

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA.

ACIDO NALIDIXICO EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES

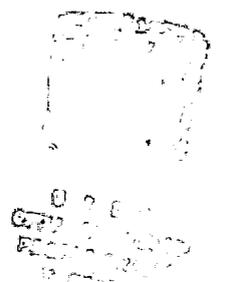
DE VIAS URINARIAS.

TRABAJO MONOGRAFICO.

Sustentante: LYDIA LOZANO ANGELES.

Carrera: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1983.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

- 1.- INTRODUCCION.
- 2.- GENERALIDADES.
 - 2.1.- Propiedades físico químicas.
 - 2.2.- Acción farmacológica.
 - 2.3.- Farmacocinética.
- 3.- EFECTOS DEL ACIDO NALIDÍXICO SOBRE LAS CELULAS BACTERIANAS.
 - 3.1.- Replicación del ADN.
 - 3.2.- Transferencia del ADN.
 - 3.3.- Acción del ácido nalidíxico sobre el ADN.
 - 3.4.- Desarrollo de los factores F y R.
 - 3.5.- Enzimas que intervienen en la replicación del ADN.
 - 3.6.- Enzimas que intervienen en la rotación de la molécula del ADN.
 - 3.7.- Ligasas de polinucleótidos.
 - 3.8.- Efectos del ácido nalidíxico sobre las enzimas que intervienen en la replicación del ADN.
- 4.- ACCION ANTIBACTERIANA.
- 5.- ACCION TERAPEUTICA.
- 6.- EFECTOS COLATERALES.
- 7.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.
- 8.- BIBLIOGRAFIA.

1.- INTRODUCCION.

De las infecciones que el ser humano llega a padecer, - las que se asientan en el tracto genitourinario han merecido un gran interés por parte de los investigadores, ya que la - morbilidad y mortalidad que conlleva un mal tratamiento pueden ser tan elevadas que repercuten notablemente tanto en la familia como en la sociedad.

Estas infecciones afectan a pacientes de todas las edades y de ambos sexos, variando su grado de severidad desde - una infección no diagnosticada, hasta llegar a un estado mucho más severo.

El diagnóstico clínico bacteriológico de las infecciones en vías urinarias, se realiza por medio del urocultivo - que demostrará la existencia del microorganismo y la proporción en que éste se encuentra, para considerar un padecimiento.

La orina por ser un excelente medio de cultivo, para la mayoría de las bacterias patógenas del tracto urinario, - hace que se reproduzcan rápidamente excediendo el número de 10^5 bacterias por mililitro; mientras que las muestras de -- las personas que no están infectadas, pueden ser estériles o contener 1000 bacterias por mililitro.

Cabe señalar, que la cuenta de bacterias en el urocultivo con menos de 10^5 bacterias por mililitro; puede ocurrir - en pacientes que han recibido terapia antibacteriana o en -- pacientes que están excesivamente hidratados, con una consiguiente dilución de la orina. Otro factor podría ser la existencia de ciertas bacterias con una curva de crecimiento muy

lenta.

Las bacterias que se pueden encontrar como flora normal en una muestra de orina son:

Estafilococos coagulasa negativa.

Bacilos difteroides.

Bacilos coliformes.

Enterococos.

Proteus sp.

Lactobacillus.

Estreptococos alfa y beta hemolitico.

La flora bacteriana de una muestra infectada incluye--
una ó más de las siguientes bacterias:

E. coli.

Klebsiella sp.

Enterobacter sp.

Serratia marcescens.

Proteus mirabilis.

Proteus sp.

Providencia sp.

Pseudomona sp.

Streptococcus faecalis.

Estafilococos coagulasa positiva y negativa.

Alcaligenes sp.

Actinobacter sp.

Haemophylus sp.

Estreptococos beta hemolítico, generalmente grupos-

B y D.

Neisseria gonorrhoeae.

Salmonella sp.

Shigella sp.

Dentro de esta serie de microorganismos que afectan el aparato urinario se ha observado claramente que la resistencia de estos gérmenes es mayor cuando el espectro del antimicrobiano es menor de ahí los cambios en los patrones de sensibilidad y resistencia de las bacterias, en especial las Gram negativas, necesitando la planificación de una mejor acción terapéutica.

Las pruebas de sensibilidad de un microorganismo a los antimicrobianos, debe brindar una guía que seleccione la droga apropiada para mejorar el manejo de cualquier proceso infeccioso; encontrando que en multitud de casos, el ácido nalidixico, reúne características para ser un quimioterápico adecuado en el tratamiento de infecciones de vías urinarias.

2.- GENERALIDADES.

Entre las investigaciones de Lesher (62), en el año de 1962, está el descubrimiento del ácido nalidíxico, el cual es un antimicrobiano derivado de la 1.8 Naftiridina, que ha demostrado después de múltiples estudios su utilidad para el tratamiento de las infecciones de vías urinarias, principalmente aquellas ocasionadas por bacterias Gram negativas.

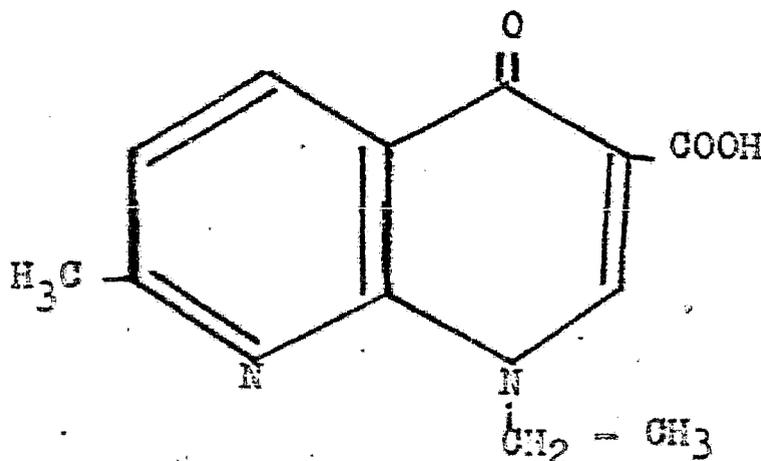
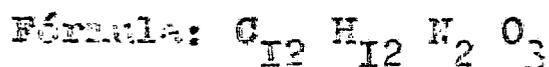
Como resultado de los estudios efectuados en animales de laboratorio (ratas, monos, perros), se encontraron dos características de gran importancia, la primera consiste en que el ácido nalidíxico se concentra en gran cantidad en las vías urinarias y, la segunda que se ha observado, consiste en que el ácido nalidíxico o uno de sus metabolitos (glucurónido), continúa siendo farmacológicamente activo sobre estas estructuras urinarias. Siendo estas dos características por las que se ha utilizado con gran éxito en el tratamiento de las infecciones de vías urinarias como son: pielitis, pielonefritis crónica y aguda, glomerulonefritis crónicas y agudas, uretritis y cistitis.

Cada antimicrobiano tiene un mecanismo de acción preciso, más o menos conocido actualmente, existiendo una forma de acción que afecta a una reacción precisa del metabolismo bacteriano. Pero debido a que las relaciones del metabolismo están relacionadas entre sí, este efecto primario entraña numerosos efectos secundarios sobre diversas funciones de la bacteria. Estas modificaciones se producen cuando una concentración suficiente de antimicrobiano se pone en contacto con la bacteria y depende en gran medida de factores múltiples que

dependen a su vez de la bacteria y de sus características físico químicas.

La concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) del ácido nalidíxico, se determinó en microorganismos que fue con probados con diferentes técnicas; dilución seriada en tubo, en placa, con sensibiliscos impregnados de este antimicrobiano en concentraciones progresivas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 60 microgramos de ácido nalidíxico. La (C.M.I.) correspondió a la mínima concentración de ácido nalidíxico que impide el crecimiento de la bacteria en estudio, en un tiempo determinado de incubación (24 h.) para la gran mayoría de bacterias probadas fue de 16 microgramos por mililitro.

2.1.- Propiedades físico químicas.



Peso molecular	238.2
Punto de fusión	136-138 °C
Estabilidad.....	Estable inclusive a 100 °C por 24 h.
Aspecto físico.....	Cristales amarillos brillosos e incoloros.
Solubilidad.....	Soluble en etanol, glicérol, agua, poco en agua y en ácidos débil.

2.2.- Acción farmacológica.

Los estudios de Lesher (62) realizados en monos, demostraron que la LD_{50} es de 3300 a 4000 miligramos por kilo, diarios, por vía oral; en cambio, por vía intravenosa es de tan solo 176 a 500 miligramos por kilo. Al ser administrado el medicamento por vía oral, no se encontró ningún efecto tóxico con dosis que pueden llegar a ser hasta de 900 miligramos por kilo por día; en cambio, cuando se llega a dar por vía intravenosa una dosis de sólo 800 microgramos por kilo, puede provocarse un paro respiratorio que en algunos casos llega a ser reversible.

Para valorar los efectos crónicos de toxicidad se trataron monos y perros durante un año (63,6,16) con dosis diarias de 225 microgramos por kilo sin llegar a presentar alteraciones en el sistema citohematológico, sobre pruebas de coagulación, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático y examen general de orina, habiéndose efectuado todos estos exámenes en forma mensual.

En las pruebas efectuadas para valorar el funcionamiento del Sistema Nervioso Central, no se demostró efecto aparente de sedación o de estímulo sobre éste.

Con objeto de observar los efectos teratogénicos del ácido nalidíxico, Lishman (63,95) en 1963, lo administró por vía oral a ratas preñadas en dosis que variaron de 75 a 150 miligramos por kilo durante toda la gestación y hasta una semana después del nacimiento, sin haber encontrado alteraciones en el curso de la gestación, del parto o malformaciones en el producto.

Es de hacer notar que las ratas presentan una mayor --- susceptibilidad que el mono hacia el ácido nalidixico, y que la administración de una dosis de 300 miligramos por kilo -- (límite de tolerancia para el mono) fué mortal para la rata.

En el caso de monas preñadas, la administración oral de 200 miligramos por kilo por día, durante los tres meses anteriores al parto, no presentó dato alguno de alteración en la gestación del producto.

Posteriormente (6,71), en el año de 1963 se administró a pacientes humanos voluntarios los cuales mostraban evidencias tanto clínicas como bacteriológicas de padecimiento en vías urinarias, llegando a dárselos hasta un gramo, cuatro veces al día durante 180 días, mostrando una notable mejoría en la infección presentada. A continuación se administró este medicamento a mujeres embarazadas después del tercer mes de gestación, un gramo cuatro veces al día, sin haber encontrado tampoco alteración o complicación alguna, ni en el embarazo, ni en el parto, ni efectos teratogénicos en el producto.

Recientemente Czinn (30) administró diluciones progresivas de ácido nalidixico a huevos fértiles, observando que esta droga penetra a las células inhibiendo la síntesis del -- ADN, modificando la secuencia genética de estas moléculas, y ocasionando con ello efectos teratogénicos, los cuales se expresaron como desarrollo anormal de los polluelos. Estos resultados son importantes ya que no existía contraindicación alguna para la administración a mujeres embarazadas.

2.3.- Farmacocinética.

En aquellos animales de experimentación (ratas y monos), que presentaban enfermedades urinarias y que recibieron un tratamiento con ácido nalidíxico por vía oral (62,63,95,71), al término de este tratamiento, dejó descansar a los animales por un período de 2 semanas, para posteriormente analizar su orina; por examen general de la misma, así como también realizó un urocultivo, llegando a observar que esta droga tiene una acción antimicrobiana muy significativa sobre infecciones en vías urinarias al ser los urocultivos negativos. Esto comprueba que la droga o uno de sus metabolitos son biológicamente activos y que se eliminan a través del tracto urinario 30 minutos después de haber ingerido un gramo de ácido nalidíxico, alcanzando niveles significativos en sangre, (53) siendo el máximo dos horas después de la ingesta y observando después una rápida disminución (ver gráfica-I).

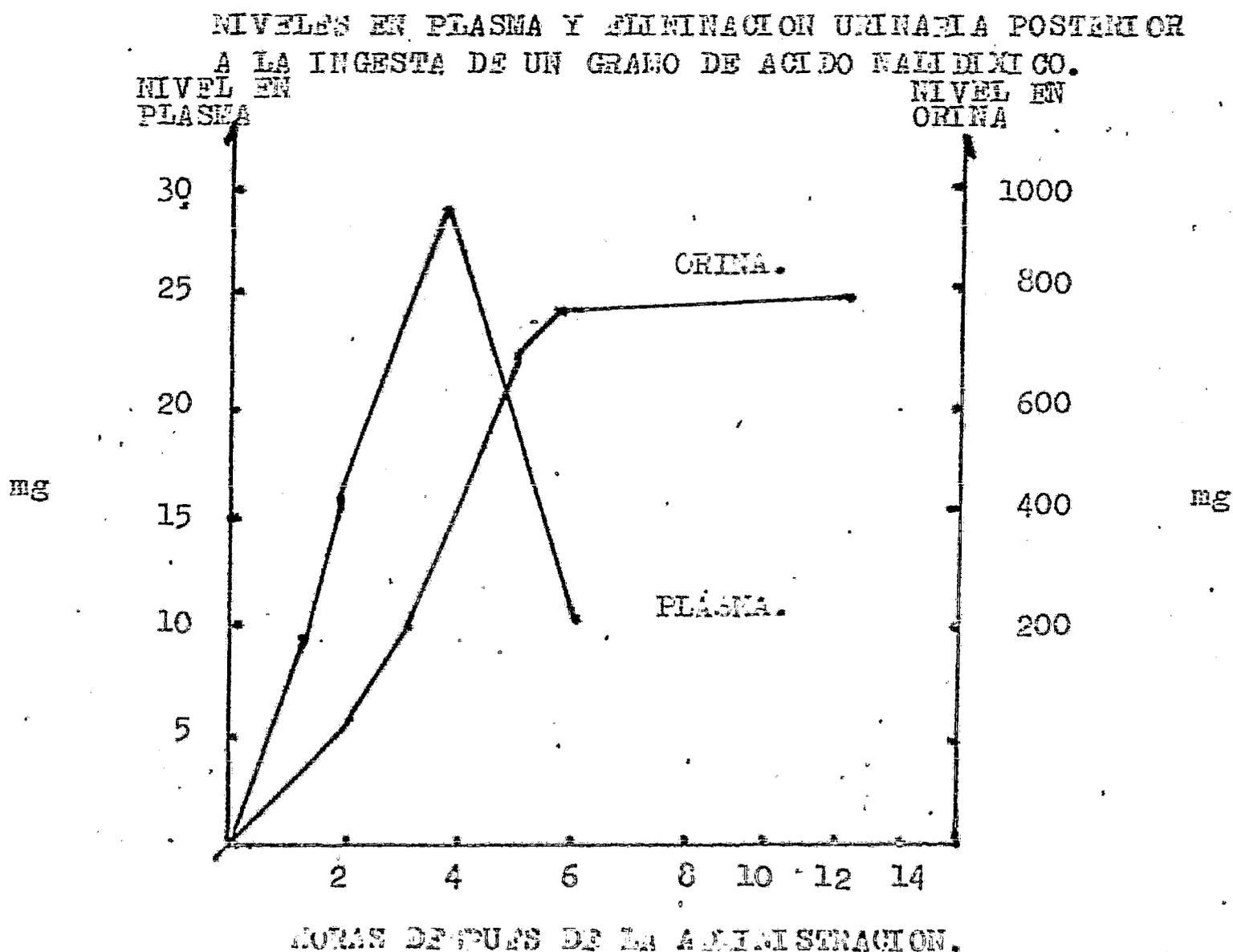
; El análisis cromatográfico de la orina dos horas después de la administración, muestra un 20 % de la droga eliminada en forma activa y el 80 % constituido por derivados conjugados, principalmente con el ácido glucurónico, que son fácilmente separados por hidrólisis ácida.

