

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FARMACOLOGIA DE LA
POLIMIXINA. ACCION SOBRE EL CORAZON AISLADO
DE RANA Y SOBRE LOS CAPILARES *

RAMÓN PÉREZ-CIRERA
Académico de número

En colaboración con
JAIME PLAZA y ALFONSO DE LA PEÑA

Las polimixinas son un grupo de antibióticos, polipéptidos, producidos por varias cepas de *Bacillus polymixa*, germen obtenido del suelo.

Benedict y Langlykke, en 1947,¹ en Estados Unidos publicaron el primer trabajo sobre: "Actividad antibiótica de *Bacillus polymixa*". El mismo año, e independientemente, Ainsworth Brown y Brownlee, en Inglaterra,² aislaron un antibiótico producido por un microorganismo identificado, como *Bacillus aerosporus*, al que denominaron aerospolina. Simultáneamente, Stansly, Shepherd y White³ describieron un antibiótico producido por otra cepa del *B. polymixa*, al que denominaron polimixina.

Se supuso inmediatamente que la polimixina y la aerospolina eran sustancias idénticas o íntimamente relacionadas. No solamente eran similares los microorganismos productores (*B. aerosporus* es sinónimo de *B. polymixa*),⁴ sino que también las propiedades antibióticas eran similares, especialmente su especificidad sobre las bacterias gramnegativas.

Posteriormente⁵ se demostró que las diferentes cepas de *B. polymixa* empleadas por los diferentes autores producen antibióticos cuyas características generales permiten incluirlos a todos en un grupo denominado "polimixina"; sin embargo, como existen entre estas sustancias diferencias específicas, tanto químicas como farmacológicas, se decidió caracterizar a cada una de ellas con una letra del alfabeto. La descubierta en Inglaterra por Ainsworth y sus colaboradores se denominó polimixina A; la aislada por Brownlee y Bushby⁶, polimixina B; la aislada por Stansly, polimixina D, y dos nuevas polimixinas aisladas en los Laboratorios Wellcome, polimixinas C y E. El *Bacillus polymixa* se encuentra frecuentemente en el suelo. Porter y sus colaboradores⁷ han aislado cepas de muestras de 22 estados de

* Trabajo leído en la sesión reglamentaria del 14 de julio de 1954.

la Unión Americana. Aparentemente difieren en su capacidad de producción de antibiótico.

Químicamente, la polimixina es un polipéptido con un peso molecular aproximado de 1,100. Posee cuatro grupos básicos libres y no tiene grupos ácidos. Los aminoácidos que constituyen este polipéptido son: leucina, treonina y ácido alfa-gamma-diaminobutírico para las polimixinas A, B y D.

La polimixina B contiene también fenilalanina, y la D contiene serina, y todas ellas son de naturaleza cíclica.⁸ Contiene, además, un ácido de fórmula empírica $C_9H_{18}O_2$, que Wilkinson⁹ identificó como el 6-metil-octanoico.

ESPECTRO ANTIBACTERIANO

Stansly y Schlosser¹⁰ indicaron el siguiente espectro antibacteriano, de sensibilidad mayor a menor: *S. typhi*, *E. coli*, *S. dysenteriae* (Flexner), *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. En cambio, la actividad contra gérmenes grampositivos es prácticamente nula. Bliss y Todd¹¹ hicieron un estudio comparativo entre ocho antibióticos y encontraron que la mayoría de los bacilos gramnegativos son mucho más sensibles a la polimixina que a la aureomicina, al cloranfenicol y a la estreptomycin, con excepción del *B. proteus*.

Una de las características de las polimixinas es la de que no se han encontrado hasta la fecha cepas resistentes a este antibiótico.⁴

SINERGISMO

Price y sus colaboradores,¹² utilizando como organismo de prueba a *S. typhi*, encontraron sinergismo de la polimixina con la aureomicina, la bacitracina, la penicilina y la estreptomycin.

Gavarron y sus colaboradores,¹³ empleando como organismo de prueba *S. sonnei*, encontraron un fuerte sinergismo entre la polimixina y la vitamina K₅ protegida de la oxidación con ácido ascórbico.

ABSORCIÓN

Las diferentes polimixinas no son absorbidas por el intestino de los animales ni el del hombre adulto, como lo demostraron las experiencias de Brownlee;⁶ en cambio, el intestino del recién nacido si es permeable a la polimixina.

