes con que se había inoculado el medio. Luego, si su acción se ejercía sólo cuando había multiplicación activa del germen y ésta era inhibida por ciertos extractos bacteriales, su efecto tenía que dirigirse hacia algún elemento químico que fuera de necesidad ineludible para formar el protoplasma bacteriano, o,

lo que vendría a ser muy similar, contra un enzima o co-enzima por medio del cual la bacteria aprovecharía dicho elemento.

En 1940, Green (*6*) obtuvo también un extracto bacterial que contrarrestaba la acción de la sulfanilamida y el mismo año Woods (*13*) encontró que los extractos de levadura de cerveza tenían esta misma acción y al fraccionar la levadura encontró una sustancia que poseía la acción inhibitoria. Esta sustancia, aunque entonces no pudo ser aislada en estado absolutamente puro de la levadura (en 1941 Blanchard (*1*) logra obtenerla en estado puro) por pruebas físicas, por reacciones químicas y por su actividad biológica igual, fué identificada por Woods como ácido p-aminobenzoico. Por razones cuantitativas, este elemento no podía combinarse químicamente con la sulfanilamida, pues se encontraba en cantidad muy inferior a ella.

Fildes dedujo en 1940 (*4*) que el ácido p-aminobenzoico se encontraba en el organismo constituyendo un metabolito esencial, que estaría siempre asociado a una enzima; la sulfanilamida actuaría apoderándose de esta enzima, es decir, obraría por competencia con el ácido p-aminobenzoico.

Selbie (*11*) con estreptococo y laucha blanca y Mc Carty (*7*) con neumococo y laucha blanca, comprobaron, *in vivo,* la acción inhibitoria del ácido p-aminobenzoico sobre el efecto de los medicamentos sulfamidados frente a la infección. Selbie empleó sulfanilamida y ácido p-aminobenzoico, introduciendo ambos medicamentos directamente en el esófago por medio de una sonda. La sulfanilamida fué administrada en dosis de 25 mgrs. y el ácido p-aminobenzoico en dosis variables de 2,5, 5 y 25 mgrs. Mc Carty empleó la misma vía que Selbie para introducir la sulfopiridina, administrando 24 mgrs. dos veces el día de inoculación y una vez diariamente los días siguientes. El ácido p-aminobenzoico fué introducido subcutáneamente en tres dosis diarias, en cantidades diferentes, a diversos grupos de animales. Con esta técnica, el número de animales era muy reducido frente a cada dosis de ácido p-aminobenzoico y por lo tanto, la estadística era muy baja.

Mayor bibliografía sobre comprobación *in vivo,* que es la que tiene la mayor importancia, no nos ha sido posible conseguir. En los "Biological Abstracts" hasta la fecha no se mencionan otros trabajos sobre este tema.

Según esta teoría, que es la única que presenta cierto número de posibilidades de ser efectiva, los múltiples trabajos que hay sobre ella podrían resumirse en la siguiente forma:

1). — La bacteria directamente, o sus enzimas o co-enzimas, se equivocarían por la similitud de un grupo químico entre el ácido p-aminobenzoico y las drogas sulfamidadas.

2). — El ácido p-aminobenzoico sería una sustancia esencial para la multiplicación bacteriana y las bacterias tendrían que tomarlo del medio o sintetizarlo, si su capacidad metabólica se lo permite, en el caso que no existiera en el medio.

3). — Las drogas sulfamidadas tienen un grupo químico igual al ácido p-aminobenzoico, pero siendo el resto de su molécula diferente, no satisfarían las necesidades metabólicas de la bacteria.

4). — La proporción en que el ácido p-aminobenzoico inhibe *in vitro* a la sulfanilamida, haría suponer que se trata de competencia por una enzima, dado que una parte del ácido es capaz de inhibir hasta 2.500 partes de sulfanilamida *in vitro*.

COMENTARIO

El factor que más duda nos produce para aceptar esta teoría es que la droga más activa frente a las bacterias piógenas en general, debiera ser la sulfanilamida, dado que es la que tiene molecularmente una cantidad mucho mayor de grupo equivocable con el ácido p-aminobenzoico. No obstante, en casi todas las bacterias piógenas, los derivados de la sulfanilamida que tienen este grupo equivocable en cantidad muy inferior son mucho más activos.

Esta teoría tampoco explicaría la casi especificidad de algunos derivados que actúan en un germen y en otros no; por lo menos limitaría su extensión.

La escasa cantidad de trabajos *in vivo* y en mayor número de animales, empleando varios derivados de estas drogas, reduce la posibilidad de emitir mayores juicios sobre este punto.

Luego, para establecer una similitud del mecanismo de acción entre la promina y demás drogas sulfamidadas, nos encontramos con la siguiente premisa: que la única teoría que hasta el momento permite posibilidades de ser efectiva, carece de la comprobación necesaria para poder comparar la manera de actuar de todas las drogas de este grupo frente a un nuevo medicamento, promina en este caso.

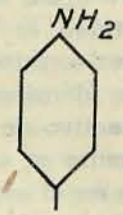
El Laboratorio Experimental de Tuberculosis encargó al autor de este trabajo, hacer un experimento que permitiera establecer una comparación entre algunos derivados sulfamidados de uso más corriente en clínica, por su mayor eficacia, y de la promina, *in vivo*, en relación a la inhibición que ejerciera en su acción terapéutica el ácido p-aminobenzoico, por ser esta acción el único índice que permitiría comparar el modo de actuar de la promina con los otros sulfamidados, en las infecciones a bacterias piógenas.