En las heces se encontró un 5% en forma activa, este hecho es bastante importante, porque existen bacterias que penetran en la circulación eliminándose por vía fecal y por vía renal. Esta ventaja ayuda a que la actividad del ácido nalidíxico se manifieste simultáneamente tanto en riñón como en el intestino con buenos resultados.

Mecanismo de excreción renal. Con dosis de un gramo, - se excreta entre 4 y 7 % de droga biológicamente activa en las siguientes 4 hrs. La eliminación del ácido nalidíxico - a partir del plasma, es de 5 a 6 ml. por min a las 2 hrs de haber ingerido la droga, se han obtenido resultados similares con perros, con aplicación intravenosa.

Cerca del 80% del ácido nalidíxico administrado por -- vía oral, puede ser recolectado en la orina como un glucoró nido inactivo, porque la eliminación del plasma es mucho ma yor. El 5 al 15%, que se encuentra en la orina en forma ac tiva, se elimina por filtración glomerular (22 ml por min), mientras que el glucorónido inactivo se excreta por los tú bulos renales, en un rango de 340 ml por min.

G R A F I C A # 1



3.- EFECTOS DEL ACIDO NALIDIXICO SOBRE LA CELULA BACTERIANA.

Con el fin de conocer con más detalle la forma de acción del ácido nalidixico, se hará referencia a los trabajos efectuados sobre la replicación celular y la transferencia genética del ADN en E.coli.

En la célula bacteriana (67, 96, 45, 85) se encuentra la molécula del ADN que es la portadora de la información genética para su replicación. Esta se realiza sobre una de las cadenas de ADN que sirve de molde para la cadena complementaria durante el proceso de replicación, o para una cadena de ARN mensajero en el caso de la transcripción bacteriana.

Las secuencias de las bases del ácido nucleico determinan la estructura de la proteína, así como el lugar donde se inicia y termina la replicación, permitiendo que las moléculas de ADN se apareen durante el proceso de recombinación para posteriormente separarse en mitosis, tal como se muestra en la figura I.

3.1.- Replicación del ADN.

La replicación del ADN se produce a partir de un punto de crecimiento o punto inicial, el cual se desplaza en forma lineal y dirigido hacia un punto terminal siguiendo una dirección única, 5' → 3' que se lleva a cabo en la mayoría de las bacterias como se observa en la figura II.

Fig 1.- REPLICACION DEL ADN.

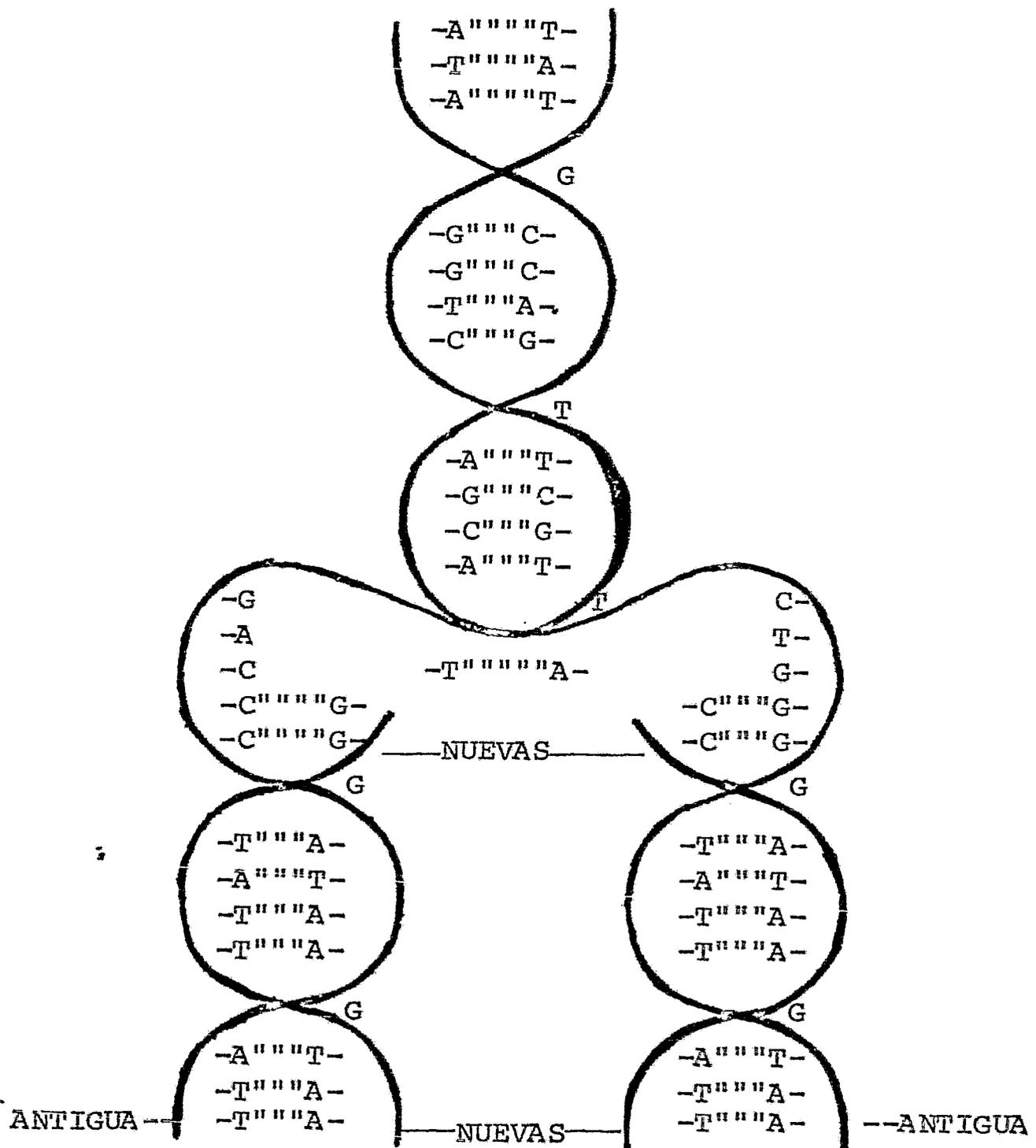


Fig 1.- REPLICACION DEL ADN.

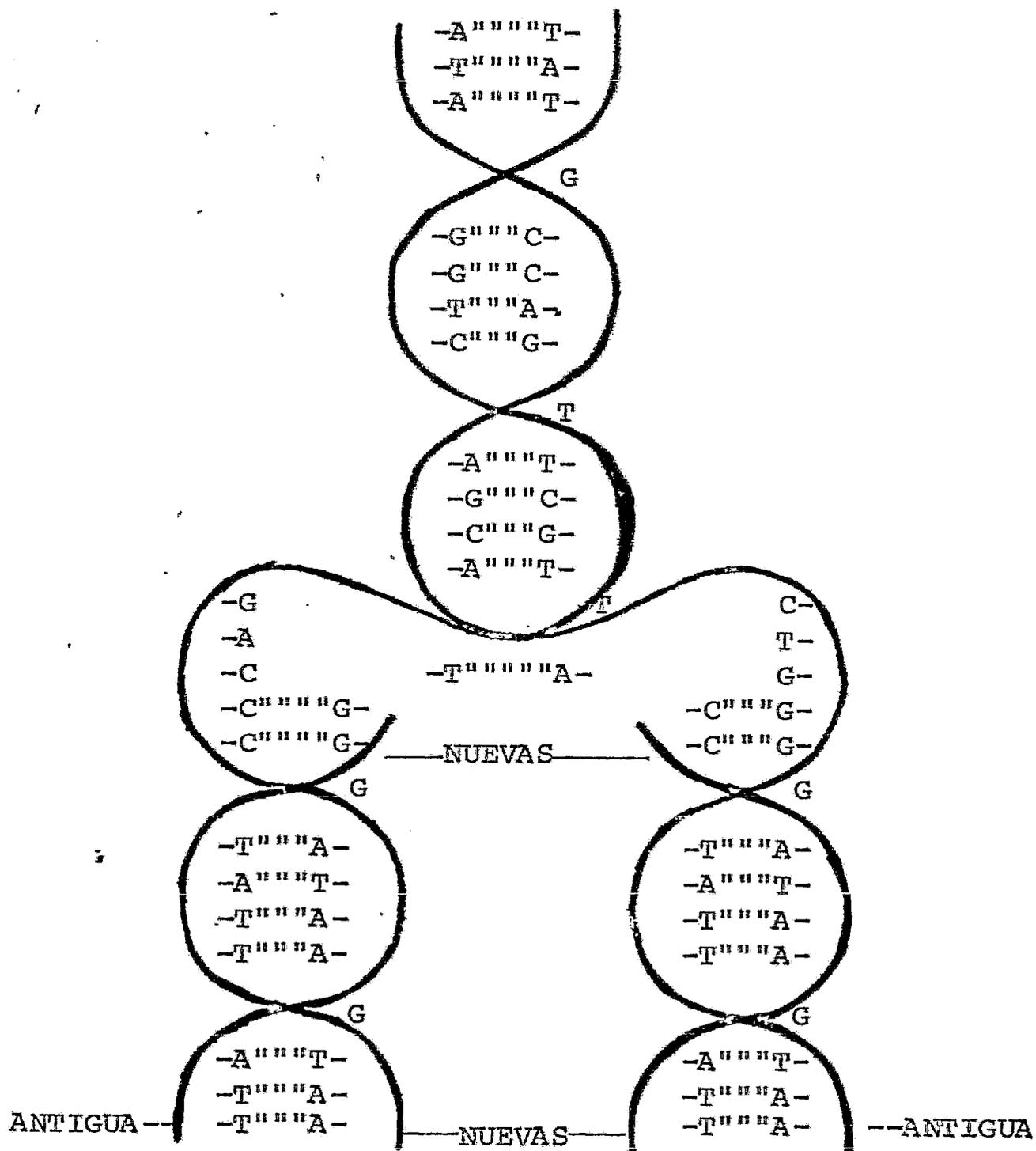
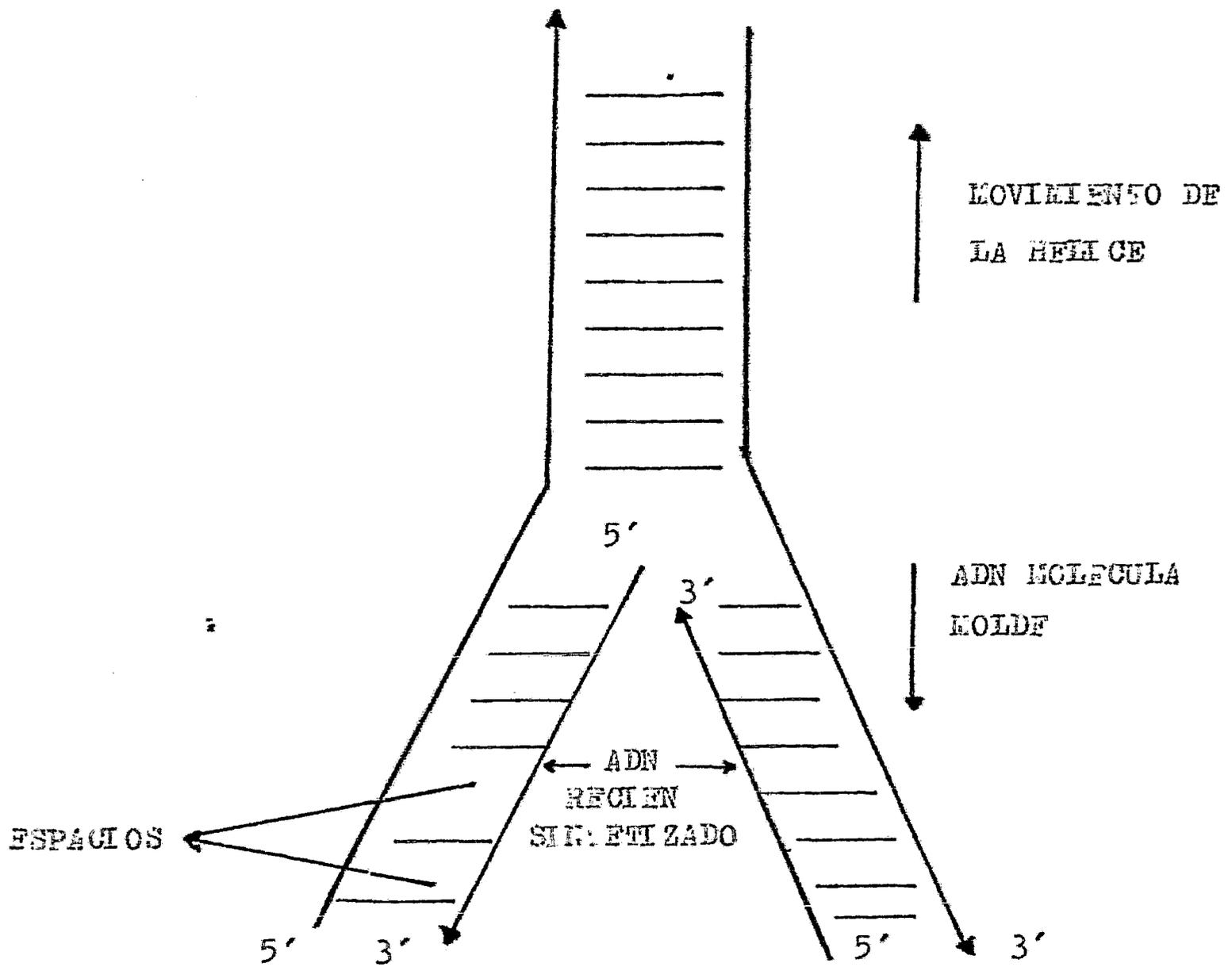


Figura II.- REPLICACION UNIDIRECCIONAL.



La replicación del ADN iniciada en puntos específicos es idéntica en cepas bacterianas íntimamente relacionadas entre sí, por consiguiente, es posible distinguir entre los procesos de iniciación y de elongación en la cadena, ya que ambos procesos utilizan proteínas diferentes. Existen ciertas mutantes de E. coli que presentan un bloqueo en la síntesis de proteínas, siendo incapaces de iniciar la replicación debido principalmente a cambios de temperatura (al elevarse) (69); sin embargo, pueden completar la síntesis de las cadenas en donde este proceso se ha iniciado, mientras que en otros casos el crecimiento de la cadena es imposible de realizarse.

Estas observaciones definen las unidades específicas de replicación del ADN llamadas replicones, cada uno de los cuales posee un origen y una terminación única.

El ADN bacteriano se encuentra siempre unido a la membrana celular o a su mesosoma (invaginaciones de la membrana). Esta unión probablemente se sitúa a nivel del punto de crecimiento, ya que después de una corta exposición en presencia de un precursor radioactivo, el ADN que acababa de ser sintetizado se encuentra preferentemente asociado con la fracción de membrana después de que la célula sufre un proceso de lisis. Además, la fracción de la membrana contiene ADN polimerasa, enzima que interviene en los procesos de replicación.

La membrana también determina la forma en que se produce la segregación de las moléculas hijas, para repartirse a las distintas células al final de la replicación. Al parecer, el ARN se incorpora temporalmente a la cadena de ADN y el nuevo ADN se encuentra unido en forma covalente a un ribonucleótido.

