

OBSERVACIONES PRELIMINARES ACERCA DEL EFECTO DE  
LA NIALAMIDA<sup>1</sup> SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS  
ENZIMAS QUE DEPENDEN DE FOSFATO DE  
PIRIDOXAL<sup>2</sup>

Por

MARIETTA TUENA,\* GUILLERMO MASSIEU H.,\*\* BERTHA G. ORTEGA\*\* y HERMINIA PASANTES.\*\*

\* Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

\*\* Departamento de Bioquímica del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Según datos presentados por los autores en una comunicación anterior (7) la nialamida induce a disminuciones de los niveles de los ácidos glutámico y aspártico libres en cerebro. Se consideró posible que estos cambios sean debidos a modificaciones de la actividad de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de dichos aminoácidos y probablemente de aquellas que dependen de fosfato de piridoxal como cofactor. En el presente informe se consignan los resultados de investigaciones preliminares relativas a la acción de la droga sobre la descarboxilasa del ácido glutámico (DGt), la transaminasa glutámico-oxalacética (TGO) y la transaminasa gamma-aminobutírica-alfa-cetoglutárica (T-GAB), del tejido cerebral del ratón y de la rata.

---

<sup>1</sup> 1-(2-benzilcarbamil etil-2-isonicotinoil hidrazina).

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

## PARTE EXPERIMENTAL

Experimentos *in vitro*: la actividad enzimática se ensayó en cerebros de ratas adultas procedentes de la colonia del Instituto de Biología, entre 200 y 250 g de peso, alimentadas previamente *ad libitum* con una dieta comercial (Purina Laboratory Chow) como se describirá posteriormente.

Experimentos *in vivo*: se utilizaron 82 ratones adultos de entre 22 y 30 g de peso, procedentes de la colonia del Instituto de Biología, alimentados *ad libitum* con la misma dieta que en el caso de las ratas.

Grupos de 12 a 16 ratones se dividieron en dos sub-grupos; los animales de uno de ellos se inyectaron intraperitonealmente con nialamida (100 mg/kg en una sola dosis en unos casos o 3 dosis de 50 mg/kg repartidas en 3 días, en otros); en el otro subgrupo los ratones se inyectaron con el diluyente de la nialamida. Al cabo de 1 hora los animales se sacrificaron por decapitación y se disecó lo más rápidamente posible el encéfalo.

Para los experimentos *in vitro*, se utilizaron cerebros de ratas que se sacrificaron por decapitación y que no se sometieron a ningún tratamiento previo.

## EVALUACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

DGt. La actividad de esta enzima se midió por el incremento en la producción de ácido gamma-aminobutírico, a pH 6.3 y en un período de incubación de 2 horas a 37°. El método seguido se basó en las condiciones experimentales establecidas por Roberts y Frankel (9) con ligeras modificaciones. En forma resumida, consistió en los siguientes pasos: 1) el cerebro recién disecado se homogeneizó con amortiguador de fosfato a 0°, de pH 6.3 (0.05 M) en la proporción 1+4 (p/v), por medio de homogeneizador de Potter-Elvehjem; 2) se tomaron 0.5 ml del homogeneizado anterior en tubos de ensayo conteniendo previamente 0.82 ml de agua destilada, 1.0 ml de amortiguador de fosfatos (pH 6.3, 0.05 M) y 0.33 ml de solución de ácido glutámico conteniendo 64  $\mu$ M y ajustada a pH 6.3; a los tubos testigo se les añadió 0.33 ml de agua destilada en lugar de la solución de ácido glutámico; 3) los tubos conteniendo la mezcla

anterior se taparon e incubaron 2 horas a 37° con agitación frecuente. Al término de la incubación, la reacción se detuvo por adición de 7 ml de alcohol etílico absoluto. El ácido gamma-aminobutírico producido, se estimó separándolo por cromatografía unidimensional en papel filtro, en extractos de los homogeneizados, libres de proteínas y lípidos (1). La estimación cuantitativa se realizó por el procedimiento de Naftalin (8).

T-GAB. La actividad de esta enzima se midió bajo las condiciones experimentales establecidas por Bessman y colaboradores (5) y Baxter y Roberts (3), adaptándolas al uso de homogeneizados completos. Los pasos principales del procedimiento se pueden resumir como sigue: 1) en tejido cerebral recién disecado se homogeneizó (Potter-Elvehjem) en amortiguador de boratos a 0°, de pH 8.25 (1+6.7, p/v); 2) 1.0 ml del homogeneizado anterior se pasó a un tubo de ensayo conteniendo 0.5 ml de una solución de ácido gamma-aminobutírico (30  $\mu$ M) ajustada a pH 8.2 y 0.5 ml de una solución de ácido alfa-cetoglutarico (30  $\mu$ M) ajustada a pH 8.2; a los tubos testigo se agregó 0.5 ml de agua destilada en lugar de la última solución; 3) la mezcla se incubó en tubos tapados, 1 hora a 37°, con agitación, y la reacción se detuvo finalmente, por adición de 7 ml de alcohol etílico absoluto. La cantidad de ácido glutámico producido en la reacción se estimó por cromatografía en papel, como en el caso de la DGt.

