

Efecto de la Nicotinamida sobre la Pérdida de Fluidos en Cólera

FABIÁN MENDOZA¹, RENZO LEÓN¹

¹Interno de Medicina - Hospital Edgardo Rebagliatti Martins

RESUMEN

El cólera en nuestro país ha generado importantes problemas de salud pública. Actualmente es tratado recuperando el volumen perdido y eliminando el *V. cholerae* mas no bloqueando la acción de la toxina. Existen evidencias que la Nicotinamida actuaría sobre la toxina disminuyendo la secreción de agua y electrolitos.

Se evaluó la capacidad de la Nicotinamida para reducir la pérdida de fluidos en conejos con cólera; utilizando un estudio experimental aleatorizado.

Se administró nicotinamida a 10 conejos sanos, cuantificando sus excretas (g/día), pre y post administración para descartar efectos que alteren la interpretación de los resultados; no se halló diferencias estadísticamente significativas (p=0,3). Luego de 5 días, para asegurar la eliminación del fármaco, se infectó a los conejos dividiendolos en 2 grupos de 5; al presentarse la diarrea administramos Nicotinamida y placebo respectivamente, cuantificamos las deposiciones (g/día) hallando diferencia estadísticamente significativa (p<0,001); demostramos que la Nicotinamida disminuye la pérdida de fluidos en cólera; abriendo una nueva posibilidad terapéutica.

Palabras claves: Nicotinamida, Toxina del Cólera, Proteína Reguladora de Guanina Nucleótido, AMPcíclico.

THE EFFECT OF NICOTINAMIDE ON CHOLERA FLUID LOSSES SUMMARY

Cholera has caused major public health problems in our country. Currently, therapeutic approach consist of both, recovering the lost volume and eliminating the microorganism; there isn't, however, any therapeutic intervention that blockades the toxin action. There are evidences indicating that Nicotinamide could act on the toxin, decreasing water and electrolytes losses.

In this work, Nicotinamide capacity to reduce fluids losses in Cholera-infected rabbits was analized through a randomized experimental study. Ten previously healthy rabbits received Nicotinamide; mass of stools (g/day) before and after Nicotinamide administration were assessed to rule out any side effects which can alter the results. There were no significant differences in the mass of stools (g/day) before and after Nicotinamide administration (p=0.3). Rabbits were infected with *V. cholerae* 5 days later (to assure the elimination of nicotinamide); then were divided in two groups (A and B), and five randomizely assigned to each group. When diarrhea appeared, group A rabbits received Nicotinamide and group B rabbits received placebo. Mass of stools were quantified in both groups, showing a significant difference (p < 0.001).

Our study demonstrates that Nicotinamide decreases fluids losses caused by cholera, and opens a new avenue of therapy.

Key words: Nicotinamide, Cholera toxin, G-Proteins, cyclic AMP.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad aguda del aparato digestivo que ha azotado a la humanidad desde tiempos inmemorables (1,2), teniendo relevancia por su universalidad y alta mortalidad. Así, ha llegado a nuestro país en dos oportunidades, siendo la última en 1991 (1,4).

Esta enfermedad se manifiesta por producir diarreas acuosas abundantes que en poco tiempo llevan a la deshidratación e hipovolemia, sobre lo cual gira el cuadro clínico, que de no ser tratado a tiempo puede conducir al shock y a la muerte (2,5).

Las estrategias del tratamiento en el presente siglo se han orientado en torno a la recuperación del volumen perdido y su mantenimiento; (5,6) sin embargo, hasta ahora no existe una forma eficaz de disminuir significativamente el tiempo de enfermedad, aplicable a todos los pacientes, a pesar del uso de antibióticos como la Tetraciclina, (7) que destruyen al *Vibrio cholerae* más no a su toxina que es la responsable de la pérdida de fluidos(8).

Correspondencia:

Sr. Fabián Mendoza
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Av. Grau 755. Lima - Perú

La toxina del cólera (T.C.) una vez que penetra en el enterocito, actúa sobre la subunidad alfa de la Proteína G heterotrimérica (responsable de traducción de señales extracelulares en respuestas intracelulares), catalizando la unión de ADP-ribosa citoplasmática a dicha subunidad, reacción llamada ADP ribosilación. Esta unión produce la activación permanente de la adenil ciclasa, la que a su vez aumenta los niveles de AMPc, incrementando la secreción de agua y electrolitos (Ver Esquema N° 1). Entonces, para que la T.C. active a la proteína G, se necesita la incorporación de una molécula de ADP-ribosa a la subunidad alfa (*¹¹).

