

ACCION DE LA 4,4-DIAMINO-DIFENIL-SULFONA * FRENTE A *NOCARDIA BRASILIENSIS*

(Estudios *in vitro*, en la infección experimental y en clínica) **

ANTONIO GONZÁLEZ OCHOA,
Académico de número

JORGE SHIELS y PONCIANO VÁZQUEZ

La síntesis de la 4,4-diamino-difenil-sulfona (DDS) fué lograda por From y Wittman en 1908; pero no fué sino hasta 1937 cuando Fournneau y Buttle, independientemente, demostraron su acción inhibidora de *Pneumococci*. A partir de esa fecha, hasta 1941, aparecieron numerosas comunicaciones acerca de la actividad de esa substancia contra diferentes microorganismos patógenos, preferentemente contra *Mycobacterium tuberculosis*, y se obtuvieron, tanto *in vitro* como en la infección experimental, muy buenos resultados, los que contrastaron con los observados en la tuberculosis humana, que fueron definitivamente desalentadores.

Por otra parte, sin que hubiese base experimental previa por la imposibilidad de obtenerla, los derivados monosustituídos de la DDS primero, y después la misma DDS, fueron empleados en el tratamiento de la lepra lepromatosa, y actualmente existe un criterio unánime en cuanto a su eficacia.

En 1946 Latapí principió a usar los derivados sulfónicos en el tratamiento del micetoma actinomicótico; y un año después nosotros obtuvimos, siguiendo la sugestión de Latapí, resultados alentadores en casos de micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis* tratados con diasona. Arnold (1948) reportó un caso de *actinomycosis* cérvicofacial curado con la misma diasona,

* La DDS empleada en este estudio nos fué proporcionada por cortesía de E. R. Squibb & Sons de México.

** Trabajo reglamentario leído en la sesión del 16 de abril de 1952.

y aunque el autor no menciona el actinomiceto causante de la infección, dada la localización cérvicofacial, probablemente debe haber correspondido a *Actinomyces bovis*. Bojalil y Shiels (1950) estudiaron la acción del promín y la diasona, *in vitro*, frente a varias *Nocardiae* y encontraron que únicamente *N. brasiliensis* mostraba inhibición hasta diluciones de 1:50,000. Recientemente García (1950) comunicó haber obtenido resultados satisfactorios en un caso de micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis*, tratado con diámidin (derivado de la DDS) y dedujo que sería necesaria una mayor experiencia para formar un juicio definitivo.

Teniendo como base los datos anteriores, y en vista de algunos resultados contradictorios, emprendimos un estudio que comprendió la exploración de la sensibilidad de las *Nocardiae* patógenas a la DDS, la administración de esa sustancia en la infección experimental del ratón con *N. brasiliensis* y en un lote de enfermos de micetoma por la misma *Nocardia*, con casos representativos de las distintas variedades. Los resultados de ese trabajo desde el triple punto de vista expresado constituyen la finalidad de esta nota.

MATERIAL Y MÉTODOS

a) *Estudios "in vitro"*. Se hicieron sobre cinco cepas de *N. brasiliensis*, una de *asteroides*, una de *madurae* y una de *pelletieri*. Los métodos empleados fueron el de González Ochoa y Zozaya (1942), en el que se estima la acción inhibidora de la sustancia por la mediación del diámetro de las colonias, en Sabouraud-agar-glucosa al 2 por ciento, y el método de los cilindros de Oxford, ligeramente modificado de acuerdo con la biología de los microorganismos estudiados.

