

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Agregación de Química Enzimológica
Barcelona

Contribución al estudio de las propiedades de la hidrazida del ácido isonicotínico

por

J. Monche y M. Ferrer-Arenillas

(Recibido para publicar el 13 de marzo de 1958)

Hace ya tiempo tuvimos conocimiento de haber sido observado algún caso de accidente como consecuencia de transfusiones sanguíneas efectuadas en niños que se hallaban sometidos a tratamiento con la isonicotinilhidrazida.

Juzgando el tema interesante, dada la gran aplicación terapéutica de dicha substancia, emprendimos desde entonces su estudio sistemático, en animales de experimentación.

Material y métodos

a) ENSAYOS BIOLÓGICOS

Efectuamos algunas experiencias iniciales y seguidamente empleamos siete lotes de cinco ratas macho, de unos 200 gr de peso. Fueron tratadas previamente con la isonicotinilhidrazida (INH), por vía oral, administrándosela diariamente a dosis continuadas, mediante el agua de bebida, en forma de disolución, a la concentración de 2 mgr. de INH por centímetro cúbico, que los animales la ingieren sin dificultad.

A la alimentación de los animales de uno de los lotes se le incorporaba diariamente 1,20 gr. de ácido glutámico (Ac. G), en forma de suspensión en gelatina, que se mezclaba fácil y uniformemente.

Separadamente dispusimos dos lotes de tres ratas similares a las anteriores, pero que no fueron sometidas a tratamiento alguno.

Todos los animales se hallaron sujetos a igual régimen alimenticio, dentro de la mayor identidad de condiciones, salvo la variante expuesta para el lote sometido a tratamiento simultáneo con ácido glutámico.

En ensayos previos determinamos la cantidad de agua ingerida por animal, que osciló alrededor de los 12 c. c. diarios. Esta cantidad corresponde a una dosis media de 120 mgrs. de isonicotinilhidrazida por kilo de peso corporal, cada 24 horas, y nos permitió fijar la de ácido glutámico en los 1,20 gr. antes mencionados, por kilo de peso corpóreo (5 ratas de 200 gr. del lote); o sea en cantidad diez veces mayor a la de isonicotinilhidrazida, según CEDRANGOLO y su escuela (1).

A los ocho días de iniciado el tratamiento con la isonicotinilhidrazida, se administra endovenosamente a cada lote respectivo, sangre total y plasma oxalatados; sangre total y plasma citratados, y disoluciones acuosas isotónicas de oxalato y de citrato sódicos. La sangre necesaria la obtuvimos de ratas análogas, mediante incisión practicada en la yugular.

La administración a las ratas ensayadas, de la sangre total o del plasma oxalatados o citratados, así como la del oxalato o citrato sódicos isotónicos, la efectuábamos mediante inyección practicada en una vena de la cola y en cantidad variable, no superior a 0,5 c. c., para interrumpir la inyección al presentarse los primeros síntomas convulsivos.

b) RESULTADOS OBTENIDOS

Ratas empleadas	Tratadas con INII	Tratadas con INII + Ac. G.	Con oxalato			Con citrato			Muertas	Vivas	Mortalidad %	Convul- siones
			Sangre total	Plasma	Disol. isotónica	Sangre total	Plasma	Disol. isotónica				
5	5	—	si	—	—	—	—	—	2	3	40	+
5	5	—	—	si	—	—	—	—	1	4	20	+
5	5	—	—	—	si	—	—	—	4	1	80	+
5	—	5	—	—	si	—	—	—	0	5	0	+
5	5	—	—	—	—	si	—	—	0	5	0	0
5	5	—	—	—	—	—	si	—	0	5	0	0
5	5	—	—	—	—	—	—	si	0	5	0	0
3	—	—	—	—	si	—	—	—	0	5	0	0
3	—	—	—	—	—	—	—	si	0	5	0	0

OBSERVACIONES. — El efecto de la inyección intravenosa de oxalato se manifiesta casi instantáneamente, incluso mientras se practica la inyección a los animales. Éstos mueren a los pocos minutos, de una crisis convulsiva aguda. Otros animales llegan a sobrevivir, a pesar de presentar dicha sintomatología tóxica. Los fenómenos convulsivos son también inmediatos, aunque menos intensos, en los animales previamente tratados con la mezcla de isonico-tilhidrazida y ácido glutámico, pero se requieren dosis mayores de oxalato.

c) ENSAYOS QUÍMICOS

Después de una serie de ensayos químicos previos, realizados para fijar las condiciones operatorias más demostrativas de las variaciones de estabilidad de la INH, en relación con los ensayos biológicos precedentes, estudiamos su hidrólisis, en presencia de ácido glutámico, de ácido aspártico, de glicocola, de los ácidos *para* y *orto*-aminobenzoicos, del ácido oxálico, del ácido cítrico, y bajo la sola acción del pH del medio.

