

MATERIALES Y METODOS

Huéspedes:

Se usaron ratones blancos machos y hembras de edades y pesos definidos. Los animales fueron mantenidos aproximadamente a 18°C en jaulas metálicas por grupos de cinco (Mol.) y agua.

LA ASOCIACION SULFANAMIDA - TRIMETOPRIM EN INFECCIONES EXPERIMENTALES CON CLOSTRIDIUM SEPTICUM

DR. CARLOS A. SORIA

Departamento de Ciencias Biológicas,
Pontificia Universidad Católica, y
Laboratorios Life, Quito

El ácido tetrahidrofólico es un metabolito activo que interviene específicamente en reacciones de transporte y utilización de residuos de un solo carbono que se convierten en el grupo formilo del ácido tetrahidrofólico. Eventualmente este carbono podría convertirse en el carbono 2 u 8 en el núcleo de las purinas adenina y guanina, dos de las bases de los ácidos ribonucleico y desoxiribonucleico (1, 2).

La mayoría de las bacterias sintetizan ácido tetrahidrofólico primariamente formando ácido fólico (3) de la unión del ácido glutámico con el ácido dihidroptérico. Este último resulta de la unión del ácido paraamino benzoico aComplejado al núcleo de pteridina, reacción que es catalizada por la enzima sintetasa del ácido dihidroptérico. El ácido fólico, a su vez, es re-

ducido a ácido dihidrofólico y éste a ácido tetrahidrofólico con la intervención de enzimas reductasas del ácido fólico empleando NADPH como donador del hidrógeno. Las sulfanamidas bloquean por inhibición competitiva con el ácido paraamino benzoico la síntesis de ácido dihidroptérico (4 - 6), reacción que es catalizada por la enzima sintetasa del ácido dihidroptérico, mientras que el derivado pirimidínico trimetoprim (TM), puede actuar inmediatamente después de las sulfanamidas inhibiendo a la enzima reductasa del ácido dihidrofólico, por bloqueo de la reducción de este último a ácido tetrahidrofólico.

Considerando la necesidad e importancia de los ácidos nucleicos en el metabolismo celular y la especificidad de los quimoterápicos se entiende la susceptibilidad de las bacterias al efecto

letal (7), potencializado y en secuencia (8, 9 - 11), que resulta del contacto bacteriano con la asociación de las sulfanamidas y el TM. Estas asociaciones, deberían ser efectivas aún para bacterias sulfanidoresistentes, las cuales necesitan adición externa de ácido fólico para la síntesis del ácido tetrahidrofólico. Además, se ha sugerido que asociaciones terapéuticas de doble acción, podrían prevenir resistencias bacterianas (12) aducidas a genes identificados en transposones o segmentos de DNA con habilidad para moverse entre plásmidos o a otros replicones como el cromosoma bacteriano o el genoma de un bacteriófago (11).

El presente estudio compara el efecto de varias sulfonamidas en asociación con TM en casos de infecciones con *Clostridium septicum* ocasionadas experimentalmente a ratones de laboratorio. Se escogió este modelo infeccioso considerando la aparente poca susceptibilidad del género *Clostridium* (13) condición que permitiría valorar el alcance potencial terapéutico de este tipo de asociaciones. Se reporta el efecto letal de *C. septicum* en las infecciones experimentales no tratadas. Por otro lado, se demuestra la influencia de las vías de administración y del número de tratamientos con quimoterápicos, así como el efecto de la dosis de confrontación en función de la edad y el peso de los animales. Estos parámetros se complementan con otros que comprueban la aguda influencia del tiempo de infección con este organismo antes del inicio del tratamiento.

MATERIALES Y METODOS

Huéspedes:

Se usaron ratones blancos machos y hembras de edades y pesos definidos. Los animales fueron mantenidos aproximadamente a 18°C en jaulas metálicas conteniendo 10 individuos por jaula con libre acceso a comida (Molinos Champion, Ecuador) y agua.

Bacterias:

C. septicum creció en medio Hibler durante 48 hr a 32°C y durante 15 días a temperatura ambiente. Posteriormente fueron colectados y lavados con 0.15 N cloruro de sodio estéril usando una centrifugadora Internacional (Mass, E. U.) a 770 G por 30 min, luego se les guardó a -70°C en frascos estériles hasta su uso. Se calculó la dosis letal 100 (DL₁₀₀) inoculando a grupos de 10 ratones con promedios de peso de 12 o de 22 g, un volumen de 0.1 ml de estas bacterias diluidas en 0.1 N cloruro de calcio, usando factores de dilución de 2 y de 10. Una DL₁₀₀ por lo tanto, correspondería al inoculum de la mas alta dilución, capaz de ocasionar la muerte del 100 por 100 de un grupo de ratones infectados a nivel del músculo en la pierna derecha, usando jeringuillas de 1 ml con aguja 27 G.