En los procesos normales esta unión del ARN debe de ser eliminada, ya que en el producto final no es posible identificarla. Es posible que la intervención del ARN en los procesos de iniciación se deba a que las enzimas que dan lugar a la síntesis de ADN, sólo son capaces de añadir nucleótidos cuando se ha iniciado el preexistente, mientras que la ARN polimerasa puede dar lugar a la iniciación sin que exista otra molécula iniciadora.

El complejo de iniciación está formado por:

- a).- Molécula molde del ADN.
- b).- Proteínas.
- c).- ARN polimerasa.
- d).- Trifosfatos de ribonucleótidos.
- e).- Desoxinucleótidos.

En el proceso de crecimiento de la cadena, los factores más importantes son:

- a).- Naturaleza de las enzimas que intervienen en la síntesis.
- b).- Cambios estructurales del ADN.

En la cadena paralela, los replicones se llevan a cabo a través de la síntesis de segmentos de corta longitud, que posteriormente se unen en forma terminal. Mediante este mecanismo, ambas cadenas pueden replicarse sintetizando ADN en dirección $5' \rightarrow 3'$, ya que la síntesis de cada uno de los segmentos es independiente de la dirección general de crecimiento de la cadena.

Otro importante problema consistía en la forma en que el ADN podía desenrollarse en la replicación, lo cual exige-

una rotación de moléculas, que plantea problemas hidrodinámicos, debido a la gran longitud de estas moléculas y que fueron mayores al descubrir que la molécula del ADN es cíclica-incapaz de desenrollarse. Sin embargo, estas dificultades se resolvieron al comprobar que:

- a).- Durante la replicación del ADN éste contiene muescas, que separan fragmentos formados por una cadena única, lo cual permite un desenrollamiento local.
- b).- El descubrimiento de enzimas de rotación, tema que se tratará posteriormente.

3.2.- Transferencia del ADN.

Aunque las mutaciones constituyen la base fundamental de la variabilidad genética, los mecanismos de recombinación de la información genética aumentan y aceleran en forma considerable los procesos biológicos de diversificación y evolución. No resulta por lo tanto sorprendente, que un fenómeno de tal importancia apareciera en las primeras fases de evolución, en el momento en que los organismos vivientes eran exclusivamente unicelulares.

Se creyó durante mucho tiempo que la reproducción de las bacterias era exclusivamente vegetativa, además se pensaba que la variabilidad presentada por estos microorganismos se debía a una cierta plasticidad celular más definida. Sin embargo, en el momento que se demostraron (28,13,29,48) las capacidades de mutación de las bacterias, se iniciaron de nuevo los estudios conducentes a determinar su mecanismo de

recombinación.

Los resultados así obtenidos unificaron la variación bacteriana con la genética clásica por lo menos a nivel de la estructura y funciones bacterianas. Los procesos bacterianos dependen de una serie de unidades ligadas entre sí, como resultado de hallarse situadas en el mismo cromosoma. Sin embargo, a nivel de los mecanismos de transferencia genética, el estudio de los procesos hereditarios en las bacterias ha dado lugar a sorpresas inesperadas que hacen pensar que la reproducción sexual constituye lo que podríamos llamar un lujo evolutivo.

En lugar de producir cigotos, las bacterias dan lugar a merocigotos, que son células parcialmente diploides ya que contienen un genoma completo de una célula receptora y un fragmento de material genético procedente por transferencia de una célula donadora.

Dicha transferencia ha sido estudiada por diferentes investigadores, (4,54,84,94) mencionando que dicho material genético se introduce en la célula receptora, dando lugar a una recombinación de su cromosoma reemplazando a un fragmento homólogo mediante un entrecruzamiento doble.

Jacob (55,76) explica que las células masculinas absorben a la femenina porque son poseedoras de dos o tres pili específicos, denominados F, los cuales no se encuentran en la célula femenina.

Estos pili F, se ha deducido que se encuentran relacionados con la fertilidad, y que al carecer de ellos, la célula bacteriana pierde su fertilidad y por consiguiente la conjugación.

ción no se realiza. Esta conexión inicial por medio de pili - entre dos células, no va necesariamente seguida de un contacto más íntimo, sólo son capaces de transferir material genético.

La estructura de estos filamentos, pili F, explica ciertas características de la conjugación:

- a).- La facilidad con que se interrumpe dicho proceso.
- b).- La incapacidad de estos filamentos pili para realizar dicho contacto.
- c).- La ausencia de transferencia de compuesto citoplásmico.

3.3.- Acción del ácido nalidixico sobre el ADN.

Hollom (52) y Goss (43), revelan por medio de sus estudios una inhibición de la síntesis del ADN inducida por la presencia del ácido nalidixico.

Examinando el efecto de esta droga sobre la incorporación de adenina y uracilo en el ARN de E. coli, se excluye cualquier efecto de la droga sobre los precursores de la síntesis de ADN. Ya que la presencia del ácido nalidixico dió como resultado que ambas fases fueran incorporadas dentro de la molécula del ARN, pero no en el ADN, demostrando así que no existe efecto del ácido nalidixico sobre las bases púricas y pirimidínicas y su conversión a sus correspondientes ribonucleótidos. Además, la síntesis del ARN continúa aún en la presencia del ácido nalidixico, a niveles en que la síntesis de ADN se encuentra bloqueada.

Deitz (33) reporta en sus estudios la acción del ácido -

nalidíxico sobre E. coli, que puede ser controlada por la regulación de la síntesis de las proteínas y del ARN, la que se logra utilizando inhibidores bacteriostáticos, condiciones de selección nutritiva, o regulación de la temperatura en el crecimiento.

Es evidente que el efecto bioquímico en la inhibición en la síntesis del ADN se distingue de la acción bactericida de la droga, con este fin se restringieron las condiciones de la síntesis de las proteínas y ARN utilizando un medio de cultivo enriquecido con timina carente de arginina y uracilo, se observó que la síntesis del ADN es bloqueada, pero no se detecta ninguna pérdida de viabilidad en la célula bacteriana.

Los resultados demuestran la exclusión de cualquier acción del ácido nalidíxico sobre los iniciadores de la síntesis de ADN, observando también que la acción letal de esta droga se controla al ser trasladadas las bacterias a un medio exento de la droga, siendo la síntesis de ADN restaurada nuevamente, pero al ser expuestas a la droga, la síntesis de ADN se inhibe, deduciendo que estas células permanecen vulnerables a la acción de la droga, y que el daño ocasionado no es en ningún sitio sensible de la célula, por lo que no se altera su integridad biológica.

3.4.- Desarrollo de los plásmidos F y R.

Las bacterias contienen frecuentemente, además de un cromosoma circular de gran tamaño, diversas moléculas cíclicas de ADN que se replican en forma autónoma y son de menor tamaño, (74,27) recibiendo el nombre de plásmidos o factores ex--

traerosómicos, éstos se descubrieron a partir de una función reconocida; en el caso del factor F (factor de fertilidad) se descubrió que da lugar a la recombinación de las bacterias, en cambio, los plásmidos R (factores de resistencia) confieren resistencia a la bacteria ante la presencia de antimicrobianos. Estos grupos poseen características genéticas comunes, aunque presentan también reacciones de resistencia al incorporar diversos bloques de material genético optativo que afectan el fenotipo del huésped. Los genes para la resistencia ante los antimicrobianos han sido los más extendidos en su estudio, no sólo por las presiones selectivas que favorecen su desarrollo, sino también por que el amplio empleo de pruebas con antimicrobianos en los laboratorios clínicos han permitido su detección.

La replicación del plásmido se encuentra relacionada con la replicación del cromosoma huésped (8,36,89). En el caso de los plásmidos de gran tamaño, la replicación es prácticamente sincrónica con la del cromosoma (quizá porque ambos poseen un punto común en la membrana) y se haya bloqueada por ciertas mutaciones bacterianas sensibles a la temperatura, impidiendo la replicación del ADN de la célula huésped.

La mayoría de los plásmidos son transmisibles, pueden dar lugar a la formación de un aparato de conjugación para su transferencia a otras células, recibiendo el nombre de factores sexuales o de fertilidad, o plásmidos conjugativos el mecanismo de conjugación ha sido estudiado principalmente a partir del plásmido F.

El plásmido induce la formación de un pili masculino específico, que forma un frágil puente de conjugación con las células receptoras.

La formación del puente provoca un tipo especial de replicación asimétrica del ADN, una de las cadenas del plásmido F replica y permanece en el donador, mientras que la otra cadena es transferida a través del puente de la célula receptora, produciendo un nuevo plásmido o recombinándose con el cromosoma de la célula receptora.

La energía necesaria para la replicación se obtiene a partir de la pirofosfólisis de trifosfato de los desoxirribonucleósidos. El factor sexual puede transferirse a sí mismo (93) y también puede transferir a un genoma adicional cromosómico o plásmido con el cual se ha recombinado (tal como ocurre en la mutación F^+ a Hfr), por consiguiente no se sabe si se produce una integración inestable o si el aparato de conjugación, aunque se haya codificado por el plásmido, pueda unirse en algunos casos a una secuencia más favorable del ADN cromosómico.

Los plásmidos transmisibles pueden tener un conjunto de genes que permitan y regulen su propia replicación y además deben especificar y regular los medios necesarios para su transferencia. La complementación de mutaciones para la transferencia del factor F ha permitido identificar doce genes que intervienen en dicho proceso, de los cuales siete están en relación con la formación del pili.

Estos plásmidos (21), limitan su multiplicación de acuerdo con los sitios de ocupación en la membrana celular, estos-

sitios no se hallan ligados a los de la unión cromosómica - durante la división celular, ya que estos plásmidos son capaces de transferirse así mismos produciendo minicélulas -- carentes de cromosomas, en ciertas cepas mutantes de E. coli.

En relación con la transferencia, la regulación de los filamentos pili es de gran importancia (61) porque después de la penetración de un plásmido R en la célula, ésta presenta una elevada frecuencia de transferencia durante varias generaciones. Sin embargo, puede producirse una acumulación de información genética reprimida que disminuya considerablemente la frecuencia de formaciones de filamentos pili.

Muchos plásmidos pueden integrarse al cromosoma bacteriano del huésped, es decir pueden replicar en forma autónoma o formando parte del cromosoma. Las unidades genéticas - capaces de variar entre estos dos tipos de replicación reciben los nombres de episomas.

Sin embargo, esta propiedad no es exclusiva de los plásmidos, la frecuencia e integración varía extraordinariamente según la combinación plásmido-célula que se produzca y por lo tanto un mismo plásmido puede ser episómico en un huésped y, básicamente, no episómico en otro.

Falkow (36) define que los plásmidos R están formados por dos partes bien definidas, la primera llamada factor de transferencia básica, (RTF) del que depende la conjugación y una segunda parte que es un determinante variable de resistencia (r), el cual contiene genes para la resistencia -

frente a los antimicrobianos.

En E. coli, las dos partes del factor forman una unidad, aunque ambos plásmidos de este par complementario constituyen replicones completos, los plásmidos constituidos por el determinante r no son transferidos a menos que funcionen con un factor de transferencia.

En la naturaleza, ciertas bacterias son portadoras de determinantes r, aislados, mientras que otros son portadores de un factor desnudo, carentes de genes de resistencia, los cuales abundan en la naturaleza pero como no transfieren en forma efectiva genes de la célula se descubrieron posteriormente al agente F.

Los genes de resistencia que se encuentran en combinaciones diversas con los plásmidos R, pueden proceder del cromosoma de diversas bacterias, habiendo sido obtenido a partir de ellos por medio de recombinaciones de tipo poco frecuente parecidos a los que dan lugar a la formación del plásmido F' a partir del plásmido F.

Bouck (10) y posteriormente Hane (51), reportan los resultados del efecto que tiene el ácido nalidíxico durante la conjugación, ellos demuestran que el ácido mencionado detiene inmediatamente la transferencia genética en una célula donadora, la cual tiene que ser necesariamente sensible a la droga en cualquier momento de su apareamiento.

Sin embargo, la inhibición que se presenta cuando la célula donadora es resistente, lo cual ocurre después de los 15 minutos de iniciarse su apareamiento, hace suponer que las bacterias sensibles al ácido nalidíxico tienden a ser más

permeables durante su apareamiento que estando en condiciones normales.

En estudios sobre la fragmentación del ADN que es una consecuencia de la inhibición en la síntesis del ADN, reportan (13, 52, 79, 22, 49, 39, 20) que es el punto de origen de la replicación es degradado en varios sitios de la cadena, por lo cual se fragmenta impidiendo la transferencia de este material genético.

Estas células no reanudan la transferencia porque dicha degradación destruye la continuidad de la cadena y no reconocen el punto de iniciación ni de elongación de la replicación.

Posteriormente Crumplin (26), al igual que los anteriores autores, reporta que el mecanismo de acción del ácido nalidíxico sobre las bacterias, es el impedimento de la conversión de fragmentos intermediarios del ADN hacia la formación de una molécula más grande y más completa de ADN.

Fenwick (37, 97) condujo el apareamiento entre una célula donadora termosensible (42° C) y como receptor utilizó minicélulas demostrando que por la presencia del ácido nalidíxico los índices celulares disminuyeron, ya que dicha droga redujo la estimulación de la síntesis de ADN causada por la presencia de minicélulas y la síntesis de ADN del plásmido dentro de las células donadoras inhibiendo la síntesis del ADN durante dicha conjugación.

Mc. Daniel (72) estudió el comportamiento de mutantes de E. coli, después de haber sido expuestas al ácido nalidíxico, observando que su recombinación fué lenta y deficiente debido

a que la molécula del ADN no fué reparada totalmente y la --
sensibilidad al ácido nalidíxico se incrementó.

En consecuencia, se interrumpe la transferencia del ADN del plásmido sintetizado antes o durante el apareamiento de las minicélulas. Estos resultados están de acuerdo con las --
observaciones genéticas y moleculares de otros autores (13, --
10, 51, 39, 5). Estos autores demuestran que la cantidad de --
ADN de la célula donadora decreció considerablemente en com-
paración con las células controles, por lo que hace suponer --
que la fragmentación de esta cadena es a causa de la presen-
cia del ácido nalidíxico que incrementa el número de rompi- --
mientos en la cadena del ADN, ésto está de acuerdo con otros
autores como Crumplin (26).

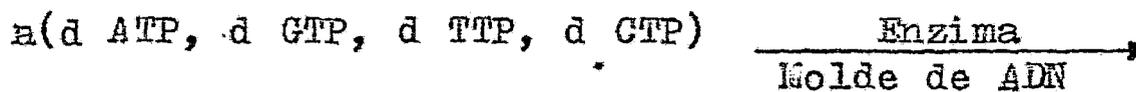
Al inhibir el ácido nalidíxico la síntesis del ADN en --
la célula donadora, por algún movimiento preventivo en el --
sitio de replicación no se afecta la síntesis del ADN del --
plásmido, el cual se replica y aumenta la cantidad del plás-
mido R en la célula que posteriormente se une a la membrana,
considerado como un efecto secundario de la droga, inducien-
do una relación aberrante entre este ADN y la membrana celu-
lar.