b) *Infección experimental en el ratón*. Con los animales inoculados por vía intraperitoneal se constituyeron dos lotes. En el lote número 1 el tratamiento se inició contemporáneamente a la inoculación; en el número 2, después de 10 días de incubación. Cada lote se subdividió en tres grupos. Al grupo A se inocularon 10 mg. de un cultivo de *N. brasiliensis* y se administraron 300 mg. de DDS/Kg.; al B se le inocularon 5 mg. de cultivo y administraron 200 mg. del medicamento; y el grupo C fué inoculado con 1 mg. de cultivo y tratado con 100 mg. de DDS. El medicamento se dió por vía oral, en una toma diaria. Para la observación de los resultados se esperó a que los animales problema murieran, y se sacrificaron algunos de los testigos al morir los animales problema, o se esperó a que estos testigos murieran por la infección dentro del lapso del experimento. La apreciación de la infección se hizo por

la mayor o menor aparición de nodulillos en peritoneo parietal, visceral y de los omentí, así como la mayor o menor cantidad de granos actinomicóticos dentro de esos nodulillos; se usó la convención de +, ++, +++ y ++++.

c) *Experimentación clínica.* El lote constituido por enfermos de micetoma, causado exclusivamente por *N. brasiliensis*, consistió en tres de localización únicamente a tejidos blandos, cuatro con extensión a huesos y articulaciones y uno con invasión pulmonar. La dosis administrada fué de 200 mg. diariamente por vía oral, y en los casos en que la respuesta terapéutica no fué satisfactoria se hicieron estudios para explorar la sensibilidad de la cepa respectiva.

Caso No. 1: F. G., campesino del Edo. de Morelos. Micetoma en el dorso localizado exclusivamente a tejidos blandos; ocho años de evolución. Resistente al tratamiento con sulfonamidas más yoduro de potasio seguido por cuatro años.

Caso No. 2: A. S., campesino del Edo. de Morelos. Micetoma axilar localizado exclusivamente a tejidos blandos. Dos años de evolución. Sin tratamiento anterior.

Caso No. 3: R. P., minero del Edo. de Oaxaca. Micetoma de tórax con invasión pulmonar de ocho meses de evolución. Pésimo estado general al principiar el tratamiento con DDS. Resistente al tratamiento con sulfonamidas.

Caso No. 4: J. R., estudiante. Matías Romero, Ver. Micetoma en la región posterior interna de la articulación de la rodilla con invasión ósea y articular, de dos años de evolución. Sometido anteriormente a yoduro de potasio y sulfonamidas, sin mejoría.

Caso No. 5: J. S., campesino del Edo. de Oaxaca. Micetoma de hombro izquierdo con invasión ósea, de nueve años de evolución. Sin tratamiento previo.

Caso No. 6: S. S., obrero del Edo. de Guanajuato. Micetoma de la cara externa del tercio superior de la pierna izquierda, con invasión osteoarticular. Seis años de evolución. Resistente al tratamiento con yoduro de potasio.

Caso No. 7: F. D., campesino del Edo. de Yucatán. Micetoma de tórax de cuatro años de evolución. Resistente al tratamiento con yoduro de potasio más sulfonamidas, y al quirúrgico. Administración irregular de diazona durante seis meses sin mejoría.

Caso No. 8: F. P., campesino del Edo. de Querétaro. Micetoma generalizado a todo el miembro inferior izquierdo con invasión osteoarticular; de dos años de evolución. Resistente al yoduro de potasio.

RESULTADOS

a) *Estudios "in vitro".* Estos que se expresan en el cuadro 1 mostraron que de las cuatro *Nocardiae* patógenas, únicamente *N. brasiliensis* es sensible a DDS, y acusa una inhibición total a la concentración de 1:10,000, y una inhibición parcial hasta 1:50,000 por el método de la medición del diámetro de las colonias. Por el método de los cilindros de Oxford, el diámetro de las zonas de inhibición fué de 25 mm. a la concentración de 1:10,000, de 20 mm. a 1:25,000 y de 15 mm. a 1:50,000.

