

EFFECTO DE LA METENAMINA SOBRE EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA

Alejandro Divo y Gladys Benavides*

RESUMEN

Se sometió a pruebas, *in vivo* e *in vitro*, el posible efecto antivírico de la metenamina (urotropina), para el agente de la encefalitis equina venezolana. Los ensayos realizados con miras al aprovechamiento terapéutico, derivados de apreciaciones favorables habidas en la práctica veterinaria de campo, mostraron que esta substancia no ejerce acción alguna sobre el citado virus.

INTRODUCCION

Durante las ondas epizoóticas de la encéfalomielitis equina ocurridas entre 1938 y 1943, se impuso la aplicación terapéutica por vía venosa de la metenamina (urotropina), sola o combinada con trementina, y cuyos efectos fueron considerados como satisfactorios en trabajos publicados en esos años (2,3,9). Gallo y Vogelsang (3) escribieron: "La urotropina del 20 al 40% en dosis endovenosa de 50 ml, dió un 60% de curación en la forma adinámica; y solo el 20% en la dinámica". En cuanto a la trementina, en cantidad de 10 a 20 ml para equinos, fue apreciada con magníficos resultados a pesar del terrible efecto inmediato resultante de su aplicación (12).

Hoy, acentuada en el campo investigativo la búsqueda de substancias quimioterápicas con efecto antivírico, era sin duda alguna un paso obligado actualizar de manera racional las apreciaciones habidas con la metenamina. Por eso, no dudamos en contribuir en este sentido, a nivel de laboratorio, con ensayos *in vivo* e *in vitro* que permitieran aclarar el probable efecto de dicha substancia sobre el virus de la encefalitis equina venezolana.

* Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

MATERIAL Y METODO

Virus: de la encefalitis equina venezolana (EEV) "V-1938" (7), originado de material cerebral de ratón y titulado a 100 DL₅₀ (dosis letal media) por vía subcutánea para el ratón en las pruebas *in vivo* o procedente de cultivo celular, y también titulado a 100 DTC₅₀ (dosis infectiva media para cultivo de tejidos) en 0,1 ml, utilizado en los ensayos *in vitro*.

Soluciones de metenamina: preparadas con producto Merck p. anal. en los medios nutritivos correspondientes a las células empleadas *in vitro* y en concentraciones varias desde 0,1% hasta el 5%, o en agua destilada pH 6,2 para las pruebas de acción directa e inoculación animal, en concentraciones del 1% al 40% y del 1% al 20% respectivamente.

Medios hísticos: células primarias de embrión de pollo y células BHK-21 (clono 13).

Animales de experimentación: ratones blancos de 21 días de nacidos.

Técnica *in vitro*: antes de iniciar las pruebas a la acción de la metenamina, se realizaron determinaciones sobre la más alta concentración del producto que las células podían soportar, añadiéndolo al medio líquido o al agar nutritivo, como también con discos de papel de filtro que se colocaban sobre el agar de cubierta. Estos ensayos nos mostraron que sólo se podía trabajar con diluciones hasta de 0,5% para las células BHK-21 y 0,4% para fibroplastos de embrión de pollo.

Grupos de frascos de plástico de 30 ml con los cultivos celulares fueron inoculados con 100 DTC₅₀, y luego de lavados los virus no absorbidos después de 90 minutos a 37°C, les eran añadidos los medios nutritivos, líquido o solidificado con agar, adicionados con metenamina. Las observaciones microscópicas se realizaban cada 12 horas para comprobar la presencia de cambios citopáticos. Después de cada período se congelaban 2 ó 3 frascos con medio líquido, tanto de prueba como testigos, para efectuar con ellos titulación vírica comparativa.

Técnica *in vivo*: se realizaron dos tipos de ensayo, uno sometiendo el virus a la actividad directa de la metenamina antes de administrarlo a los animales, y otro, inyectando el virus a ratones y tratándolos diariamente con las soluciones de metenamina.

En el ensayo para la acción directa, se colocaba en tubo igual cantidad de la suspensión vírica titulada a 100 DL₅₀ en 0,1 ml por vía subcutánea (vsc) para ratones de 21 días y de la solución de metenamina, que variaba desde 1% al 40%, para concentraciones finales desde el 0,5% hasta el 20%.