PLANTEAMIENTO

Un experimento de esta naturaleza posee valor efectivo únicamente cuando sus resultados estadísticos están basados en un número considerable de casos. Por esto elegimos como animal de experimentación a la laucha blanca, que por razones de costo y cantidad de drogas gastadas, nos hacía posible esta condición. Además la laucha blanca es de conocida sensibilidad frente a varias bacterias patógenas para el hombre o los animales, y en especial, a bacterias sensibles a los sulfamidados.

Después de un estudio teórico resolvimos experimentar con cinco bacterias que podrían tener la posibilidad de reunir las condiciones necesarias para servir como reactivo biológico en este estudio. Estas fueron: Estafilococo áureo, Estreptococo hemolítico, Neumococo y Estreptococo de Schütz. Después de una larga comprobación experimental por inoculaciones en lauchas, dos cepas, una de Neumococo tipo II (*) y una de Estreptococo de Schütz, (**) reunían las cualidades de matar a bajas dosis y a corto plazo a todos los animales inyectados. Con ellas dos emprendimos el estudio comparativo para establecer, frente a la acción de varios sulfamidados, cuál nos convenía emplear.

La cepa a elegir debía reunir las siguientes condiciones: 1º ser muy virulenta para la laucha blanca y 2º ser inhibida en su acción patógena por la sulfanilamida, la sulfopiridina, la sulfodiazina y la promina, en escalas diversas. Esta última condición será explicada al hablar en particular de las drogas empleadas. Hecho este estudio, se comportó más virulenta y de sensibilidad más graduada para cada una de las drogas enumeradas, la cepa de Estreptococo de Schütz. Elegimos esta cepa.



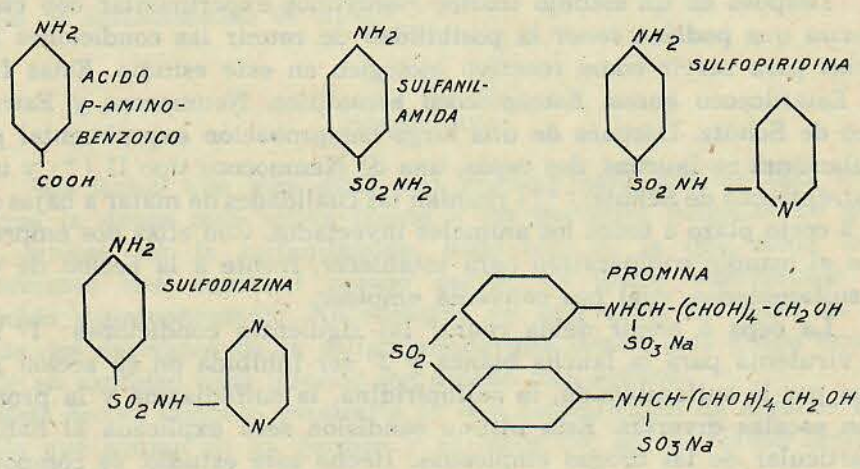
Hemos partido de la posibilidad de confusión de un cuerpo químico con otros por tener un grupo en común. El grupo en común en este

---

(*) Cedida gentilmente por el Dr. E. Armijo del Instituto Bacteriológico de Chile.

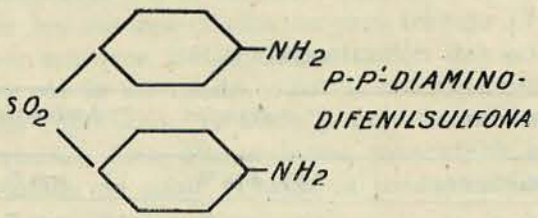
(**) Previamente de una mastitis gurmosa, diagnosticada por el Dr. Lionel Leigh, aislada por nosotros y que a reacciones de Laboratorio confirmó el diagnóstico.

caso sería la anilina o fenilamina, menos el H en posición para, que en el dibujo adjunto reemplazaremos por un guión. A este grupo, que se encuentra en el ácido p-aminobenzoico y en todas las drogas del grupo de las sulfamidadas, lo llamaremos "grupo confundible" en el curso de este trabajo y lo anotaremos por su abreviatura G. C. Su peso calculado como molécula gramo es 92. Así, el ácido p-aminobenzoico tendría el 67% de grupo confundible, tomado, como es lógico, sobre su peso molecular. La sulfanilamida tendría el 53,4%; la sulfopiridina, el 36,9%; la sulfodiazina, el 36,8% y la promina, el 23,5%.



Se eligieron estas drogas porque presentaban una cantidad diferente de grupo confundible entre ellas, menos dos, la sulfopiridina y la sulfodiazina, en que dicha cantidad es prácticamente igual. Esta condición nos permitiría ver, una vez terminados los trabajos, si el comportamiento de estas dos drogas era idéntico. En cuanto a la promina, cabe hacer la salvedad que el grupo activo de esta droga es la p, p' diaminodifenil sulfona y que probablemente su acción se deba a la posible liberación que sufre el grupo activo en el organismo, al ser separado de los dos grupos glucosa-sulfonato. Si esto fuese así, deberíamos calcular el grupo confundible, no en relación a la promina (cuyo peso molecular es 780), sino a la p-p'-diaminodifenil sulfona, cuyo peso molecular es 248. Como la p, p'-diaminodifenilsufona está formada por dos grupos confundibles unidos entre sí por un grupo S02, presentaría en su fórmula el 74% de su peso molecular de grupo confundible, o sea, una cifra más alta aún que la del mismo ácido p-aminobenzoico. En este trabajo los cálculos se hicieron en relación a la promina; sobre este mismo punto volve-

remos a tratar más adelante, en la penúltima parte de este trabajo, en el Comentario.