Quimoterápicos:

Se usaron tres fórmulas experimentales de los Laboratorios Life, Quito,

que consistían de asociaciones de sulfanamidas con trimetoprim (2, 4 diamino —5 (3', 4', 5' — trimetoxibenzil, pirimidina) en soluciones con bases acuosas y alcohólicas guardando las proporciones 5 a 1 para las sulfamidas y el trimetoprim, respectivamente. Las sulfamidas usadas fueron: sulfametoxazole (4 amino -N- (-metil - isoxazolil) benzenosulfanamida), sulfadiazina (4 -amino -N-2 pirimidinil benzenosulfonamida), o la sulfadoxina (4 - amino N-(5, 6 - dimetoxi -4- pirimidinil) benzenosulfonamida).

Previo al uso de estos quimoterápicos se hicieron valoraciones de los principios activos usando nitrito de sodio para la titulación de las sulfonamidas y determinando la densidad óptica (DO) del trimetoprim en un espectrofotómetro Beckman (Irvine, Cal., E. U.) a la máxima absorción, entre 261 y 279 nm, usando extractos de cloroformo y ácido acético (14). Diluciones de los quimoterápicos fueron preparados asépticamente en agua y propilén glicol, al momento de utilizarse y en las concentraciones deseadas. Estas diluciones fueron administradas por las vías y en las concentraciones indicadas, a diferentes tiempos, después de la infección, usando una jeringuilla de 1 ml y aguja de 27 G. Los animales de cada experimento fueron observados diariamente durante 15 días después de la confrontación, anotándose la sintomatología, mortalidad y sobrevivencia. Al cabo de los 15 días indicados se dio por terminado el experimento.

Estudios de confrontación y control:

En 2 experimentos similares, cada ratón de 13 grupos con 10 animales adultos por grupo, fueron confrontados con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*. Dos horas más tarde, cada animal de 12 de estos grupos, fue administrado 20 mg de sulfametoxazole - trimetoprim (SMZ-TM) por kg de peso; cuatro de estos grupos recibieron tratamiento por vía intramuscular (im), otros 4 por la vía intraperitoneal (ip) y los 4 restantes fueron tratados por la vía subcutánea (SC). El tratamiento fue repetido en tal forma que hubo 3 grupos con un solo tratamiento, cada grupo por una vía distinta; otros 3 grupos recibieron 2, 3 y 4 tratamientos administrados en forma similar. El segundo tratamientos fueron administrados a hr. del primero; el tercero y cuarto tratamientos fueron administrados a las 24 hr. del primero y del segundo respectivamente. Uno de los 13 grupos sirvió de control, en consecuencia no fue sometido a ningún tratamiento después de la confrontación.

La confrontación con *C. septicum* y el efecto de las 3 sulfonamidas en asociación con TM, fueron estudiadas en 2 experimentos similares con 7 grupos de 10 animales adultos, todos confrontados con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*.

Los animales de 2 de estos grupos fueron tratados con 1 y 2 dosis respectivamente de SMZ- TM, a razón de 20 mg por kg de peso; el primer tratamiento se inició a las 2 hr de la confrontación y el segundo a las 16 hr. Dos grupos recibieron sulfadiazina-trime-

toprim (SDI-TM) mientras que otros dos grupos fueron tratados con sulfadoxina-trimetoprim (SDX-TM). Uno de los grupos fue designado control y no recibió tratamiento.

El efecto de la dosis de confrontación se estudió en 12 grupos de 10 ratones adultos. Los animales de 4 de estos grupos recibieron 1 DL₁₀₀, otros 4 grupos recibieron 10 DL₁₀₀ y los restantes animales fueron confrontados con 100 DL₁₀₀. Tres grupos, cada uno confrontado con 1, 10 y 100 DL₁₀₀, fueron tratados 2 hr después con una dosis de SMZ-TM, equivalente a 20 mg por kg de peso. Otros 3 grupos confrontados de la misma manera que los anteriores recibieron tratamientos con SDI-TM, mientras que 3 más fueron tratados con SDX-TM. Los 3 grupos restantes sirvieron de control y no recibieron tratamiento. El mismo experimento se repitió en grupos de animales similares a los anteriores que recibieron 2 tratamientos, el primero administrado a las 2 hr y el segundo a las 16 hr después de la confrontación.

