

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON NIALAMIDA¹ Y DOSIS CONVULSIVANTES DE ESTRICNINA SOBRE LA CONCENTRACION DE ALGUNOS AMINOACIDOS LIBRES DE CEREBRO DE RATON ²

Por

GUILLERMO MASSIEU H.* MA-
RIETTA TUENA,** BERTHA G.
ORTEGA* y HERMINIA PASAN-
TES.*

* Departamento de Bioquímica del
Instituto de Biología.

** Departamento de Bioquímica de
la Facultad de Medicina, Universi-
dad Nacional Autónoma de México.

Haber y Saidel (4) consignaron que durante las convulsiones inducidas por estricnina disminuyen los niveles del ácido glutámico en el tejido cerebral, lo que parece indicar que en esas condiciones se modifica profundamente su metabolismo. Existe además evidencia experimental en el sentido de que la nialamida reduce el umbral de las convulsiones inducidas por dicho alcaloide (8). Por consiguiente, se puede suponer que en animales tratados con ambas drogas la respuesta, con respecto a niveles cerebrales de ácido glutámico, sea diferente que en el caso de la aplicación de estricnina solamente.

En esta comunicación, los autores presentan los primeros resultados de una investigación sobre los efectos del tratamiento simultáneo con estricnina y nialamida, y los de estas drogas aplicadas aisladamente, sobre los niveles de ácido glutámico cerebral libre y los de otros aminoácidos metabólicamente relacionados con él.

¹ 1-(2 benzilcarbamil etil-2-isonicotinoilhidrazina).

² Trabajo leído en el Simposio Panamericano sobre Farmacología y Terapéutica, agosto 23-27, Guadalajara, Jal., 1961.

PARTE EXPERIMENTAL

Se emplearon 115 ratones adultos, hembras o machos de entre 22 y 30 g. de peso, procedentes de la colonia del Instituto de Biología, que se alimentaron *ad libitum* previamente con dieta comercial (Purina Laboratory Chow). Antes de los experimentos los animales no se sometieron a ayuno. Se distribuyeron en diferentes grupos que a su vez se subdividieron en los siguientes subgrupos: A) Testigos; B) Tratados con nialamida; C) Tratados con estricnina y D) Tratados con estricnina y nialamida.

Se realizaron experimentos agudos en los que se emplearon dos diferentes dosis de estricnina, 1.43 y 2.0 mg/kg respectivamente, partiendo de la base libre, la cual se disolvió en agua destilada acidulada con HCl. En estos grupos la dosis de monoclorhidrato de nialamida aplicada (intraperitonealmente) fue de 100 mg/kg y se dejó actuar en unos casos $\frac{1}{2}$ hora y en otros 1 hora. En otros experimentos, la nialamida se inyectó (i.p.) durante 3 días y la dosis empleada fue 50 mg/kg. Las condiciones de los experimentos fueron las siguientes: los animales testigo (subgrupo A) se inyectaron intraperitonealmente con 0.1 ml del diluyente comercial de la nialamida y después de $\frac{1}{2}$ ó 1 hora, se volvieron a inyectar con el diluyente de la estricnina (agua acidulada); los ratones sometidos a la acción de la nialamida (subgrupo B) se trataron con la dosis correspondiente (cuando se empleó 50 mg/kg fue la última inyección) y al cabo de $\frac{1}{2}$ ó 1 hora se les aplicó 0.1 ml de agua acidulada; los del subgrupo C se inyectaron inicialmente con solvente de la nialamida y al término de los plazos señalados, con la dosis correspondiente de estricnina, contenida en un volumen no mayor de 0.12 ml; finalmente, los ratones del subgrupo D se trataron primero con la dosis correspondiente de nialamida y al cabo de $\frac{1}{2}$ ó 1 hora, con estricnina. En los experimentos crónicos, los testigos y los tratados únicamente con el alcaloide se inyectaron (i.p.) durante los 3 días con diluyente de la nialamida.