CUADRO 1

Nocardias estudiadas	No. de la cepa	Desarrollo a las diferentes concentraciones de DDS			Testigos
		1:10.000	1:25.000	1:50.000	
<i>N. Brasiliensis</i>	1	—	+	++	+++
	5	—	+	++	+++
	43	—	+	++	+++
	407	—	+	++	+++
	824	—	+	++	+++
<i>N. asteroides</i>	19	+++	+++	+++	+++
<i>N. pelletieri</i>	293	+++	+++	+++	+++
<i>N. madurae</i>	412	+++	+++	+++	+++

Explicación de los siglos convencionales:

- : No hubo desarrollo.
- +: Ligeró desarrollo.
- ++: Desarrollo moderado.
- +++ : Desarrollo normal.

b) *Infección experimental.* Los resultados, expuestos en el cuadro 2, señalan que en el lote número 1, del grupo A, formado por 60 ratones en los que el tratamiento se inició al mismo tiempo que la inoculación, sólo se tomaron en cuenta 20 animales, debido a que los restantes murieron dentro de los 12 primeros días de tratamiento; la supervivencia de los animales tratados fué de 61 días como promedio, y la infección se catalogó como de ++; la de los testigos, de +++. En el grupo B de este mismo lote, formado con 60 ratones sujetos a las mismas condiciones que el anterior, salvo que el inóculum fué de 5 mg., y la DDS 200 mg./Kg., sólo se tomaron en cuenta, por las razones expresadas, 9 animales que tuvieron una supervivencia de 45 días, y se encontró una infección promedio de +. Del grupo C inoculado con 1 mg. de cultivo y tratado con 100 mg. de DDS/Kg. formado también con 60 ratones, sólo se aprovecharon 14 que tuvieron una supervivencia de 68 días; en éstos la infección se catalogó como de ±, debido a que prácticamente la mitad de los animales problema no presentaron signos de enfermedad, y la infección de los correspondientes testigos fué de +++++.

En el lote número 2, en que el tratamiento se principió a los 10 días de inoculados, en el grupo A sólo se tomaron en cuenta 24 animales que tuvieron una supervivencia de 63 días, y se encontró una infección de ++. El grupo B tuvo 32 animales aprovechables que dieron una supervivencia de 31 días y mostraron una infección de ++. El grupo C comprendió 32 ani-

CUADRO 2

Lote No. 1.

DDS administrada concomitantemente a la inoculación

Grupo	Cantidad de inóculo	Dosis de DDS	No. inicial de animales	Animales aprovechados	Supervivencia en días (promedio)	Resultados de la infección	
						Animales problema (promedio)	Testigos (promedio) (15 animales)
A	10 mg.	300 mg/Kg.	60	20	61	++	+++++
B	5 mg.	200 mg/Kg.	60	9	45	+	++++
C	1 mg.	110 mg/Kg.	60	14	68	±	+++++

Lote No. 2

DDS administrada 10 días después de la inoculación

A	10 mg.	300 mg/Kg.	60	24	63	++	++++
B	5 mg.	200 mg/Kg.	60	32	31	++	++++
C	1 mg.	100 mg/Kg.	60	26	52	+	++++

males aprovechables, con supervivencia de 38 días, y mostraron una infección que catalogamos como de ++. En el grupo C hubo 26 animales aprovechados con una supervivencia de 52 días, y en los que la infección se catalogó como de +, mientras que los testigos correspondientes a cada grupo mostraron infección de +++++, aun los inoculados con 1 mg. de cultivo.

c) *Resultados clínicos.* Señaladas brevemente las características más salientes de cada uno de los casos tratados, como fueron localización y extensión del micetoma, tiempo de evolución, terapéutica anterior y sus resultados, en el cuadro 3 veremos únicamente el tiempo de administración de la DDS y los resultados que se obtuvieron. Como se ve, de los ocho enfermos, todos menos uno mostraron grandes beneficios del tratamiento, ya que seis de ellos se consideran como clínicamente curados en un promedio de 12 meses, uno mejorado, y únicamente en un caso no se obtuvo la respuesta esperada, sino que, por el contrario, hubo un empeoramiento.

