

## Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de oxígeno y glucosa por algunos tejidos de rata *in vitro*

J. L. Velasco, J. M. Arévalo, M. de Armijo y A. Velasco

Departamento de Farmacología  
Cátedra de Hidrología Médica  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
Madrid-3 (España)

(Recibido el 2 de diciembre de 1972)

J. L. VELASCO, J. M. AREVALO, M. DE ARMIJO and A. VELASCO. *Effect of Pyridoxine Hydrochloride on Oxygen and Glucose Uptake by Several Tissues of Rat in vitro*. R. esp. Fisiol., 29, 55-60. 1973.

Pyridoxine hydrochloride *in vitro* at concentrations  $5 \times 10^{-3}$  -  $10^{-2}$  M depresses the uptake of oxygen and glucose by the rat brain slices, this effect seems to be independent of potassium concentration in the medium of incubation; it inhibits oxygen consumption by whole brain homogenates and increases oxygen uptake by diaphragm and liver homogenates of the male albino rats.

MCKHAN *et al.* (14) en cortes de cerebro de animales sometidos a una dieta carencial de vitamina B<sub>6</sub> han encontrado una disminución del consumo de oxígeno que se restablece al añadir al medio fosfato de piridoxal o ácido gamma amino butírico (GABA).

ARÉVALO *et al.* (1) han demostrado en homogeneizados y cortes de cerebro de rata *in vitro* que el fosfato de piridoxal deprime el consumo de oxígeno e inhibe el incremento del mismo, inducido por GABA y l-Glutamina. Se ha introducido en terapéutica un derivado de la piridoxina (glioxilato de piridoxina, piridoxilato

o glyo-6) como sustancia economizadora del consumo de oxígeno propuesta para el tratamiento de las afecciones vasculares coronarias y periféricas a pesar de carecer de efecto vasodilatador (8). LAMARCHE y MARIGNAC (11) han encontrado que el clorhidrato de piridoxina y el glyo-6 o piridoxilato inhiben el consumo de oxígeno de corazón *in vitro*.

Cuando los consumos de glucosa y oxígeno cerebrales son estimulados por altas concentraciones de potasio, el efecto de los fármacos depresores de sistema nervioso central (anestésicos generales, hipnóticos, narcóticos, etc.) que disminuyen el

consumo de oxígeno se hace más evidente (6, 12, 19).

En este trabajo se estudia el efecto de clorhidrato de piridoxina a concentraciones farmacológicas sobre el consumo de oxígeno en diafragma, homogeneizados y cortes de hígado y cerebro y consumo de glucosa de cerebro, así como la influencia de la concentración de potasio en el medio de incubación sobre los efectos de clorhidrato de piridoxina.

### Material y métodos

Se utilizaron ratas blancas, machos, raza Wistar (150-200 g de peso), muertas por decapitación. Los cortes de hígado y cerebro (de un espesor de 100  $\mu$ ) se obtuvieron de acuerdo con la técnica de McILWAIN y BUDDLE (13). El diafragma fue dividido en cuadrantes, poniéndose un hemidiafragma en cada frasco. Cortes y diafragma se incubaron en Krebs-Ringer fosfato (pH 7,4) conteniendo glucosa 10 mM y potasio 5 ó 100 mM. Los homogeneizados de cerebro total fueron preparados a 2-4° centígrados en un homogeneizador Potter Elvehjen, mezclando 1 g de muestra de tejido con 9 ml de una solución que contiene sacarosa 0,25 M tamponada a pH 7,4, siendo esta solución el medio de incubación en homogeneizados (21).

El consumo de oxígeno a 37° C fue determinado por técnica manométrica (20), utilizando aire como fase gaseosa en cortes y homogeneizados, pero en diafragma la fase gaseosa fue oxígeno. Los resultados se expresan en  $\mu$ l/100 mg de tejido fresco. El consumo de glucosa se estimó midiendo la concentración de glucosa en el medio al final de la incubación con el método de la glucosa oxidasa (17) expresándose este consumo en mg/100 mg de tejido fresco/hora. Las concentraciones de fármaco utilizadas aparecen expresadas en resultados. El contraste estadístico de resultados se verificó mediante un t-test (16). Se calcularon las ecuaciones de las rectas de regresión tiempo consumo de oxígeno.

