

Laboratorio de Fisiología General del C. S. I. C.
Facultad de Medicina de Valencia.
(Prof. J. García-Blanco).

Contribución al estudio de la degradación del bromacetato "in vitro" y por el organismo animal.

por
J. Viña

(Recibido para publicar el 22 de octubre de 1956)

En otro trabajo verificado en este Laboratorio y no publicado todavía, se estudia la intoxicación en perros, del bromacetato sódico, en determinadas condiciones experimentales. En ellas se estableció en principio, la dosis mínima mortal capaz de terminar con el animal en un tiempo determinado y con un cuadro sintomatológico constante, en el cual el componente nervioso ejercía un papel preponderante, y cuya descripción corresponde al trabajo aludido. Sistematizada la muerte del animal, se estudiaba los fármacos capaces de acelerar, retrasar o modificar el cuadro final y al mismo tiempo lo sucedido en el animal cuando la dosis no era mortal, haciendo pensar en principio que en este último caso el organismo era capaz de destoxicar el bromacetato.

Los antecedentes de desbromación de otras sustancias de estructura más compleja (2) nos hizo estudiar el mecanismo de destoxicación del bromacetato y a ello tiende el presente trabajo.

Material y métodos

En nuestros experimentos hemos empleado perros, cuyo peso oscilaba entre 6 y 8 kilogramos.

La inyección del fármaco se verificaba por vía venosa previa

introducción de una cánula, por vena safena de una de las dos patas traseras del animal.

Se determinó la dosis mínima capaz de matar al animal en un tiempo determinado, que resultó ser de 0,07 gr. por kg. de peso, en cuyas condiciones el animal muere, con bastante exactitud, en unos 20 minutos con un cuadro de rigidez muscular que persiste aún después de la muerte.

El ácido bromacético antes de inyectarlo era neutralizado con sosa hasta llevarlo a un pH 7.

En los experimentos de incubación con cortes de hígado empleamos una cápsula de Petri, en la cual a la solución de bromacetato se agregaban cortes de hígado de perro recién sacrificado recogido en cápsula envuelta con pedazos de hielo y lavado con suero fisiológico frío (unos 4° C), procurando que los cortes tuviesen el menor espesor posible, que en líneas generales oscilaban entre 0,5 y 1 mm. El volumen de la solución era también constante. La incubación se verificaba en estufa con termostato regulada a 18° C. La preparación en contacto con el aire.

Resultados

Inyectando por vía safena 0,07 gr. por kg. de peso de bromacético neutralizado con sosa muere el animal en 20 minutos con un cuadro de rigidez muscular y fuerte tetanización de corazón.

Si se pone a incubar la dosis antedicha con cortes de hígado durante 48 horas y se inyecta al animal, éste no da ninguno de los síntomas observados al inyectar bromacético y tampoco muere aún después de las 24 horas, momento en que estimamos como finalizada la experiencia. Si sólo se dejan pasar 24 horas de incubación, los resultados son variables, teniendo casos en los cuales el animal sobrevive y otros en que muere alrededor de la media hora de la inyección.

Si ponemos a incubar como testigos bromacetato en las condiciones descritas con clara de huevo durante 11 días, la inyección en el animal desencadena la muerte a los 20 minutos.

Con cortes de riñón sucede lo mismo que con cortes de hígado.

Mezclando la dosis mortal de 0,07 gr. por kilo con glucosa durante 11 días, el animal muere a los 20 minutos.

Discusión

A la vista de los resultados obtenidos se sugiere una primera idea fundamental: Que los cortes de hígado son capaces de modificar la estructura química del bromacetato de manera que

la nueva molécula obtenida esté desprovista de acción tóxica y que en su totalidad o en parte la dosis mortal de bromacético es degradada. Si consideramos el primer caso, es natural que no ejerza una acción tóxica el producto de la incubación y sí en el segundo al disminuir la cantidad de bromacetato, la dosis deja de ser tóxica y esto nos explica la supervivencia del animal