En el caso de los animales tratados con estricnina (subgrupos C y D) se esperó a que muriesen después de un período variable de estado convulsivo y se procedió entonces a extraer el encéfalo lo más rápidamente posible, el cual se congeló inmediatamente en aire líquido.

Los ratones de los subgrupos A y B se sacrificaron por decapita-

ción en tiempos paralelos a los correspondientes a los tratados con estricnina; el encéfalo se disecó en la misma forma que en los casos anteriores y se congeló asimismo en aire líquido.

ANALISIS DE LOS AMINOACIDOS LIBRES

El tejido congelado se pesó y se homogeneizó con 20-25 volúmenes de alcohol etílico al 80%, en homogeneizador de Potter-Elvehjem. Para obtener una solución acuosa libre de lípidos, los extractos alcohólicos, una vez centrifugados y lavado el residuo, se trataron con cloroformo siguiendo el procedimiento de Awapara (2).

Los extractos de cerebro, libres de proteínas y lípidos, se concentraron convenientemente y se utilizaron para la separación cromatográfica de los aminoácidos, en sistema uni-dimensional, utilizando la técnica descendente. La cantidad de extracto aplicada en el papel (Whatman N° 1) correspondió en general a 15-25 mg del tejido original. El solvente utilizado fue fenol al 80%; el fenol comercial utilizado (reactivo analítico) se purificó por destilación a presión reducida, junto con zinc en polvo, según la recomendación de Williams y Kirby (9). En los cromatogramas así obtenidos, se realizó la cuantificación de los ácidos aspártico, glutámico y gamma-aminobutírico, que se separan con poca contaminación y la de la glutamina junto con alanina, que en fenol al 80% exhiben un Rf casi idéntico. El método empleado para la estimación de estas sustancias fue el de Naftalín (7) con ligeras modificaciones, que implica la elución e intensificación del color desarrollado primeramente con ninhidrina al 0.05%, por tratamiento con una solución más concentrada de este reactivo (5.0% en butanol saturado con buffer de pH 7.0). Las lecturas se hicieron en espectrofotómetro Beckman B, a 570 m μ . Con cada lote de muestras se introdujeron soluciones patrón de los aminoácidos estudiados. Todas las manipulaciones, inclusive las lecturas en espectrofotómetro, se hicieron paralelamente con los extractos procedentes de los cuatro tipos de animales experimentales utilizados.

RESULTADOS

Los datos obtenidos se agrupan en las tablas 1 a 4. El contenido del cerebro en los aminoácidos libres se expresa en mg por 100 g de tejido húmedo. Se anota en cada caso el error "Standard".

Se puede observar (tablas 1 a 3) que en todos los experimentos agudos los animales tratados con estriquina mostraron concentraciones menores de los ácidos aspártico y glutámico cerebrales, cuando se comparan con las encontradas en los cerebros de los animales testigo. En el caso del segundo de los aminoácidos la diferencia fue siempre cercana al 10% y por lo tanto, su significación es dudosa, ya que está dentro del error de la técnica de análisis empleada. Esta observación discrepa con los datos de Haber y Saidel (4), los cuales encontraron en cerebro de rata disminuciones del orden del 30% durante las convulsiones inducidas por estriquina. Desafortunadamente, del trabajo de estos autores solamente disponemos de un extracto resumido que apareció como una comunicación previa. El examen de la literatura científica no reveló que posteriormente Haber y Saidel hubiesen descrito en detalle el resultado de su investigación.