La forma como se comporta el ácido p-aminobenzoico inhibiendo a estas drogas en su acción protectora, es lo que creemos aportará una luz en el mecanismo de acción de la promina.

Elegidas las drogas a usar como protectoras (sulfanilamida, sulfopiridina, sulfodiazina y promina) y como inhibidora el ácido p-aminobenzoico, era necesario estudiar las dosis y las vías de introducción al organismo. La toxicidad de estas drogas es diferente, no obstante había que colocar una cantidad igual por kilo de peso vivo de cada una de ellas para poder compararlas entre sí, en cuanto a su acción protectora contra la bacteria infectante. Tuvimos que establecer una escala ascendente de estas drogas por kilo de peso animal y la dosis que en todas ellas se mostró visiblemente activa para el germen infectante, pero no abiertamente tóxica frente al animal infectado, fué la de 0,5 gr. por kilo de peso, por vía subcutánea, inyectando la droga en una emulsión de goma hecha en agua estéril.

Elegimos esta vía por la dificultad que existe en administrar las drogas por vía oral a un número grande de lauchas, tanto por el tiempo empleado en el manejo de la sonda, como por la pérdida de medicamento. Si se diera la droga colocada en el alimento, no hay seguridad que todos los animales la ingieran en igual cantidad.

No usamos la sal sódica, que es soluble en agua, porque es muy necrosante por su pH alto: 10,5; y por lo tanto hay formación de histamina, cuerpo tóxico que vendría a desfigurar los resultados, y también, porque siendo los cuerpos administrados en esta forma altamente solubles, el nivel sanguíneo sube en aguja y desciende en vertical, sin mantenerse. Hecha experimentalmente en conejos la inyección de estas drogas por vía subcutánea en goma y no en forma de sal sódica, dió niveles satisfactorios, con excepción de la sulfopiridina (ver cuadro I) cuya concentración no fué nunca bastante alta como para poder titular en cifras (titulación colorimétrica con alfanaftilamina); sólo conseguimos indicios en la sangre, pero a la autopsia, los animales inyectados con esta droga presentaban en su gran mayoría una completa absorción a las 24 horas.

Por esto y por haber encontrado en la bibliografía un caso semejante de un cuerpo sulfamidado (2) que administrado por vía oral fué activo y aún tóxico y no fué posible titularlo en la sangre, no abandonamos esta técnica.

CUADRO I.

N° Conejo	*Medicamento*	*1ª dosificación*	*2ª dosificación*	*3ª dosificación*
655	Sulfanilamida	8,55 mgs. %	3,7 mgs. %	Indicios
675	Sulfanilamida	6,0 mgs. %	2,0 mgs. %	No se hizo
698	Sulfanilamida	6,0 mgs. %	Fallecido	
605	Sulfopiridina	—	—	—
685	Sulfopiridina	Leve indicio	Indicios	Indicios
689	Sulfopiridina	—	Indicios	No se hizo
616	Sulfodiazina	5,3 mgs. %	Indicios	—
625	Sulfodiazina	Ind. marcadas	Ind. marcados	No se hizo
696	Sulfodiazina	Indicios	Indicios	No se hizo
604	Ac. p-aminobenz.	Indicios	—	No se hizo
614	Ac. p-aminobenz.	2,63 mgs. %	—	No se hizo
674	Ac. p-aminobenz.	Indicios	—	No se hizo

La raya corta indica resultado negativo. En algunos animales no se hizo la tercera dosificación por considerarse innecesaria. La 1ª dosificación se hizo a las 4 1/2 horas, la 2ª a las 21 horas y la 3ª a las 28 horas, contando siempre a partir de la hora en que se inyectó el medicamento.

La promina presentaba la diferencia de ser altamente soluble en agua. Para acercarla a las condiciones experimentales de los otros cuerpos, fué colocada en la misma forma en emulsión con goma.

El ácido p-aminobenzoico, que fué colocado a la mitad de los animales que recibieron las drogas protectoras y a la mitad de la dosis que éstas, o sea, 1/4 de gramo por kilo de peso, fué inyectado también con goma por vía subcutánea. El estudio de la concentración de este cuerpo fué hecho en iguales condiciones que en las demás drogas, ya que por su grupo amino da la misma reacción de coloración con la alfanaftilamina. Se hizo un pequeño estudio experimental para saber si habría diferencia de acción colocándolo junto con la droga protectora o en otro sitio, siempre en emulsión con goma. Como no se encontraron

diferencias, por no traumatizar mayormente a los animales y por comodidad, se inyectó junto con la droga protectora en los animales en que había que colocar este cuerpo. La dosis elegida, 1/4 de gramo por kilo de peso, fué determinada por el estudio de las técnicas y de los resultados obtenidos por los autores citados en este trabajo (7; 11) y por un estudio, hecho por nosotros, de la concentración del ácido p-aminobenzoico en la sangre por la vía usada, y por la cantidad que emplearon los autores ya citados inyectando el ácido p-aminobenzoico como sal sódica por vía subcutánea. Esta última forma presentaba el inconveniente anteriormente anotado de subir y bajar la concentración sanguínea rápidamente.