El efecto de la dosis de tratamiento se demostró en 2 experimentos similares, cada uno con 10 grupos de 10 animales por grupo, todos ellos confrontados con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*. Tres de los grupos recibieron 2 tratamientos de SMZ-TM, a las 2 y 16 hr después de la confrontación. Los animales del primer grupo recibieron tratamiento a razón de 10 mg por kg de peso, mientras que los del segundo y tercer grupo fueron tratados con 20 y 30 mg por kg respectivamente. Otros 3 grupos fueron tratados con SDI-TM,

mientras que 3 grupos más recibieron SDX-TM, en forma similar a los 3 primeros grupos. El grupo control no recibió tratamiento.

La influencia de la edad y el peso de los animales se estudió en 2 experimentos similares, cada uno con 8 grupos de 10 animales. Cuatro de los grupos se conformaron con animales de 1 mes de edad entre 10 y 12 g de peso, quienes recibieron 1 DL₁₀₀ correspondiente a la mitad de la dosis de confrontación (dilución 1:2) de los animales adultos. Los 4 grupos restantes se conformaron de animales de 4 meses de edad con pesos entre 20 y 24 g, confrontados con el equivalente a 1 DL₁₀₀. Un grupo de animales jóvenes y otro de adultos, recibieron 2 tratamientos con 20 mg de SMZ por kg, a las 2 y 16 hr después de la confrontación. Otros 2 grupos fueron tratados con SDI-TM, mientras que otros 2 grupos recibieron SDX-TM, en forma similar al tratamiento descrito para el primer grupo. Los grupos control no recibieron tratamiento.

La influencia del tiempo de infección con *C. septicum* y el tratamiento con una dosis de SDX-TM a razón de 20 mg por kg fue estudiada en 2 experimentos similares, cada uno con 7 grupos de ratones adultos de 10 animales cada uno, infectados con 1 DL₁₀₀. Uno de los grupos confrontados fue inmediatamente tratado con SDX-TM; otros 5 grupos recibieron tratamientos a las 2, 4, 6, 8 y 24 hr posteriores a la confrontación, respectivamente. El séptimo grupo control no recibió tratamiento.

La mortalidad fue analizada por la prueba "goodness of fit" de Kolmogorov - Smirnov y solo se reportaron diferencias si el nivel de significancia era menos que 0.05 (15).

RESULTADOS

La Tabla I indica que en confrontaciones letales con *C. septicum* se logra un progresivo aumento en la sobrevivencia a medida que aumenta el número

TABLA I: Efecto de la vía de administración y del número de tratamientos con SMZ-TM después de la confrontación con DL₁₀₀ de *C. septicum*

VIA DE TRATAMIENTO 20 mg/kg/TRA- TAMIENTO	NUMERO DE TRATAMIENTOS Y RESULTADOS							
	1		2		3		4	
	M	S	M	S	M	S	M	S
im	4	6	2	8	1	9	0	10
ip	5	5	5	5	2	8	2	8
sc	8	2	3	7	2	8	3	7

SMZ — TM = Sulfametoxazol — Trimetoprim.

im = intramuscular, ip = intraperitoneal, sc = subcutáneo

M = número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes

Resultados representan el promedio de 2 experimentos. Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Grupos control no recibieron tratamiento y todos murieron de la infección.

mero de tratamientos con SMZ-TM; la mortalidad más alta se observó cuando el tratamiento consistió en una sola dosis. Además, se observó que la sobrevivencia parece aumentar cuando se administra tratamientos por la vía im; otras vías como la ip o sc parecen ser menos efectivas. Todos los animales control que no recibieron tratamiento y aquellos tratados que no soportaron la confrontación, murieron con infecciones caracterizadas por la presencia de hinchazón pronunciada en

el sitio de la confrontación y generalizada a nivel del abdomen y genitales. Mientras tanto, los animales sobrevivientes tratados permanecieron saludables durante los 15 días siguientes a la confrontación, al cabo de los cuales se dio por terminado el experimento.

Del estudio comparativo entre las 3 sulfonamidas (Tabla II) se desprende que el número de sobrevivientes aumenta considerablemente cuando el tratamiento consiste en una o dos do-

TABLA III: Confrontación con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum* y el efecto terapéutico de 3 sulfonamidas en asociación con trimetoprim.

**ASOCIACION TERAPEUTICA
ADMINISTRADA
(20 mg/kg/TRATAMIENTO**

NUMERO DE TRATAMIENTOS Y RESULTADOS

	1		2	
	M	S	M	S
SMZ — EM	4	6	3	7
SDI — TM	3	7	1	9
SDX — TM	0	10	0	10

SMZ — TM = Sulfametoxazol — trimetoprim. SDI — TM Sulfadiazina-trimetoprim SDX — TM = sulfadoxina — trimetoprim.

