

BIOEVALUACION DEL ACIDO 2-AMINO-6-YODOACETAMIDO HEXANOICO (AYAH) EN DESARROLLO POSTNATAL Y CICATRIZACION CUTANEA EN ANIMALES

*Roberto Mendoza Zepeda**
*Ricardo Yáñez Avila**
*Guillermo Ceballos Reyes**
*José G. Trujillo Ferrara**
*Laura Ruz Bonilla***

INTRODUCCION

En los últimos años las poliaminas han alcanzado gran importancia biológica debido a que se ha demostrado su participación en los procesos de multiplicación, crecimiento y diferenciación celular (Jane y cols., 1978).

Las poliaminas más importantes en animales son: putrescina, espermidina, espermina y cadaverina. Su biosíntesis se describió inicialmente en bacterias y posteriormente se observó que era similar en humano (Campbell y cols., 1978).

Existen evidencias experimentales acerca de que la concentración de poliaminas y las enzimas que las sintetizan se encuentran incrementadas en tejidos en proliferación. En el hombre la velocidad de síntesis de estos compuestos está determinada por la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), misma que se ha intentado inhibir en forma selectiva e irreversible con objeto de encontrar un procedimiento terapéutico para las enfermedades ca-

racterizadas por incremento en la multiplicación celular.

ANTECEDENTES

Con el objeto de obtener inhibidores de la ODC útiles en el tratamiento de enfermedades proliferativas, se ha sintetizado una serie de compuestos que hasta el momento han sido de utilidad como antivirales, antiparasitarios, anticonceptivos, en el estudio de los procesos de multiplicación, crecimiento y diferenciación celular. Al respecto, los compuestos más destacados son la α -metil ornitina (MO) un inhibidor competitivo (Mamont, 1976), y la DL- α -difluorometil ornitina (DFMO) un inhibidor irreversible de tipo suicida (Fozard 1980). Sin embargo, ninguno de los inhibidores de la ODC sintetizados hasta la fecha ha podido cristalizar como fármaco de utilidad clínica en humanos (Yáñez y cols., 1985).

Por tal motivo, en el Departamento de Farmacología de la Sección de Graduados de la Escuela Superior de Medicina del IPN, se han diseñado y sintetizado una serie de inhibidores selectivos e irreversibles de la ODC. Entre estos compuestos se encuentra el AYAH (Iraola, 1985) que constituye el motivo de este estudio.

* Departamento de Bioquímica y Biofísica y Departamento de Farmacología. Sección de Graduados de la Escuela Superior de Medicina del IPN.

** Bioterio de la Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

El AYAH corresponde al tipo de antimetabolitos no clásicos propuesto por Baker (1962). La diferencia entre los inhibidores clásicos y los no clásicos radica en que éstos tienen tamaño superior al metabolito que antagonizan por introducción de grupos voluminosos, respetándose los grupos funcionales necesarios para que se una al sitio activo de la enzima. La parte voluminosa del inhibidor contiene un grupo funcional capaz de reaccionar con la apoenzima. Este tipo de inhibidores dirigidos al sitio activo actúan en forma irreversible.

El ácido 2-amino-5-yodoacetamido pentanoico (AYAP), similar estructuralmente al AYAH, inhibe *in vitro* a la ODC procedente de hepatoma de rata (Rodríguez y Wong, 1985) y produce resorción fetal en ratas, con la administración intrauterina de 10 microgramos del compuesto (Méndez y cols., 1984). Acerca del AYAH se sabe que su DL_{50} en ratones BALB/c es de 75 mg/kg y en ratas Wistar de 32 mg/kg (Trujillo y cols., 1978).

También se ha demostrado que la estructura propuesta para el AYAH concuerda con los resultados del análisis elemental de yodo y

nitrógeno, espectral infrarrojo y de resonancia magnética nuclear. Como criterio de pureza se utilizó el análisis cromatográfico, es decir, que el AYAH reúne en teoría las características estructurales necesarias para inhibir a la enzima en forma específica e irreversible (Fig. 1).