Podría criticarse a esta elección de drogas, que ha habido estudios similares con sulfanilamida y sulfopiridina, pero necesitábamos establecer una comparación entre drogas cuya inhibición por el ácido p-aminobenzoico era ya conocida y drogas en que esto era una incógnita. Además debíamos elegirlas de modo que en dos de ellas el porcentaje de G. C. fuera completamente distinto: una que ya se sabía que era fuertemente inhibida por el ácido p-aminobenzoico: sulfanilamida (*11*) y la otra, promina, en que esto se desconocía. En cuanto al otro par de drogas, cuyo porcentaje de G. C. era idéntico, como ya anotamos anteriormente, en una de ellas ya era conocido el alto grado de inhibición que ejercía en su acción el ácido p-aminobenzoico: sulfopiridina (7) y en la otra, sulfodiazina, este factor también era desconocido.

Para determinar la dosis de bacteria infectante se procedió a exaltar primera al máximo la cepa de Estreptococo de Schütz por pases sucesivos en peritoneo de laucha. Cuando esta exaltación llegó al mayor grado que nos fué posible alcanzar, se procedió a hacer una titulación rigurosa de la virulencia de la cepa, empleando para esto el método de determinación de la "Dosis media mortal".

Dosis media mortal. — Se buscó una cantidad de bacterias que garantizara la muerte de la mitad de los animales inoculados sin excederse, de manera que doblando esta cantidad se tuviera la dosis mínima mortal para todos los inoculados. Se empleó un método de cálculo matemático para evitar en lo posible los errores provenientes de la sensibilidad individual. El método usado en este trabajo es una modificación hecha por el señor Germán Bueno de la Cruz, del Laboratorio Experimental de Tuberculosis, del método que emplea el Dr. F. Chávez en el Instituto Bacteriológico de Chile para titular las cepas de virus rábico.

CUADRO II

Nº laucha	Dilución cultivo	Sobre-vida	Nº laucha	Dilución cultivo	Sobre-vida	Nº laucha	Dilución cultivo	Sobre-vida
1	10^{-4} cc.	57 hrs.	8	10^{-3} cc.	57 hrs.	15	10^{-2} cc.	36 hrs.
2	10^{-4} cc.	Indef.	9	10^{-3} cc.	78 hrs.	16	10^{-2} cc.	43 hrs.
3	10^{-4} cc.	Indef.	10	10^{-3} cc.	Indef.	17	10^{-2} cc.	79 hrs.
4	10^{-4} cc.	Indef.	11	10^{-3} cc.	Indef.	18	10^{-2} cc.	104 hrs.
5	10^{-4} cc.	Indef.	12	10^{-3} cc.	Indef.	19	10^{-2} cc.	Indef.
6	10^{-4} cc.	Indef.	13	10^{-3} cc.	Indef.	20	10^{-2} cc.	Indef.
7	10^{-4} cc.	Indef.	14	10^{-3} cc.	Indef.	21	10^{-2} cc.	Indef.

Indef. significa sobrevida indefinida.
Germen inyectado: Estreptococo de Schütz. Cultivo de 20 hrs. en calcio glicerinado.
Vía: intraperitoneal.

En el cuadro II se suman todos los animales muertos de las tres dosis y como esta cantidad —7— alcanza el total de los animales de la dilución más concentrada, 10^{-2} se elimina. Tomando la segunda dosis 10^{-3} y sumándole el único animal muerto de la dilución más alta (10^{-4}), tenemos:

2 animales muertos con la dilución 10^{-3}
1 animal muerto con la dilución 10^{-4}

3 animales muertos, o sea:

0,001
0,0001

Con 0,0011 de cc de cultivo inoculado a cada laucha intraperitoneal, mueren 3 de 7.

Tenemos que buscar el punto teórico medio, o sea, la dosis de cultivo que mate 3½ lauchas de cada 7.

3 animales mueren de cada 7 con 0,0011 de cc.
3½ " " " " 7 " x " "

Seguimos el cálculo con la ayuda de logaritmos, o sea:

Log. de 0,0011	0,0413927	(—3)
Log. de 3,5000	0,5440680	
	0,5854607	(—3)
Log. de 3,0	0,4771213	
	0,1083394	(—3)

Este sería el logaritmo de la unidad de dosis que mataría teóricamente a la mitad de los animales inoculados, o sea, de la "dosis media mortal".

Multipliquemos esta cantidad por 2 para tener la cantidad teórica de cultivo que inoculada a cada laucha, debe matarlas a todas.

	0,1083394	(—3)
Log. de 2	0,3010300	
	0,4093694	(—3) o sea, 0,0025666 de cc. de cultivo.

Para obtener una muerte uniforme y rápida, decidimos inyectar alrededor de 20 dosis mortales por animal, es decir, tomamos 0,05 cc. de cultivo.

Log. de 0,0025666	0,4093694	(—3)
Log. de 0,05	0,6989700	(—1)
	1,2896106	

Antilogaritmo de 1,2896106 = 19,481. Es decir, inyectamos por animal 1/20 de cc. o lo que es igual, 0,05 de cc. de cultivo en caldo glicerinado de 20 horas, lo que corresponde a 19,481 dosis mortales.

La titulación de las cepas se comprobó antes de cada una de las cinco series de que posteriormente hablaremos, y cada vez que se hubo modificado se hizo nuevos pases por peritoneo de laucha para restablecer su título.