TABLA 1

AMINOÁCIDOS LIBRES DEL CEREBRO DE RATONES SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES (ver el texto)‡

SUBGRUPO	<i>Umbral minutos</i>	<i>mg del aminoácido por 100 g de tejido húmedo</i>			
		<i>ácido aspártico</i>	<i>ácido glutámico</i>	<i>ácido gamma-amino-butírico</i>	<i>Glutamina + alanina</i>
A. Testigos (11)	...	54.3± 1.91	208.0± 8.44	34.3± 1.71	82.5± 4.21
B. Tratados con nialamida (12)	...	48.0± 3.56	189.0± 12.00	31.5± 1.59	78.7± 8.95
C. Tratados con estriquina (12)	5.4	44.4± 2.19	189.0± 8.01	32.3± 2.02	76.8± 4.38
		P < 0.01			
D. Tratados con estriquina y nialamida (11)	5.7	44.5± 2.02	189.8± 7.00	32.3± 1.82	77.4± 6.84
		P < 0.01			

‡ Dosis de estriquina: 2.0 mg/kg; tratamiento con nialamida: 100 mg/kg ½ hora antes de la aplicación de estriquina.

Entre paréntesis se anota el número de animales del subgrupo.

Mientras se estaba realizando la presente investigación, apareció publicado un artículo de De Ropp y Snedeker (3) en el cual los autores informaron, que ratas sometidas a la acción de la estriquina

(4 mg/kg) solamente mostraron incremento en la concentración de alanina cerebral libre y prácticamente ningún cambio en el nivel de ácido glutámico (no estimaron ácido aspártico). En los experimentos descritos en este trabajo, no observamos cambios notables en la concentración de alanina + glutamina bajo el efecto del alcaloide, debido, probablemente, al predominio de la concentración de la segunda de estas sustancias, lo que puede enmascarar cualquier cambio en alanina.

Como consecuencia del tratamiento con nialamida, en los experimentos agudos, se observaron concentraciones menores de los aminoácidos libres cerebrales aspártico y glutámico al comparar con los testigos. Estos cambios tendieron a hacerse aún más notables cuando al tratamiento con nialamida se adicionó el de estriocnina. En general, estas condiciones experimentales no influyeron notablemente en las concentraciones cerebrales de glutamina + alanina. En estos experimentos agudos no sólo no hubo reducción en el umbral de aparición de convulsiones inducidas por estriocnina, sino más bien la tendencia a prolongarse (tablas 1 a 3).

TABLA 2

AMINOÁCIDOS LIBRES DEL CEREBRO DE RATONES SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES (ver el texto) ‡

SUBGRUPO	Umbral minutos	mg del aminoácido por 100 g de tejido húmedo			
		ácido aspártico	ácido glutámico	ácido gamma-amino-butírico	Glutamina + alanina
A. Testigos (6)	...	53.4± 2.62	196.3± 9.85	29.5± 2.55	66.4± 6.69
B. Tratados con nialamida (6)	...	42.8± 2.58 P < 0.02	150.0± 10.01 P < 0.01	21.9± 1.71	53.9± 3.51
C. Tratados con estriocnina (6)	4.8[7.4]*	46.6± 2.2	171.8± 5.65 P < 0.05	25.2± 1.37	68.3± 5.15
D. Tratados con estriocnina y nialamida (6)	5.5[10]*	41.7± 3.71 P < 0.05	141.2± 11.9 P < 0.01	23.0± 2.06	67.7± 8.45

‡ Dosis de estriocnina: 1.43 mg/ kg; tratamiento con nialamida: 100 mg/kg, 1/2 hora antes de la aplicación de estriocnina.

Entre paréntesis se anota el número de animales del subgrupo.

* Los números entre corchetes indican el tiempo transcurrido entre la inyección de estriocnina y la muerte de los animales.

El tratamiento de los ratones por 3 días con nialamida afectó ligeramente al nivel de ácido glutámico cerebral (tabla 4). En este tipo de animales, cuando se inyectaron además con estriquina, se notó disminución del nivel de ácido aspártico cerebral. En los animales inyectados únicamente con el alcaloide, no se observaron cambios notables en los niveles de los aminoácidos analizados. En este experimento crónico fue posible observar la reducción en el umbral de aparición de las convulsiones inducidas por estriquina, en animales previamente tratados con nialamida.