Por todo lo anterior creemos que, si el AYAH inhibe a la ODC y ésta enzima es indispensable para la multiplicación celular, entonces la aplicación de este fármaco en los animales en estudio inhibirá su crecimiento y disminuirá la velocidad de cicatrización cutánea.

MATERIAL Y METODO

Para medir la actividad biológica del AYAH se utilizaron dos modelos de experimento: efecto del AYAH en desarrollo postnatal de ratones singénicos BALB/c y en cicatrización cutánea en ratas Wistar.

a) Efecto del AYAH sobre el desarrollo postnatal de ratones singénicos BALB/c

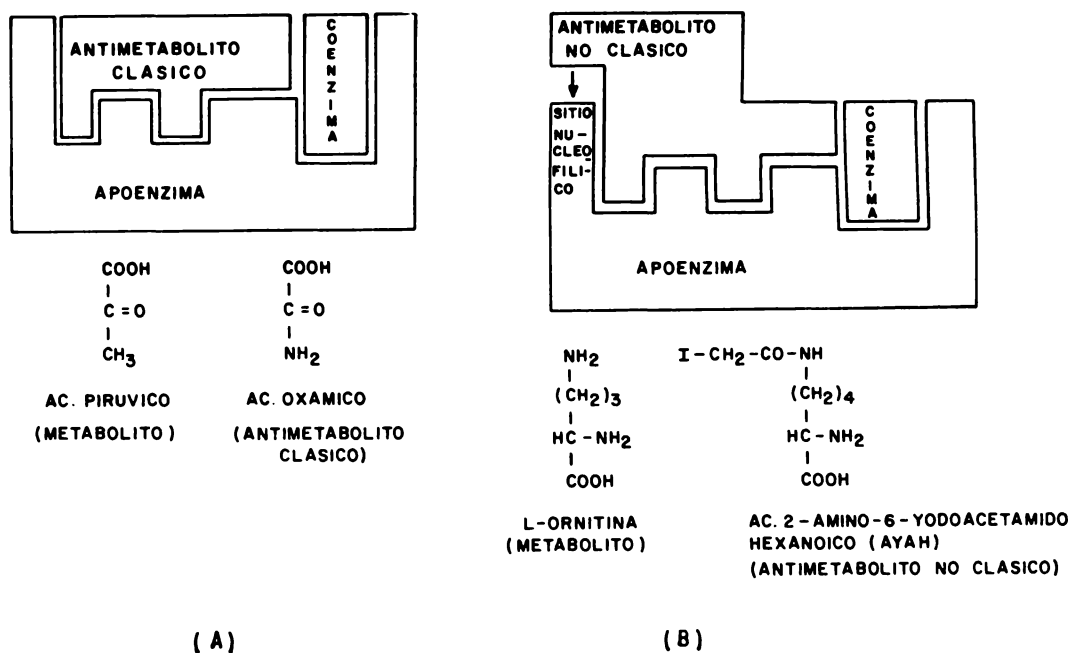


Figura 1.

Para este estudio se utilizaron ratones singénicos BALB/c recién destetados, de 11.9 ± 2.2 g. La variable controlada fue el peso, es decir, el incremento ponderal de los ratones durante sus primeros días de vida.

Se hizo distribución aleatoria para formar tres grupos de cinco ratones cada uno. La aplicación del fármaco fue por vía intraperitoneal; a un grupo se le aplicó 5 mg/kg; a otro, 15 mg/kg; al tercer grupo se le aplicó solución salina isotónica en relación proporcional a su peso y sirvió como testigo.

Las inyecciones se aplicaron cada tres días y durante tres semanas. El incremento ponderal se evaluó cada 48 horas. Se realizaron dos repeticiones del experimento.

b) Efecto del AYAH sobre la velocidad de cicatrización cutánea en rata Wistar

Se utilizaron ratas Wistar de tres meses de edad de la misma camada. La aplicación del fármaco fue por vía intramuscular.

Se hizo una distribución aleatoria para formar cuatro grupos de seis animales cada uno. A tres grupos se les aplicó dosis de 5, 10, y 15 mg/kg respectivamente. El grupo restante sirvió como testigo y se le aplicó solución salina isotónica IM en relación proporcional a su peso.