M = Número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes.

Resultados representan el promedio de 2 experimentos. Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Grupos control no recibieron tratamiento y todos murieron de la infección.

sis de SDX-TM a razón de 20 mg por kg, por dosis. Se nota que la asociación SMZ-TM parece ser menos efectiva en el control de la infección aún cuando se le administra en 2 dosis de 20 mg por kg por dosis. Los resultados del tratamiento con 2 dosis de SDI-TM son similares a los resultados con uno o 2 tratamientos de SDX-TM, pero se observó una disminución en la sobrevivencia cuando se administró una sola dosis de SDI-TM. Los animales que no fueron tratados murieron con sintomatología durante el primero o segundo día después de la confrontación, mientras que los sobrevivientes no presentaron síntomas durante los 15 días que duró el experimento.

La Tabla III indica los resultados del efecto de varias dosis de confrontación con *C. septicum* y su tratamiento con una dosis (20 mg/kg) de varias sulfonamidas en asociación con trimetoprim. Nuevamente se encuentra un mayor número de sobrevivientes en los animales tratados con SDX-TM, aún en aquellos confrontados con 10 (o) 100 DL₁₀₀. Se nota disminución en el número de sobrevivientes a medida que aumenta la dosis de confrontación hasta llegar al 100 por 100 de mortalidad cuando se confronta con 100 DL₁₀₀ y se trata con una dosis de SDI-TM o de SMZ-TM, o por lo menos al 70 por 100 de mortalidad al usar SDX-TM en animales confrontados en forma similar. El menor porcentaje de

TABLA III: Efecto de la dosis de de confrontación con *C. septicum* según tipo y número de tratamientos administrados.

TIPO DE TRATAMIENTO
(1 × 20 mg/kg)

DOSIS DE CONFRONTACION Y RESULTADOS

	1 DL ₁₀₀		10 DL ₁₀₀		100 DL ₁₀₀	
	M	S	M	S	M	S
SMX — TM	6	4	10	0	10	0
SDI — TM	3	7	8	2	10	0
SDX — TM	0	10	4	6	7	3
CONTROL	9	1	10	0	10	0

SMZ — TM = Sulfametoxazol — trimetoprim, SDI — TM = Sulfadiazina-trimetoprim, SDX — TM = Sulfadoxina — trimetoprim.

M = Número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes.

Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Grupos control no recibieron tratamiento

TABLA IV: Efecto de la dosis de confrontación con *C. septicum* según tipo y número de tratamientos administrativos.

TIPO DE TRATAMIENTO
(2 × 20 mg/kg)

DOSIS DE CONFRONTACION Y RESULTADOS

	1 DL ₁₀₀		10 DL ₁₀₀		100 DL ₁₀₀	
	M	S	M	S	M	S
SMZ — TM	3	7	5	5	10	0
SDI — TM	1	9	4	6	10	0
SDX — TM	0	10	2	8	8	2
CONTROL	10	0	10	0	10	0

SMZ — TM = Sulfametoxazol — trimetoprim, SDI — TM = Sulfadiazina-trimetoprim, SDX — TM = Sulfadoxina — trimetoprim.

M = Número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes.

Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Grupos control no recibieron tratamiento.

sobrevivencia se puede observar en los animales tratados con una sola dosis de SMZ-TM, inclusive en las confrontaciones con 1 DL₁₀₀ donde se observa mas mortalidad (60 por 100) que sobrevivencia. Los grupos control y aquellos tratados que soportaron la confrontación, murieron por la infección en el transcurso de 2 días. Un animal control del grupo confrontado con 1 DL₁₀₀ sobrevivió a la infección.

Resultados similares se observaron en otros grupos de animales que recibieron 2 tratamientos contra 100 DL₁₀₀ de *C. septicum* (Tabla IV); sin embargo se nota un aumento de la sobrevivencia en animales confrontados con 1 (o) 10 DL₁₀₀. Además, los resultados indican que la mortalidad es menor cuando se trata a base de SDX-TM. Otros animales, incluyendo los controles, murieron por la infección al

segundo o tercer día de la confrontación.