Hasta hace un tiempo no existía manera de bloquear este proceso, no pudiendo actuar terapéuticamente a este nivel. Sin embargo, se ha demostrado que la Nicotinamida (NCT) y derivados, disminuyen los niveles intracelulares de AMPc que como hemos explicado son indispensables para la producción de la diarrea (*¹¹).

De esta manera, creemos que no se debe dejar de lado esta posibilidad terapéutica que a diferencia de las hasta hoy utilizadas, neutraliza el modo de acción de la toxina.

Así, realizamos este estudio experimental a doble ciego en que demostramos el efecto antitoxina de la NCT, al disminuir la pérdida de fluidos en conejos infectados por *V. cholerae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

Este estudio fue realizado en el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que cuenta con laboratorios equipados para fines de investigación, así como un bioterio para el cuidado de los animales de experimentación, durante el período del 21 de agosto al 23 de setiembre de 1995. Utilizamos 10 conejos raza "Nueva Zelanda" que cumplieron los siguientes criterios de selección:

- Machos, sin enfermedades evidentes, activos y en aparente buen estado general.
- Peso: entre 1000 - 1200 g.
- Edad: entre 1.5 - 2.0 meses.

De esta manera uniformizamos el sexo, la edad y el peso, ya que la superficie intestinal sobre la que va a actuar tanto la TC como la NCT, depende de los factores mencionados.

- Estos animales recibieron raciones similares de alimentos sólidos: Conejina (Industrias Purina S.A., Lima - Perú) y Alfalfa (*Medicago sativa*) y líquidos *ad libitum* durante el tiempo de ejecución.
- Se utilizó NCT, al 99.9% de pureza. (Laboratorios ROCHE), la cual fue dividida en dosis de 100 mg.

La cepa de *V. cholerae* utilizada fue catalogada como *Vibrio cholerae* O:1 Biotipo El-Tor, de serotipos múltiples (Ogawa e Inaba): fue aislada y cultivada por métodos bacteriológicos estándar y proporcionada por el departamento de Microbiología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

MÉTODOS

Ya que demostraríamos el efecto anti-toxina del *V. cholerae*, realizamos este trabajo en 2 etapas. La primera destinada a verificar que la NCT no produce modificaciones en el peso de excretas de animales sanos y la segunda dirigida a demostrar comparativamente la reducción en la pérdida de fluidos en animales infectados (tratados con NCT vs. control no tratados).

Antes de iniciar estas etapas, decidimos "eliminar" la flora intestinal de los animales con la administración de Enoxacina (quinolona de segunda generación que cubre un amplio espectro de gram (+) y gram (-) a una CIM relativamente baja), a 2 dosis de 20 mg c/h con un intervalo de 12 horas. Esto se realizó para acortar el tiempo de incubación del *V. cholerae*, que en presencia de la flora protectora en conejos es de aproximadamente 1 semana (según nuestro estudio piloto), lo que dificulta un cuidadoso seguimiento de los mismos. Esperamos 5 días para asegurar su eliminación.

1ª Etapa: Efecto de la NCT Sobre el Peso de Excretas en Animales Sanos

Para descartar otros efectos de la NCT que interfieran con la toma de datos e interpretación de los resultados, se administró 100 mg de NCT vía oral a c/h de los 10 conejos, cuantificando el peso de las deposiciones por día antes y después de la administración.

Se esperó 5 días para asegurar la eliminación del fármaco antes de pasar a la siguiente etapa.

2ª Etapa: Efecto de la NCT Sobre el Peso de Excretas en Animales Infectados

Previamente a este proceso, los 10 conejos, colocados en jaulas metabólicas individuales fueron divididos en 2 grupos de 5 conejos (A y B), utilizando la tabla de números aleatorios.

Se inoculó a los 10 conejos con la cepa antes mencionada, enfluvada en Caldo Nutricio e incubada durante 8 horas a 37°C hasta conseguir una turbidez semejante al N° 3 de la escala de Mac Farley, utilizando un método comparativo visual. La cantidad administrada fue de 1 ml, por conejo V.O.

Cuando observamos el inicio de la diarrea (aprox. 16 horas después de la inoculación), al grupo experimental (A) se le administró una dosis de NCT vía oral disuelta en 1 ml de agua destilada. Al grupo control (B), sólo se le administró 1 ml de agua destilada.