El mismo día de la aplicación de la primera dosis de AYAH, se realizó en la piel del dorso de las ratas una herida de 1 cm², utilizando un sacabocado. El índice de cicatrización se evaluó por la técnica de Lecomte de Noty (1942) en la cual se determina el índice de cicatrización cada cuatro días utilizando la fórmula: $S1 - S2/S1 \times t$; donde S1 = superficie inicial, S2 = superficie final y t = tiempo (cada cuatro días).

Las inyecciones de AYAH fueron cada 24 horas durante los primeros cinco días; posteriormente se efectuaron cada 48 horas hasta finalizar el estudio, éste se terminó a los 20 días de haber realizado la excisión de piel.

RESULTADOS

Efecto de AYAH sobre incremento ponderal de ratones singénicos BALB/c

El análisis de varianza de los resultados mostró que el AYAH inhibe el crecimiento de los ratones sometidos al tratamiento. El efecto del fármaco fue estadísticamente significativo con $p \leq 0.05$. (Tabla 1.)

Para las comparaciones múltiples se utilizó el método de Tukey, el cual mostró que el fármaco ejerce efecto estadísticamente significativo sólo a la dosis de 15 mg/kg. (Tabla 2.)

Efecto del AYAH sobre cicatrización en rata Wistar

Los resultados se analizaron por medio de la técnica de análisis de varianza para datos de perfiles y se encontró que el fármaco inhibe la velocidad de cicatrización cutánea. El efecto del compuesto fue estadísticamente significativo con $p \leq 0.05$. (Tabla 3.)

Para las comparaciones múltiples se utilizó la técnica de Scheffé, encontrándose diferencias significativas con $p \leq 0.05$ entre las dosis 0 y 10, 0 y 15, 5 y 10, y 5 y 15 mg/kg. (Tabla 4.)

Por otra parte, la gráfica del análisis para datos en perfiles nos muestra que al decimosegundo día de realizada la excisión de piel, los grupos correspondientes a la dosis de 10 y 15 mg/kg de AYAH mejoran su respuesta media de cicatrización, éste fenómeno es más notable con la dosis mayor del fármaco (Fig. 2). Este resultado es contrario al encontrado en el resto del experimento, en el que la tendencia es de disminución de la velocidad de cicatrización, en relación proporcional al incremento en la dosis de AYAH, tal como se demuestra por la correlación encontrada ($r = -0.92$) válida estadísticamente (Fig. 3).

DISCUSION

Si bien es cierto que el AYAH produce inhibición de crecimiento en ratones BALB/c y disminuye la velocidad de cicatrización cutánea en ratas, también lo es que presenta un efecto bimodal. Esto es, que a dosis bajas (5 mg/kg) produce efecto relativamente contrario al encontrado con dosis de 10 y 15 mg/kg, en las que es clara la tendencia de inhibición de los procesos estudiados.

La interpretación de este fenómeno podría

TABLA 1

ANALISIS DE VARIANZA DEL INCREMENTO PONDERAL DE RATONES BALB/c SINGENICOS SOMETIDOS A TRATAMIENTO CON AYAH

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	FC	Fp ≤ 0.05, 2,12
Tratamiento	2	22.94	11.47	6.91	3.89
Error	12	20.00	1.67		
TOTAL	14	42.94			

El AYAH produce inhibición del crecimiento. Su efecto es estadísticamente significativo con $p \leq 0.05$.

TABLA 2

PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION DE MEDIAS DEL INCREMENTO PONDERAL DE RATONES BALB/c SINGENICOS SOMETIDOS A TRATAMIENTO CON AYAH

T (0 mg) \bar{x}_i , 10.06 Comparaciones	5 mg 9.08 $D\bar{x}_i - \bar{x}_j$	15 mg 7.72 Significancia
T vs. 5 mg.	0.98	NS
T vs. 15 mg.	2.34	S
5 vs. 15 mg.	1.36	NS

El AYAH produce inhibición del crecimiento de los ratones tratados, sólo a dosis de 15 mg/kg.