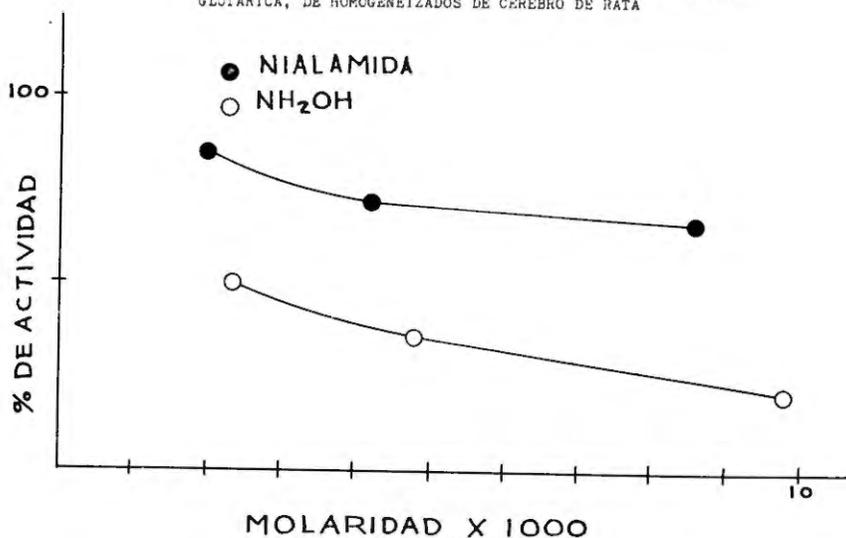
TGO. La actividad de esta enzima se estimó midiendo la cantidad de ácido glutámico producido, en una mezcla de ácido aspártico, ácido alfa-cetoglutarico y homogeneizado, a pH 7.6, siguiendo el procedimiento de Awapara y Seale (2).

En los experimentos *in vitro*, se aplicaron las mismas técnicas para la estimación de las actividades enzimáticas. La nialamida, en estos casos, se incorporó a las mezclas reaccionantes en diferentes concentraciones. El efecto de la droga sobre la DGt se estudió sobre preparaciones de mitocondrias obtenidas de acuerdo con el procedimiento de Brunngraber y Abood (6). Para el caso de la T-GAB, el ensayo se llevó a cabo en buffer de fosfatos de pH 7.4 con el objeto de disolver mayor cantidad de nialamida, cuya solubilidad disminuye cuando se eleva el pH.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los ensayos sobre la influencia de la nialamida *in vitro*, solamente mostraron que la droga tiene un ligero efecto inhibitorio sobre la T-GAB. En presencia de nialamida en concentraciones de 0.0088 y 0.0044 M, la inhibición en homogeneizados de cerebro de rata fue solamente 19% y 13%, respectivamente. Comparada con la notable inhibición que ejerce la hidroxilamina sobre esta enzima, la encontrada en el caso de la nialamida es de pequeña magnitud (fig. 1).

FIGURA 1  
EFECTO COMPARATIVO DE LA NIALAMIDA Y LA HIDROXILAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA GAMMA-AMINOBUTIRICA-ALFA-CETO-GLUTARICA, DE HOMOGENEIZADOS DE CEREBRO DE RATA



Se puede observar (tablas 1 y 2) que las actividades de DGt, T-GAB y TGO, fueron prácticamente las mismas en los cerebros de ratones testigo y en los cerebros de ratones tratados con nialamida, tanto en los inyectados con una sola dosis de la droga como en aquellos que se aplicaron 3 consecutivas. Estos resultados parecen indicar que los cambios en el patrón de aminoácidos inducidos por esta sustancia, ya descritos anteriormente, no se deben a modificaciones de la actividad de las enzimas ensayadas. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que en experimentos a largo plazo la nialamida mostrase algún efecto sobre enzimas dependientes de fosfato de piridoxal.

TABLA 1

ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS EN CEREBRO DE RATONES TESTIGO Y TRATADOS CON NIALAMIDA (ver el texto)‡

	Actividad enzimática		
	<i>DGt</i> $\mu\text{M}$ de AGAB producidos por 100 mg de tejido húmedo	<i>T-GAB</i> $\mu\text{M}$ de ácido glutámico producidos por 100 mg de tejido húmedo	<i>TGO</i> $\mu\text{M}$ de ácido glutámico producidos por 100 mg de tejido húmedo
A. Testigos	3.48 $\pm$ 0.216 (6)	2.42 $\pm$ 0.170 (8)	34.54 $\pm$ 0.970 (6)
B. Tratados con Nialamida ‡	3.72 $\pm$ 0.240 (6)	2.37 $\pm$ 0.745 (8)	34.73 $\pm$ 0.675 (6)

‡ Tratamiento: 3 dosis de 50 mg/kg inyectadas en 3 días consecutivos. Entre paréntesis se indica el número de animales empleado.