La cuantificación de las excretas se realizó a partir del momento de administración de NCT y agua, respectivamente, por un período de veinticuatro horas, siendo rotulados como grupo A y B, desconociendo el investigador que cuantificó las excretas, cuál correspondía al grupo con tratamiento con NCT y cuál al grupo placebo.

La comprobación de la infección por *V. cholerae*, fue realizada en el hisopado rectal por métodos bacteriológicos estándar.

Para el análisis de la significancia estadística en la asociación y el análisis de las medias, se utilizó la prueba paramétrica del análisis de varianza (ANOVA 1 WAY), para lo cual se cumplen los criterios de aleatoriedad, normalidad y homogeneidad de varianzas. Se consideró significativamente estadístico el nivel de significancia (alfa) < 0,001 (p<0,001).

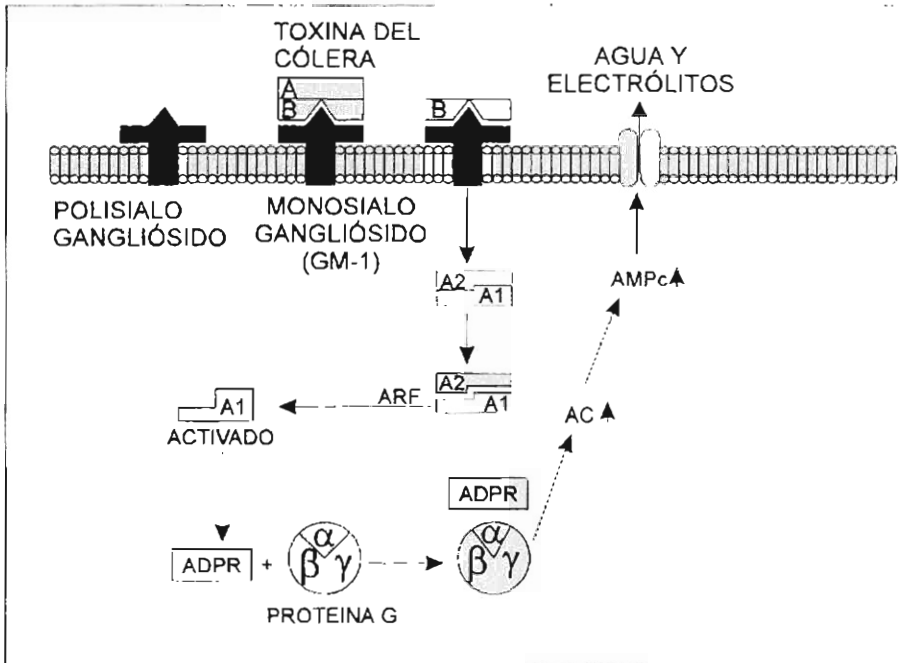


Figura N° 1.- Mecanismo de acción de la toxina del cólera

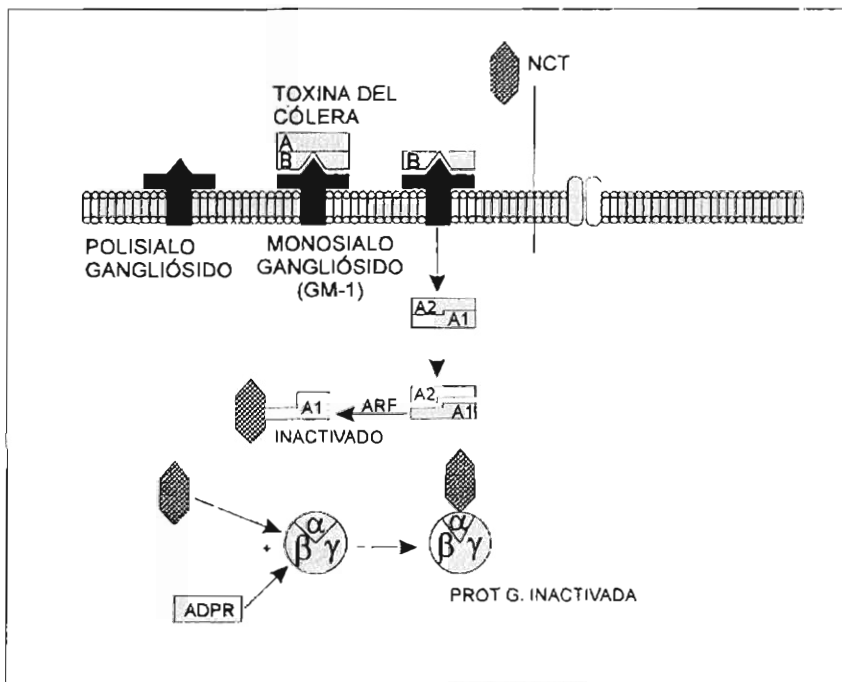


Figura N° 2.- Mecanismo de acción de la nicotinamida

Se elaboró la base de datos en el programa estadístico MSTAT-C. Los datos fueron procesados en un micro computador 486 DX2, IBM compatible. Los resultados del peso de las excretas (variables continuas) son reportados como media \pm desviación estándar, en gramos.

RESULTADOS

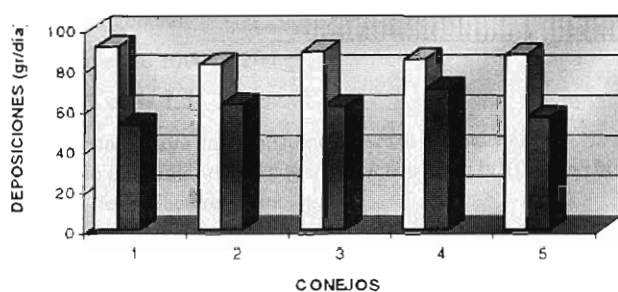
1° Etapa: Efecto de la NCT Sobre el Peso de Excretas en Animales No Infectados

- Los valores obtenidos en el peso de las excretas de los 10 conejos sanos, antes de administrarles NCT, fueron de $35,66 \pm 4,09$.
- Los valores obtenidos en el peso de las excretas de los 10 conejos sanos, después de administrarles NCT fueron de $35,15 \pm 3,92$.
- Siendo similares ambos valores (pre y post administración), no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0,3$).

2° Etapa: Efecto de la NCT Sobre el Peso de Excretas en Animales Infectados