Burman (18), al igual que Fenwick (37) y Barbour (5), --
encontró que los plásmidos F y R no son transferidos por la --
acción del ácido nalidíxico, además de que este autor supone
que el factor de fertilidad se encuentra fuertemente reprimi-
do, por lo cual la capacidad del plásmido R para establecer
un apareamiento es muy escasa, dado que estos filamentos pi-
li son muy cortos de tamaño, haciendo inestable el contacto-

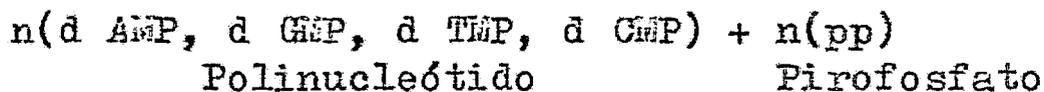
entre las dos bacterias.

3.5.- Enzimas que intervienen en la replicación.

Se han aislado de E coli (82, 40, 75, 57) tres polimerasas de ADN (I, II, III) las cuales catalizan las reacciones siguientes:



Trifosfatos de ribonucleósido



Los procesos de polimerización exigen la presencia del molde iniciador con una extensión de cadena única en la terminación 5'. Este segmento terminal no apareado sirve de molde y, la otra cadena que posee la terminación 3' OH es el iniciador, el cual se une a la doble cadena mediante un enlace fosfo diéster 3' → 5'.

Durante los procesos in vitro, empleando la cadena de ADN como molde, se obtiene una actividad máxima al introducir numerosas muescas en el molde, pero a pesar de que el rendimiento obtenido sea varias veces superior a la cantidad de molde existente, el producto resultante es anormal y da lugar a moléculas ramificadas; en el caso de que el ADN transformante actúe como molde, el producto obtenido carece de actividad biológica.

Las mutantes de E. coli que carecen de la polimerasa I se multiplican normalmente, por lo cual no es una enzima que intervenga principalmente en los procesos de replicación, pero sí en los procesos de reparación.

Las polimerasas II y III están presentes en la célula en cantidades inferiores a la polimerasa I. La ADN polimerasa -- III se supone que interviene en los procesos de replicación, y se ha observado (69, 37) en estudios realizados en bacterias mutantes de E. coli termosensibles, que esta enzima es muy lábil y fácilmente se degrada, al variar la temperatura, lo que no sucede con las polimerasas I y II que son más estables.

3.6.- Enzimas que intervienen en la rotación de la molécula del ADN.

En las células bacterianas, existe un mecanismo por el cual se convierte el ADN cíclico helicoidal en un ADN separado, en fase de relajación, mediante una enzima, la ADN girasa que ha sido estudiada por diversos autores (42, 68, 41, 91, 24). Ellos han descrito la función de la ADN girasa como la responsable de la formación de la hélice en la molécula del ADN en E. coli.

La ADN girasa, es muy sensible a pequeños cambios en la molécula del ADN, habiéndose observado (78), en extractos de ADN, aislados de E. coli una notable reducción en su peso molecular, debido a la acción del ácido nalidíxico.

Dichos autores, reportan la existencia de un locus genético (nal A) en el cual se determina la resistencia al ácido-

nalidíxico, suponiendo así que este es el sitio de acción de dicho antimicrobiano, (44, 88) mediante el control de la actividad de la ADN girasa.

Bourguignon (11) identificó y mapeó dos clases de mutantes resistentes al ácido nalidíxico. La primer mutación ocurre sobre un locus (nal B) a 57 minutos sobre el mapa normal de E. coli siendo responsables de una resistencia para el ácido nalidíxico a bajas concentraciones (10-15 microgramos por mililitro), y caracterizándose por su interferencia con la permeabilidad de la célula hacia dicho antimicrobiano.

La segunda mutación ocurre en otro locus, colocado a 48 minutos del mapa genético (nal A) el cual determina la resistencia para el ácido nalidíxico en altos niveles de concentración (de 30 a 40 microgramos por mililitro), la función de este locus no se ha identificado aún.

Bugino (91) propone que dicho gene nal A codifica la proteína P-nal la cual es necesaria para la actividad del ácido nalidíxico. Observó que las mutaciones efectuadas en este gene confieren alto nivel de resistencia a la bacteria frente al ácido nalidíxico en varios sistemas de replicación del ADN (23, 92) y solo el 1% es sensible a la droga causando una inhibición en los giros de la molécula e induciendo hacia la formación de un complejo formado por la ADN girasa y la molécula del ADN bloqueando la actividad de dicha enzima.

Wright (99, 73) estudió los efectos del ácido nalidíxico, ácido oxolínico y novobiocina, sobre un grupo de enzimas, las ARN sintetetas, y observó que su actividad se inhibe, pero a concentraciones mucho más altas que aquéllas que se nece

nalidíxico, suponiendo así que este es el sitio de acción de dicho antimicrobiano, (44, 88) mediante el control de la actividad de la ADN girasa.

Bourguignon (11) identificó y mapeó dos clases de mutantes resistentes al ácido nalidíxico. La primer mutación ocurre sobre un locus (nal B) a 57 minutos sobre el mapa normal de E. coli siendo responsables de una resistencia para el ácido nalidíxico a bajas concentraciones (10-15 microgramos por mililitro), y caracterizándose por su interferencia con la permeabilidad de la célula hacia dicho antimicrobiano.

La segunda mutación ocurre en otro locus, colocado a 48 minutos del mapa genético (nal A) el cual determina la resistencia para el ácido nalidíxico en altos niveles de concentración (de 30 a 40 microgramos por mililitro), la función de este locus no se ha identificado aún.

Jugino (91) propone que dicho gene nal A codifica la proteína P-nal la cual es necesaria para la actividad del ácido nalidíxico. Observó que las mutaciones efectuadas en este gene confieren alto nivel de resistencia a la bacteria frente al ácido nalidíxico en varios sistemas de replicación del ADN (23, 92) y solo el 1% es sensible a la droga causando una inhibición en los giros de la molécula e induciendo hacia la formación de un complejo formado por la ADN girasa y la molécula del ADN bloqueando la actividad de dicha enzima.

Wright (99, 73) estudió los efectos del ácido nalidíxico, ácido oxolínico y novobiocina, sobre un grupo de enzimas, las ARN sintetasas, y observó que su actividad se inhibe, pero a concentraciones mucho más altas que aquéllas que se nece

sitan para la ADN girasa.

La inhibición competitiva de la glicil y leucil ARN sintetetasas por el ácido nalidíxico, con respecto al ATP es muy poco común, sóloamente se manifiesta cuando la enzima se incubaba con la droga antes de que la reacción se inicie. Este requisito sugiere que el ácido nalidíxico actúa cambiando la conformación o el estado de esas enzimas ADN girasa, ARN sintetetasas, de forma activa a la inactiva ya que ambas reacciones son dependientes de ATP.

El hecho de que el ácido nalidíxico, el ácido oxolínico y la novobiocina, inhiban las reacciones catalizadas por ADN girasa y las ARN sintetetasas, no implica ninguna relación en los mecanismos de acción de estas enzimas.

3.7.- Ligasas de polinucleótidos.

Estas enzimas (81) cuya acción consiste en producir la unión de cadenas de polinucleótidos se encuentra en la totalidad de las células bacterianas. Su papel en la replicación ha sido demostrado mediante mutaciones que eliminan la acción de las ligasas al mismo tiempo.

La ligasa de E. coli da lugar a la reparación de un enlace fosfodiéster en el ADN de cadena única situado entre 3' OH y una terminación 5' P, el cual tiene lugar en tres fases:

- 1.- NADP + Enzima ----- Enzima + ALP + NEN
- 2.- Enzima - AMP + ADN con muescas - Enzima + AMP - AMP con muescas
- 3.- ADN con muescas - AMP ----- AMP + ADN reparado.

Las endonucleasas y exonucleasas también participan en -

la replicación bacteriana.

3.8.- Efectos del ácido nalidíxico sobre las enzimas que intervienen en la replicación del ADN.

Boyle (12) y posteriormente Pedrini (77), examinaron el efecto de la droga por medio de los estudios efectuados in vitro sobre algunas enzimas involucradas en la síntesis del ADN, empleando extractos celulares de cultivos de E. coli. Ellos reportan que no se observó inhibición en la actividad enzimática de cada una de las enzimas probadas.

La mayoría de los agentes quimioterápicos, que inhiben la síntesis de ADN (por ejemplo el mitomicin C) actúan por uno de dos caminos, ya sea ligando la molécula molde del ADN o por inhibición específica de las enzimas involucradas en la formación de los precursores de la molécula del ADN, lo cual no se observa en el mecanismo de acción del ácido nalidíxico.

Estos autores, suponen la presencia de un metabolito activo de la droga, el cual es necesario para la inhibición del ADN en la célula bacteriana, pero en los estudios in vitro no se detectó su presencia.

En E. coli, la formación de los desoxirribonucleótidos proviene principalmente de la reducción de los ribonucleótidos; como se ha demostrado, el ácido nalidíxico no inhibe la síntesis del ARN, por lo tanto la droga no afecta la síntesis de los ribonucleótidos, los cuales son substratos de la ribonucleótido reductasa. Este autor (77) propone otro probable sitio de acción del ácido nalidíxico, el cual puede ser el de formación de los desoxirribonucleósidos- difosfato por la ---

ribonucleótido reductasa, ya que estos desoxirribonucleósidos exógenos al ser añadidos al medio de cultivo en presencia del ácido nalidíxico, inhiben la síntesis del ADN, y ésta no es reversible.

Sin embargo, reportes recientes (17, 56) sobre la degradación de los desoxirribonucleósidos exógenos por E. coli nos informan que estos nucleósidos no están disponibles intracelularmente, por lo tanto este hecho excluye cualquier cambio en la inhibición de la ribonucleótido reductasa.

Aunque estas reacciones no han sido estudiadas profundamente, es probable que contribuyan a la regulación de las bacterias púricas y pirimidínicas en las bacterias y tengan un mecanismo por el cual nucleótidos y desoxirribonucleótidos se intercambien.

Es muy interesante observar, que estas reacciones son muy comunes entre las enterobacterias y son éstas precisamente las bacterias más sensibles al ácido nalidíxico.

;

4.- ACCION ANTIBACTERIANA.

Lishman (63), Barlow (6) y Buchbinder (16), -- fueron los primeros investigadores que estudiaron la actividad antibacteriana del ácido nalidíxico, usado contra bacterias Gram negativas aisladas de pacientes con padecimientos en vías urinarias.

Utilizando la técnica de dilución seriada en tubo, se comprobó que la C.M.I. (concentración mínima inhibitoria) fué de 16 microgramos por mililitro o menos para la mayoría de las bacterias analizadas, a excepción de Pseudomonas sp y Streptococcus faecalis que presentaron una C.M.I. mayor, de hasta 2400 microgramos por mililitro (ver tabla I).

Con el método de difusión en placa se obtuvieron resultados semejantes (16 microgramos por mililitro).

La M.B.C. (mínima concentración bactericida) fué idéntica a la C.M.I. en un 76 % de los microorganismos probados. Se comparó la sensibilidad en 524 clases de bacterias, encontrando que E. coli en un 90 % y Proteus sp en un 81 % muestran una zona de inhibición al ácido nalidíxico mayor que para otros antimicrobianos (observar tabla II).

TABLA # I

DISTRIBUCION DE LA C.M.I. DEL
ACIDO NALIDIXICO POR ESPECIES

		ESPECIES CON SU CORRESPONDIENTE C.M.I. MICROGRAMOS POR MILILITRO									
BACTERIAS	ESPECIES PROBADAS	256	256	128	64	32	16	8	4	2	1
<u>E. coli</u>	114	1		1	1		3	14	40	39	15
<u>Proteus</u> <u>sp.</u>	51			6	3	1	1	5	16	11	8
<u>Ps. pyocyanea</u>	16	12	1	1	1		1				
<u>Klebsiella</u> <u>sp.</u>	13			1				2	2	3	5
<u>Aerobacter</u> <u>sp.</u>	4						2	1		1	
<u>Staph.</u> <u>aureus</u>	30	1		15	13	1					
<u>Strept.</u> <u>faecalis</u>	8	5		3							
TOTAL.-	236										

TABLA # II

DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES SENSIBLES
A LOS DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

BACTERIA	ESPECIES PROBADAS	A.N.	C.	T	S	F
<u>E.coli</u>	416	374	291	158	20	135/ 352
<u>Proteus sp.</u>	64	52	37	1	0	15
<u>Ps. pyocyanea</u>	25	1	0	0	0	0
<u>Klebsiella sp.</u>	3	3	3	3	0	0
<u>Staph.aureus</u>	16	4	12	5	0	0

A.N.- Acido nalidixico.....30 mcg.
C.- Cloramfenicol... ..25 mcg.
T.- Tetraciclina.....25 mcg.
S.- Sulfonida.....200 mcg.
F.- Furazantina.....100 mcg.

La resistencia al ácido nalidíxico se demostró en un 10% para E. coli y en un 19% para Proteus sp., durante el tratamiento con dosis diarias de 4 gramos durante 5 días demostrando así su efectividad en infecciones urinarias. Este autor -- (16) recomienda utilizar un segundo tratamiento después de 20 días del término del primer tratamiento, para evitar así una nueva reinfección.

Los efectos tóxicos reportados en estos pacientes, fueron escasos, no habiéndose administrado a mujeres embarazadas cuando se encontraban en las primeras semanas de gestación, a pesar de no existir en la literatura médica reporte alguno -- sobre efectos teratogénicos.

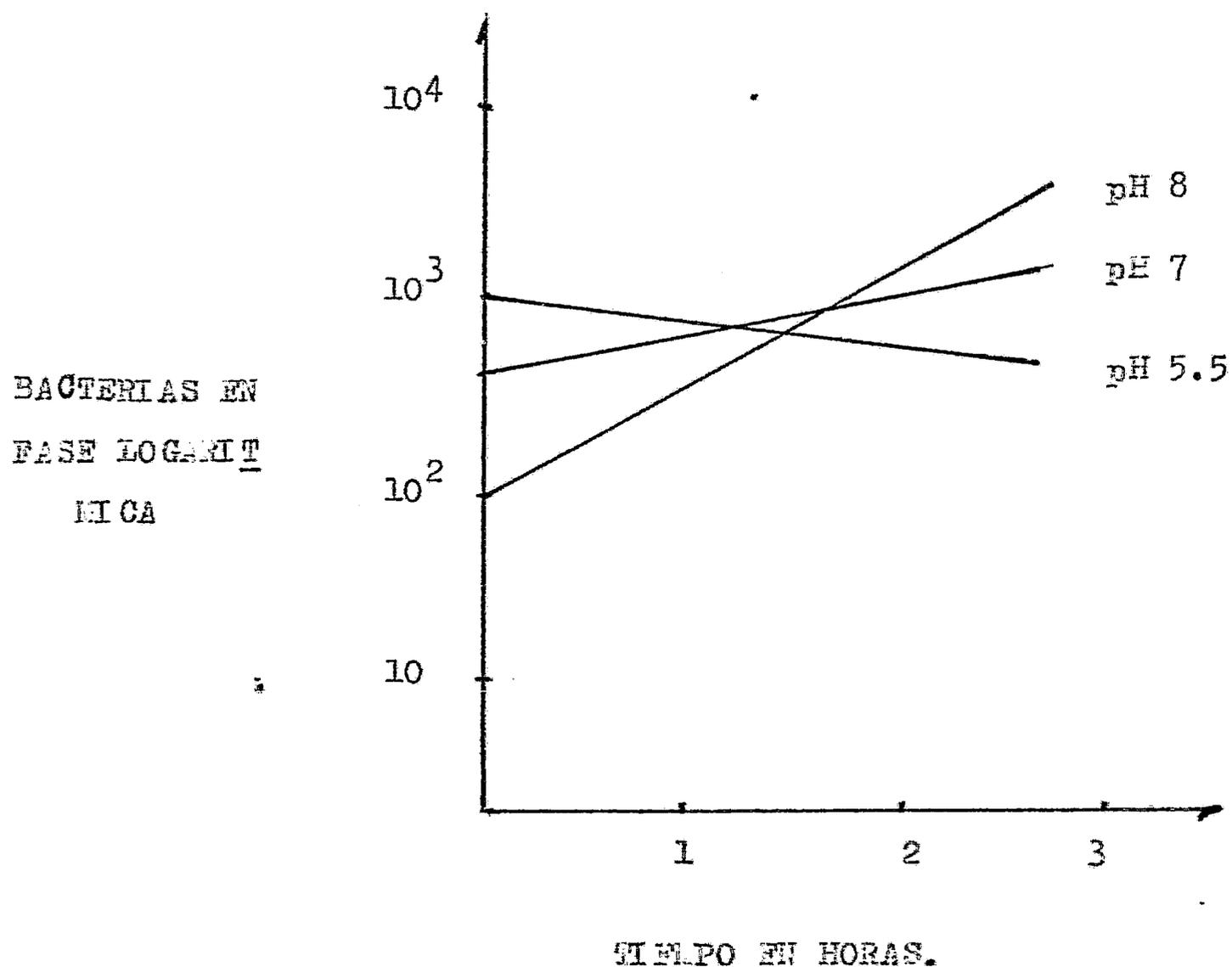
Posteriormente en 1971, varios centros hospitalarios de Inglaterra (15, 87), reportaron resultados de las sensibilidades practicadas en cepas de bacterias aisladas de pacientes -- con infecciones de vías urinarias y que habían recibido tratamiento con ácido nalidíxico. Estos autores reportan que la -- bacteria más frecuente en este tipo de infecciones es E. coli y en segundo lugar Proteus mirabilis y Klebsiella sp., las -- cuales muestran una sensibilidad mayor para el ácido nalidíxico (observar tabla III). Los pacientes tratados con furadantina en infecciones por Proteus mirabilis fracasaron, porque -- esta bacteria alcaliniza la orina, y con este pH, la furadantina tiene poca actividad; pero en cambio, al ser tratadas -- con ácido nalidíxico, el resultado terapéutico fue mejor (ver gráfica II).