Efectuamos nuestras experiencias, operando en condiciones de pH y temperatura constantes, mediante una mezcla amortiguadora de CLARK y LUBS ($H_3BO_3 + KCl + NaOH$) 0,2 M, a pH=7,5 y $T=45^\circ C.$, durante una hora. Por lo tanto, dentro de la mayor suavidad.

Las variaciones de velocidad hidrolítica de la INH en dichas condiciones, las determinamos fotométricamente, por las variaciones de intensidad de la coloración formada en cada caso, mediante Nesslerización, expresándolas en densidades ópticas.

Empleamos catorce tubos de ensayo, previamente numerados, de 50 c. c., de capacidad. Los numeramos correlativamente por pares, y en cada uno de los tubos de la serie de siete pares, introducimos 0,00036 moles de cada uno de los siete ácidos antes mencionados. Disponemos dos tubos más de ácido oxálico testigo, para mantenerlos a la temperatura de $15^\circ C.$, y otros cuatro, con sólo la mezcla amortiguadora de CLARKS y LUBS, a la misma concentración que en los demás, dos de ellos para mantenerlos a la indicada temperatura de $15^\circ C.$, y los dos restantes para calentarlos a 45° , juntamente con los de la serie. Resultan de este modo veinte tubos en total.

Los ácidos los disolvemos en NaOH 0,2 N, hasta pH=7,5, ajustando el pH potenciométricamente, previa adición a cada tubo de 20 c. c. de agua destilada. Acto seguido, se introduce en diez de los tubos con numeración diferente, 1 c. c. de una disolución acuosa de isonicotinilhidrazida (INH), al 5 por ciento (50 mgr.=0,00026 moles), preparada inmediatamente al efecto, y se completa el volumen en todos ellos hasta el de 30 c. c., añadiéndoles las cantidades necesarias de la mezcla amortiguadora de CLARK y LUBS 0,2 M.

Salvo los cuatro tubos dispuestos para mantenerlos a la temperatura de $15^\circ C.$, se calientan todos los demás durante una hora, en baño de agua, mantenido a la temperatura constante de $45^\circ C.$, para terminar enfriándolos hasta la temperatura ambiente, en el mismo baño, previamente dispuesto al efecto.

Se tienen preparados otros veinte tubos marcados con numeración correlativa y se introduce en cada uno 40 c.c. de agua destilada, medidos con exactitud. Seguidamente se añaden

0,1 c. c. por tubo, del contenido del tubo inicial respectivo; se agita cada tubo, se le agrega 0,5 c. c. de reactivo de NESSLER, se vuelve a agitar, y en los tubos que corresponden a los iniciales en que se había añadido la INH, se observa un desarrollo de color amarillo, de intensidad muy variable de unos tubos a otros, y cuyo desarrollo se completa al cabo de unos siete minutos. Las diferencias de intensidad del color formado se determinan fotométricamente, en densidades ópticas, y las lecturas se efectúan después de transcurridos diez minutos desde la adición del reactivo de NESSLER.

En los restantes tubos, no se observa prácticamente desarrollo alguno de color. Tampoco se observa en los tubos iniciales correlativos respectivos, a pesar de la gran diferencia de concentraciones, ni aun añadiéndoles mayores cantidades de reactivo de NESSLER.

d) RESULTADOS EXPERIMENTALES (*)

Velocidades hidrolíticas relativas de la INH a pH = 7,5 (mezcla amortiguadora de CLARK y LUBS), T = 45°C. durante 1 hora, determinadas en densidades ópticas, mediante el reactivo de NESSLER.