La Tabla V resume los resultados de experimentos realizados con varias dosis de asociaciones entre sulfonamidas y trimetoprim, empleadas en cada uno de 2 tratamientos administrados después de la confrontación con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*. Se nota mayor sobrevivencia en animales que recibieron 20-30 mg de sulfonamidas -TM por kg, en comparación con aquellos que recibieron 10 mg por kg. Nuevamente se encuentran sobrevivencias mas altas a base de SDX-TM y sobrevivencias mas bajas con el uso de SMZ-TM. Los animales que sucumbieron a la infección, incluyendo todos los controles, murieron con síntomas en el transcurso de 1 a 2 días después de la infección.

TABLA V: Efecto de la dosis y tipo de tratamiento después de la confrontación con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*.

TIPO DE TRATAMIENTO

(DOS DOSIS)

DOSIS/ CADA TRATAMIENTO Y RESULTADOS

0	SMZ — TM	5	5	3	7	3	7		
0	SDI — TM	3	7	3	7	2	8		
0	SDX — TM	3	7	0	10	1	9		

SMZ — TM = Sulfametoxazol — trimetoprim, SDI — TM = Sulfadiazina - trimetoprim, SDX — TM = sufadoxina - trimetoprim.

M = Número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes.

Resultados representan el promedio de 2 experimentos. Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Grupos control no recibieron tratamiento y todos murieron de la infección.

La influencia de la edad y peso de los ratones en la infección con el tra-

tamiento contra *C. septicum* está indicada en la Tabla VI. Se nota en todos

TABLA VI: Influencia de la edad y peso de los animales y el efecto del tipo de tratamiento en la infección con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*.

TIPO DE TRATAMIENTO

(2 × 20 mg/kg)

	EDAD Y PESO DE LOS RATONES				
	M		S		
	1 mes, 10-12 g		4 meses, 20-24 g		
SMZ — TM	0	7	3	2	8
SDI — TM	1	6	4	2	8
SDX — TM	4	3	7	0	10
CONTROL	8	10	0	10	0

SMZ — TM = Sulfametoxazol — trimetoprim, SDI — TM = Sulfadiazina — trimetoprim, SDX — TM = Sulfadoxina — trimetoprim.

M = Número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes.

Resultados representan el promedio de 2 experimentos. Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Grupos control no recibieron tratamiento.

los casos una mortalidad más alta en los animales jóvenes de 1 mes con pesos entre 10 - 12 g; en cambio en los animales adultos de 4 meses con pesos entre 20 y 24 g se encuentra disminución en la mortalidad. Se anotan porcentajes de sobrevivencia más altos con el tratamiento SDX-TM y menores pero sobrevivencias comparativas cuando el tratamiento administrado consistió en SDI-TM o SMZ-TM. Todos los animales controles murieron con síntomas de infección en el transcurso de los 2 días después de la confrontación; casos similares se observa-

ron en algunos de los animales tratados que no soportaron la dosis de confrontación.

La influencia del tiempo de infección y el inicio del tratamiento se puede apreciar en los resultados de la Tabla VII. Se encuentra un aumento progresivo de la mortalidad a medida que avanza la enfermedad antes del inicio del tratamiento con una dosis de SDX-TM, notándose que el porcentaje de sobrevivientes es alto cuando se inicia el tratamiento simultáneamente a la infección experimental. Este porcen-

TABLA VII: Influencia del tiempo de la infección (1 DL₁₀₀ de *C. septicum* antes del tratamiento con una dosis de SDX-TM (20 mg/kg).

EVOLUCION DE LA CONFRONTACION (HORAS TRANSCURRIDAS ANTES DEL TRATAMIENTO).

RESULTADOS DESPUES DE LA INFECCION Y DEL TRATAMIENTO

Horas de confrontación	M	S	M	S
0	8	2	7	10
2	8	4	6	9
4	10	7	3	6
6	0	0	10	4
8	0	0	10	5
24	0	0	10	0

SDX — TM = Sulfadoxina — trimetoprim.

M = Número de ratones muertos, S = número de sobrevivientes.

Resultados representan el promedio de 2 experimentos. Cada grupo experimental consistió de 10 animales. Los grupos control no recibieron tratamiento y todos murieron de la infección.

taje fue reducido al 50 por 100 cuando se trató a las 8 hr de la confrontación, tiempo en el cual se empieza a notar hinchazón y vascularización en el sitio de la infección. Todos los controles al igual que los animales tratados a las 24 hr de la confrontación, incluyendo aquellos que no respondieron al tratamiento, murieron a las 24 hr. Los animales sobrevivientes no presentaron síntomas de enfermedad durante los 15 días que estuvieron en observación.