En general, en los experimentos descritos no se notó correlación entre la extensión de los tiempos en los que se presentaron las convulsiones o la muerte y la magnitud de los cambios en los niveles de los ácidos glutámico, aspártico y, en algunos casos, gamma-aminobutírico.

DISCUSION

Dentro de las condiciones experimentales establecidas en esta investigación, las convulsiones inducidas por la estriquina no parecieron afectar profundamente el metabolismo de los aminoácidos libres analizados del cerebro de ratón, excepto en el caso del ácido aspártico. Cabe señalar que Anguiano y McIlwain (1) demostraron en experimentos *in vitro*, utilizando corteza cerebral de conejillo de Indias, que la estriquina y otros agentes convulsivantes no afectan los síntomas metabólicos oxidativos del tejido y sugieren que estos agentes probablemente actúan indirectamente *in vivo*. Por otro lado Killam y colaboradores (5, 6) demostraron que la estriquina no modifica la actividad de varias enzimas cerebrales que dependen de fosfato de piridoxal. Es posible que a la asfixia, que es en realidad la causa final de la muerte por estriquina, se deban los cambios metabólicos que presenta el tejido cerebral de animales tratados con el alcaloide.

TABLA 3

AMINOÁCIDOS LIBRES DEL CEREBRO DE RATONES SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES (ver el texto)‡

SUBGRUPO	Umbral minutos	mg del aminoácido por 100 g de tejido húmedo			
		ácido aspártico	ácido glutámico	ácido gamma-amino- butírico	Glutamina + alanina
A. Testigos (6)	...	55.6± 2.90	213.2± 12.2	26.7± 0.89	73.9± 4.43
B. Tratados con nialamida (6)	...	43.4± 1.85 P<0.01	175.5± 16.31	26.7± 1.00	57.8± 2.06
C. Tratados con estricnina (6)	6.2[11]*	41.4± 2.04 P<0.005	194.1± 11.10	24.1± 1.39	86.6± 5.55
D. Tratados con estricnina y nialamida (6)	6.4[11]*	41.2± 2.98 P<0.02	168.6± 17.20	25.7± 1.59	74.2± 7.04

‡ Dosis de estricnina: 1.43 mg/kg; tratamiento con nialamida: 100 mg/kg, 1 hora antes de la inyección de estricnina.

Entre paréntesis se anota el número de animales del subgrupo.

* Los números entre corchetes indican el tiempo transcurrido entre la inyección de estricnina y la muerte de los animales.

Aunque las modificaciones que indujo el tratamiento con nialamida sobre los niveles de los ácidos glutámico y aspártico fueron, en algunos casos, más bien discretos, la constancia en su presentación merece que se tomen en consideración. También es significativo el hecho de que tales cambios tendieron a hacerse más pronunciados cuando se aplicó, además, estricnina.

Con los datos con que contamos hasta el momento, no se puede ofrecer la explicación adecuada de los mencionados efectos de la nialamida. A primera vista puede esperarse que la droga manifieste acción inhibitoria sobre algunas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los aminoácidos estudiados. Los autores han realizado investigaciones preliminares relativas a su efecto sobre la actividad de algunas enzimas que dependen de fosfato de piridoxal y que se presentarán en otra comunicación.

TABLA 4

AMINOÁCIDOS LIBRES DEL CEREBRO DE RATONES SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES (ver el texto)‡

SUBGRUPO	Umbral minutos	mg del aminoácido por 100 g de tejido húmedo			
		ácido aspártico	ácido glutámico	ácido gamma-amino- butírico	Glutamina + alanina
A. Testigos (6)	...	42.3± 4.82	198.0± 6.19	26.2± 0.93	75.3± 2.72
B. Tratados con nialamida (6)	...	44.6± 2.04	174.4± 6.75	27.7± 3.73	70.4± 3.51
			P < 0.05		
C. Tratados con estricnina (6)	-6.2[8.3]*	38.5± 3.2	194.8± 4.89	31.8± 2.94	81.0± 2.78
D. Tratados con estricnina y nialamida (6)	4.3[6.6]*	28.8± 1.98	175.0± 8.46	22.9± 0.52	79.8± 7.31
			P < 0.005		

‡ Dosis de estricnina: 1.43 mg/kg; tratamiento: 50 mg/kg de nialamida durante tres días. La última inyección se aplicó una hora antes del tratamiento con estricnina. Entre paréntesis se anota el número de animales del subgrupo.