Examinando primero nuestras posibilidades de tiempo necesario para realizar y controlar la experiencia y en segundo lugar, la cantidad de animales de que disponíamos, se dividió la experiencia total en cinco series: tres de noventa animales, una de noventa y nueve y una de cuarenta y cinco. Era imposible, aunque así fuera nuestro deseo para igualar las condiciones, inocular y tratar a los cuatrocientos catorce animales a la vez. Estudiados y titulados todos los elementos que entraban en nuestra experiencia, se procedió a establecer los grupos de animales anteriormente anotados, repartidos siempre en la misma proporción, como puede observarse en los cuadros respectivos. Ya hemos dicho que la droga protectora se administró siempre a la dosis de ½ gramo por kilo y la droga inhibidora (ácido p-aminobenzoico) a la dosis de ¼ de gramo por kilo. A todos los animales sin excepción, se les inyectó intraperitonealmente la dosis de gérmenes ya dicha.

Tomaremos por ejemplo uno de los grupos de noventa animales: diez sirvieron de control bacteriológico, recibiendo igual cantidad de

bacteria infectante que los demás animales de la serie; este grupo no recibió droga alguna. Diez animales fueron inyectados subcutáneamente con sulfanilamida; diez con sulfanilamida y ácido p-aminobenzoico; diez con sulfapiridina; diez con sulfopiridina y ácido p-aminobenzoico; diez con sulfodiazina; diez con sulfodiazina y ácido p-aminobenzoico; diez con promina; y diez con promina y ácido p-aminobenzoico. Estas dosis fueron repetidas en exactas condiciones durante tres días, pasados los cuales no se administró droga alguna a los animales. Se les observó durante diez días y se hizo control diario de los decesos, anotándose lo más aproximadamente posible, las horas de sobrevida. Todos los animales muertos fueron sometidos a autopsia. Se rechazó de la experiencia a todo animal que al frotis no afreciera bacterias ni en la sangre ni en el bazo. Se hizo frotis de todas las lauchas. En la inmensa mayoría, como es clásico en la infección a Estreptococo de Schütz, se encontró gran cantidad de gérmenes en el bazo, no así en la sangre. Los detalles de las cinco series pueden ser observados en los cuadros adjuntos. Debió haberse eliminado de la experiencia sólo a dos animales, por no presentar bacterias al frotis; como este resultado no variaba la estadística general, se despreció para hacer más fácil la lectura de los cuadros. Esta condición de exigir la presencia de Estreptococo de Cchütz en el bazo, la consideramos para evitar el pasar inadvertida una posible epizootia en las lauchas, que nos habría falseado los resultados. Felizmente esto no ocurrió.

Sumando los resultados obtenidos en todas las series (cuadros III, IV, V, VI y VII) hemos confeccionado del cuadro VIII.

CUADRO III

Contro	*Sulfo-diazina*	*Sulfo-diazina y PAB.*	*Sulfo-piridina*	*Sulfo-piridina y PAB.*	*Promina*	*Promina y PAB*	*Sulfani-lamida*	*Sulfani-lamida y PAB.*
16	43	42	35	35	23	20	19	19
16	70	42	42	35	26	27	30	30
20	230	130	206	43	27	33	32	30
23	Indef.	227	230	46	35	35	44	31
25	Indef.	Indef.	Indef.	60	177	35	133	32
26	Indef.	Indef.	Indef.	60	200	35	142	36
28	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	220	42	168	46
32	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	46	Indef.	62
36	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	130	Indef.	86
50	Indef.	Indef.	21	29	22	Indef.	Indef.	182

PAB significa ácido p-aminobenzoico.
En este cuadro y en los siguientes (IV, V, VI y VII) las cifras indican horas de sobrevida desde el momento de la inyección.

CUADRO IV.

Contro	*Sulfo-diazina*	*Sulfo-diazina y PAB.*	*Sulfo-piridina*	*Sulfo-piridina y PAB.*	*Promina*	*Promina y PAB*	*Sulfani-lamida*	*Sulfani-lamida y PAB.*
11	60	28	25	13	60	22	33	32
46	65	34	25	Indef.	66	36	43	33
72	66	46	25	Indef.	68	37	60	33
Indef.	108	70	26	Indef.	205	148	60	34
Indef.	204	112	27	Indef.	Indef.	150	70	44
Indef.	Indef.	116	28	Indef.	Indef.	164	84	47
Indef.	Indef.	160	30	Indef.	Indef.	231	110	58
Indef.	Indef.	184	36	Indef.	Indef.	Indef.	132	80
Indef.	Indef.	Indef.	40	Indef.	Indef.	Indef.	200	158
Indef.	Indef.	Indef.	50	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.

CUADRO V.

Contro	*Sulfo-diazina*	*Sulfo-diazina y PAB.*	*Sulfo-piridina*	*Sulfo-piridina y PAB.*	*Promina*	*Promina y PAB*	*Sulfani-lamida*	*Sulfani-lamida y PAB.*
23	53	10	38	13	24	14	22	23
24	236	12	182	24	74	34	26	40
24	Indef.	38	200	33	118	36	44	43
28	Indef.	53	Indef.	36	136	37	44	44
30	Indef.	62	Indef.	37	178	44	45	44
31	Indef.	84	Indef.	60	180	60	88	55
32	Indef.	90	Indef.	64	180	63	96	85
38	Indef.	114	Indef.	82	188	86	97	90
38	Indef.	160	Indef.	Indef.	Indef.	90	114	121
39	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	184