La administración oral al conejo de 100,000 U. por Kg., dos veces al día; al perro de 500,000 U. por Kg. dos veces al día, y al hombre de un millón de unidades cada cuatro horas, no produce niveles sanguíneos demostrables.

La polimixina es resistente, *in vitro*,¹⁴ a la acción de las enzimas proteolíticas, pepsina, tripsina, pancreatina y erepsina. Administrada por vía oral disminuye notablemente el número de microorganismos intestinales sensibles a este antibiótico y la *Escherichia coli* desaparece de las heces al tercer día de tratamiento cuando éste es suficientemente intenso (un millón de unidades de polimixina B o E cada cuatro horas para el hombre adulto, o 20,000 U. cada cuatro horas en el niño).⁶

ADMINISTRACIÓN PARENTERAL

Después de una sola inyección subcutánea o intramuscular de polimixina, ésta pasa al plasma sanguíneo y permanece en él durante algún tiempo, al igual que otros antibióticos. El tiempo durante el cual existen en la sangre niveles demostrables de polimixina depende de la dosis, del tipo de polimixina y de la vía de administración. Las experiencias en el conejo⁶ demuestran niveles sanguíneos apreciables aun después de seis horas de efectuada la inyección por vía intramuscular; en cambio, si la inyección se hace por vía intravenosa en dosis de 10,000 U., desaparece de la sangre mucho más rápidamente.

Si se comparan los niveles sanguíneos de polimixina en seres humanos, tratados con una sola dosis y con dosis sucesivas, se encuentra un efecto acumulativo.

Después de una única inyección intramuscular, solamente una pequeña fracción del antibiótico es excretada por la orina en forma biológicamente activa. La pequeña cantidad de polimixina excretada por la orina hizo suponer otras posibles vías de excreción, pero no se ha podido demostrar la excreción de polimixinas A, B y E ni por la bilis ni por el líquido céfalo-raquídeo, haciendo determinaciones a los 60, 120 y 240 minutos.

Se han hecho experiencias, tanto de laboratorio como clínicas, de la inyección de polimixina por vía intratecal en la cisterna magna, y se han observado niveles demostrables en el líquido céfalo-raquídeo durante seis horas como mínimo.

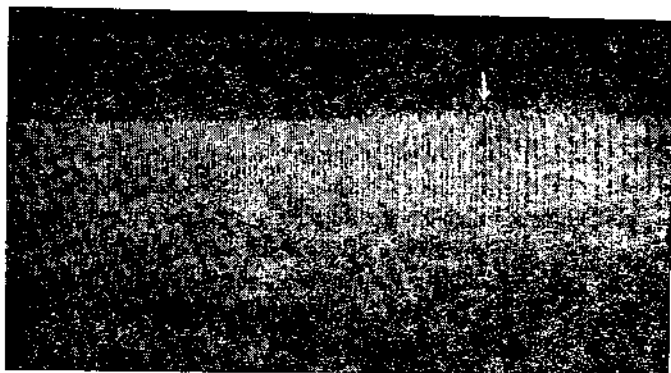


FIG. 1. Corazón aislado de rana. Sulfato de Polimixina "B" 1: 10,000.

TOXICIDAD

Respecto a su toxicidad, las polimixinas muestran efectos generales de grupo, es decir, efectos semejantes en calidad e intensidad para las polimixinas A, B, C, D y E, y algunas reacciones particulares de cada una de ellas.

En la toxicidad aguda en el ratón se han estudiado las vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea y oral, y son, respectivamente, la DL_{50} de 6-9, de 14-28 y de 86-160 mg. por Kg. prácticamente atóxicas por vía oral debido a que no se absorben por el intestino.

Las dosis tóxicas producen síntomas inmediatos de palidez en las orejas y extremidades, cianosis de la cola, incoordinación muscular y trastornos respiratorios. Generalmente se observan convulsiones similares a las estrícnicas, seguidas de una flaccidez completa de los músculos esqueléticos y acompañada de disnea. La muerte se produce entre los tres y los cuatro minutos, aparentemente por asfixia.

En los animales que se recuperan después de dosis subletales, el efecto curarizante sobre los músculos esqueléticos es más evidente, y después se produce una fase de vasodilatación y recuperación subsiguientes.

Las experiencias sobre toxicidad aguda se han llevado a cabo también en el conejo, en la rata y en el perro.