CUADRO 3

Caso	Localización y extensión del micetoma	Meses de tratamiento	Resultado
1. FG.	Dorsal localizado a tejidos blandos	24	Curación
2.	Axilar localizado a tejidos blandos	10	Curación
3. RP.	Torácico con invasión pulmonar	8	Curación
4. JR.	Rodilla con invasión ósteoarticular	10	Curación
5. JS.	Hombro con invasión ósea	7	Curación
6. SS.	Pierna con invasión ósteoarticular	8	Curación
7. FD.	Tórax localizado a tejidos blandos	6	Empeorado
8. FP.	Miembro inferior con invasión ósteo-articular	6	Mejorado

El caso que consideramos como empeorado, debido a la extensión de sus lesiones y a la decadencia de su estado general, corresponde a un enfermo que había sido largamente tratado con sulfonamidas más yoduro de potasio sin resultado alguno (caso No. 7). Desde antes de iniciar su tratamiento con DDS, la exploración de la sensibilidad de la cepa correspondiente a esa substancia mostró ser menor que la generalidad de las cepas de *N. brasiliensis*, y en aislamiento posterior, cuando observamos la falta de respuesta al

medicamento, encontramos una sensibilidad aun menor que en la primera exploración.

ACCIÓN COLATERAL DE LA DDS

A la dosis de 200 mg. no observamos más efecto indeseable que anemia normocítica hipocrómica en un caso, que fué fácilmente controlada con la administración de hierro y cobre. Es de mencionarse que el caso número 3 del micetoma tóracopulmonar, que presentaba un estado general precario, diarrea, fiebre y enflaquecimiento, subió de peso y mejoró notablemente su condición física en los seis meses de tratamiento, sin ningún otro recurso tendiente a mejorar su estado general.

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos demuestran una vez más que no existe constantemente un paralelismo absoluto entre lo observado en la experimentación *in vitro*, en la infección inducida a los animales de laboratorio y en la clínica. La experimentación *in vitro* es sumamente indicativa al señalarnos que la DDS podría tener utilidad en el tratamiento del micetoma por *N. brasiliensis*, pero no en el causado por las otras *Nocardiae*, si bien las concentraciones para obtener alguna inhibición son altas (1:50,000). En la infección experimental no se obtuvieron los resultados esperados, debido probablemente a que la inoculación intraperitoneal, con una gran cantidad de inóculum, origina una infección total en un corto tiempo, a diferencia de lo que acontece en clínica, donde la infección es limitada y su extensión se hace lentamente, dando tiempo a que el organismo construya todo un sistema de defensas, preferentemente de orden inmunológico. Tal hemos venido observando en estudios que iniciamos con la hipótesis de trabajo de que, contrariamente a los animales inoculados en los que la inyección de un polisacárido del mismo actinomiceto no acusa reacción, en los enfermos mejorados o curados aparece una pápula plana a las 24 horas. (González Ochoa y Baranda, 1952). En estos casos parece que el aporte de un medicamento activo, como muestran los resultados *in vitro*, aunque no sea necesario el que se alcancen niveles sanguíneos correspondientes a las concentraciones necesarias del tubo, es suficiente para que, unido a las defensas del enfermo, proporcione la curación. Esta hipótesis se apoya en la falta de reacción cutánea en el enfermo empeorado. Por el contrario, la infección experimental parece mostrar cierto paralelismo con los resultados *in vitro*, en lo referente

a que, aun grandes concentraciones de la substancia (1:50,000 en el tubo de ensayo y 300 mg./Kg. de peso en el ratón), no suspenden el desarrollo del actinomiceto, probablemente porque la responsabilidad de la DDS es mayor por lo que respecta a cantidad de germen y a falta de las defensas con que el organismo humano infectado contribuye; esta suposición se apoyaría en el hecho de que los grupos de animales de mayor supervivencia e infectados con menor cantidad de inóculum, en los que probablemente se principian a formar las defensas del huésped, son los que mostraron algún beneficio de la administración de la DDS.

El futuro que los enfermos de micetoma tenían hasta antes de la DDS o sus derivados era sombrío, ya que la terapéutica con las sulfonamidas más yoduro de potasio, considerada como la más eficaz, solamente lograba la curación de casos tempranos sin invasiones ósea o visceral. Los casos de micetoma en los huesos eran condenados a sufrir la amputación en la mejor de las situaciones y las localizaciones facial o torácica, tarde o temprano llevaban a la invasión pulmonar o encefálica, sin que las sulfonamidas y el yoduro pudieran evitarla, y el paciente moría rápidamente. Con la DDS se obtuvo curación en el caso con micetoma tóracopulmonar; parece, pues, que la DDS ha cambiado el futuro de estos tipos de micetoma.