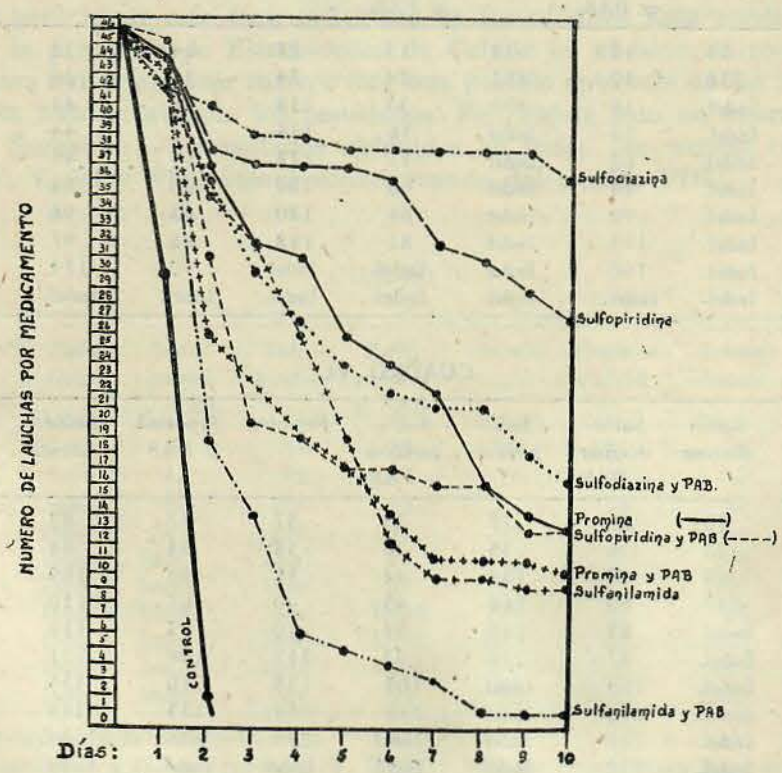
CUADRO VI.

Contro	*Sulfo-diazina*	*Sulfo-diazina y PAB.*	*Sulfo-piridina*	*Sulfo-piridina y PAB.*	*Promina*	*Promina y PAB*	*Sulfani-lamida*	*Sulfani-lamida y PAB.*
18	20	20	27	35	57	32	82	23
20	23	36	35	36	58	34	84	39
20	63	45	154	41	58	40	109	40
21	117	60	160	45	40	67	110	47
22	Indef.	83	166	58	110	95	119	47
24	Indef.	97	226	63	112	104	121	60
27	Indef.	105	Indef.	105	135	110	135	65
28	Indef.	210	Indef.	160	152	133	168	82
30	Indef.	212	Indef.	Indef.	210	Indef.	Indef.	82
37	Indef.	232	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	83
45	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	Indef.	85

CUADRO VII.

Contro	Sulfo-diazina	Sulfo-diazina y PAB.	Sulfo-piridina	Sulfo-piridina y PAB.	Promina	Promina y PAB	Sulfani-lamida	Sulfani-lamida y PAB.
20	Indef.	41	121	37	Indef.	40	95	24
22	Indef.	47	162	60	Indef.	61	136	40
23	Indef.	114	Indef.	62	Indef.	132	144	42
25	Indef.	Indef.	Indef.	200	Indef.	Indef.	Indef.	44
28	Indef.	Indef.	Indef.	204	Indef.	Indef.	Indef.	112

Control diario de lauchas vivas



COMENTARIO

Como puede observarse en el cuadro VIII de resumen, la infección bacteriana fué eficaz, pues a las 48 horas estaba casi el total de los controles muertos y a las 50 horas no quedaba ninguno vivo. El orden de protección de los medicamentos, fué, en forma descendente, como sigue: sulfodiazina, sulfopiridina, promina y sulfanilamida. Esto nos permite hacer una recomendación de orden práctico, alejada propiamente del objeto de este trabajo: en clínica, en la infección a Estreptococo de Schütz convendría usar la sulfodiazina o la sulfopiridina y no la sulfanilamida.

A base de cifras obtenidas en el cuadro VIII y para facilitar la interpretación de los resultados, hemos confeccionado un pequeña cuadro de relación (IX); en la primera columna hemos colocado las drogas; en la segunda el porcentaje de animales salvados con la droga (sin inhibición) durante diez días; en la tercera, la cantidad de G. C. que tiene cada una de estas drogas; y en la cuarta, el porcentaje de inhibición que ejerce el ácido p-aminobenzoico en cada una de estas drogas.

CUADRO IX.

Drogas	*Actividad de la droga (medida en porcentaje de anim. salv.)*	*Cantidad de G. C.*	*Porcentaje de inhibición por PAB.*
Sufanilamida	19,5 %	53,4 %	88 %
Sulfopiridina	58,6 %	36,9 %	51,8 %
Sulfodiazina	76 %	36,8 %	48,5 %
Promina	28,22 %	23,5 %	23 %

Al observar este cuadro vemos que no existe relación, ni siquiera aproximada, entre la actividad de la droga y el grupo confundible (G. C.), lo que estaría en contradicción con la teoría. Esto tal vez podría explicarse por la posibilidad de mayor penetración en determinada clase de células (algunos elementos figurados de la sangre, por ejemplo), o sea, especificidad para salvar ciertas barreras. Una posible prueba de ello es la distinta capacidad de concentración de la sulfopiridina y la sulfodiazina, dado que teniendo casi un mismo tamaño molecular, la sulfodiazina se cencentra a altas dosis en el líquido céfalo-raquídeo, no así la sulfopiridina, que en él acusa una concentración tan baja que casi no puede titular y la actividad de este cuerpo en las meningitis es nula.