EFFECTO ANTIDIURÉTICO Y TOXICIDAD RENAL

La administración de cualquiera de las polimixinas a la dosis de 10 mg. por Kg. de peso⁶ retarda de cuatro a seis horas la excreción urinaria en

animales hidratados con 50 c.c. de agua por kilogramo de peso. Con dosis menores de polimixina, el efecto es menos manifiesto. Si se inyectan 5 mg. por Kg., el tiempo de excreción máxima es de 180-330 minutos, mientras que en el grupo testigo es de solamente 80 minutos.

Brownlee y sus colaboradores⁶ hicieron estudios sobre toxicidad renal con las diferentes polimixinas, y encontraron que las polimixinas A, C y D producen en la rata un fuerte aumento de la excreción de proteínas, mientras que las polimixinas B y E no producen aumento apreciable de la proteinuria.

PARTE EXPERIMENTAL

Hemos llevado a cabo experiencias sobre el corazón aislado de rana y sobre los capilares sanguíneos en el mismo animal.

La polimixina empleada ha sido el sulfato de polimixina B proporcionado por la casa Pfizer. Un miligramo corresponde a 6,850 unidades. Es soluble el 40 por ciento en agua destilada a 25° C. y su punto de fusión es de 220° C., temperatura a la que rápidamente se descompone.

ACCIÓN SOBRE EL CORAZÓN AISLADO DE LA RANA

En estas experiencias se ha utilizado la técnica de Straub, introduciendo una cánula en el ventrículo, y se ha registrado gráficamente la contracción cardíaca, utilizando como líquido de perfusión el de Ringer, con distintas diluciones de polimixina que se cambian periódicamente.

Se han hecho experiencias con diluciones desde 1:100 hasta 1:100,000.

Con diluciones de 1:100,000 no se observa acción alguna sobre el corazón.

Con diluciones al 1:10,000 se observa una acción franca, ya que tanto la amplitud de las contracciones como del tono aumentan.

Al cambiarse repetidas veces la solución de polimixina por líquido de Ringer se observa un aumento de dicho efecto.

ACCIÓN SOBRE LOS CAPILARES

En estas experiencias se ha utilizado la técnica de Lowen-Trendelenburg, de perfusión de las extremidades posteriores de la rana con líquido de Ringer.

Se utilizan dos frascos de Mariot, uno con Ringer y el otro con la so-

lución de polimixina en Ringer, unidos por un tubo en Y con la cánula de perfusión.

Se perfunde con Ringer hasta que el número de gotas sea constante durante quince minutos, y entonces se cambia por la solución de polimixina en Ringer.

La perfusión con una solución de sulfato de polimixina B al 1:10,000

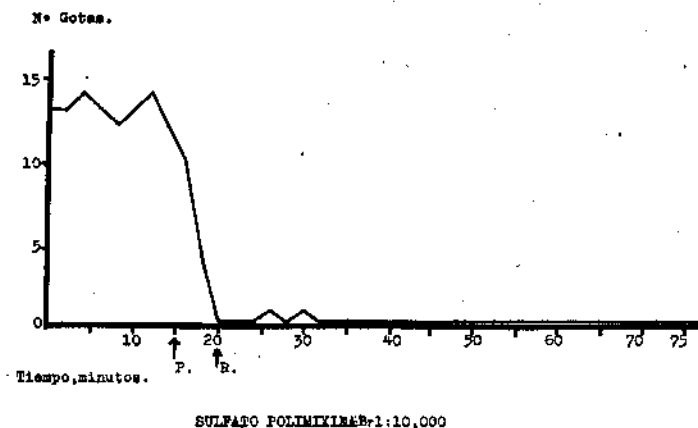


FIG. 2.

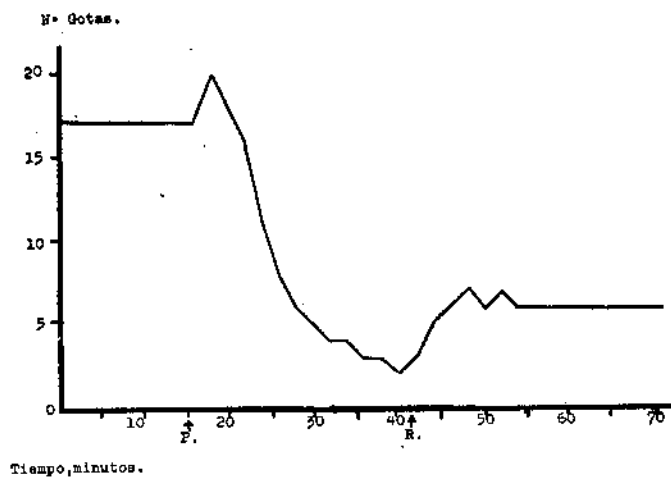
produce una vasoconstricción brusca, y el número de gotas desciende a cero, como puede verse en la gráfica 2.