Transcurridas 1 hora a temperatura ambiente, y 12 y 24 horas en nevera, se inocularon las mezclas a grupos de 10 ratones por vsc en la cantidad de 0,2 ml. Se tomaron estos tiempos en base a la concentración hemática y períodos de eliminación del producto. En cuanto al ensayo de la actividad de la metenamina en animales infectados, se condujo de la siguiente manera: grupos de 12 animales fueron inoculados vsc con 0,1 ml de suspensión vírica contentiva de 100 DL₅₀, y a partir del siguiente día se les inyectaba la solución de metenamina, también vsc, en cantidad de 0,2 ml.

RESULTADOS

Prueba in vitro: las titulaciones víricas realizadas tanto de los frascos de prueba como testigos, mostraron que las citadas concentraciones de metenamina no ejercían efecto alguno sobre la duplicación vírica, puesto que los títulos comparados resultaban equivalentes.

Prueba in vivo: no pudo apreciarse ni total ni parcial inactivación del virus por acción directa de metenamina, por cuanto los ratones morían entre el 3° y 4° día como el grupo control (Cuadro I). Tampoco se detectó actividad de la metenamina en los ratones infectados, ya que los grupos para las diferentes soluciones sucumbieron al igual que el grupo testigo, por no reducir en absoluto la capacidad infectiva del microorganismo (Cuadro II).

CUADRO I

PRUEBA DE ACCION DIRECTA DE LA METENAMINA SOBRE EL VIRUS DE LA EEV, SEGUIDA DE INOCULACION EN RATONES.

| TIEMPO MEZCLA | SOLUCIONES DE METENAMINA | | | | | CONTROL VIRUS |
|------------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|------------------|
| | 1% | 5% | 10% | 20% | 40% | |
| 1 hora | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d |
| 12 horas | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d |
| 24 horas | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d |

* = muerte; d = días.

CUADRO II

PRUEBA DE ACCION DE LA METENAMINA EN ANIMALES INFECTADOS CON VIRUS DE LA EEV.

| GRUPOS ANIMALES | SOLUCIONES DE METENAMINA | | | | | CONTROL |
|--|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 1% | 2% | 5% | 10% | 20% | VIRUS |
| Inoculados con 100 DL ₅₀ | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d | * 3-4 d |
| Control Sol. Metenamína | N | N | N | N | N | — |

* = muerte; d = días; N = normales.

Es de notar, que este último ensayo se repitió con aplicación de la solución de metenamína por dos veces diarias a los animales, no obteniendo diferencia alguna a la anterior prueba. También se hizo empleando 10 DL₅₀, sin resultado aparente.

DISCUSION

La búsqueda de substancias quimioterápicas con efecto viroestático o viricida, ha sido siempre de general interés para la profilaxia y el combate de las afecciones virales; pero a pesar de los grandes esfuerzos investigativos realizados, solo unas pocas son señaladas con limitada acción contra estos agentes y han tenido aplicación clínica, tales como la amantadina (1-amino adamantano) para el virus influenzal A₂, la metisazona (1-metilistatin β-tiosemicarbarzona) para los virus variólico y vacuna, y la idoxuridina (5-yodo-2-desoxiuridina) y la citarabina (1-β-D arabinofuranosilcitosina) para el virus del herpes simple (1,5,11,13). Con este deseo, trajimos a proceso investigativo la metenamína (hexametilentetramina, urotropina), la cual había ganado, durante el curso de varias epizootias ocurridas en Venezuela hace muchos años, la aceptación por sus efectos curativos en animales, al parecer con formas leves de la enfermedad. No fue posible hallar los porcentajes de mortalidad en ganado caballar, mular y asnal, en la numerosa bibliografía nacional, para así conocer con cierta precisión las recuperaciones naturales en casos leves y severos, y poder compararlos a las cifras citadas para los tratados con ambas condiciones. Hubiésemos

deseado empezar nuestra investigación en el campo durante un brote, pero al no ser posible, recurrimos exclusivamente a ensayos en el laboratorio.

La acción de la metenamina radica en el formaldehído liberado, hecho que ocurre en medio ácido, siendo poco manifiesta en pH neutro y nula en pH alcalino; por ello se establece en terapéutica, que la metenamina circula sin cambio alguno en el organismo y solo ejerce su acción antiséptica a nivel vesical cuando el pH de la orina es ácido (8). Aparece también citada para uso veterinario en la forma nerviosa del moquillo canino (encefalitis viral), con aplicación parenteral, subcutánea o endovenosa, en dosis de 1 a 2 grs diarios (10). Quizás esto indujo a su empleo en la encéfalomielitis equina, aunque es difícil aquí precisarlo, así como su modo de acción en esta nosología.