No puede medirse la mayor actividad de una droga por su capacidad de concentración en la sangre, ya que esto se ha hecho notar nu-

merosas veces en clínica humana; observando los cuadros I y IX, podemos ver el mismo caso. Posiblemente pudiera existir una influencia de tipo bacteriotrópico, ligada a los núcleos químicos diferentes de cada una de las distintas drogas del tipo sulfonamida, pero esto se alejaría ya de la simple teoría de equivocación de la enzima por grupos parecidos. De aceptar sin restricciones la teoría de Fildes, la sulfanilamida debiera ser la droga más activa. En esta parte la teoría presenta contradicciones hasta el momento inexplicables.

No obstante la contradicción anterior, de la observación del cuadro IX se desprende que hay una relación muy aproximada entre el porcentaje de G. C. de cada droga y el porcentaje de inhibición de la misma droga por el ácido p-aminobenzoico. Como puede verse, la sulfanilamida es la que tiene el G. C. más alto; el porcentaje de inhibición por el ácido p-aminobenzoico es, en esta droga, el más alto. Le siguen en esta escala, con muy poca diferencia entre ambas (0,1%), la sulfopiridina y la sulfodiazina; estas dos cantidades, como puede observarse, descienden bastante, manteniendo una relación con la teoría, al comparalas con la droga anterior, sulfanilamida. La promina ocupa el último lugar del cuadro en cantidad de G. C. Aquí también el porcentaje de inhibición por el ácido p-aminobenzoico desciende en relación estrecha con la cantidad de G. C. llegando ambas cifras prácticamente a igualarse: 23,5 y 23%. Esta droga presenta, a diferencia de las otras tres, bloqueados sus grupos amino y es posible que su actividad se ejerza sólo a través de las pequeñas cantidades de p,p'-diamino difenil sulfona que son liberadas en el organismo. No hay duda, al observar el cuadro VIII, que es tan pequeña la diferencia entre los animales tratados con promina y los tratados con promina y ácido p-aminobenzoico, que bien estas diferencias pudieran deberse a idiosincracias individuales. Sería interesante conocer el comportamiento parelelo de la promina, de la p,p'-diamino difenil sulfona y de otra droga derivada también de la p,p'-diaminodifenil sulfona, que tuviese sus grupos amino bloqueados (ejemplo: diasona o p,p'-diamino difenil sulfona, N N, formal dehido sulfoxilato) (*8*). En esta forma se aclararía en definitiva el comportamiento de estas drogas derivadas de la p,p'-diamino difenil sulfona, en relación con la teoría de Fildes, es decir, frente a la inhibición de los sulfamidados por el ácido p-aminobenzoico, único etalón posible hasta hoy, para comparar la similitud de los mecanismos de acción de este grupo de drogas.

RESUMEN

El Laboratorio Experimental de Tuberculosis del Hospital San José se interesó por conocer el mecanismo de acción de la promina, me-

dicamento que ha tenido efecto inhibidor en Tuberculosis experimental y que actúa también en infecciones de carácter piógeno.

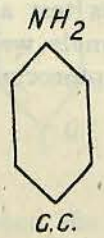
El objeto de este trabajo fué establecer una comparación entre el mecanismo de acción de la promina y otros sulfamidados de acción conocida, sólo en lo que concierne a bacterias piógenas.

Se consideró que el mejor índice para comparar el mecanismo de acción era la inhibición producida por el PAB sobre los sulfamidados. Para acercarnos más al objeto deseado se prefirió hacer el trabajo *in vivo*. Para establecer la escala comparativa se tomaron los siguientes sulfamidados, además de la promina: sulfanilamida, sulfopiridina y sulfodiazina.

Como animal de experimentación se empleó la laucha blanca y como bacteria infectante, el estreptococo de Schütz. Se inocularon en total 414 animales con 19 dosis mortales cada uno de estreptococo de Schütz de una cepa virulenta, de los cuales se dejaron 46 sin medicamento alguno (control bacteriológico). 46 recibieron sulfanilamida y 46 sulfanilamida y PAB. El resto se dividió en grupos de igual cantidad de animales que fueron recibiendo las otras drogas nombradas, quedando siempre un grupo con droga sulfamidada frente a un grupo con droga y PAB.

Las drogas sulfamidadas (incluyendo a la promina) fueron inyectadas subcutáneamente en suspensión gomosa a la dosis de ½ gr. por kilo de peso. El PAB fué inyectado en la misma forma en los grupos correspondientes, pero en distinto sitio, a la dosis de ¼ de gramo por kilo de peso.

Se observó la sobrevida de las lauchas durante 10 días y se sacaron los resultados comparando las cifras de los distintos grupos. Al décimo día quedaban vivas 35 lauchas con sulfodiazina y 18 lauchas con sulfodiazina y PAB; 27 lauchas con sulfopiridina y 13 con sulfopiridina y PAB; 13 lauchas con promina y 10 con promina y PAB; 9 lauchas con sulfanilamida y 1 laucha con sulfonilamida y PAB. De estos resultados, por cálculos matemáticos se sacaron las siguientes conclusiones:



1ª. — Si designamos grupo confundible (G. C.) a la parte igual de las drogas sulfamidadas y del ácido p-aminobenzoico, deducimos en esta experiencia que no existe relación entre el porcentaje por molécula gramo de dicho grupo y la actividad protectora de las drogas usadas, colocadas *in vivo*, en iguales condiciones, frente a una misma bacteria.