### Resultados

#### EFFECTO DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA EN CORTES DE CEREBRO *in vitro*

En la figura 1 se puede comprobar que en un medio Krebs-Ringer fosfato normal (5 mM de potasio), el clorhidrato de piridoxina a las concentraciones de  $5 \times 10^{-3}$  y  $10^{-3}$  M reduce significativamente ( $P < 0,001$ ) el consumo de glucosa en un 46 y 37 %, respectivamente. Cuando el medio de incubación contiene una concentración elevada de potasio (100 mM), el clorhidrato de piridoxina únicamente a la concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M inhibe significativamente ( $P < 0,01$ ) el consumo de glucosa (28,2 %).

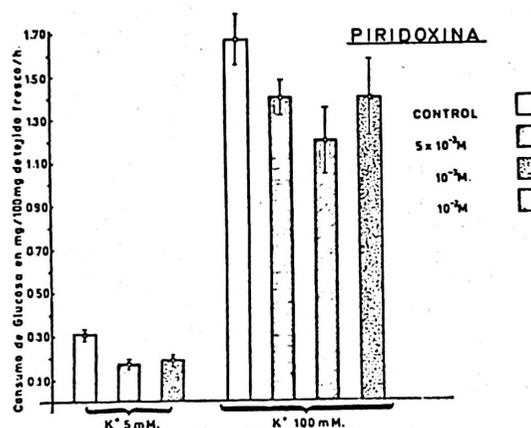


Fig. 1. Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de glucosa en cortes de cerebro de rata *in vitro* en Krebs-Ringer fosfato.

El consumo de glucosa se determinó midiendo su concentración en el medio al final de la incubación; se expresan los resultados en mg de glucosa consumida por 100 mg de tejido fresco/hora. Valores medios  $\pm$  E.S.M. El número de cortes utilizando un medio de incubación con concentración normal de potasio (5 mM) ha sido de 8, mientras que utilizando un medio con concentración elevada de potasio (100 mM) ha sido 9.

**EFFECTO DEL CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE ALGUNOS TEJIDOS DE RATA *in vitro***

a) *Homogeneizados y cortes de hígado.*  
El clorhidrato de piridoxina a la concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M incrementa significativamente ( $P < 0,005$ ) el consumo de oxígeno en un 21,0 % en homogeneizados de hígado (fig. 2). En cortes de hígado a ninguna de las concentraciones estudiadas ( $10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$  y  $10^{-3}$  M) modifica el consumo de oxígeno.

b) *Homogeneizados y cortes de cerebro.*  
En homogeneizados de cerebro, el clorhidrato de piridoxina a la concentración de  $10^{-2}$  M disminuye significativamente ( $P < 0,01$ ) el consumo de oxígeno en todos los

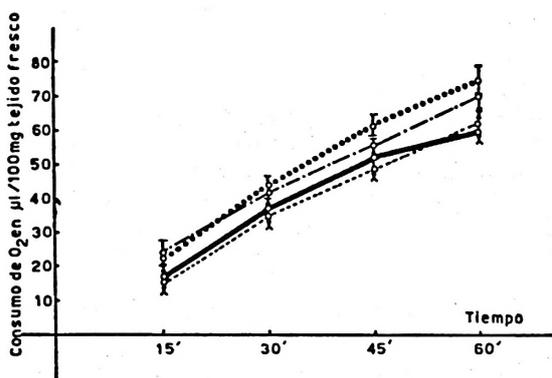


Fig. 2. Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de oxígeno en homogeneizado hepático *in vitro*.

El medio de incubación utilizado fue sacarosa 0,25 M tamponada a pH 7,4. Valores medios  $\pm$  E.S.M. a partir de los cuales se han calculado las ecuaciones de las rectas de regresión. Entre paréntesis se indica el número de frascos por experimento.

- (—) Control (15); ecuación de regresión:  $y = 0,957x + 5,938$ .
- (---) Exp.  $10^{-2}$  M (15); ecuación de regresión:  $y = 0,982x + 4,300$ .
- (-.-.-) Exp.  $5 \times 10^{-3}$  M (15); ecuación de regresión:  $y = 0,952x + 11,952$ .
- (.....) Exp.  $10^{-3}$  M (14); ecuación de regresión:  $y = 1,106x + 9,318$ .