El formaldehído se ha venido empleando satisfactoriamente en el país, como inactivador vírico en concentración de 1:625 durante 48 horas a 37°C, para la producción de la vacuna anti-encefáltica de aplicación animal y elaborada con embriones de pollo. Gallo y Ríos (4), probaron con solución al 0,5% en formol y emulsión de cerebro de cobayo al 1% durante una hora, sin detectar efecto alguno para el virus de la encefalitis equina en este breve tiempo.

Nuestros ensayos probaron el nulo efecto de la metenamina, tanto *in vitro* como *in vivo*, y en especial en estos últimos, para llevarnos a estimar que las apreciaciones originales sobre el valor terapéutico de la urotropina no son del todo reales, sino que posiblemente los animales tratados y "curados", pertenecían al porcentaje de los naturalmente recuperables sin necesidad de tratamiento alguno. Mencionamos antes la falta de información estadística en cuanto a la morbilidad y mortalidad durante las diferentes epizootias ocurridas en el país, la cual hubiese sido de significativo interés para valorar las apreciaciones que se hicieron en el campo, en cuanto a la recuperación de animales inyectados con la metenamina.

Effect of methenamine on the Venezuelan equine encephalitis virus

Divo A. and Benavides G. (Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela). *Invest Clín* 13 (3): 142-148, 1972.- "In vivo" and "in vitro" studies with methenamine were performed to test its possible effect against the Venezuelan equine encephalitis virus. Previous field observations in veterinary practice, claimed therapeutic value of the drug in sick animals. Our results, showed no action of the methenamine on this virus.

AGRADECIMIENTO

Apreciamos la ayuda prestada por el Auxiliar de Laboratorio Sr. Andrés Laya, en la realización de las pruebas con animales de experimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BAUER DJ: Clinical experiences with antiviral drug MARBORAN (1-metilisatin β -thiosemicarbasone). *Ann NY Acad Sci* 130: 110-117, 1965.
- 2- DE ARMAS J: Observaciones sobre la peste loca o encéfalomiелitis equina en el Edo. Guárico. *Rev Pecuaria Caracas* 1: 18-23, 1938.
- 3- GALLO P, VOGELSANG EG: Resumen de los conocimientos actuales acerca de la encéfalomiелitis equina en Venezuela. *Rev Med Vet y Paras Caracas* 2: 143-148, 1940.
- 4- GALLO P, RIOS FA: Estudios experimentales sobre el virus de la encéfalomiелitis equina en Venezuela. *Rev Med Vet y Paras Caracas* 5: 63-68, 1946.
- 5- JAWETZ E, SCHULTZ R, COLEMAN V, OKUMOTO M: Studies on herpes simplex. XI. The antiviral dynamics of 5-iodo-2-deoxyuridine in vivo. *J Immunol* 95: 635-642, 1965.
- 6- KAUFMAN HE, MALONEY EM: IDU and cytosine arabinoside in experimental herpetic keratitis. *Arch Ophthalmol* 69: 626-629, 1963.
- 7- KUBES V, DIAMANTE A: Estudios de inmunidad cruzada entre el virus de la encéfalomiелitis equina de Venezuela y los virus encéfalomiелíticos Norteamericanos del Este y Oeste y el Argentino. *Bol Inst Inv Vet Caracas* 2: 179-198, 1944.
- 8- LITTER M: *Farmacología*. 3a edición. Buenos Aires, El Ateneo, 1964, p 1098.
- 9- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRIA. La encéfalomiелitis infecciosa de los equinos o peste loca de las bestias. *Rev Pecuaria Caracas* 1: 12-15, 1938.
- 10- THE MERCK INDEX. 8a edición. New Jersey, Merck & Co, 1968, p 673.
- 11- UNDERWOOD GE: Activity of 1- β -D arabinofuranosylcytosine hydrochloride against herpes simplex keratitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 660-664. 1962.

- 12- VOGELSANG EG, ALVAREZ RJ: La esencia de trementina intravenosa en el tratamiento de la encéfalomiélitis de los equinos. Rev Med Vet y Paras Caracas 1: 68-71, 1939.
 - 13- WINGFIELD WL, POLLACK D, GRUNERT RR: Therapeutic efficacy of amantadine HCl and rimantadine HCl in naturally occurring influenza A2 respiratory illness in man. New Engl J Med 281: 572-584, 1969.
-