2ª. — Existe una estrecha relación entre la cantidad de grupo confundible y el grado de actividad que es capaz de inhibir el ácido p-aminobenzoico.

3ª. — De las cuatro drogas empleadas, la promina demostró ser la menos influenciada por el ácido p-aminobenzoico. Esto haría suponer que su mecanismo de acción pudiese ser diferente.

4ª. — Este experimento plantea, con respecto a la conclusión anterior la necesidad de estudiar, en estas mismas condiciones, el porcentaje de inhibición del ácido p-aminobenzoico frente a la p,p'-diaminodifenilsulfona sola, sin modificaciones, y frente a otros derivados de este cuerpo, que al igual que la promina, tengan los grupos "amino" bloqueados. Esta prueba aclararía el problema.

SUMMARY

The Experimental Section for Tuberculosis of San José Hospital carried on a trial to find out the mode of action of promine, which has shown an inhibitin effect on experimental tuberculosis and also in pyogenuos infections.

The object of this study was to establish a comparison of the mode of action of promine on pyogenes bacteria with that of other sulfa drugs of known action.

The best index of comparison of the action was considered to be that of the inhibition of PABa on sulfa drugs. To obtain clear cut results, in vivo trials were made. In making the comparative scale, the following sulfa drugs were used: Sulfanilamide, Sulfapiridine, Sulfadiazine and Promine.

White mice were used as test animals and Streptococcus Schütz as the infective agent. 414 animals were given 19 lethal doses each of a highly virulent strain of Streptococcus Schütz. Nine groups of 46 animals each were made.

The drugs were given as follows:

Group	I	Sulfanilamide.
"	II	Sulfanilamide and PABa.
"	III	Sulfapiridine.
"	IV	Sulfapiridina and PABa.
"	V	Sulfadiazine.
"	VI	Sulfadiazine and PABa.
"	VII	Promine.
"	VIII	Promine and PABa.

The ninth group did not receive any drug, it was the control group.

The sulfa drugs including promine were given in subcutaneous injections suspended in tragacanth mucilage, in the proportion of 0,5 gramm per kilogramm of body weight. The PABa was injected in the same way in the corresponding groups in doses of 0,25 gramm per kilo of body weight.

Comparisons were made of the number of mice living at the end of ten days in the different groups. The results were as follows:

Sulfanilamide	9
Sulfanilamide and PABa	1
Sulfapiridine	27
Sulfapiridine and PABa	13
Sulfadiazine	35
Sulfadiazine and PABa	18
Promine	13
Promine and PABa	10

CONCLUSIONS

I. — If we take the homologous part of sulfa drugs and of the p-aminobenzoico acid as a "Grupo Confundible" (G. C.), we can conclude



that there was no relation between the G. C. percentage per molecule gramm and the protective activity of the drugs used, when used *in vivo* in equality of conditions, against the same infecting bacteria.

II. — There was a close relationship between the quantity of G. C. and the degree of inhibition of the p-aminobenzoic acid.

III. — Considering the four drugs used promine was less influenced by the p-aminobenzoic acid. This would suggest that its mode of action could be different.

IV. — The experiment undertaken suggests the need of further research, in relation to conclusion number III, of the percentage of inhibition in the same conditions of p-aminobenzoic acid as compared the p,p'-diaminodifenilsulfona alone, as also compared with other derivatives of this chemical group which, like Promine, may have blocked amino groups. This experiment would clear up the problem suggested.

LITERATURA CITADA

(1) BLANCHARD K. C., 1941. The isolation of p-aminobenzoic acid from yeast. Jour. of Biol. Chem. **140**: 919.

(2) CALLOMON F., 1943. New derivatives of diaminodiphenylsulfone. Amer. Rev. Tuberc. **47**: 103.

(3) FELDMAN, HINSHAW and MOSES., 1940. Effect of promine (sodium salt of p,p'-diaminodiphenylsulfone-N-N'-dextrose sulfonate) on experimental tuberculosis: A preliminary report. Proc. Staff Meet., Mayo Clin. 15: 695.

(4) FILDES P., 1940. Rational approach to research in chemotherapy. Lancet. **1**: 955.

(5) GONZALEZ F., 1942. Acción de las sulfonamidas y metabolismo microbiano. Rev. de Med. y Alim. **5**: 178.

(6) GREEN H. N., Citado por: P. Fildes. 1940. Rational approach to reserch in chemotherapy. Lancet. **1**: 955.

(7) MC CARTY M., 1941. Effect of p-aminobenzoic acid on therapeutic and toxic action of sulfapyridine. Soc. Expt. Biol. and Med. Proc. **46**: 133.

(8) RAIZISS G. W., 1943. Diasone. A new and active chemotherapeutic agent. Science. **98**: 350.

(9) RIST N., BLOCH F. and HAMON V., 1940. Action inhibitrice du sulfamide et d'une sulfone sur la multiplication in vitro et in vivo du bacille tuberculeux aviaire. Annales de L'Institut Pasteur. **64**: 203.

(10) ROSELLO H., 1942. Antisepsia interna y profunda. Terapéutica y Farmacodinamia. **2**: 426.

(11) SELBIE F. R., 1940. The inhibition of the action of sulphanilamide in mice by p-aminobenzoic acid. Brit. Jour. Expt. Path. **21**: 90.

(12) STAMP T. C., citado por: P. Fildes. 1940. Rational approach to ressearch in chemotherapy. Lancet. **1**: 955.

(13) WOODS D. D., 1940. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide. Brit. Jour. Expt. **21**: 74