Tubos	Substancias ensayadas	Acción ejercida en Dens. Opt.	Dens. Opt. en ausencia de INH
1	Acido glutámico	12,5 inhibe	0
2	Acido aspártico	11 inhibe	0
3	Glicocola	13,5 sin acción	0
4	Acido <i>para</i> -aminobenzoico	9,5 inhibe	0
5	Acido <i>orto</i> -aminobenzoico	10 inhibe	0
6	Acido cítrico	7 inhibe	0
7	Acido oxálico	17 activa	0
8	Mezcla de Clark y Lubs	13,5 testigo	0
9	Id., id., a 15° C.	9 testigo	0
10	Acido oxálico a 15° C.	9 testigo	0

Discusión

El descubrimiento de la acción antitóxica ejercida por el ácido glutámico respecto a la isonicotinilhidrazida, sin disminu-

(*) En la realización de estas experiencias nos ha prestado inteligente ayuda la señorita Marina Alvarez.

ción de su actividad terapéutica, se debe a CEDRANGOLO (2 y 14). El síndrome convulsivo consecutivo a una dosis letal de hidrazida isonicotínica, es análogo al provocado por una dosis letal de cloruro amónico. En uno y otro caso, la acción del ácido glutámico se manifiesta por la abolición del síndrome convulsivo y supervivencia del animal.

CEDRANGOLO y su escuela han demostrado que la muerte de los animales sometidos a la acción de la hidrazida obedece al efecto del amoníaco y que los tejidos «in vitro» producen cantidades enormes de amoníaco a partir de la hidrazida (3).

El ácido glutámico influye en la disminución de la toxicidad de la hidrazida, bloqueando el catión amonio liberado en el catabolismo de la misma, en forma de glutamina. Dicha síntesis se observa especialmente en el tejido nervioso, ligada a la actividad enzimática de la glutaminasa (4). Precisamente, después de la administración de una dosis mortal de isonicotinilhidrazida, se acumula en el sistema nervioso central una cantidad de amoníaco igual a la hallada inyectando una dosis mortal de cloruro amónico, según SALVATORE (15). En consecuencia, el tejido nervioso desempeña un papel preponderante en la degradación enzimática de la isonicotinilhidrazida (5).

Según nuestras experiencias, la inyección endovenosa de oxalato a animales que han recibido una dosis diaria de hidrazida isonicotínica muy inferior a la letal (*), desencadena, casi instantáneamente, el síndrome convulsivo y la muerte. En cambio, la sola acción de la hidrazida, aun administrándola a dosis letales por sonda gástrica, no determina la aparición de las convulsiones más que entre los 35 y 70 minutos de ingerido el tóxico y la muerte ocurre entre los 50 y 150 minutos (1). Por lo tanto, el ion oxálico administrado endovenosamente exalta de modo muy poderoso la toxicidad de la hidrazida. Y este hecho, que no tenemos noticias haya sido estudiado hasta ahora, ofrece un gran contraste con la influencia nula en la acción tóxica de la hidrazida observada mediante el citrato.

Absorción intestinal de la hidrazida

PORCELLATI y PREZIOSI han demostrado, conforme lo observó ya con anterioridad AZNAR-FERRERES (13), que la hidrazida isonicotínica no es escindida al nivel de la mucosa intestinal, y esta inalterabilidad de la hidrazida prueba el hecho de que la misma pueda ser reabsorbida sin obstáculo, a través del tubo

(*) La dosis letal por vía oral para la rata, en los animales ensayados por CEDRANGOLO y su escuela, es de 800 mgr. de hidrazida por kilo de peso corporal (1).

digestivo, conservando toda su actividad quimioterápica cuando se administra por vía oral (6).

PIAZZA, ZARRILLI y ROGLIANI (10) y PIAZZA y ZARRILLI (11), determinan la concentración de hidrazida en la sangre de ratas y conejos tratados con la mezcla de hidrazida y de ácido glutámico, administrada por vía oral, utilizando un método todavía inédito, basado en una reacción específica, debido a SEARD, y encuentran que dicha concentración es notablemente superior respecto a la correspondiente a la de hidrazida administrada sola a los animales, en identidad de condiciones experimentales.

