

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología y Bioquímica de Valladolid
Facultad de Medicina
Valladolid

Efecto de un derivado metil-hidrazínico sobre la respiración celular

por

E. Romo, A. Velasco *, J. Vázquez y B. Herreros

(Recibido para publicar el 15 de julio de 1968)

El Ro-4-6467 (Natulán, Roche) (clorhidrato de metil 2-p-[Isopropil carbamoil]-benzil-hidrazina) es una sustancia con acción antitumoral. BOLLAG y col. (2) han demostrado que este agente induce la aparición de aberraciones cromosómicas en células de tumor ascitis de Erlich tratadas *in vivo* (3), y produce despolimerización del DNA *in vitro* en presencia de oxígeno (1). Este último efecto parece ser debido a la autooxidación de la droga con formación de peróxido de hidrógeno, el cual actuaría sobre el DNA por medio de radicales OH (1).

Aunque la acción sobre el DNA puede ser la responsable del efecto antitumoral del Natulán, no han sido estudiadas otras acciones bioquímicas de la droga. En el presente trabajo mostramos los resultados de un estudio del efecto del Natulán sobre la respiración de levaduras, diafragma de rata y homogenizado de hígado del mismo animal.

Material y métodos

Las determinaciones del consumo de O₂ se realizaron en un aparato de War-

burg de tipo convencional, a 37° C, por el método directo (4), con 0,2 ml de NaOH al 40 % en el comportamiento central de los vasitos, y haciendo lecturas cada 15 minutos durante media a una hora.

EXPERIENCIAS CON CÉLULAS DE LEVADURA. Se utilizó levadura fresca de panadería (*Saccharomyces minor*), lavada dos veces en agua destilada y otra en buffer de fosfatos 0,06 M (pH 6,6). Para las experiencias de respiración exógena, en cada vaso del Warburg se colocaron 3 a 5 mg (peso seco) de levadura, suspendidos en 2 ml del mismo buffer de fosfatos con glucosa (2×10^{-2} M), y para la respiración endógena 12 a 15 mg de levadura en 2 ml de buffer sin glucosa. En cada experiencia se emplearon 6 vasos, a tres de los cuales se añadió la droga (concentración final 1×10^{-3} M y 1×10^{-4} M). La fase gaseosa fue aire.

EXPERIENCIAS CON DIAFRAGMA DE RATA. Se utilizaron ratas blancas machos de 150

* Becario de Protección Escolar.

a 200 g de peso. Cada diafragma dividido en cuadrantes según la técnica habitual, se repartió en dos vasos, experimental y testigo. El medio de incubación (2 ml) fue solución Krebs-Ringer-fosfato (pH 7,4) con glucosa (1×10^{-2} M) y al vaso experimental se añadió Natulán a una concentración final de 1×10^{-3} M. La fase gaseosa fue oxígeno.

EXPERIENCIAS CON HOMOGENIZADO DE RATA. El hígado procedente de ratas machos de 150 a 200 g de peso, fue homogenizado con un aparato Potter-Elvehjem a $2-4^{\circ}$ C, en un medio consistente en 100 partes de solución de sacarosa (0,25 M) y 20 partes de buffer de fosfatos (0,1 M) pH 7,4, poniendo 1 g de tejido por cada 9 ml de medio. En cada vaso del Warburg se colocó 1,5 ml del homogenizado y 0,5 ml del mismo medio de homogenización, con Natulán (concentración final 1×10^{-3} M) en los experimentales, y sin la droga en los testigos. La fase gaseosa en este caso fue aire y se emplearon seis vasos en cada experiencia, tres experimentales y tres testigos.

Resultados y discusión

Los resultados van expresados numérica y gráficamente en las tablas y figuras adjuntas. El análisis estadístico de los

TABLA I

Levaduras. Respiración exógena.

Tiempo minutos	Testigos *	Experimentales * Natulán (1×10^{-3} M)	P
15	41,180 \pm 2,567	38,680 \pm 1,574	>0,20
30	76,020 \pm 2,506	72,980 \pm 1,967	
45	111,990 \pm 3,924	108,510 \pm 3,943	
60	145,030 \pm 4,733	136,490 \pm 2,431	<0,05

* Valores medios de 10 experiencias \pm E.S. de la media expresados en microlitros de O_2 consumidos por cada mg de levadura (peso seco).