TABLA 4

TECNICA DE SCHEFFE PARA LAS COMPARACIONES MULTIPLES

Dosis (mg/kg)	0	5	10	15
$\bar{x} \cdot j$	564.99	559.59	433.59	420.45

Las comparaciones múltiples con la técnica de Scheffé encontraron diferencias significativas con $p \leq 0.05$ entre la dosis 0 y 10, 0 y 15, 5 y 10 y 5 y 15.

* Medias unidas por una línea continua no son diferentes.

TABLA 3

ANALISIS DE VARIANZA EN PERFILES

Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M.	FC	Fp ≤ 0.05
Tiempo de cicatrización	92 280.95	3	30 760.32	9.012	$F_{1,19} = 4.38$
Grupos de tratamientos	26 627.53	3	8 875.84	4.548	$F_{3,19} = 3.13$
Ratas (dentro de los tratamientos)	37 078	19	1 951.47		
Tiempo x tratamientos	56 666.12	9	6 296.23	1.84	$F_{3,19} = 3.13$
Ratas x tiempos (dentro de tratamientos)	194 439.6	57	3 411.22		
TOTAL	407 092.2	91			

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de la técnica de anova en perfiles, encontrándose significativo el efecto del fármaco con $p \leq 0.05$.

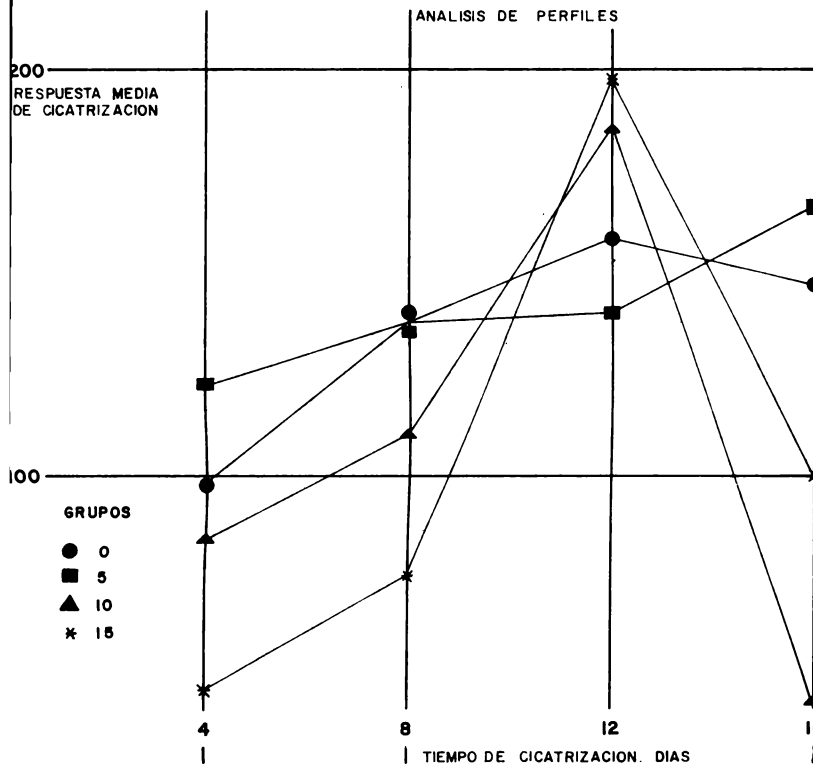


Figura 2.