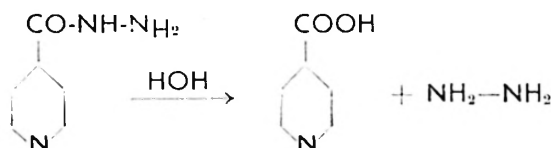
Por lo tanto, pueden existir en la sangre cantidades apreciables de hidrazida inalterada y de sus productos de degradación, cuando la misma se administra por vía oral.

En virtud de todos estos hechos, hemos considerado interesante estudiar el comportamiento de la hidrazida isonicotínica, sometida a hidrólisis química, en condiciones de suavidad que pudieran ofrecer cierta similitud con las de los medios biológicos, a fin de seguir la marcha de dicho proceso hidrolítico, operando además en presencia de sustancias, entre ellas los ácidos oxálico, cítrico y glutámico, que nos permitieran deducir consecuencias respecto a una posible influencia ejercida por estos tres ácidos en la marcha del referido proceso.

CEDRANGOLO, GIOIA y BAGNULO, no excluyen la posibilidad de que a la acción antitóxica del ácido glutámico puedan coadyuvar otros mecanismos (7).

Hidrólisis química

La isonicotinilhidrazida, como amida hidrazínica que es del ácido isonicotínico, se escinde hidrolíticamente, dando ácido isonicotínico e hidrazina:



Por lo tanto, se formarán cantidades de hidrazina correspondientes a la intensidad del proceso hidrolítico.

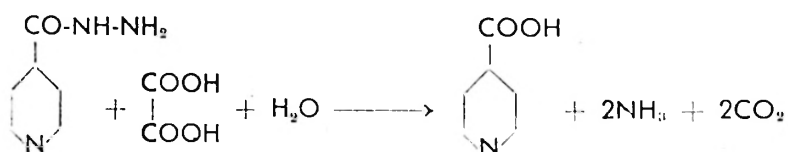
No obstante su carácter reductor bastante más acentuado, la hidrazina ofrece, conforme es sabido, muchas de las características propias del amoníaco. Cabía, pues, suponer que, como éste, fuera determinable fotométricamente, mediante el reactivo Nessler, dando coloraciones mucho más intensas que las que pudiera ser capaz de desarrollar, en todo caso, la propia

hidrazida isonicotínica (INH). Y esto es precisamente lo que podrá deducirse del examen de nuestros resultados experimentales incluídos en d). En ellos se observa una clara acción protectora de la descomposición hidrolítica de la isonicotinilhidrazida, ejercida por los ácidos glutámico y aspártico; siendo muy notable la correspondiente a los ácidos *orto* y *para*-aminobenzoicos.

Estas acciones inhibitoras pueden explicarse, en nuestro concepto, por la tendencia de los derivados hidrazínicos a formar combinaciones moleculares, incluso con aminoácidos (12).

Una acción inhibitora aún más acentuada la ofrece en nuestro caso el citrato, pero el ácido cítrico puede influir en el reactivo de Nessler, según GENTZKOW y MASEN (9). En cambio los aminoácidos ensayados no ejercen influencia alguna (16).

En cuanto a la acción activadora ejercida por el oxalato en las condiciones operatorias descritas, favorecida por la influencia del resto isonicotínico en el carácter de la función amida hidrazínica, cabe suponer, en nuestro concepto, que ocurra el proceso siguiente:



Que conduciría directamente a la formación de ácido isonicotínico y de dos moles de amoníaco por cada mol de isonicotinilhidrazida.

Acción tóxica del oxalato

La acción tóxica fulminante ejercida por el oxalato administrado endovenosamente a los animales tratados con dosis diarias continuadas de hidrazida isonicotínica, debe, pues, obedecer, en nuestro concepto, a un incremento rápido y momentáneo de la concentración de amoníaco, por acumulación lenta, especialmente en el tejido nervioso, de la isonicotinilhidrazida que va pasando inalterada del tubo digestivo al torrente circulatorio (10) (*). Bastan, por lo tanto, pequeñas cantidades de oxalato para provocar el síndrome convulsivo.

De los trabajos de PIAZZA, ZARRILLI y ROGLIANI (10) y

(*) En el torrente circulatorio las condiciones son óptimas para que el proceso de formación de amoníaco a expensas de la hidrazida isonicotínica, bajo la acción directa del oxalato, pueda ocurrir de modo inmediato.