DISCUSION

Las sulfonamidas son consideradas como antimetabolitos del ácido paraamino benzoico y actúan bloqueando la formación del ácido fólico por inhibición enzimática de la sintetasa del ácido dihidroptérico (3). El uso efectivo de las sulfonamidas en el tratamiento de infecciones bacterianas, probablemente radica en el hecho de que los mamíferos dependen de ácido fólico externo a diferencia de la mayoría de bacterias que lo sintetizan de ácido paraamino benzoico. El TM por otro la-

do, es un potente inhibidor de la enzima reductasa del ácido dihidrofólico que en su condición normal finalmente termina con la conversión del ácido fólico en el activo metabolito ácido tetrahidrofólico (16). Ventajosamente, la enzima bacteriana parece ser miles de veces mas sensible al TM que la enzima de los mamíferos (17, 19).

Se ha encontrado que la asociación entre sulfonamidas de corta o larga duración con TM (3) da como resultado un efecto sinérgico de potenciación (8), lo cual permite usar dosis mucho mas pequeñas, inclusive con efectos bactericidas (7) y no solamente bacteriostáticos.

Estas consideraciones bien pudieron servir para explicar los resultados reportados con las 3 asociaciones de sulfonamidas y TM, las cuales no parecían ser tóxicas en las concentraciones usadas y antes bien al ser administradas apropiadamente, daban sobrevivencias estadísticamente significativas ante infecciones experimentales de *C. septicum* que en animales controles resultaron ser letales (Tabla I - VI).

Se puede apreciar la importancia de la vía im en la administración terapéutica de SMZ-TM (Tabla I) encontrándose un mayor número de sobrevivientes en los animales tratados por esta vía que en aquellos en los que se utilizó la vía o sc. Estos resultados posiblemente se expliquen por diferencias en el tiempo de absorción y en las cantidades de los quimoterápicos absorbidos, resultados que a su vez dependen de las vías de administración usados (19, 20, 21).

En igual forma se anota la necesidad de 2 o más tratamientos con SMZ-TM para obtener sobrevivencias entre 50 y 100 por 100. Los resultados seguramente concuerdan con las propiedades del SMZ y del TM que se caracterizan por su rápida absorción; alcanzando valores máximos sanguíneos entre los 40 min y las 4hr dependiendo de la vía de administración (20, 21). Esta información contrasta con las vidas medias sanguíneas relativamente cortas, que pueden estar por las 11hr aproximadamente para estos fármacos (7, 12), lo que indica la necesidad de readministrar el tratamiento (19) para mantener niveles terapéuticos aceptables por al menos 24 hr durante la infección experimental.

Las propiedades farmacológicas de las sulfonamidas (12) pueden explicar las diferencias que se anotan del estudio comparativo entre las sulfanamidas en asociación con TM (Tabla II). Un porcentaje de sobrevivencia significativamente mayor se encuentra en los animales tratados con SDX-TM y no parece haber diferencias significativas entre usar 1 o 2 tratamientos con SDX-TM; más aún, resulta atractivo el poder utilizar una dosis terapéutica única en vez de varias. No se puede decir lo mismo de los animales tratados con SMZ-TM, o con SDI-TM. Si bien el mecanismo de acción de las sulfonamidas es similar, sus propiedades farmacológicas son diferentes, así la vida media de la SDX en el plasma es de 150 hr, en contraste las de la SDI y SMZ son de 16 a 11 hr respectivamente; a su vez, a la

SDX se la puede encontrar como un 5 por 100 libre en el plasma, a diferencia de la SDI y SMZ que pueden existir entre un 55 y un 32 por 100 libre. El resto de la droga se acompleja a la proteína del plasma, lo que dificulta su eliminación a través del riñón. Ahora bien, estas observaciones no pueden generalizarse, considerando que algunas infecciones pueden reducir la concentración de albúmina en el plasma y de consiguiente reducir la habilidad de estos fármacos para combinarse con dicha proteína; en igual forma la infección puede ocasionar daños a la función renal con la consecuente alteración en la excreción urinaria de los fármacos (7, 12). Es procedente anotar también que la tasa de excreción urinaria de las sulfanamidas y del TM depende del pH de la orina (11) porque en condiciones alcalinas se incrementa la cantidad de SMZ recolectado y decrece el TM, mientras que en condiciones ácidas es el TM el que puede ser recolectado en mayores proporciones.

Se pueden observar diferencias significativas en las sobrevivencias de animales confrontados con dosis letales altas o bajas y tratados con los quimioterapéuticos en estudio (Tablas III, IV). Se nota la dificultad de controlar la infección cuando la confrontación es mas agresiva, así al usar 100 DL₁₀₀ como inoculum de confrontación se observan mortalidades que van desde el 80 al 100 por 100, y no parece haber diferencias entre el uso de una sulfanamida u otra. Diferencias significativas se pueden anotar cuando las dosis

de confrontación consisten de 1 o de 10 DL₁₀₀ encontrándose sobrevivencias más altas en los animales tratados con SDX-TM.