Dichos autores (63, 6, 16) concluyen que a pesar del uso

TABLA III.- BACTERIAS AISLADAS SENSIBLES AL
 ACIDO NALIDIXICO 30 MICROGRAMOS / ML.

BACTERIA	ESPECIES PROBADAS	% SENSIBILIDAD
<u>E.coli</u>	1859	99.1
<u>P.mirabilis</u>	436	97.7
<u>Klebsiella- Enterobacter</u>	160	91.9
<u>Pseudomonas sp.</u>	44	0
<u>P.morganii</u>	38	97.4
<u>P.vulgaris</u>	21	95.2
<u>P.rettgeri</u>	8	75.0
Otros coliformes.	44	79.5

Gráfica II.- EFECTOS DE pH SOBRE LA ACTIVIDAD
DE LA FURADANTINA 100 MICROGRAMOS/ML.



La C.M.I. con pH de 5.5 fue de 15 microgramos por ml.

La C.L.I. con pH de 7.0 fue de 50 microgramos por ml.

La U.I.I. con pH de 8.0 fue de 100 microgramos por ml.

extenso de esta droga, los reportes indican que no se ha incrementado la resistencia de las bacterias tratadas con este medicamento, continuando con su gran sensibilidad al ácido nalidíxico.

Burman (19) compara el incremento de resistencia del ácido nalidíxico con otros antimicrobianos (tetraciclina, ampicilina, penicilina) en los cuales ha disminuido su uso por la presencia de los factores de resistencia en las células bacterianas tratadas. En cambio, con el uso del ácido nalidíxico, la frecuencia de bacterias resistentes es relativamente baja (observar tabla IV).

Posteriormente, este autor (19) clasificó 470 bacterias resistentes al tratamiento con el ácido nalidíxico, de acuerdo con su especie (ver tabla V).. En estas bacterias aisladas se probó su capacidad para transferir el factor de resistencia R, observando en los experimentos de conjugación que el número de células receptoras resistentes al ácido nalidíxico, Nal-r, no excedió el número de mutantes donadores Nal-r, conservando su sensibilidad el resto de las células tratadas; la transferencia se realizó a concentraciones de 10 microgramos por mililitro de ácido nalidíxico.

Estas mutantes Nal-r, probablemente llevan el plásmido R pero la resistencia al ácido nalidíxico no fué manifestada quizá por ser de carácter recesivo. De los mecanismos empleados por los plásmidos R, para contrarrestar los efectos de los antimicrobianos, la enzimática es la más común; por ejemplo en el caso del cloramfenicol, los compuestos beta lactámicos

Tabla IV.- INCREMENTO DE RESISTENCIA CON
DIVERSOS ANTIMICROBIANOS.

BACTERIA	ESPECIES PROBADAS	NUMERO Y % DE RESISTENCIA A:								
		AN 32	AM 16	CA 16	CE 16	CL 8	FU 32	ST 10	SU 64	TE 10
		microgramos por mililitro.								
<u>E.coli</u>	%	3	9	6	2	6	3	18	25	11
	233	7	21	13	5	14	8	42	60	25
<u>Klebsiella- Enterobacter</u>	%	19	72	64	24	21	29	27	53	25
	85	15	61	54	20	18	25	23	45	21
<u>Proteus- mirabilis</u>	%	19	24	19	9	6	80	26	40	90
	70	13	17	13	6	4	56	18	28	63
<u>Proteus sp.</u>	%	0	78	0	89	11	44	22	33	56
	9	0	7	0	8	1	4	2	3	5
Otras bact- Gram neg.	%	5	41	5	55	46	27	36	36	27
	22	1	9	1	12	10	6	8	8	6
TOTAL.	%	9	27	19	12	11	23	22	34	28
	419	36	115	81	51	47	99	93	114	120

AN.- Acido nalidixico.

AM.- Ampicilina.

CA.- Carbenicilina.

CE.- Cefalosporinas.

CL.- Cloramfenicol.

FU.- Furadantina.

ST.- Estreptomina.

SU.- Sulfadiazina.

TE.- Tetraciclina.

Tabla V.- CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS GRAM
NEGATIVAS RESISTENTES AL ACIDO NALIDIXICO.

	<u>Klebsiella</u> <u>Enterobac-</u> <u>ter</u>	<u>Proteus</u> <u>mirabi-</u> <u>lis</u>	<u>E.coli</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>sp.</u>	<u>Proteus</u> <u>sp.</u>	<u>Serra-</u> <u>tia sp.</u>
ESPECIES PROBADAS	144	106	104	86	16	14
	30	22	22	18	3	3
	De otros Gram negativos se probaron 13 especies con un 3 % de resistencia.					

cos y aminoglucósidos, pareciera que este factor codifica - proteínas específicas que previenen a la célula bacteriana - de la entrada de dicha droga. Como el ácido nalidíxico es -- una droga sintetizada en el laboratorio, no parece ser inactivada por las proteínas específicas codificadas por el plásmido R.

Las mutantes Hfr al ser expuestas a diferentes concen-- traciones de ácido nalidíxico (50, 64) presentan mutaciones cromosomales, lo que se han demostrado que ocurre en dos --- locus cromosomales Nal-A, (alto nivel de resistencia) y Nal-B (bajo nivel de resistencia) y se le llama también mutante de transporte.

En situaciones diploides, dichas mutantes Nal-A son del tipo recesivo con respecto a la sensibilidad, por lo tanto - los plásmidos que llevan un alelo Nal-A en su cromosoma no - serán capaces de transferir un fenotipo de resistencia a células receptoras sensibles. A este respecto, Burman (19) sugiere, que las enzimas bacterianas capaces de inactivar el -- ácido nalidíxico no son afectadas, ya que el número de bacterias resistentes no se incrementó.

Singh (86), al igual que los autores anteriores, reporta los resultados de 100 pacientes que estuvieron bajo el -- tratamiento con ácido nalidíxico con buenos resultados. (Ver- tabla VI).

En los pacientes con infecciones crónicas, se observa - una disminución en la sensibilidad de bacterias infectantes - debido a que han sido tratadas anteriormente con otros anti- microbianos, sin resultado alguno favorable, originando una-

Tabla VI.- DISTRIBUCION DE LAS BACTERIAS
SENSIBLES A LOS ANTIMICROBIANOS

BACTERIA	ESPECIES PROBADAS	NUMERO Y % SNSIBLE A:					
		AM.	G	F	CL	TR	AN.
<u>E.coli</u>	% 52	38.5 20	86.5 45	92.3 48	94.2 49	44.2 23	98.1 51
<u>K.aeroge nes</u>	% 5	20 1	40 2	60 3	20 1	40 2	80 4
<u>Proteus sp.</u>	% 3		33.3 1	33.3 1			100 3
<u>Staph. aureus</u>	% 1	100 1	100 1				100 1
Total	% 61	36.1 22	78.7 49	83.6 52	83.5 50	40.9 25	96.7 59
		AM.- Ampicilina.		G.- Gentamicina.			
		F.- Furadantina.		CL.-Cloramfenicol.			
		TR.-Tetraciclina.		AN.- Acido nalidixico.			

resistencia a estos medicamentos; pero al ser tratadas con -- ácido nalidíxico estas infecciones mejoran notablemente.

El ácido nalidíxico ha sido utilizado en otro tipo de -- infecciones con muy buenos resultados, por ejemplo, Lascurren (60) reporta la eficacia del medicamento en un 77 %, en el -- tratamiento de enfermedades pélvicas, siendo la bacteria más-frecuentemente aislada E.coli.

Zinzer (100) aplicándolo intravenosamente al 10 % en so- lución sódica con dosis de 15 miligramos por kilo cada 8 ho-- ras en pacientes con enfermedades genitourinarias, controló - en un 70% los casos resistentes de Klebsiella y Aerobacter; - pero en infecciones asociadas con E. coli fué menos del 50 %, siendo ésto probablemente debido a que cerca del 93% del áci- do nalidíxico se liga a las proteínas del plasma disminuyendo su actividad bactericida.

Chitkara (32) al igual que Banerjee (3), reportan al --- ácido nalidíxico como un agente quimioterápico efectivo con-- tra E. coli en 127 de 136 especies probadas, indicando un ---- 97.6% de sensibilidad, Proteus mirabilis en 22 de 26 especies con un 84.6 % de efectividad, Klebsiella pneumoniae en 38 de- 51 especies con un 74.5 % de sensibilidad. Estos autores indi- can que el ácido nalidíxico fué superado solamente por la --- kanamicina; sin embargo, ésta última es ototóxica.

Greenwood (46, 47) estudió también los efectos del ácido nalidíxico sobre E. coli en varias exposiciones a diferentes - concentraciones, encontrando dos tipos de respuesta en pobla- ciones bacterianas de 5×10^7 bacterias/ml.

La primera respuesta consta de tres etapas, siendo la --

primera una curva de crecimiento normal por un corto período de tiempo (el cual fué inversamente proporcional al incremento de la concentración del ácido nalidíxico).

La segunda etapa presenta una caída lenta y prolongada en el índice de crecimiento bacteriano, el cual posteriormente en el período de incubación, presenta la tercera etapa -- que es un incremento en dicho índice igualmente dependiente, e inversamente proporcional a la droga, utilizando una concentración de ácido nalidíxico de 1 a 2 microgramos por milímetro.

La concentración de la droga necesaria para inhibir el crecimiento es variable, por ejemplo:

2 microgramos por mililitro	-----	No afecta el crecimiento.
4 a 8 " " "	-----	Crecimiento ca 5 de 8 exposiciones.
16 " " "	-----	Sólo en dos de 4.
32 " " "	-----	No hay crecimiento.

La C.M.I. es controlada por la capacidad de algunos miembros de la población bacteriana, llamados mutantes, para crecer en condiciones inhibitorias de la droga, mostrando con ello las diversas respuestas para la misma. Es importante hacer notar, que con inóculos menores de 5×10^5 bacterias por mililitro no se observaron estas respuestas, debido a la menor población bacteriana, que dificulta el surgimiento de bacterias mutantes.

En el segundo tipo de respuesta no se observaron desviaciones en la curva de crecimiento hasta la concentración de -

16 microgramos por mililitro de ácido nalidíxico, pero a mayores concentraciones se presenta una suspensión gradual del -- crecimiento notándose un incremento en la resistencia de las bacterias.

Greenwood induce esta resistencia al ácido nalidíxico en unas bacterias mutantes, escogiendo aquéllas que inicialmente mostraron resistencia a bajas concentraciones, aumentando --- gradualmente dicha concentración hasta 64 microgramos por mililitro, obteniendo crecimiento en esta concentración.

La estabilidad de la resistencia desarrollada por estas mutantes es mayor cuantas más resiembras se utilizaron para -- llegar al máximo de concentración de la droga; en estas mutan tes, su velocidad de crecimiento decreció notablemente en relación a las células control. Las diferencias encontradas, -- para inducir resistencia de las bacterias al ácido nalidíxico, reflejan la ineficacia del mismo para actuar en el sitio de -- replicación del ADN en concentraciones de 64 microgramos por mililitro. Ocasionando que a esta concentración, se inhiba la replicación del ADN tanto como el ARN, disminuyendo la acción bactericida de la droga.

Otros autores (7, 25, 46, 47, 90, 98) llegan a la misma conclusión, analizando los estudios del comportamiento de varias especies de bacterias Gram negativas, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones, encontrándose a bajas concentraciones mayor susceptibilidad en la síntesis de ADN, -- con un 60% de inhibición, y un 20% para la síntesis del ARN.

En concentraciones de 50 a 100 microgramos por mililitro se observó el desarrollo de bacterias resistentes a la droga.

Estos autores (7, 25, 46, 47, 90, 98) deducen que el ácido nalidíxico disminuye su efecto bactericida llegando a ser solo bacteriostático.