PIAZZA y ZARRILLI (11), parecería deducirse que al administrar la hidrazida isonicotínica por vía oral, mezclada con el ácido glutámico, los efectos tóxicos de la inyección endovenosa de oxalato deberían incrementarse, puesto que la concentración de hidrazida en la sangre se halla entonces aumentada. Pero en nuestros ensayos hemos observado precisamente lo contrario, según nuestros resultados experimentales incluídos en d).

Y este hecho, en apariencia contradictorio, deja de serlo si se tiene en cuenta que PIAZZA, ZARRILLI y ROGLIANI efectúan las determinaciones de hidrazida en sangre de animales a los que se les ha administrado una dosis elevada de hidrazida y ácido glutámico de una sola vez, mediante sonda gástrica, mientras que en nuestras experiencias la administración oral se efectúa diariamente, de un modo normal, continuo y regular, dando así tiempo a que el ácido glutámico se vaya transformando en glutamina, ejerciendo su máxima capacidad antitóxica, y a una más regular eliminación de la hidrazida presente en la sangre (*).

A mayor abundamiento, PIAZZA, ZARRILLI y ROGLIANI, efectúan las determinaciones de hidrazida en el intervalo máximo de tres horas, desde la administración de la mezcla de hidrazida y ácido glutámico por sonda gástrica a los animales.

En esta clase de experiencias ejercen, naturalmente, una influencia extraordinaria los factores biológicos de tipo individual y el régimen alimenticio y condiciones de vida de los animales empleados; hecho éste al que ya hacen referencia CEDRANGOLO, GIOIA y BAGNULO (8). Las condiciones experimentales más adecuadas en cada caso, se hallan pues sujetas a variación.

En cuanto a los fenómenos convulsivos, no mortales, que hemos observado en los animales tratados previamente con la mezcla de ácido glutámico e hidrazida, no permiten que se aprecie totalmente el efecto antitóxico, ya que existe en casos de aumento rápido de la toxicidad de la hidrazida por administración endovenosa, una diferencia esencial, según CEDRANGOLO (4), entre el momento en que la hidrazida está a punto de ejercer su acción tóxica máxima y el momento en que, por el contrario, se halla el ácido glutámico en posesión de su poder antitóxico máximo.

Otra interpretación distinta de la que hemos expuesto, nos induciría a admitir que la acción del oxalato se ejerce disminu-

(*) De acuerdo con nuestros resultados experimentales que hemos expuesto en d), el ácido glutámico es un inhibidor de la hidrólisis de la hidrazida isonicotínica. Según de RITTER, DREKTER, SCHNEIDER y RUBIN (*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 79, 654, 1952), administrada oralmente se elimina en parte inalterada con la orina en 48 horas.

yendo el calcio total y el ion calcio del plasma, mientras que el citrato sólo actúa disminuyendo este último; pero es precisamente el calcio iónico el que es activo en la regulación de la excitabilidad neuromuscular y aun inyectando endovenosamente a los animales cantidades mucho mayores de citrato, no hemos logrado reproducir el efecto tóxico provocado por el oxalato, descrito en este trabajo (*).

Resumen

Se estudia la acción tóxica aguda provocada por la administración endovenosa de oxalato a ratas previamente tratadas con dosis diarias continuadas de isonicotinilhidrazida por vía oral, que contrasta de modo muy notable con la tolerancia observada, en condiciones idénticas, cuando la administración endovenosa es de citrato.

Paralelamente se practican ensayos químicos de transformación de la isonicotinilhidrazida en ácido isonicotínico, en condiciones de máxima suavidad, operando a $\text{pH} = 7,5$, y los resultados así obtenidos se atribuyen a una liberación de hidrazina, si se opera en ausencia de oxalato; o bien de amoníaco, al intervenir este último en el proceso correspondiente.

Se da en consecuencia una explicación de la acción tóxica aguda del oxalato, atribuyéndola a liberación inmediata de amoníaco, como consecuencia de la transformación de la isonicotinilhidrazida en ácido isonicotínico bajo la acción directa del oxalato, que conduce a la formación de dos moles de amoníaco por cada mol de isonicotinilhidrazida.

Se apoya esta hipótesis experimentalmente, administrando a los animales la isonicotinilhidrazida previamente mezclada con ácido glutámico, según CEDRANGOLO y colaboradores, observándose una disminución considerable del efecto tóxico del oxalato.