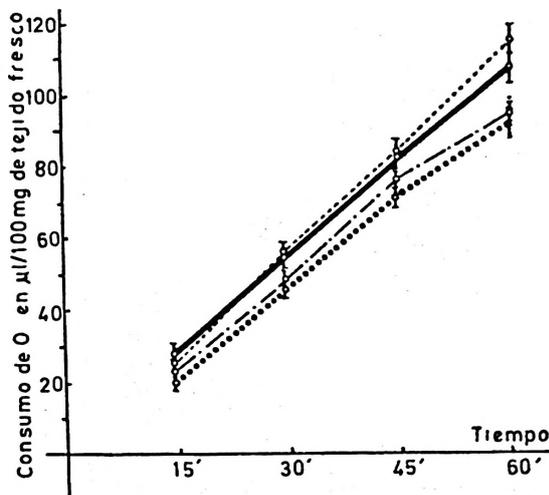


Fig. 3. Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de oxígeno en homogeneizado de cerebro de rata *in vitro*.

El medio de incubación utilizado es sacarosa 0,25 M tamponada a pH 7,4. Valores medios  $\pm$  E.S.M. a partir de los cuales se han calculado las ecuaciones de las rectas de regresión. Entre paréntesis se indica el número de frascos por experimento.

- (—) Control (20); ecuación de regresión:  $y = 1,829x + 0,800$ .
- (---) Exp.  $5 \times 10^{-3}$  M (10); ecuación de regresión:  $y = 1,669x + 1,053$ .
- (-.-.-) Exp.  $10^{-2}$  M (10); ecuación de regresión:  $y = 1,549x + 2,563$ .
- (.....) Exp.  $10^{-3}$  M (10); ecuación de regresión:  $y = 1,954x + 2,024$ .

tiempos, siendo a los 60 minutos esta inhibición de un 15,5 %. A la concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M sólo a los 30 y 45 minutos de la incubación se deprime significativamente ( $P < 0,025$ ) el consumo de oxígeno (fig. 3).

En cortes de cerebro, el clorhidrato de piridoxina a las concentraciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  M inhibe el consumo de oxígeno a los 60 minutos en un 13,5 y 16,0 %, respectivamente ( $P < 0,01$ ), a la concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M y al mismo tiempo la inhibición es de un 21,5 % ( $P < 0,02$ ) cuando la concentración de potasio en el medio es 5 mM (fig. 4). Elevando la con-

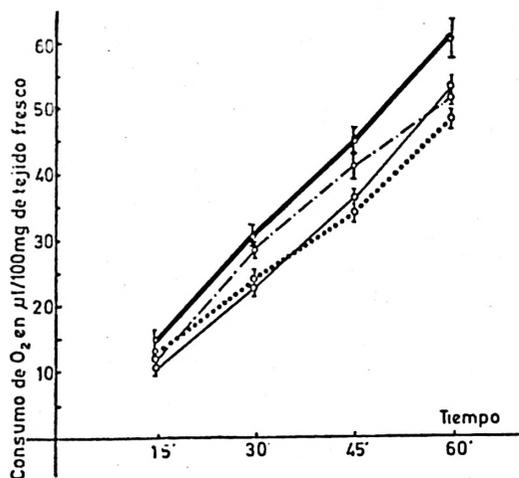


Fig. 4. Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de oxígeno en cortes de cerebro de rata in vitro.

Medio de incubación, solución Krebs-Ringer-Fosfato con una concentración de potasio 5 mM. Valores medios  $\pm$  E.S.M. a partir de los cuales se calcularon las ecuaciones de regresión. Entre paréntesis se indica el número de cortes por cada experimento.

(—) Control (12); ecuación de regresión:  $y = 1,005x + 0,575$ .

(.....) Exp.  $5 \times 10^{-3}$  M (6); ecuación de regresión:  $y = 0,774x + 0,900$ .

(- - - -) Exp.  $10^{-2}$  M (6); ecuación de regresión:  $y = 0,880x + 1,250$ .

(- - - -) Exp.  $10^{-3}$  M (6); ecuación de regresión:  $y = 0,823x + 3,500$ .

concentración de potasio a 100 mM, el clorhidrato de piridoxina sólo a la concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M inhibe el consumo de oxígeno en un 21,5 % ( $P < 0,01$ ) a los 60 minutos (fig. 5).

c) *Diafragma de rata*. El clorhidrato de piridoxina en diafragma y sólo a la concentración de  $10^{-2}$  M aumenta significativamente ( $P < 0,02$ ) el consumo de oxígeno a los 60 minutos en un 7 %. Las otras concentraciones estudiadas ( $5 \times 10^{-3}$  y  $10^{-3}$  M) no producen modificaciones significativas (tabla 1).