En los casos que consideramos como curados, seguimos administrando el medicamento, y pensamos que debe continuarse un año por lo menos después de la aparente curación clínica, ya que con las sulfonamidas y yoduro de potasio se llegaba a obtener mejorías marcadas, y al suspender la medicación el proceso se exacerbaba, con la particularidad de que al reanudarla ya no se obtenían los resultados inicialmente benéficos. Es indiscutible que se necesita que transcurra más tiempo para opinar definitivamente acerca de lo que hoy parece un gran medicamento. Por el momento podemos deducir que, siendo el 90 por ciento de las micetomas en nuestro país debido a *N. brasiliensis*, tenemos en la DDS, a la dosis de 200 mg. diarios, el mejor recurso terapéutico actual.

RESUMEN

El trabajo presentado se refiere a la exploración de la sensibilidad de las *Nocardiae* patógenas a la 4,4-diamino-difenil-sulfona (DDS), a la acción de esta substancia en la infección experimental del ratón, y a diversos casos de micetoma por *N. brasiliensis*.

Los resultados muestran que únicamente *N. brasiliensis* es sensible y se inhibe completamente el desarrollo al 1:10,000 y parcialmente a 1:50,000. En la infección experimental los resultados son pobres, debido probablemente a que la inoculación intraperitoneal produce una infección total, y a que no transcurre el tiempo necesario, por muerte del animal, para que se constituyan las defensas inmunológicas. Por el contrario,

en casos humanos los resultados obtenidos fueron muy favorables, ya que, de ocho enfermos, seis se consideran curados, uno mejorado, y sólo uno no respondió al tratamiento. La dosis administrada, de 200 mg. diarios, no produjo efectos tóxicos.

SUMMARY

This paper deals with the sensibility of pathogen *Nocardiae* to the 4,4-di-amino-di-phenyl-sulphone (DDS), with the action of the drug on the experimental infection of mice, and with the results of its use on human cases.

Results tend to prove that only *N. brasiliensis* is susceptible to the drug, its development being curtailed at a concentration of 1:50,000 and stopped at 1:10,000. Results on the experimental infection of mice are not useful, because the animals died too quickly and the action of the drug could not be appraised.

Human cases, on the other hand, were very favorably altered; 6 of the 8 cases were healed, 1 of them improved and only one was not improved at all. The daily dosage of 200 mg. was not followed by any toxic effect.

REFERENCIAS

- Arnold, H. L., Jr., y E. R. Austin, 1948: Diasone Therapy of Actinomycosis of the Jaw. J.A.M.A., 138: 955-956.
- Bojalil, L. F., y J. A. Shiels S., 1950: Estudio de la acción *in vitro* de algunos compuestos sobre el crecimiento de varias especies de *Nocardia*. Revista de Pal. y Med. Trop., México, 2: 133-136.
- Buttle, G. A. H., D. Stephenson, S. Smith, T. Dewing y G. E. Foster, 1937: Lancet, 1: 1331-1334.
- Fourneau, E. T., J. Tréfouel, F. Nitti, Bovet y Mme. Tréfouel, 1937: Action antristreptococcique des dérivés sulfures organiques. Compt. Rend. Acad. Sci., 204: 1763-1766.
- From, E., y J. Wittman, 1908: Derivative des *p*-nitrothiphenols. Berichte der Deutsch. Chem. Gesellschaft, 41: 2264.
- García, P. M., 1950: Sulfonas en el tratamiento del micetoma, estudio de un caso. Prensa Méd. Mex., 15: 262-266.
- González Ochoa, A., y J. Zozaya, 1942: Influencia de la Sulfanilamida *in vitro* sobre el desarrollo y estructura del *M. canis*, *S. Schencki* y *A. asteroides*. Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop., 3: 145-152.
- González Ochoa, A., y F. Baranda, 1952: Comunicación próxima a aparecer.
- Latapí, F., 1947: Comunicación personal.