Varias concentraciones por dosis de tratamiento se ensayaron en grupos de animales infectados con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum* y que recibieron 2 dosis de 10, 20 o 30 mg de dosis tratante por kg de peso. No parece haber diferencias significativas entre los animales tratados con 20 o con 30 mg de sulfanamidas -TM, por kg de peso y se nota una ligera disminución de la sobrevivencia en los grupos que recibieron 2 dosis de SMZ-TM y SDX-TM a razón de 10 mg por kg. Estos experimentos indican que la dosis de tratamiento óptimo se encuentra entre los 20 mg por kg por dosis y que un aumento al doble de la dosis no parece alterar los resultados (Tabla V). Otros investigadores (22, 23) han tratado exitosamente infecciones urinarias en perros y gatos usando dosis aproximadas a los 20 mg de asociaciones SMZ-TM o SDI-TM, por kg de peso.

La importancia de la edad y el peso de los animales, así como el efecto del tipo de tratamiento administrados a estos ratones infectados con 1 DL₁₀₀ de *C. septicum*, queda demostrado en los resultados de la Tabla VI. Se aclara que 1 DL₁₀₀ en animales de 1 mes, con pesos entre 10 y 12 g, corresponde a la mitad del número de esporas que equivalen a 1 DL₁₀₀ en los animales adultos. Los resultados demuestran sobrevivencias significativamente mas altas en los animales adultos, mientras que los animales más jóvenes parecen ser

más susceptibles, a pesar de haber recibido dosis letales y terapéuticas igualmente proporcionales a las recibidas por los animales adultos, en función del peso del animal.

La importancia del tratamiento oportuno queda demostrado en los experimentos sobre la influencia del tiempo de infección en ratones confrontados con 1 DL_{100} de *C. septicum* y tratados con 20 mg de SDX-TM por kg de peso (Tabla VII). Se nota que el porcentaje de sobrevivencias es alto cuando el tratamiento es iniciado hasta 2 hr después de la confrontación, o pasadas las 2 hr en estos experimentos se nota un avance progresivo de la mortalidad al extremo que ninguno de los tratamientos resultó ser efectivo al iniciarse 24 hr después de la infección. *C. septicum* produce potentes exotixinas (24), los quimoterapéuticos pueden eliminar a estas bacterias, en cambio las toxinas, una vez en el sistema continúan ejerciendo efectos histopatológicos. Es de esperarse que en el caso de infecciones avanzadas con *C. septicum*, el inicio de un tratamiento quimoterapéutico acompañado de antitoxinas resulte ser satisfactorio.

RESUMEN

Infecciones experimentales con *C. septicum* en ratones sirvieron para estudiar comparativamente el efecto quimoterapéutico de soluciones con sulfametaxozole, sulfadiazina o sulfadoxina, en asociación con trimetoprim. Se estudió el efecto de algunas vías de administración terapéutica así como las

dosis óptimas y la influencia del número de dosis de cada tratamiento en el curso de infecciones letales. Se observó la influencia de la edad y peso de los animales confrontados, así como el tiempo de la infección transcurrido antes del tratamiento. Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de estos quimoterápicos de amplio espectro en el control de infecciones letales con *C. septicum*. Esta efectividad parece depender del inoculum de confrontación usado, de la edad y peso de los animales huéspedes, del tiempo de la infección transcurrida antes del tratamiento, así como de la vía de administración y del tipo de tratamiento usado. Una combinación cuidadosa de estos parámetros, especialmente cuando se usó al asociación terapéutica sulfadoxina-trimetoprim por la vía intramuscular, dio como resultado altos números de sobrevivencia ante infecciones que en animales controles resultaron ser letales. Se discute el significado de estas observaciones en términos del curso de la infección bacteriana dependiente del mecanismo de acción de cada asociación terapéutica estudiada.

SUMMARY

Experimental infections with *C. septicum* in mice were used as a model to study chemotherapeutical effects of solutions containing sulfamethoxazole, sulfadiazine or sulfadoxine in association with trimethoprim. Studies were conducted on the influence of the routes used for therapeutical

administration, as well as optimum dosages and number of doses administered during the course of lethal infections. The influence of age and weight of the host as well as time of infection before treatment was also observed.