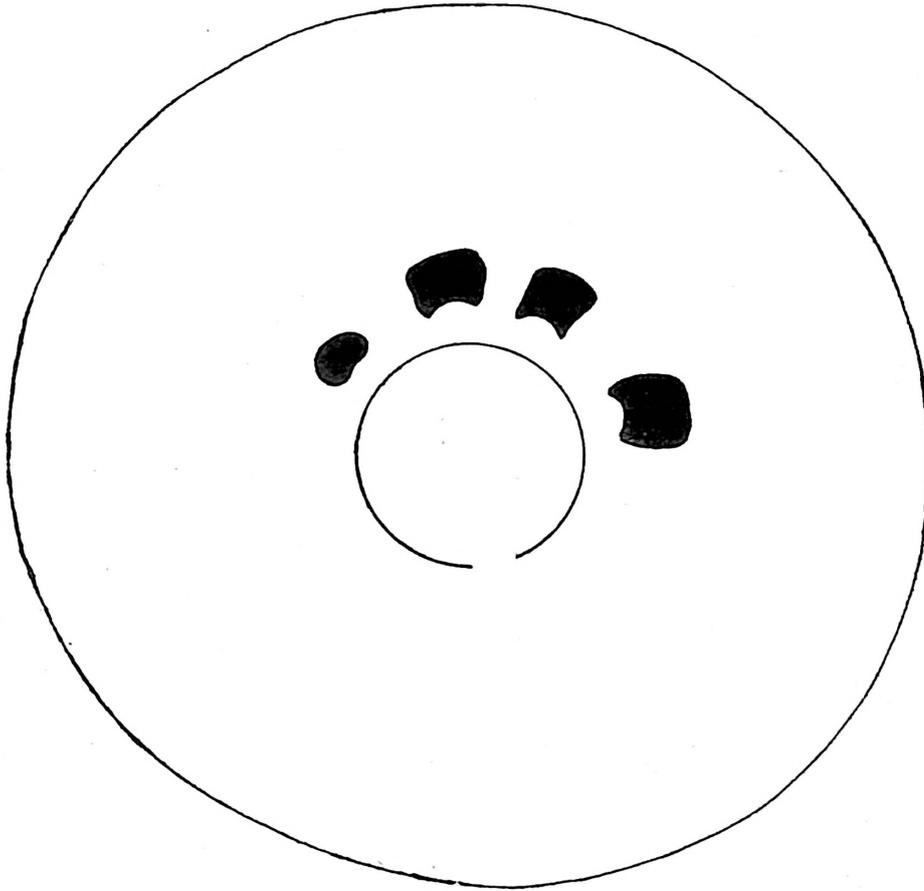


Figura 1

Cromatografía circular. — En el círculo pequeño se depositaron las sustancias a estudiar. Círculo mayor: altura alcanzada por el frente. De izquierda a derecha: Acético (testigo), las dos siguientes problema de la preparación que se describe en el texto, y la última bromacetato (testigo).

Planteadas así las cosas, investigamos en el producto de incubación de 48 horas, desproteinizado, la existencia de bromacetato, que resultó ser positiva y para lo cual empleamos una técnica cromatográfica con papel Whatman núm. 1 con disolvente n-butanol-amoniaco acuoso 1,5 N (1:1) con revelador pul-

verizando con una solución acuosa o en acetona de bromotimol al 0,04 % ajustada a pH 7,5. Quedaba, pues, que si el animal no moría era debido a una disminución de la concentración de bromacetato existente en la solución puesta a incubarse y, por lo tanto, observamos en el animal lo mismo que cuando se inyectaba una dosis notoriamente inferior a la señalada como tóxica mortal.

Se imponía entonces conocer el destino de las moléculas de bromacetato. A este efecto observamos un enriquecimiento en bromuros en la preparación de cortes de hígado, pensando entonces que el bromo había sido desprendido enzimáticamente de la molécula del bromacetato y oxidado a bromuro, el resto de la molécula del bromacetato podía sufrir un destino vario. Al encontrar abundante ácido oxálico en la preparación, pensamos que tras la desbromación, el resto dicarbonado del bromacetato había sufrido una oxidación final a ácido oxálico detectado éste por el procedimiento de la difenil-amina con formación de anilina azul (2). Hipotéticamente, pensamos que el resto hidrocarbonado tras la pérdida del bromo pudiera ser aminado con formación de glicocola. No fué así por no haber enriquecimiento en la preparación de este aminoácido, hecho que determinamos también cromatográficamente con disolvente fenol, papel Whatman núm. 1 y revelador con Nihidrina.

Como contraprueba de todo lo expuesto hasta ahora, inyectamos a un animal 0,03 gr. por kilo de peso de bromacetato y a la hora y media de la inyección extrajimos sangre, encontrando en ella, previa desproteinización, ácido oxálico, que no encontramos en la sangre que antes de la inyección y como testigo habíamos sacado al animal.

Inyectamos a este animal una dosis inferior a la tóxica, para evitar la muerte de éste excesivamente corta y dar tiempo al organismo para que fuese capaz de metabolizar el tóxico inyectado.

Resumen

1.º Se estudia la degradación del bromacético *in vitro* por cortes de hígado.

2.º Se observa la formación de bromuros y ácido oxálico a expensas del bromacetato.

3.º En la sangre circulante del animal vivo previa inyección de una dosis no tóxica mortal de bromacetato se observa un enriquecimiento de ácido oxálico.

Summary

Contribution to the study of bromacetate degradation «in vitro» and in the animal organism

In a previous unpublished work of this laboratory a study was made of the intoxication of dogs by bromacetate and of the products which tend to modify the final picture, which shows a very accentuated nervous component. On incubating the lethal dose (0.07 g. per kg.) with liver preparations it is observed that after 48 hours the injection of this dose does not kill the dog. This suggests that the bromacetate molecule has modified its structure due to the action of the liver preparations.

The end-products are studied and it is found that the Br is converted to bromide and the bicarbonate remainder has been oxidised to oxalic acid. There is no enrichment of glycolic acid in the preparation.

The injection of an animal with a smaller than lethal dose, does not kill the animal and two hours later we find in the circulating blood oxalic acid which we could not detect before the bromoacetate injection.

Bibliografía

- (1) FEIGL, F. y FREHDEN, O. : *Mikrochemie*, **18**, 272, 1935.
- (2) MORIN, G. A. y APELGAT, S. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 1183-1187, 1955.