Teniendo como base que los grupos A y B no presentaban diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso de las excretas en condiciones basales (Grupo A= $35,66 \pm 4,09$, Grupo B= $35,15 \pm 3,92$) ($p=0,3$). Se procedió a cuantificar las excretas en ambos grupos luego de presentar diarrea, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con NCT y el control ($61,02 \pm 6,84$ vs. $87,2 \pm 3,51$ respectivamente) ($p<0,001$).

Una observación adicional es que no hubo reducción en la duración de la diarrea en ambos grupos.



□ Control ■ NCT

Control = $87,20 \pm 3,51$ g
 Nicotinamida = $61,02 \pm 6,84$ g } $p < 0,001$

Figura N° 3.- Efecto de la nicotinamida vs. placebo sobre la pérdida de fluidos en animales infectados por cólera

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que la administración de NCT disminuye la pérdida de fluidos en animales infectados por cólera.

En la primera etapa se demuestra que la NCT no modifica los volúmenes de las deposiciones en animales sanos, ya que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,3$) entre las deposiciones de los días pre y post administración de NCT.

Tabla N° 1.- Efecto de la Nicotinamida sobre las deposiciones en animales sanos

| Conejos | Peso de Deposiciones en gr/día | |
|------------|--------------------------------|-------------------|
| | Basal | Post Nicotinamida |
| 1 | 38,5 | 37,5 |
| 2 | 32,7 | 31,3 |
| 3 | 41,8 | 40,4 |
| 4 | 37,0 | 40,3 |
| 5 | 30,9 | 31,3 |
| 6 | 29,3 | 30,3 |
| 7 | 32,9 | 32,6 |
| 8 | 39,3 | 38,5 |
| 9 | 38,8 | 36,5 |
| 10 | 35,4 | 32,7 |
| Media + DE | $35,66 \pm 4,08$ | $35,14 \pm 3,92$ |

* No hay diferencia significativa entre ambos grupos ($p = 0,3$)

En la segunda etapa se comprueba el efecto antitoxina de la NCT en los conejos infectados, encontrándose diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0,001$) entre el grupo tratado con NCT versus el grupo control.