Si se perfunde con una solución de polimixina al 1:1.000,000 se observa una vasoconstricción marcada, aunque no se produce un bloqueo completo de los capilares como en la experiencia anterior.

La substitución de la polimixina por líquido de Ringer produce un aumento del número de gotas, y la recuperación de su nivel original no es constante.

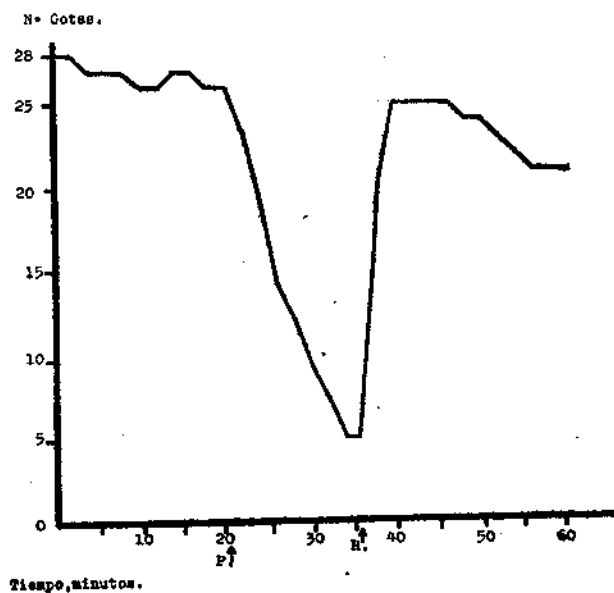
En estas experiencias hechas sobre capilares quisiéramos hacer notar la relación que pudiera existir con las experiencias de Brownlee y sus colaboradores,⁶ quienes citan una acción antidiurética, así como también la llamada nefrotoxicidad. Pudiera ser que la acción vasoconstrictora que posee la polimixina B sea la responsable de la oliguria observada por dichos autores, así como también de ciertos cambios renales.

En experiencias posteriores trataremos de ver la acción directa sobre los vasos renales y variaciones en la cantidad de orina, así como también sobre la presión arterial, la que pudiera estar afectada por dicha vasoconstricción.



SULFATO POLIMIXINA B-1:1 millón.

FIG. 3.



SULFATO POLIMIXINA B-1:1 millón.

FIG. 4.

Brownlee y sus colaboradores,⁶ experimentando con polimixinas B y E menos purificadas, observaron en el perro un descenso de la presión arterial que no desapareció por la atropinización. Esta acción fué atribuida a la presencia de sustancia de tipo histamínico y desapareció por purificaciones ulteriores de estas polimixinas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El sulfato de polimixina B, en diluciones al 1:10,000, produce un aumento de la amplitud y del tono en el corazón aislado de la rana.
2. El sulfato de polimixina B produce una fuerte vasoconstricción en los capilares de la rana, en diluciones de 1:1,000,000.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. Sulphate of polymyxin B, in a 1:10,000 solution brings about an increase on the tonus and the contraction of the isolated heart of the frog.
2. When used in solutions up to 1:1,100,000, sulphate of polymyxin B produces a strong constriction of the capillaries of the frog.

BIBLIOGRAFIA

1. Benedict, R. G., y Langlykke, A. F.: J. Bact. 54:24 (1947).
2. Ainsworth, G. C., Brown, A. M., y Brownlee, G.: Nature, 160:263 (1947).
3. Stansly, P. G. R., Shepherd, R. G., y White, H. J.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 81:43 (1947).
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1950).
5. Brownlee, G., y Stansly, P. G. R.: Nature, 163:611 (1949).
6. Brownlee, G., Bushby, S. R. M., y Short, E. I.: Brit. J. Pharmacol., 7:170 (1952).
7. Porter, J. N., Braschard, R., Kruwa, G., Little, P., y Zellat, J. S.: Ann. New York Acad. Sc., 51:857 (1949).
8. Cousden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. P., Synge, R. L. M.: Bioch. J., 41:596 (1947).
9. Wilkinson, S.: Nature, 164:622 (1949).
10. Stansly, P. G. R., y Schlosser, M. E.: J. Bact., 54:549 (1947).
11. Bliss, E. A., y Todd, H. P.: J. Bact., 58:61 (1949).
12. Price, C. W., Randall, N. A., Welch, H., y Candler, V. L.: Am. J. Publ. Health, 39:340 (1949).
13. Gavarron, F. (En prensa.)
14. Stansly, P. G., y Ananenko, N. H.: Arch. Biochem., 15:473 (1947).