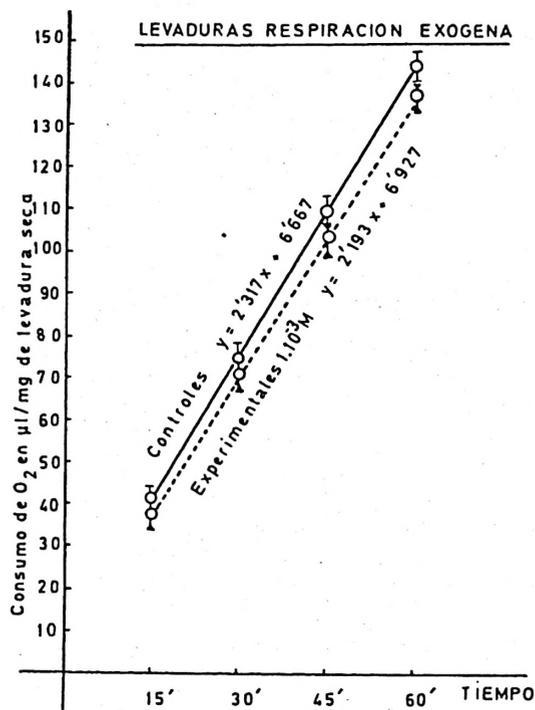


FIG. 1. Rectas de regresión del consumo de O_2 en función del tiempo, obtenidas a partir de los datos de la Tabla I

mismos demuestra que las pequeñas diferencias en el consumo de oxígeno que se observan entre experimentales y testigos no son significativas, salvo en las experiencias de respiración exógena de cé-

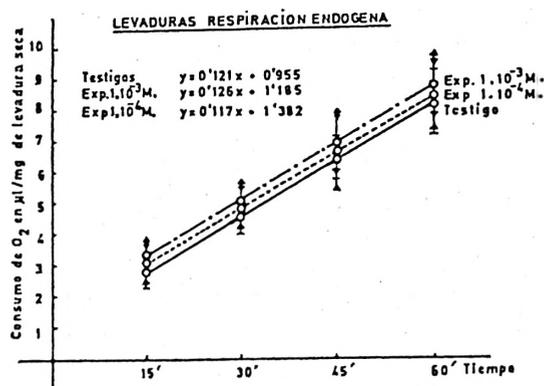


FIG. 2. Rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de la Tabla II

TABLA II
Levaduras. Respiración endógena

Tiempo	Testigos *	Experimentales *			
		Natulán (1×10^{-3} M)	P	Natulán (1×10^{-4} M)	P
15	2,685 ± 0,387	2,855 ± 0,374	>0,60	2,842 ± 0,458	>0,70
30	4,659 ± 0,648	5,151 ± 0,660		5,062 ± 0,735	
45	6,466 ± 0,787	6,996 ± 0,954		6,816 ± 1,222	
60	8,159 ± 0,948	8,601 ± 1,020	>0,60	8,359 ± 1,135	>0,80

* Valores medios de 10 experiencias ± E.S. de la media expresados en microlitros de O₂ consumidos por cada mg de levadura (peso seco).