Summary

A contribution to the study of the properties of isonicotinylhydrazide

The acute toxicity provoked by the intravenous injection of oxalate to rats having received a continued daily oral dose of isonicotinylhydrazide is studied. It contrast notably with the tolerance observed when citrate is injected to animals in identical conditions.

In a parallel way, several chemical experiments for the study of transformations of isonicotinylhydrazide at $\text{pH} = 7,5$ are accomplished, in conditions of accurate smoothness, and the

(*) Separadamente hemos ensayado el efecto tóxico de dosis letales de hidrazida isonicotínica, administrada intramuscularmente a los animales, mezclada con cloruro cálcico y también con gluconato cálcico inyectables. La sintomatología tóxica es siempre, en ambos casos, la misma de la hidrazida isonicotínica, aunque se administre intramuscularmente mezclada incluso con citrato o con oxalato sódicos. Los animales presentan invariablemente en la fase final, accesos de intensa rigidez muscular, en todos los casos.

results obtained are attributed to a liberation of hydrazine, in the absence of oxalate ; or of ammonia, when the oxalate is present in the process, resulting in this way that two mols of ammonia are formed for each mol of isonicotinylhydrazide.

An explanation of the acute toxic effects of oxalate, based upon this above mentioned assumption is given and is supported experimentally by means of the oral administration to the animals of isonicotinylhydrazide mixed with glutamic acid, according to CEDRANGOLO. A considerable diminution of the toxic effects of oxalate is observed as consequence, proving that they are occasioned by a rapid liberation of ammonia.

Oxalated blood and oxalated blood plasma, in the same way as the solutions of oxalate, are frequently extremely toxic to rats previously treated with continued daily oral doses of isonicotinylhydrazide, when the above are injected endovenously.

On the contrary, citrated blood, citrated blood plasma and citrate solutions, are not toxic in the same experimental conditions.

The rats of 200 g nearly were treated with a daily oral dose of about 120 mg. of isonicotinylhydrazide per kilo of corporal weight. Eight days after, a quantity not greater than 0,5 ml. of oxalated blood, oxalated plasma or of an isotonic oxalate solution, is injected endovenously and immediately an acute convulsive crisis appears, according to our experimental results which are given in a table included at the beginning of this paper.

Bibliografía

- (1) CEDRANGOLO, F. ; GIOIA, A., y BAGNULO, R. : *Enzymologia*, **16**, 45, 1953.
- (2) CEDRANGOLO, F. : *Scientia Medica Italica*, **3**, 446, 1955.
- (3) CEDRANGOLO, F. : *Scientia Medica Italica*, **3**, 450, 1955.
- (4) CEDRANGOLO, F. : *Scientia Medica Italica*, **3**, 449, 1955.
- (5) CEDRANGOLO, F. : *Scientia Medica Italica*, **3**, 452, 1955.
- (6) CEDRANGOLO, F. : *Scientia Medica Italica*, **3**, 454, 1955.
- (7) CEDRANGOLO, F. ; GIOIA, A., y BAGNULO, R. : *Enzymologia*, **16**, 49, 1953.
- (8) CEDRANGOLO, F. ; GIOIA, A., y BAGNULO, R. : *Enzymologia*, **16**, 45, 1953.
- (9) GENTZKOW, C. J., y MASEN, J. M. : *J. Biol. Chem.*, **143**, 531, 1942.
- (10) PIAZZA R. ; ZARRILLI, L., y ROGLIANI, E. : *Biochimica Applicata*, **3**, 187, 1956.

- (11) PIAZZA, R., y ZARRILLI, L. : *Biochimica Applicata*, **3**, 221, 1956.
- (12) POLONOWSKY, C. : *Ber.*, **21**, 183, 1888.
- (13) PORCELLATI, G. : y PREZIOSI, P. : *Enzymologia*, **17**, 47 1954 ; AZNAR-FERRERES, J. : *R. esp. Fisiol.*, **9**, 126, 1953.
- (14) RUFFO, A. : *Biochimica Applicata*, **4**, 1, 1957.
- (15) SALVATORE, F. : *Enzymologia*, **30**, 379, 1954.
- (16) Véase, por ejemplo : KING, E. J. : *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, pág. 14. Churchill Ltd. Londres, 1956.