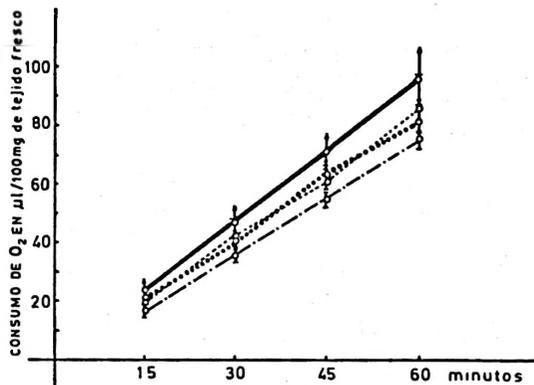


Fig. 5. Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de oxígeno en cortes de cerebro de rata in vitro en un medio con concentración elevada de potasio.

Medio de incubación, solución Krebs-Ringer-Fosfato con una concentración de potasio 100 mM. Valores medios  $\pm$  E.S.M. a partir de los cuales se calculan las ecuaciones de regresión. Nueve cortes para cada experimento.

(—) Control; ecuación de regresión:  $y = 1,613x - 0,642$ .

(- - - -) Exp.  $10^{-3}$  M; ecuación de regresión:  $y = 1,448x - 1,545$ .

(- - - -) Exp.  $5 \times 10^{-3}$  M; ecuación de regresión:  $y = 1,281x - 1,596$ .

(.....) Exp.  $10^{-2}$  M; ecuación de regresión:  $y = 1,338x + 2,207$ .

## Discusión

ARÉVALO *et al.* (1) describieron un efecto depresor del consumo de oxígeno y glucosa inducido por fosfato de piridoxal en cortes y homogeneizados de cerebro que son confirmados por los resultados obtenidos con piridoxina. Esta inhibición del consumo de oxígeno del tejido cerebral parece apoyar las observaciones de SPIES *et al.* (18) sobre el efecto sedante y anti-convulsivante de la piridoxina en el hombre, las de BALZER *et al.* (3) y KRAFT *et al.* (10) que demostraron que la inyección de 10 mg endovenosos en gato provoca una intensa sedación; por otra parte, la piridoxina antagoniza las convulsiones provocadas por hidrazidas y tiosemicarbazonas

Tabla 1. Efecto del clorhidrato de piridoxina sobre el consumo de oxígeno de diafragma de rata *in vitro*.

Valores medios  $\pm$  E.S.M. experimentos pares, entre paréntesis debajo de los valores controles el número de pares (diafragmas), debajo de los valores experimentales, la significación correspondiente. Medio de incubación solución Krebs-Ringer-fosfato pH 7,4

Tiempo min	Consumo de oxígeno $\mu$ l/100 mg tejido fresco	
	Control	Piridoxina $10^{-2}$ M
15	25,3 $\pm$ 2,1 (8)	26,5 $\pm$ 2,2 (0,40 < P < 0,50)
30	51,2 $\pm$ 0,9 (8)	55,6 $\pm$ 0,6 (P < 0,005)
45	77,3 $\pm$ 1,5 (8)	84,5 $\pm$ 1,4 (P < 0,01)
60	105,1 $\pm$ 2,2 (8)	113,5 $\pm$ 0,8 (P < 0,02)
r *	y = 1,768x - 1,571	y = 1,933x - 2,454

\* r = Ecuación de regresión.

(9), si bien en este efecto está implicado el GABA (7).

ASHFORD y DIXON (2) y DICKENS y GREVILLE (5) describieron que el aumento de la concentración de potasio en el medio de incubación incrementa el consumo de oxígeno y glucosa del tejido cerebral; este efecto no parece deberse a la hipertonia de la solución y se ha atribuido a un desacoplamiento de la fosforilización oxidativa (15). BASSI y BERNELLI-ZAZZERA (4) confirmaron estos resultados y observaron que el estímulo de la respiración cerebral inducido por potasio sólo ocurre en presencia de glucosa y en atmósfera de oxígeno. En los resultados obtenidos cuando la concentración de potasio en el medio es 100 mM, se observa un incremento significativo del consumo de oxígeno y glucosa (figs. 1 y 5), que tiene lugar en atmósfera de aire, discrepando de los hallazgos de BASSI y BERNELLI-ZAZZERA (4). Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre con otros depresores centrales (19),

la depresión del consumo de oxígeno y glucosa inducida por el clorhidrato de piridoxina es cuantitativamente similar tanto si la concentración de potasio en el medio de incubación es 5 ó 100 mM.