COMENTARIO AL TRABAJO DEL DR. RAMON PEREZ CIRERA

RUBÉN BRETÓN
Académico de número

El trabajo que nos presenta el doctor Pérez Cirera como una contribución al estudio de la Farmacología de la polimixina, está encaminado a esclarecer el complejo problema que se ha presentado en el estudio de su toxicidad.

Desde el descubrimiento de las polimixinas, realizado en 1947 por Benedict y Langlykke en los Estados Unidos y por Stansly y Schlosser en Inglaterra, se pensó en la importancia que tendría este antibiótico en el tratamiento de infecciones provocadas por gérmenes gramnegativos.

Estas investigaciones vinieron a conferirle definitivamente a las polimixinas un reducido espectro encuadrado exclusivamente en los gérmenes gramnegativos, ya que no posee acción alguna frente a rickettsias y virus. Puede considerarse a la polimixina como el antibiótico de más reducido campo de acción; pero, en cambio, de una notable actividad frente a los gérmenes ya indicados anteriormente.

Poco se conoce de la constitución química de las polimixinas, pues ya el doctor Pérez Cirera nos citó las recientes investigaciones, que han dado por resultado conocer fragmentos de estas moléculas formadas por aminoácidos; con estos resultados no es posible precisar los agrupamientos farmacológicamente activos, pues será necesario obtener la molécula íntegra para poder localizar los agrupamientos funcionales y determinar el influjo que ejerzar frente a los microorganismos.

Otro de los inconvenientes que ha restado una franca aplicación en la antibioterapia ha sido la acción tóxica renal que ha obligado a los investigadores a usar la droga con cautela hasta no encontrar los verdaderos motivos de tal toxicidad. Swift considera que se trata de un factor nefrotóxico que no ha sido posible eliminar en los procesos cromatográficos de separación de las polimixinas obtenidas de los filtrados de cultivos estériles; basa esta hipótesis en que ha extraído de diferentes cepas de *Bacillus polymixa* polimixinas con dosis tóxicorrenales muy variables.

Las gráficas de perfusión obtenidas por el doctor Pérez Cirera en su generalidad revelan que los porcentos de recuperación son inversamente

proporcionales a las concentraciones de polimixina B, lo cual hace sospechar que no se trate de un simple cambio de permeabilidad motivado por modificaciones físico-químicas, sino que por alguna lesión permanente que sólo un estudio anatomopatológico pudiera aclarar.

Otro de los inconvenientes que ha habido en la aplicación clínica de la polimixina es lo que podríamos llamar pobreza de espectro, pues ninguno de los antibióticos hasta ahora empleados en la clínica tiene un campo tan reducido de actividad farmacológica como la polimixina; esto, unido a su acción nefrotóxica, le impide, por el momento, una amplia aplicación por vía directa.

En cambio, la nula absorción que tiene la polimixina en el tracto intestinal le confiere un gran campo de aplicación, que con toda seguridad todavía no conocemos con la amplitud posible.

Es de importancia citar, a favor de la polimixina, que su empleo no origina formas de resistencia y que, muy por el contrario, según las investigaciones de Waksman, está indicada en los casos en que se ha creado resistencia a otros antibióticos frente a infecciones provocadas por gérmenes gramnegativos. Waksman también recomienda su uso en tratamientos cuando han fracasado otros antibióticos en infecciones susceptibles a la polimixina.

Por lo anteriormente expuesto se llega a la conclusión de que el ciclo experimental de la polimixina iniciado por el doctor Pérez Cirera es de un indiscutible valor científico, porque, como decíamos al iniciar este comentario, trata de esclarecer los factores que intervienen en la toxicidad de este antibiótico que pueden llegar a tener un brillante porvenir si se logra eliminar sus inconvenientes.

Felicitó muy cordialmente al doctor Pérez Cirera por el trabajo que nos acaba de presentar, y dada su amplia preparación en estos asuntos farmacológicos no dudo que coronará con todo éxito las experiencias que posteriormente trata de realizar.