Tabla N° 2.- Efecto de la Nicotinamida versus placebo sobre la pérdida de fluidos en animales infectados por cólera

| Grupo Conejos | Peso de las Deposiciones (gr/día) | | | | | Media \pm DE |
|---------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| (A) NCT | 91,5 | 82,6 | 89,4 | 85,0 | 87,5 | $87,20 \pm 3,51$ |
| (B) Placebo | 52,6 | 62,7 | 62,3 | 70,7 | 56,8 | $61,02 \pm 6,84$ |

* Altamente significativo ($p \leq 0,001$)

Como hemos explicado, la NCT interferiría en el mecanismo de acción molecular de la TC a un nivel no bien definido (²), pero lo claro es que disminuye los niveles altos de AMPe en los enterocitos afectados (¹¹).

Nuestros resultados se pueden explicar por la acción bioquímica de la NCT, de la siguiente manera:

- a) La NCT inhibiría competitivamente la ADP-ribosilación de la Gs alfa.
- b) La NCT se uniría a la subunidad A₁ de la TC, inactivando su acción (ver Esquema N° 2).

Estas hipótesis deberán ser corroboradas con futuros estudios a nivel molecular, ya que contrastan con la opinión de algunos autores que piensan que la NCT podría revertir el proceso de ADP-ribosilación, lo que nos parece poco probable por comprender éste la formación de un enlace covalente (irreversible).

Sin embargo, a pesar de la administración de NCT, el grupo experimental presentó diarrea, aunque de menor magnitud (expresada en peso).

Esto puede ser explicado debido a la existencia de canales de iones que no se activarían por AMPe, donde la toxina actuaría directamente. Además el *V. cholerae* produce otras toxinas como la Toxina de la Zona Ocludens (ZOT), que aumenta la permeabilidad entre los enterocitos, y las que median la acción de prostaglandinas y neurotransmisores que aumentan la motilidad intestinal (¹²).

Es así que demostramos experimentalmente la utilidad de la NCT en la pérdida de fluidos por cólera en conejos raza Nueva Zelanda, y estamos convencidos que el estudio más profundo de este nuevo agente terapéutico contribuirá al actual esquema de tratamiento que ha tenido avances muy importantes en este último siglo.

AGRADECIMIENTO

Nuestro sincero agradecimiento por la asesoría brindada por el Dr. José Chumpitaz del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión - UNMSM.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Dhiman, Greenough III B. Cholera. Plenum Medical. N.Y. 1992
- 2) Romer MA. Colera para Gastroenterólogos. GLEN 1991. Jul-Sep; 45 (3):231-41.
- 3) Carpenter JC. The Erratic Evolution of Cholera Therapy: From Folklore to Science. Clinical Therapeutics 1990; 12 (Suppl A)
- 4) Reyna C, Zapata A. Crónica sobre el Cólera en el Perú. 1992. DEISCO
- 5) Cieza J, Gamarrá G, Torres C y cols. Expansión endovenosa rápida con Cloruro de Sodio al 0,9% en adultos moderada y severamente deshidratados por Colera. Rev Med Herediana 1991; 2(2): 57-64.
- 6) Cieza J. Esquema para el manejo de pacientes deshidratados por Colera. Rev Med Herediana 1991; 2(2): 85-89.
- 7) Pullitzer ND. Cholera. WHO. Serie de Monografías. 1959
- 8) Yamane HK, Fung BK. Covalent Modifications of G-Proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1993; 32: 201-41.
- 9) Felly, Semrad Disorders of gut ion Transport. Annu. Rev. Physiol. 1993; 635-40.
- 10) Salazar R y cols. Cólera, la experiencia en el IPSS. Medilibros. Lima-Perú. 1991.
- 11) Rabbani GH, Bardhan PK, Butler T y cols. Reductions of Fluid Loss in Cholera by Nicotinic Acid: A randomised controlled trial. Lancet 1983; 2: 1439-42.
- 12) Mensa J, Gatell J y cols. Guía de Terapéutica Antimicrobiana. 2ª edición. 1992. p. 58-9.
- 13) Brooks G, Botel y cols. Capítulo 27. En: Melnick y Adlberg, ed. Microbiología Médica de Jawetz. 14ª edición. Manual Moderno. 1992. p. 309-10.
- 14) Rall, Goodman, Nies y Taylor, eds. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8ª edición. 1991. p. 1018-35.
- 15) Cotran R, Kumar V, Robins S. Robins. Patología Estructural y Funcional 4ª edición. McGraw-Hill. 1990. p. 907.
- 16) Wilson J, Brounwald E y cols. Harrison's Principios de Medicina Interna. 12ª edición. 1991. p. 1402.