TABLA 2

ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS EN CEREBRO DE RATONES TESTIGO Y TRATADOS CON NIALAMIDA (ver el texto)‡

	Actividad enzimática		
	<i>DGt</i> $\mu\text{M}$ de AGAB producidos por 100 mg de tejido húmedo	<i>T-GAB</i> $\mu\text{M}$ de ácido glutámico producidos por 100 mg de tejido húmedo	<i>TGO</i> $\mu\text{M}$ de ácido glutámico producidos por 100 mg de tejido húmedo
A. Testigos	3.21 $\pm$ 0.192 (8)	1.67 $\pm$ 0.165 (7)	35.52 $\pm$ 1.66 (6)
B. Tratados con Nialamida‡	3.84 $\pm$ 0.212 (7)	1.76 $\pm$ 0.125 (7)	30.06 $\pm$ 1.12 (6)

‡ Tratamiento: 100 mg/kg, una hora antes del sacrificio. Entre paréntesis se indica el número de animales empleado.

## RESUMEN

Se investigó la influencia de la nialamida sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (DGt), la transaminasa gamma-aminobutírica (T-GAB), y la transaminasa glutámico oxalacética (TGO), en cerebros de ratones inyectados con una dosis única de la droga (mg/kg) o con 3 dosis repartidas en 3 días (50 mg/kg). También se estudió el efecto de la nialamida *in vitro*, sobre la actividad de estas enzimas, en homogeneizados de cerebro de rata (T-GAB y TGO) y en mitocondrias de cerebro de ratón (DGt).

Los datos obtenidos en los experimentos *in vivo*, indicaron que la nialamida no modifica la actividad de las enzimas ensayadas. En experimentos *in vitro* y en concentraciones de  $8.8 \times 10^{-3}$  M y  $4.4 \times 10^{-3}$  M, de la droga, se observó una ligera inhibición de la actividad de T-GAB.

## SUMMARY

The influence of nialamide on the activities of several pyridoxal phosphate-dependent enzymes was studied in brain tissue *in vivo* and *in vitro*. The enzymes studied were glutamic acid decarboxylase,  $\gamma$ -aminobutyric- $\alpha$ -ketoglutaric acid transaminase, and glutamic-oxalacetic transaminase.

The brains from mice killed  $\frac{1}{2}$  or 1 hr. after the injection of nialamide (100 mg/kg) showed no significant changes of the three enzymatic activities. The daily injection of mice with nialamide (50 mg/kg) through a 3-day experimental period did not modify the activities of the enzymes.

Nialamide did not modify the glutamic acid decarboxylase or glutamic-oxalacetic transaminase activities of rat brain homogenates. In concentrations from  $8.8 \times 10^{-3}$  to  $4.4 \times 10^{-3}$  of nialamide, a slight inhibition of the  $\gamma$ -aminobutyric acid- $\alpha$ -ketoglutaric acid transaminase was observed.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AWAPARA, J. Application of paper chromatography to the estimation of free amino acids in tissues, *Arch. Biochem.*, 19:172 (1948).

2. AWAPARA, J. and SEALE B. Distribution of transaminases in rat organs, *J. Biol. Chem.*, 194:497 (1952).
3. BAXTER, C. F. and ROBERTS, E. The gamma-aminobutyric acid-alfa-cetoglutaric acid transaminase of beef brain, *J. Biol. Chem.*, 233:1135 (1958).
4. BAXTER, C. F. and ROBERTS, E. Gamma-aminobutyric acid and cerebral metabolism. En: *The Neurochemistry of the nucleotides and amino acids*, John Wiley and Sons, New York, pag. 127 (1960).
5. BESSMAN, S. P., ROSSEN, J. and LAYNE, E. C. Gamma-aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain, *J. Biol. Chem.*, 201:385 (1953).
6. BRUNNGRABER, E. G. and ABOOD, L. G. Mitochondrial glycolysis of rat brain and its relationships to the remainder of cellular glycolysis, *J. Biol. Chem.*, 235:1847 (1960).
7. MASSIEU, H. G., TUENA, M., ORTEGA, B. G. y PASANTES, H. Efecto del tratamiento con nialamida y dosis convulsivantes de estriquina sobre la concentración de algunos aminoácidos libres de cerebro de ratón. Trabajo leído en el Simposio Panamericano sobre Farmacología y Terapéutica, agosto 23-27, Guadalajara, Jal. (1961).
8. NAFTALIN, N. A. Quantitative chromatographic estimation of amino acids, *Nature*, 161:763 (1948).
9. ROBERTS, E. and FRANKEL, S. Further studies of glutamic-acid descarboxylase in brain, *J. Biol. Chem.*, 190:505 (1961).