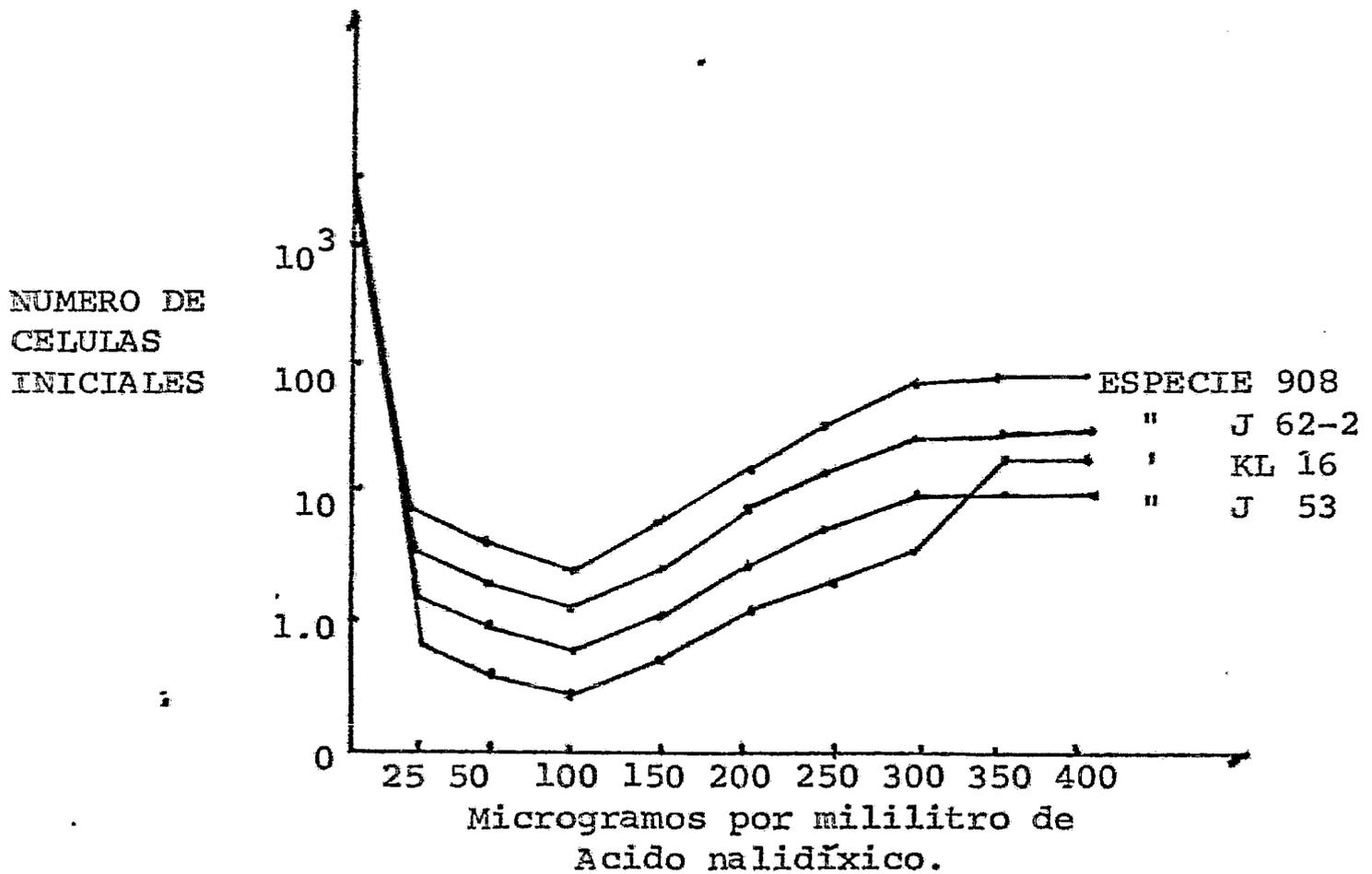
En mutantes sensibles a la temperatura, se estudiaron los efectos del ácido nalidíxico sobre la síntesis del ARN, ADN y proteínas (33). La integridad del ARN y la síntesis de proteínas fué medida después de agregar la droga (100 microgramos por mililitro) y se encontró que la droga inhibe la síntesis del ARN en ausencia de la síntesis del ADN. El porcentaje de inhibición fué comparado con el de la bacteria E. coli, KI-16 en donde la síntesis de ADN fué artificialmente bloqueada.

Este autor deduce que la síntesis de ARN se inhibe, independientemente de la síntesis de ADN. Sin embargo, para investigar la posibilidad de que esta inhibición del ARN resulte de una inhibición primaria de la síntesis de proteínas, se efectuó otro experimento, utilizando la misma mutante sensible a la temperatura de 25^o C, con lo que la síntesis de ADN fué bloqueada; la síntesis de proteínas se inhibió por la adición de 20 microgramos por mililitro de cloramfenicol y aunque se redujo en un 20% la síntesis de ARN, el ácido nalidíxico ejerció solamente un 20% de la inhibición de la síntesis de ARN. Parece ser que el ácido nalidíxico inhibe la síntesis de ARN directamente y no como una consecuencia de la inhibición de ADN. Con estos resultados se deduce que el ácido nalidíxico efectivamente antagoniza su propia acción letal, resultando ser bacteriostático más que bactericida, al ser usadas cantidades excesivas, por lo que es importante en la terapéu-

tica tener cuidado de no alterar la dosis, ya que el desarrollo de bacterias resistentes no se dejará esperar. Ver gráfica III.

Gráfica III.- RESPUESTA DE CUATRO ESPECIES DE BACTERIAS

SENSIBLES AL ACIDO NALIDIXICO



5.- ACCION TERAPEUTICA.

El ácido nalidíxico, es un quimioterápido muy activo en contra de las infecciones causadas por bacterias Gram negativas que se establecen en el tracto urinario ocasionando padecimientos como son cistitis, uretritis, pielonefritis, etc.-

(31)

Se ha utilizado con bastante éxito en las infecciones - del tracto biliar ya que se concentra en gran cantidad en la vesícula biliar, tanto como en el riñón.

También en infecciones intestinales (por Shigella sp y Salmonella sp.) debido a que se elimina en forma activa en un 5% en las heces, siendo ésto muy importante ya que la bacteria penetra en primer término en la circulación, regresando más tarde al intestino y eliminando posteriormente en las heces y en algunas ocasiones en la orina. Por consiguiente, - el ácido nalidíxico actúa simultáneamente en vesícula biliar, riñón e intestino, cualidad que contribuye para tener buenos resultados en infecciones de estos tipos.

Stamey (87) y Lowenfritt (65) valoraron la eficacia del ácido nalidíxico en varios pacientes, formando los grupos siguientes:

- 1.- Pacientes con función renal normal.
- 2.- Pacientes con infección en un riñón.
- 3.- Pacientes con ambos riñones infectados.
- 4.- Pacientes con frecuentes infecciones, en quienes se combinó el ácido nalidíxico con otros antimicrobianos.

- 1.- Pacientes con función renal normal.

Previo al vaciamiento vesical, se administró 1 gramo de ácido nalidíxico cada 6 horas por vía oral, recolectando la orina 4 horas más tarde, así como una muestra sanguínea a las dos horas.

Observando la tabla VII, se ve que las concentraciones de ácido nalidíxico en suero variaron de 21 a 50 microgramos por mililitro, las concentraciones en orina dependieron del flujo renal y rara vez fueron menores de 100 microgramos por mililitro. Cerca del 4 al 7 % fué excretada en la orina como droga libre biológicamente activa.

Los datos encontrados, muestran que a una concentración de 20 microgramos por mililitro, nivel rápidamente alcanzado en plasma, es bactericida para la mayoría de E. coli y un 70% para Klebsiella, Proteus mirabilis y Proteus morgani, ver gráficas IV, V y VI.

El 30% de las bacterias restante, desarrolló resistencia durante el tratamiento, probablemente a consecuencia de un efecto mutagénico en la síntesis de ADN.

2.- Pacientes con infección en un riñón.

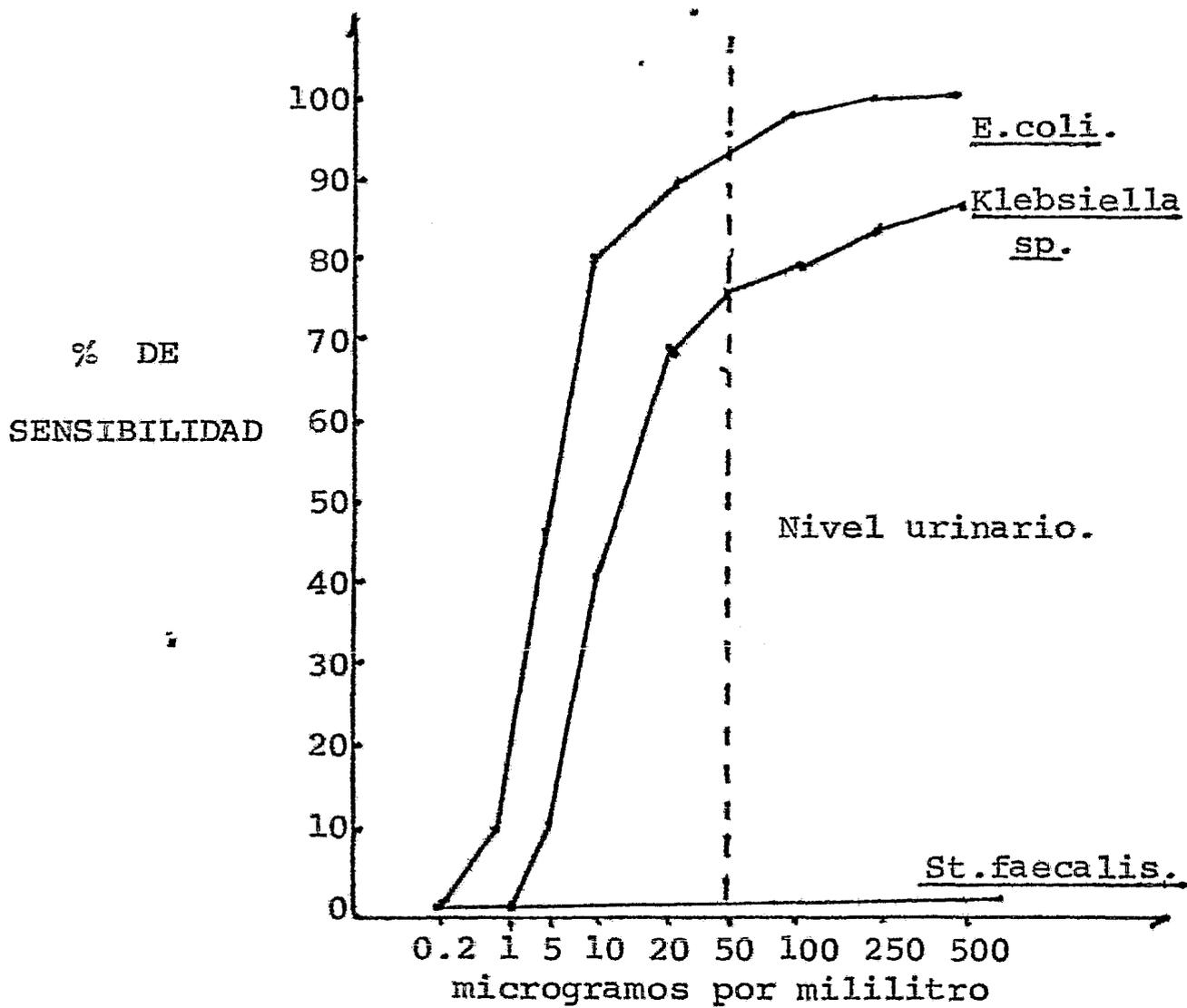
Stamey sugiere que es necesaria una dosis de 500 mg. por vía oral por diez días cada 6 horas para erradicar la infección presente. Se tomaron muestras de orina del riñón infectado después de 12 horas de haber iniciado la terapia, procediéndose a hacer un cultivo siendo los resultados negativos, así como las subsiguientes muestras.

Sin importar la pobre función del riñón infectado, la concentración del ácido nalidíxico en la orina se encontró entre 33 y 56 microgramos por mililitro, concentración sufi-

Tabla VII.- CONCENTRACION DE ACIDO NALIDIXICO
 EN ORINA Y SUERO CON FUNCION RENAL
 NORMAL.

PACIENTES	DOSIS DE A.N.	CREATININA EN ORINA ml/min	FLUJO ORINA ml/min	A.N. en SUERO 2 HRS-DESPUES DE 1 G. mcg/ml.	A N en ORINA 4 HRS. DESPUES DE 1 G.	% DROGA ACTIVA ELIMINADA VIA-RENAL A LAS 4 H.	ELIMINACION DE A.N.en-PLASMA-ml/min.
MASCULINO 28 años .	1 G.	113.8	0.80	34	230	4.4	5.4
FEMENINO 31 años .	1 G.	70.6	2.12	37	86	4.3	4.9
FEMENINO 33 años .	1 G.	74.9	1.77	49.5	172	7.3	6.1
FEMENINO 46 años .	1 G.	93.2	0.92	32	185	4.0	5.3
CON CATETER VESICAL:							
MASCULINO DE 62 años, después de iniciar su tratamiento:							
3' día	1 G.	111.2	4.2	26	105		
4' día	1 G.	111.2	3.4	29	140		
5' día	1 G.	113.2	3.6	24	140		
FEMENINO DE 28 años, después de iniciar su tratamiento:							
3' día	1 G.	135.3	0.8	21	430		
4' día	1 G.	138.7	2.2	26.5	200		
5' día	1 G.	112.9	0.9	50	430		

Gráfica IV.- SENSIBILIDAD AL ACIDO NALIDIXICO.

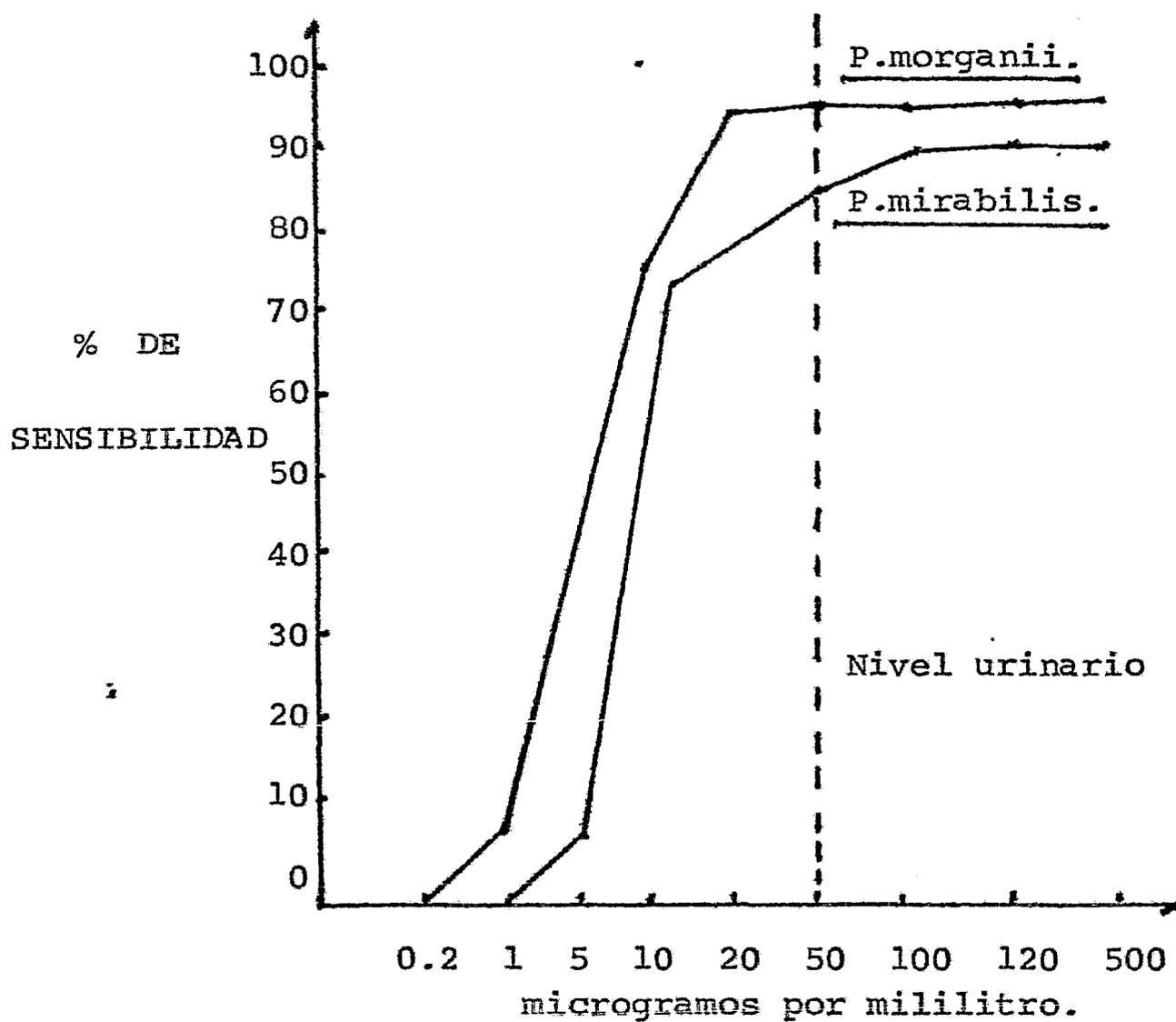


E. coli.- 209 especies.

Klebsiella.- 67 especies.