The results obtained showed that broad spectrum chemotherapeutics are effective against lethal challenge with *C. septicum*. This effectiveness appeared to depend on the challenge inoculum used as well as on the age and weight of the host. The time of infec-

tion before treatment and the route of therapeutic administration seemed to be important considerations. A careful combination of these parameters, specially when was done/via intramuscular with the association sulfadoxine trimethoprim gave higher survival numbers after treatment. The significance of these observations are discussed in terms of the course of the infection and the mechanism of action of each of the therapeutical associations studied.

LITERATURA CITADA

- 1 Schofield, C. B. S., Mastertoh, G., Moffett, M. Gonorrhoea in woman: Treatment with sulfamethoxazole and trimethoprim. *J. Inf. Disc.* 124: 533, 1971.
- 2 Mahler, H. R., Cordes, E. H. Biological chemistry. Harper and Row, Publishers, New York, 1966.
- 3 Beisberg, B., Herzog, J., Weinstein, L. In vitro antibacterial activity of trimethoprim alone and combined with sulfonamides. *Antimicrobial agents and Chem.* 6: 424, 1966.
- 4 Hitchings, G. H. Mechanism of action of trimethoprim -sulfamethoxazole I. *J. Infect. Dis.* 128, Suppl.: S437, 1973.
- 5 Burchall, J. J. Mechanism of action of trimethoprim -sulfamethoxazole II. *J. Infect. Dis.* 128. Suppl.: 5437, 1973.
- 6 Hitchings, G. H. Folate antagonists as antibacterial and antiprotozoal agents. *Ann N. Y. Acad Sci.* 186:444, 1971.
- 7 Darrell, J. H., Garrod, L. P. Waterworth, MP. Trimethoprim laboratory and clinical studies *J. Clin. Path.* 21:202, 1968.
- 9 Then, R. Angedrn, P. Nature of the bactericidal action of sulfonamides and trimethoprim alone and in combination. *J. Infect. Dis.* 128, Suppl.: S 498, 1973.
- 10 Maskell, R., Okubadejo, O. A., Payne, R. H., Pead, L. Human infection with thymine requiring bacteria. *J. Med. Microbiol.* 11:33, 1978.
- 11 Rubin, R. H., Swartz, M. N. Trimethoprim - sulfamethoxazole. *The New England J. Med.* 303:426, 1980.
- 12 Reeves, D. S., Bint, A. J., Bullock, D. W. Use of antibiotics sulphonamides, cotrimoxazole, and tetracyclines. *British Med. Journal*, 2:410, 1978.
- 13 Wüst, J., Wilkins, T. D. Susceptibility of anaerobic bacteria to sulfamethoxazole trimethoprim and routine susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:384, 1978.
- 14 British Pharmacopoeia. University Press, Cambridge, 1980.
- 15 Zar, J. H. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood. Cliffs, N. J., 1974.
- 16 Roth, B., Falco, B. A. Hitchings, G. H., and Bushby, S. R. M. 5 Benzyl 2, 4. diamino pyrimidines as antibacterial agents. Synthesis and antibacterial activity in vitro. *J. Med. Pharm. Chem.* b:1103, 1962.

- 17 Hitchings, G. H. Species differences among dihydrofolate reductases as a basis for chemotherapeutic, *Postgrad. Med. J.* 45 (suppl.): 7, 1969.
- 18 Martin, D. C., Arnold, J. D. Trimethoprim in therapy of acute attacks of malaria. *J. Clin. Pharm.* 7:336, 1967.
- 19 Jassus, A., Renkonen, O. Short-term treatment of gonorrhoea with intramuscular and oral forms of trimethoprim sulphamethoxazole. *British J. Ven. Dis.* 55:24, 1979.
- 20 Lozano A, Badia, A, Castells, I., Mylonakis, N. Trimethoprim and sulfamethoxazole blood levels in man after intramuscular administration *J. Antimicrob. Chemother.* 4:287, 1978.
- 21 Craig W. A. Kumin, C. M. Trimethoprim-sulfamethoxazole. Pharmacodynamic effects of urinary pH and impaired renal function. *Studies in humans Ann. Intern. Med.* 78:491, 1973.
- 22 Ling, G. V., Ruby, A. L. Trimethoprim in combination with a sulfonamide for oral treatment of canine urinary tract infections. *J. Am. Med. Assoc.* 174 (9): 1003, 1979.
- 23 McCaig, J. A. Clinical trial using trimethoprim-sulphadiazine in dogs and cats. *Vet. Rec.* 87:265, 1970.
- 24 Davis et. al. *Tratado de Microbiología*. 2ª ed., Salvat, Barcelona, 1978.