En cerebro (cortes y homogeneizados) el clorhidrato de piridoxina a la concentración de  $10^{-2}$  M o no modifica los consumos de oxígeno y glucosa o su efecto es menor que el que se obtiene con concentraciones más inferiores; la explicación de este fenómeno es difícil. El clorhidrato de piridoxina a dosis terapéuticas (que siempre son elevadas) es sedante y anti-convulsivante (18), pero a dosis tóxicas provoca convulsiones y es excitante del sistema nervioso central (3, 10). Los fármacos sedantes habitualmente deprimen el consumo de oxígeno cerebral (6, 12, 19), mientras que los convulsivantes o no lo modifican o lo incrementan (21).

El clorhidrato de piridoxina produce un ligero incremento del consumo de oxígeno en homogeneizado hepático y diafragma en contradicción con los resultados de algunos autores (8, 11) obtenidos con piridoxina y algunos de sus derivados. En homogeneizado hepático este incremento aparece con la concentración  $5 \times 10^{-3}$  M y no con  $10^{-2}$  M; el porqué, es difícil de explicar.

### Resumen

El clorhidrato de piridoxina *in vitro* a las concentraciones de  $5 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  M deprime el consumo de oxígeno y glucosa de cortes de cerebro de rata, siendo este efecto independiente de la concentración de potasio en el medio de incubación; deprime el consumo de oxígeno de homogeneizado de cerebro total e incrementa el consumo de diafragma y homogeneizado de hígado de rata.

### Bibliografía

1. ARÉVALO, J. M., VELASCO, A., RODRÍGUEZ, L. P. y ARMUJO, M.: *Arch. Ins. Farm. Exp. (Medicina)*, 22, 47, 1970.
2. ASHFORD, C. A. y DIXON, K. C.: *Biochem. J.* 29, 157, 1935.

3. BALZER, H., HOLTZ, P. y PALM, D.: *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **239**, 520, 1960.
4. BASSI, M. y BERNELLI-ZAZZERA, A.: *Experientia*, **16**, 430, 1960.
5. DICKENS, G. y GREVILLE, G. D.: *Biochem. J.*, **29**, 1468, 1935.
6. GHOSH, J. J. y QUASTEL, J. H.: *Nature* **174**, 28, 1954.
7. HOLTZ, P. y PALM, D.: *Pharmacol. Rev.*, **16**, 113, 1964.
8. HUSSON, J. M.: *Prog. Medical*, **97**, 231, 1969.
9. KILLAN, K. F. y BAIN, J. A.: *J. Pharmacol.*, **119**, 255, 1957.
10. KRAFT, H. G., FIEBIO, L. y HOTOVY, R.: *Arzneimittel Forsch.*, **11**, 922, 1961.
11. LAMARCHE, M. y MARIGNAC, B.: *Ann. med. Nancy*, **8**, 123, 1969.
12. MCILWAIN, H.: *Biochem. J.*, **53**, 403, 1953.
13. MCILWAIN, H. y BUDDLE, H. L.: *Biochem. J.*, **53**, 412, 1953.
14. MC KHAN, G. M., MICKELSEN, O. y TOWER, D. B.: *Am. J. Physiol.*, **200**, 34, 1961.
15. ROSSITER, R.: *Metabolism of the Nervous System*. Edited by D. RICHTER, p. 355. Pergamon Press, London, 1957.
16. SNEDECOR, G. W.: *Métodos Estadísticos C.E.C.S.A.*, Méjico, 1964.
17. SOLS, A. y DE LA FUENTE, G.: *R. esp. Fisiol.*, **13**, 231, 1957.
18. SPIESS, T. D., HIGHTOWER, D. P. y HUBBARD, L. M.: *J.A.M.A.*, **115**, 292, 1942.
19. TAMARIT, J.: *Actas V Reunión Nacional Soc. Esp. Ci. Fisiol.*, p. 303, 1959.
20. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. y STAUFFER, J. F.: *Manometric and Biochemical Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972.
21. VELASCO MARTÍN, A., ARÉVALO ALONSO, J. M. y CASTAÑEDA CASADO, J.: *Experientia*, **28**, 1070, 1972.