St. faecalis.- 20 especies.

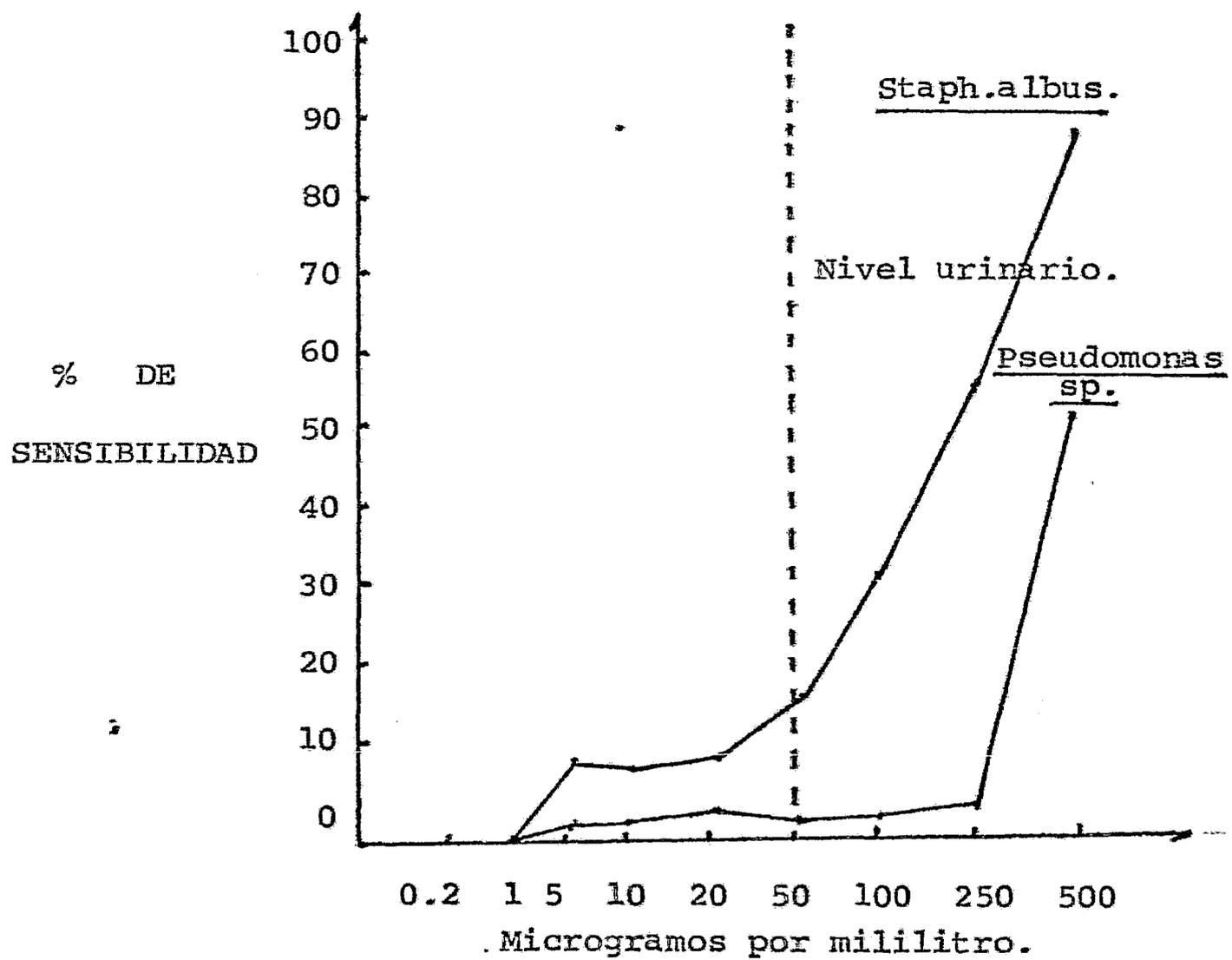
Gráfica V.- SENSIBILIDAD AL ACIDO NALIDIXICO



P.morganii.- 9 especies.

P.mirabilis.- 61 especies.

Gráfica VI.- SENSIBILIDAD AL ACIDO NALIDIXICO.



Pseudomonas sp.-57 especies.

St. albus.- 13 especies.

ciente para ser bactericida.

3.- Pacientes con ambos riñones infectados.

Estos pacientes también recibieron 500 miligramos cada 6 horas por vía oral durante diez días, alcanzando concentraciones en orina de 70 microgramos por mililitro en las primeras 4 horas de haber iniciado el tratamiento. Es importante el hacer notar que el suero no mostró acúmulo de ácido nalidíxico, biológicamente activo, en ninguno de los días de tratamiento. Después de la administración de 3 gramos de ácido nalidíxico, la concentración en suero fué de 56 microgramos por mililitro, pero bajó hasta 50 y posteriormente hasta 34 microgramos por mililitro.

Estos niveles de ácido nalidíxico alcanzados en el suero, son importantes si se considera la C.M.B. de la mayoría de bacterias Gram negativas, la cual es suficiente para acabar con la infección.

4.- Pacientes con frecuentes infecciones, en quienes se utilizó ácido nalidíxico con otros antibióticos.

Stamey (87) junto con otros investigadores (66, 35) han realizado estudios acerca de la actividad del ácido nalidíxico con otros antimicrobianos, sobre diferentes especies de bacterias entéricas, siendo los resultados los expuestos en la tabla VIII.

Brisow (14), también realizó estudios sobre el ácido nalidíxico combinado con otros antimicrobianos, encontrando que el efecto antagónico de esta droga con el cloramfenicol es del 30 % en las especies probadas de Serratia marcescens, supo

TABLA # VIII

EFEECTO EN 95 ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS
DEL ACIDO NALIDIXICO (500 U_g/ml) COMBINADO.

COMBINADO CON:	CONCENTRACION U _g /ml	% SINER-GISMO	% INDI-FER.	% ANTA-GON
Ampicilina	500	2	72	26
Carbencilina	500	1	76	23
Cefalosporina	2000	5	83	12
Estreptomici-na	500	5	80	15
Kanamicina	500	22	63	12
Gentamicina	500	38	52	10
Cloramfenicol	1000	3	41	56
Tetraciclina	200	2	50	48
Colimicina	650	24	64	12
TOTAL		12	64	24

niendo en consecuencia que puede deberse a la acción bacteriostática del cloramfenicol, el cual disminuyó el metabolismo bacteriano interfiriendo con la acción bactericida -- del ácido nalidíxico.

Resumiendo estos trabajos, se indica que la mayoría de -- los agentes antimicrobianos combinados con el ácido nalidí-- xico, producen una acción antagónica frecuentemente y siner-- gismo en menor grado, por esta razón se aconseja estudiar -- in vitro el efecto de cada una de las combinaciones antes -- de ser utilizado en la clínica.

Estos resultados muestran que el ácido nalidíxico, com-- binado con los beta lactámicos, presenta una menor propor-- ción de sinergismo, sólo es del 1 %, principalmente con --- carbencilina. La más baja incidencia de antagonismo, se pre-- sentó con los aminoglucósidos, 10 % principalmente con la -- gentamicina. El porcentaje más alto de sinergismo, se pre-- sentó, con kanamicina y colimicina.

6.- EFECTOS COLATERALES.

La mayoría de los autores (6, 16, 60, 63, 65, 71, 86), están de acuerdo, en que el ácido nalidíxico es bien tolerado por el hombre y que sus efectos secundarios son raros y leves, aún en pacientes que sufren de insuficiencia renal.

Los efectos que se presentan son: náuseas, vómitos, -- erupciones en la piel y escasos pacientes con fotosensibilidad, disturbios en el Sistema Nervioso Central, dolor de -- cabeza, disnea, disturbios en la visión, etc.

Se ha estudiado (83, 70) la posibilidad de que el ácido nalidíxico produjera cambios mutagénicos para E. coli y Salmonella typhi, pero según los resultados de sus estudios, no se afecta el metabolismo de la bacteria cuando la misma es retirada a un medio de cultivo exento de la droga, la -- bacteria permanece con sus funciones vitales sin presentar ningún cambio mutagénico.

Otros autores han reportado cuadros clínicos más severos, Ramabat (80), observó a un niño de 3 años tratado con ácido nalidíxico con dosis de 50 miligramos por kilo cada 6 horas durante dos meses, al cabo de los cuales la infección persistía, por lo cual se cambió el tratamiento por ampici--lina y gentamicina encontrando que la infección no cedía -- aún con la asociación de los mencionados antimicrobianos, -- decidiendo reiniciar el tratamiento nuevamente con ácido -- nalidíxico pero al cabo de tres días de tratamiento el pa--ciente presentó fiebre, cefalea, vómito, e hipertensión in--tracraneal.

Anderson (1), reporta edema y parálisis del VI par ---

craneal, en un niño de 5 años que estuvo con tratamiento -- con ácido nalidíxico, 250 miligramos cada 8 horas durante 6 semanas.

Borcus (9), Fisher (38) y Deonnat (34), reportan hipertensión intracraneal aguda en niños menores de 5 años sometidos a tratamiento con ácido nalidíxico, con dosis menores de 50 miligramos por kilo, durante 6 semanas.

En todos estos casos, al suspender el tratamiento, los síntomas desaparecieron sin llegar a complicaciones más graves.

Bailey (2), basándose en los trabajos de Grumplin (25), propone una dosis reducida de 0.5 gramos tres veces al día en pacientes adultos con enfermedad de vías urinarias, por un período de 8 días, minimizando así los efectos adversos que se puedan presentar. Reporta que un 80 % de sus casos clínicos mejoraron notablemente y el índice de resistencia bacteriana fué casi nulo.

Recientemente Kowalczyk (58), utilizando la técnica de bromo desoxiuridina y microscopio fluorescente (59), reporta los resultados de niños con edades entre los 5 y 12 años los cuales padecían frecuentemente infecciones en vías urinarias, se administró tratamiento con ácido nalidíxico en cada una de ellas por un período no mayor de 10 días con dosis de 1 gramo cada 8 hrs. Pero al observar que la infección reincidía, se decidió aumentar la dosis a 1 gramo cada 6 hrs por 20 días. Al finalizar este tratamiento, se esperaron 3 semanas para restablecimiento de estos pacientes, se tomaron muestras de sangre y un urocultivo el cual se repor

tó negativo. Pero en las muestras de sangre se observaron - alteraciones cromosomales (mutaciones) dentro del linfocito, pero dicho autor (58) no reporta el tipo de cambios dentro del cromosoma.

Debe añadirse que estos niños no fueron tratados con - ninguna otra droga antes de iniciar el tratamiento con ácido nalidíxico.

7.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.

Como se ha podido deducir, en base a los datos reportados en la literatura, el ácido nalidíxico es un medicamento que reúne propiedades terapéuticas suficientes para ser utilizado en infecciones de vías urinarias. A continuación se mencionarán algunas conclusiones:

A).- Se utiliza principalmente en infecciones causadas por bacterias Gram negativas (E. coli, Proteus sp., -- Klebsiella sp., Enterobacter sp.) por lo cual, su uso restringe a estas bacterias.

B).- Los pacientes que han recibido dicho tratamiento, eliminan el medicamento rápidamente a través de la vía urinaria y entérica, inclusive en aquellos pacientes que presentan un daño renal.

C).- Después de veinte años de uso, no se ha incrementado el desarrollo de resistencia en las bacterias presentes en aquellos pacientes que han sido sometidos a tratamiento, probablemente debido a que se encuentra ligado a proteínas específicas del organismo humano interfiriendo en el desarrollo de la resistencia.

D).- Se dedicó un capítulo exclusivamente para genética molecular debido a que el mecanismo de acción del ácido nalidíxico se encuentra en la inhibición de la síntesis -- del ADN de la bacteria.

F).- Al utilizar este medicamento debe de ser en la -- concentración apropiada (1 gramo cada 6 horas) para que -- sus propiedades bactericidas sean conservadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson. E.F., Anderson B. and Nesheld B.S. Childhood complications of nalidixic acid. J.A.M.A. 216: 1023-24 1971.
- 2.- Bailey R.R. Nalidixic acid. J.A.M.A. 237: 2720-21. 1977
- 3.- Banerjee. P.L., AYRA. S.C. Sensitivity patterns of --- gram negative pathogens towards nalidixic acid. Ind. - J. Med. Res. 56: 1638-1641. 1968.
- 4.- Banhoeffer. F. and W. Vielmetter. Conjugational DNA -- transfer in E. coli. Cold Spring Harbor. Symp. Quant.- Biol. 33: 623-627. 1968.
- 5.- Barbour. J.D. Effect of nalidixic acid on conjugal --- transfer and expression of episomal lac genes in ---- E. coli. K-12. J. Mol. Biol. 28: 373-376. 1967.
- 6.- Barlow. A.E. Nalidixic acid in infections of urinary - tract. Brit. Med. J. 2: 1308-1310. 1963.
- 7.- Bauernfeind A., Grummer G. Biochemical effects of nali dixic acid on E. coli. Chemother. 10: 95-101. 1966.
- 8.- Blinkova. A.A., SE. Bresler and V.A. Lanzov. DNA syn-- thesis and chromosome transfer in E. coli. K-12 Z. --- Verer Bungel. 96: 267-274. 1965.
- 9.- Boreus. K.O., Smedstrom. L. Intracranial hipertension- in a child during treatment with nalidixic acid. Brit. Med. J. 2: 744-745. 1967.
- 10.- Bouck N. S., A. Adelberg. Mechanism of action of a --- nalidixic acid on conjugation bacteria. J. Bacteriol.- 102: 688-701. 1970.

- 11.- Bourguignon G.J., Levitt. M. Studies on the mechanism of action of nalidixic acid. Antimicrob. Agents. Chemother. 4: 479-486. 1973.
- 12.- Boyle J.V., T.M. Cook and W.A. Goss. Mechanism of action of nalidixic acid on E.coli. VI. Cell Free Studies. J. Bacteriol. 97: 230-236. 1969.
- 13.- Bresler. S.E., V.A. Landov and H.A. Lukjanie Blinkova- On the mechanism of conjugation in E.coli, K-12. Mol.-Gen. Genet. 102: 269-284. 1968.
- 14.- Brisou. J. and F. Davis. Comportement de Serratia sp. d'origine hospitaliere in presence de quelques associations d'antibiotiques. Pathol. Biol. 19: 655-660. - 1973.
- 15.- Brumfiel E. and Pursell. R. Observations on bacterial sensitivities to nalidixic acid and critical comments on the G. Centre survey. Postgrad. Med. Suppl. 47: 7-18.- 1971.
- 16.- Buchbinder. M. Webb. J.C. Anderson L.V. and McCabe -- Wr. Laboratory studies and clinical pharmacology of -- nalidixic acid. Antimicrob. Agents. Chemother. 308: -- 250-254. 1962.
- 17.- Buñman D.R. and A.B. Pardee. Thymidine and thymine incorporation in deoxyribonucleic acid, inhibition and repression by uridine of thymidine phosphorylase of -- E.coli. J. Bacteriol. 94: 1546-50. 1976.
- 18.- Burman G.I.R. Plasmid transfer and its responses to -- nalidixic acid. J. Bacteriol. 131: 76-81. 1977.