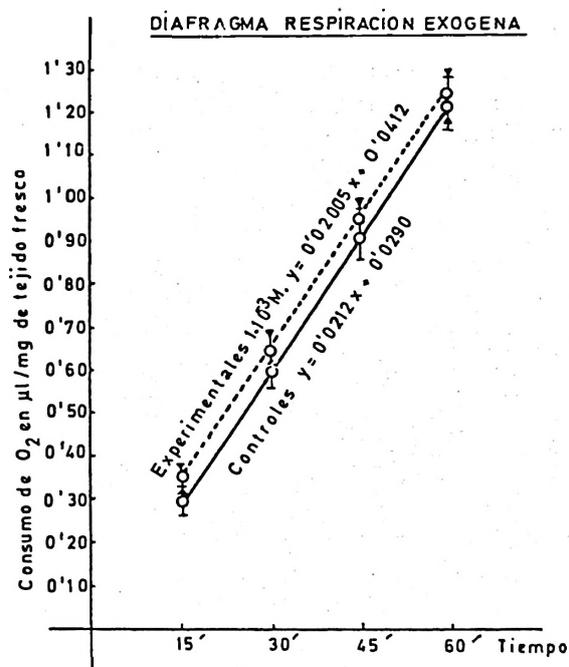


FIG. 3. Rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de la Tabla III

lulas de levadura a los 60 minutos de incubación (tabla I, figura 1). Aun en este último caso las diferencias están en el límite de la significación estadística, por lo cual creemos que se puede concluir que el Natulán no afecta la respiración de las células y tejidos por nosotros estudiados.

TABLA III
Diafragma de rata.

Tiempo minutos	Testigos *	Experimentales * Natulán (1×10^{-3} M)	P
15	0,2829 ± 0,0238	0,3161 ± 0,0185	>0,10
30	0,6195 ± 0,0326	0,6397 ± 0,0383	
45	0,9392 ± 0,0458	0,9522 ± 0,0570	
60	1,2232 ± 0,0623	1,2635 ± 0,0709	>0,50

* Valores medios de 10 experiencias ± E. S. de la media, expresados en microlitros por cada mg de tejido fresco.

TABLA IV

Homogenizado de hígado de rata.

Tiempo minutos	Testigos *	Experimentales * Natulán (1×10^{-3} M)	P
15	42,733 ± 2,624	43,466 ± 2,083	>0,80
30	69,483 ± 3,361	70,450 ± 2,349	>0,70

* Valores medios de 6 experiencias ± E. S. de la media, expresados en microlitros de oxígeno consumidos por 150 mg de tejido fresco.

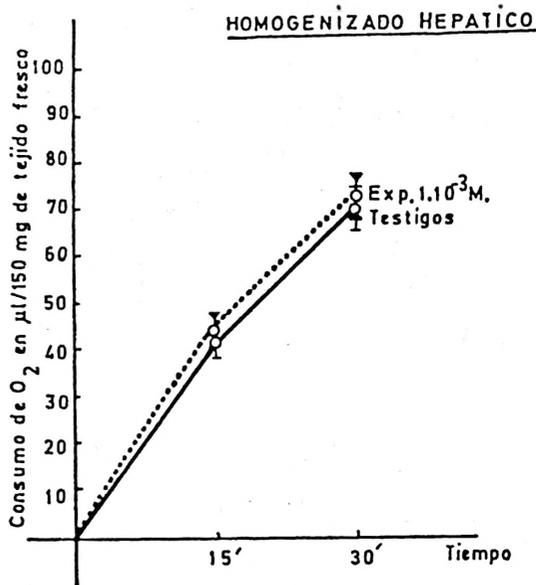


FIG. 4. Representación gráfica de los datos presentados en la tabla IV

Resumen

Se ha estudiado el efecto del Clorhidrato de 1 metil 2-p-(isopropil-carbamoil)-Benzil-hidrazina sobre la respiración de células de levadura, diafragma y homogenizado de hígado de rata, observando que esta droga no produce apreciables modificaciones del consumo de O₂

de las células y tejidos estudiados. Únicamente se observó una discreta, pero significativa, disminución de la respiración exógena de la levadura con glucosa.

Summary

Effect of a Methyl-hydrazine Derived on Cellular Respiration

The effect of methyl 2-p-(isopropyl-carbamyl) Benzyl-hydrazine chlorhydrate on the respiration of yeast cells, rat diaphragm and liver homogenate has been studied. It was found that this drug does not produce appreciable alterations in O₂ consumption, the only observed effect being a discreet but significant drop in the exogenous respiration of the yeast with glucose.

Bibliografía

1. BERNEIS, K., KOFLER, M., BOLLAG, W., KAISER, A. y LANGEMAN, A.: *Experientia*, **19**, 132, 1963.
2. BOLLAG, W. y GRUMBERG, E.: *Experientia*, **19**, 130, 1963.
3. RUTISHAUSER, A. y BOLLAG, W.: *Experientia*, **19**, 131, 1963.
4. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFER, J. F.: *Manometric Techniques*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1959.