* Los números entre corchetes indican el tiempo transcurrido entre la inyección de estricnina y la muerte de los animales.

RESUMEN

El tejido cerebral de ratones inyectados con estricnina (1.43 mg/kg y 2.0 mg/kg, intraperitoneal) mostró disminuciones del nivel de ácido aspártico libre, al comparar con el encontrado en cerebros de animales testigo.

El tejido cerebral de ratones tratados con nialamida mostró descenso en los niveles de los ácidos glutámico y aspártico libres. En ratones tratados previamente con la droga, en períodos cortos (1/2 ó 1 hora, 100 mg/kg) no se observó reducción en el umbral de aparición de las convulsiones inducidas por estricnina.

SUMMARY

The free glutamic acid, aspartic acid, γ -aminobutyric acid, and glutamine plus alanine content of brains from mice injected with convulsive doses of strychnine were analyzed. Some animals were treated with nialamide prior to the strychnine injection. This previous treatment with nialamide consisted in the injection of the drug (100 mg/kg) $\frac{1}{2}$ or 1 hr. before the strychnine treatment; in one group the animals were injected daily with nialamide (50 mg/kg) through a 3-day period. Several groups of mice received only the nialamide treatment.

In comparison with those found in the control animals, the brains from the strychnine-treated mice showed a significant decrease of the free aspartic acid level. The level of the free glutamic acid tended to diminish in these animals.

The brains from mice treated with one single dose of nialamide (100 mg/kg) showed a decrease of the free glutamic acid and aspartic acid levels. The brains from mice treated with 3 doses of nialamide (50 mg/kg), through a 3-day experimental period, showed a decrease of the glutamic acid level.

The brains from mice treated with nialamide and strychnine showed a significant lowering of the free aspartic acid level. The cerebral glutamic acid tended to diminish in these animals.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANGUIANO, G. and McILWAIN, H. Convulsive agents and the phosphates of the brain examined *in vitro*. *Brit. J. Pharmacol.*, 6:448 (1951).
2. AWAPARA, J. Application of paper chromatography to the estimation of free amino-acids in tissues. *Arch. Biochem.*, 19:172, (1948).
3. DE ROPP, R. and SNEDECKER, E. H. Effect of drugs on amino acid levels in brain, excitants and depressants, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 106:696 (1961).
4. HABER, C. and SAIDEL L. Glutamic acid in neural activity, *Federation Proc.*, 7:47 (1948).
5. KILLAM, K. F. and BAIN, J. A. Convulsant hydrazides. I: *In vitro* and *in vivo* inhibition of vitamin B₆ enzymes by convulsant hydrazides, *J. Pharmacol. and Exptl. Therap.*, 119:255 (1957).
6. KILLAM K. F., DASGUPTA, S. R. and KILLAM, E. K. Studies of the action of convulsant hydrazides as vitamin B₆ antagonist in the central nervous system Proceedings of an International Symposium held at the City of Hope Medical Center, Pergamon Press, Oxford, pag. 302 (1960).

7. NAFTALIN, N. A. Quantitative chromatographic estimation of amino acids, *Nature*, 161:763 (1948).
8. REINERT, H. International symposium on Nialamide, *Supl. J. Soc. Cienc. Med. Lisboa*, 123:69 (1959).
9. WILLIAMS, R. J. and KIRBY, H. Paper chromatography using capillary ascendent, *Science*, 107:481 (1948).