- 19.- Burman L.G. Apparent abascense to nalidixic acid in -- pathogenic gram negative bacteria. J. Anti microb. --- Chemother. 3: 508-516. 1977.
- 20.- Buttin G. and M. Wright. Enzimatic DNA degradation in- E.coli, its relationship to synthetic processes at the chromosome levels. Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. - Biol. 33: 259-269. 1968.
- 21.- Cohen A., W.D. Fisher, R. Curtiss and H.I. Adler. The- properties of DNA transfered to minicells during con- jugation. Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol. 33: 635-641. 1968.
- 22.- Cook. T., M. Deitz and N.A. Goss. Mechanism of action- of nalidixic acid on E.coli. I.V. effects on the esta- bility of cellular constituents. J. Bacteriol. 91: --- 774-779. 1966.
- 23.- Cozzarelli M.R. The mechanism of action of inhibitors- of DNA synthesis. Annu. Rev. Biochem. 46: 641-668. 1977.
- 24.- Cozzarelli M.C. DNA girase and the supercoiling of DNA. Science. 207 (4434) 953-60. 1980.
- 25.- Crumplin. G.C. and Smith J.T. Nalidixic acid, an anti- bacterial paradox. Antimicrob. Agents. Chemother. 8: - 251-261. 1975.
- 26.- Crumplin. G.C. and J.T. Smith. Nalidixic acid and bac- terial chromosome replication. Nature (London) 260: -- 643-645. 1976.
- 27.- Crumplin. G.C. The effect of R factor plasmids on host cells responses to nalidixic acid. J. Antimicrob, Che- mother. 7 (4) 379-388. 1981.

- 28.- Curtiss. R. Bacterial conjugation. Annu. Rev. Micro---
biol. 23: 69-136. 1969.
- 29.- Cuzin. E., G. Buttin and F. Jacob. On the mechanism of
genet transfer during conjugation of E.coli. J. Cell -
Physiol. 70 (Suppl) 77-88. 1967.
- 30.- Czinn. S.J., Speck. W.T. and Rosenkranz H.S. Abnorma--
lities in the development of the american sea urchin -
induced by nalidixic acid. Mutat. Res. 91: 119-121. --
1981.
- 31.- Chamfenil R. and H. Curcier. Study of nalidixic acid -
activity on 3186 strains of gram negative bacilli. ---
Application to the treatment of urinary infections. --
Press. Med. 77: 1763-64. 1969.
- 32.- Chitkara Y.K. In vitro positivity pattern of gram nega
tive pathogens to nalidixic acid. Ind. J. Path. Bact.-
35: 162-166. 1969.
- 33.- Deitz W.H., T.E. Cook. and W.A. Goss. Mechanism of ac-
tion of nalidixic acid on E.coli. Conditions required-
for lethality. J. Bacteriol. 91: 768-773. 1966.
- 34.- Deonnat T. and Guignard J.P. Acute Intracranial hiper-
tension after nalidixic administration. Arch. Dis. ---
Child. 49: 743. 1974.
- 35.- Dominici A. and C. Pedrini. Interaction betwen nalidi-
xic acid and some antibacterial substances. Antibiot.-
5: 212-223. 1967.
- 36.- Falkow. S., L.S. Tomkins, R.R. Silver., P. Guerry and-
D.J. Leblanc. The replication of R - factor DNA in ---
E.coli following conjugation. Ann. N.Y. Acad. Scie. --
182: 153-171. 1971.

- 37.- Fenwick. R.G. Jr. and R. Curtiss III. Conjugal deoxy-
rribonucleic acid replication by E.coli K-12. J. Bac-
teriol. 116: 1236-1246. 1973.
- 38.- Fisher. O.D. Nalidixic acid and intracranial hipertension. Brit. Med. J. 3: 370-371. 1967.
- 39.- Fisher. K.W. and M.B. Fisher. Nalidixic acid inhibition of DNA transfer in E.coli K-12. Cold. Spring. - Harbor. Symp. Quant. Biol. 33: 629-633. 1968.
- 40.- Cofter. M., Y. Hirota., T. Kornberg, J. Wechsler and-
C. Barnoux. Analysis of DNA polymerases II and III in mutants of E.coli thermosensitive for DNA synthesis - Proc. Nat Acad. Sci. USA. 68: 3150-53. 1971.
- 41.- Geller. E., Mizuuchi K., Odea E. et al. DNA girasa an enzyme that induces superhelical turns into DNA. Proct. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 3871-3876. 1976.
- 42.- Geliart M., Mizuuchi K., Odea E., Itoh I. Nalidixic - acid resistance. A second genetic character involued ; in DNA girase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 73: 3872-3876. 1976.
- 43.- Goss W.A., WH. Deitz and T.M. Cook. Mechanism of ac--- tion of nalidixic acid on E.coli. Inhibition of deoxy- rribonucleic acid synthesis. J. Bacteriol. 89: 1068-1070. 1965.
- 44.- Goss. N.A., Cook. T.M. In antibiotics. Vol. III Mecha- nism of action of antimicrobial an antitumor agents. - Ed. Corcoran. J.W.I. Han F.F. (Springer Verlag New -- York). 174-196. 1975.

- 45.- Goulian M. Biosynthesis of DNA. Annu. Rev. Biochem. 40: 855-898. 1971.
- 46.- Greenwood D.O., Grady F. The response of E. coli -- tonalidixic acid. Chemother. 24: 249-258. 1978.
- 47.- Greenwood. D.O., Grady F. Factors governing the --- emergence of resistance to nalidixic acid in treat- ment of urinary tract infection. Antimicrob. Agents. Chemother. 12: 678-681. 1977.
- 48.- Gross J.D. and L. Caro. Genetic transfer in bacte-- rial conjugational. J. Mol. Biol. 16: 269-284. 1965.
- 49.- Hanawalt P. and J. Brempelis. Selective degradation of newly replicated DNA after inhibition of DNA syn- thesis in E.coli. Abst 7th. Congr. Biochem Tokyo. - p. 650. 1967.
- 50.- Hans E.W. and T.H. Wood. E.coli K-12 mutants resistant to nalidixic acid genetic mapping and dominance --- studies. J. Bacteriol. 99: 238-241. 1969.
- 51.- Hans E.W. Some effects of nalidixic acid on conjuga- tion in E.coli. K-12. J. Bacteriol. 105: 46-56. 1971.
- 52.- Hollom S. and RH. Pritchard. Effect of inhibition - of DNA synthesis on mating in E.coli. K-12. Genet - Res. 6: 479-483. 1965.
- 53.- Hundt H.K. Thin layer chromatographyc method for -- the quantitative analysis of nalidixic acid in hu-- man plasma J. Chromatog. 223 (1): 165-172. 1981.
- 54.- Ihler G. and H.D. Rupp. Strand specific transfer of donor DNA during conjugation in E.coli. Proc. Nat.- Sci. USA. 53: 138-143. 1969.

- 55.- Jacob E., S. Brenner and F. Cuzin. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-348. 1963.
- 56.- Kammen H.D. Thymine metabolism in E.coli. A factors-involved in utilization of exogenous thymine. Biochem. Biophys. Act. 134: 301-311. 1967.
- 57.- Knippers R. DNA polimerasa II. Nature (London) 228: 1050-53. 1970.
- 58.- Kowalezy J. Sister chromatid exchanger in children treated with nalidixic acid. Mutat. Res. 77: 371-375. 1980.
- 59.- Lambert B, K. Hansson, J. Lindstein, E. Sten and B. Werelius. Bromodeoxiuridina induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Hredit. 83: 163-174. 1976.
- 60.- Lascurin and cols. Uso del áxico nalidíxico en algunos procesos infecciosos pélvicos. Ginec. Obstet. -- : Mex. 34: 287-295. 1973.
- 61.- Lawn A.M., E. Meynell, G.G. Meynell and N. Datta. -- Sex pili and the classification of sex factors in -- the enterobacteriaceae. Nature. (London) 216: ----- 343-346. 1967.
- 62.- Leshner G.Y., E.J. Froelich, H.D. Gruett, J.H. Bailey and R.P. Brundage. 1.6 Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic. J. Med. Pharm. Chem.- 5: 1063-1065. 1962.
- 63.- Lishman I.V. and J. Swinney. Studies of a new anti-bacterial agent. Nalidíxic acid. Brit. J. Url. 25: - 116-121. (Win, 18,320) 1963.

- 64.- Lloyd R.G. Loss of HFr. from E.coli merozingotes during inhibition of conjugation by nalidixic acid. Genet. -- Res. 36 (1): 69-79. 1980.
- 65.- Lowentritt L.L., Schlegel J.V. Treatment of bacteriu-- ria in patients with impaired renal function. J. Urol. 102: 473-478. 1969.
- 66.- Luboshitzky J.M. and T. Sacks. Bactericidal effect of combinations of nalidixic acid and various antibiotics on enterobacteriaceae. Antimicrob. Agent. Chemother. - 4: 201-204. 1973.
- 67.- Maaloe O. The control of normal DNA replication in bac- teria. Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 26: --- 45-52. 1961.
- 68.- Marians K.I., Ikedaj., Schlayman. Role of DNA girasa - in phi X replicative form replication in vitro. Proc - Natl. Acad. Sci. USA. 74: (75) 1965-1968. 1977.
- 69.- Marinus MG. and FA. Adelberg. Vegetative replication - of deoxyribonucleic acid in temperature sensitive --- mutants of E.coli. K-12. J. Bacteriol. 104: 1266-1272. 1970.
- 70.- Mc. Coy E., Petrullo L.A., Rosenkraus. A.S. Non muta-- genic gentoxicants, novobiocin and nalidixic acid 2 -- inhibitors of DNA gyrase. Mutat. Res. 79: 33-43. 1980.
- 71.- Mc. Chesney, F.W., Froelich. E.J., Leshner, G.Y. et al- Absorption, excretion and metabolism of a new antibac- terial agent, nalidixic acid. Toxic. Appl. Pharmacol - 6: 292- 1964.

- 72.- Mc. Daniel L.G. Rogers L.H. and Hill H.F. Survival of recombination deficient mutants of E.coli during incubation with nalidixic acid. J. Bacteriol. 134: ----- 1195-1198. 1978.
- 73.- Nakayama K. et al. Novobiocin and nalidixic acid ---- target proteins in yeast. Biochem. Biophys. Res. Comm. 96: (1) 306-312. 1980.
- 74.- Nishimura J.M., Ishibashi, E. Waynell and Y Hirota -- Specific piliation directed by a fertility factor and a resistance factor of E.coli. J.Gen. Microbiol. 49:- 89-98. 1967.
- 75.- Nusslein V., B. Otto, F. Bonhoeffer and H. Schaller - Function of DNA polimerase III in DNA replication Nature. Mol. Biol. 234: 285-6. 1971.
- 76.- OU. S. and Anderson T.F. Role of pili in bacterial -- conjugation. J. Bacteriol. 102: 648-54. 1970.
- 77.- Pedrini. M.A., Geroldi. D. Sicardi A. Falashi A. Studies on the mode of action of nalidixic acid Eur. J.- Biochem. 25: 359-365. 1972.
- 78.- Pisetsky. D., Berkower, I., Wickmer R. and I. Hurwitz Role of ATP in DNA synthesis in E.coli. J. Mol. Biol. 71: 557-571. 1972.
- 79.- Ramareddy. G. Reiter H. Specific loss of newly replicated deoxyribonucleic acid in nalidixic acid treated Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 100: (2): 724-729. - 1969.
- 80.- Ramavat L.G. Nalidixic acid toxicity. Ind. Ped. 13:325. 1980.

- 81.- Reichard P. The biosynthesis of deoxyribonucleotids. Eur. J. Biochem. 3: 259-266. 1968.
- 82.- Richardson G.C., C.L. Schildkrant. H.V. et al. Studies on the replication of DNA by E.Coli polymerase - p. 15-26. In: H.J. Vogel. Bryson and J.O. Lampen --- (ed) Informational macromolecules. Academic Press Inc. New York. 1963.
- 83.- Rosenkranz H.S. and L.A. Poirier. An evaluation of -- the mutagenicity in microbial systems of carcinogens- and non carcinogens. J. Natl. Cancer. Inst. 62: ----- 873-892.
- 84.- Rupp. W.D., G. Ihler. Strand selection during bacte-- rial mating. Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol. 33: 647-650. 1968.
- 85.- Schaller H., B. Otto, V. Nusslein, J. Huf, R. Herman- and Banhoeffer. Deoxyribonucleic acid replication in vitro. J. Mol. Biol. 63: 183-200. 1972.
- 86.- Singh S.N. et al. Nalidixic acid against urinary tract pathogens. J. Ind. M.A. 73: 151-154. 1979.
- 87.- Stamey T.A. The clinical aspects of urinary tract in- fections. Observations on the clinical use of nalidi- xic acid. Postgrad. Med. J. (suppl) 47: 21-38. 1971.
- 88.- Staundenbauer W.L. Replication of E.coli. DNA in vi--- tro. Inhibition by oxolinic acid. Eur. J. Biochem. 62:- 491-497. 1976.
- 89.- Staundenbauer W. Replication of small plasmids in --- extracts of E.coli. Mol. Gen. Genet. 145 (3) 273-280. 1979.

- 90.- Stevens P.J. Bactericidal effect against E.coli. of nalidixic acid and four structurally related -- compounds. J. Antimicrob, Chemother. 6 (4) 535-42. 1980.
- 91.- Sugino A., Peebles C.L., Kreuser K.N., Cozzarelli - N.R. Mechanism of action of nalidixic acid: Purifi- cation of E.coli. Nal A. gene product and its rela- tionship to DNA gyrase and a novel nicking close -- enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 4767-4771.- 1977.
- 92.- Sumida, Yasumoto, C. Yudelevich A. DNA synthesis -- in vitro dependent upon phi X 174. Replicative form I DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 1887-1891. - 1976.
- 93.- Vapneck. D.M. Lipman and W.D. Rupp. Physical proper- ties and mechanism of transfer of R factors in ---- E.coli. J. Bacteriol. 108: 508-514. 1971.
- 94.- Vielmetter R.W.F., Banhoeffer and Schutte. Genetic- evidence for transfer of a single DNA strand during bacteriol conjugation. J. Mol. Biol. 37: 81-86. --- 1968.
- 95.- Ward M.C. Quaid. J.F., N.C. Jickfinski M.D., R. --- Macis and Rosi D. Nalidixic acid in urinary infec- tions. Brit. Med. J. 2: 1311-12. 1963.
- 96.- Watson. J.D. New York. Molecular Biology of the gene. 1970.

- 97.- Wechsler J. and J. Gross. E.coli mutants temperature - sensitive for DNA synthesis. Mol. Gen. Genet. 113: --- 273-284. 1971.
- 98.- Winshell E.B. and Smith J.T. Nalidixic acid and the -- metabolism of E.coli. J. Bacteriol. 104: 1168-75. 1970.
- 99.- Wright H.T., Nurse K.C., Golsdtein D.J. Nalidixic acid, oxolinic acid and novobiocin inhibit yeast glycyl and - leucyl transfer RNA synthesis. Science 213: (4606) ---- 455-456.
- 100.- Zinzer. H., Doenecke A. Intravenous nalidixic acid in - urogenital sepsis. J. Urol. 103: 476-79. 1970.