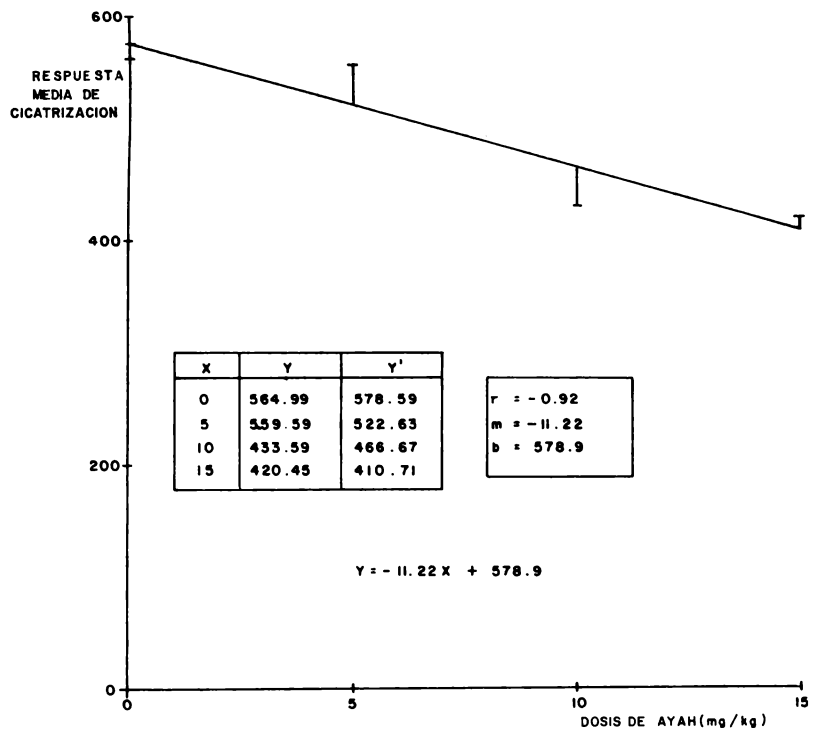


Fig. 3. Efecto del ácido 2-amino-6-yodoacetamido hexano (AYAH) sobre cicatrización cutánea en ratas Wistar de tres meses de edad.

explicarse por la teoría de la ampliación genética, en la cual se postula que al ocurrir inhibición de la ornitina descarboxilasa se copian y se ponen a funcionar genes que codifican la síntesis de dicha enzima.

Sin embargo, la dilucidación de este problema será objeto de otro estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados enunciados permiten suponer que el AYAH disminuye la velocidad de multiplicación celular, además de que posiblemente inhiba a la ornitina descarboxilasa *in vivo*.

De ser cierto lo anterior, la hipótesis de trabajo planteada tendría por primera vez apoyo experimental. A reserva de confirmar los resultados iniciales con nuevos trabajos que actualmente tenemos en marcha.

RESUMEN

Existen evidencias experimentales de que las poliaminas son esenciales para la reproducción celular. La enzima limitante de su biosíntesis es la ornitina-d Descarboxilasa (ODC). Se sabe que hay estrecha relación entre multiplicación celular e incremento en la actividad de ODC y síntesis de poliaminas.

Se ha comprobado que el AYAH actúa como inhibidor de la ODC *in vitro*, que produce resorción fetal en rata con la administración intrauterina de 10 microgramos del fármaco, y que su LD₅₀ en ratones singénicos BALB/c es de 75 mg/kg y en ratas Wistar de 32 mg/kg.

Se realizó la bioevaluación del ácido 2-amino-6-yodoacetamido hexanoico en desarrollo postnatal de ratones singénicos BALB/c y en cicatrización cutánea de ratas Wistar, y se observó que el AYAH inhibe el crecimiento de los ratones singénicos BALB/c mediante la aplicación intraperitoneal de 15 mg/kg, y disminuye la velocidad de cicatrización cutánea de ratas Wistar con la aplicación intraperitoneal de 10 y 15 mg/kg de AYAH.

SUMMARY

Experimental evidence exist which show

that polyamines are essential for cellular reproduction. The limiting enzyme for its biosynthesis is the ornithinedecarboxylase (ODC). It is known that there is a close relationship between cellular multiplication and an increase of the ODC activity and synthesis of polyamines.

It has been demonstrated that AYAH acts as an ODC inhibitor *in vitro* that it produces fetal resorption in the rat by intrauterine administration of 10 micrograms of the drug and that its LD₅₀ in syngenic BALB/c mice is of 75 mg/kg and in Wistar rats is of 32 mg/kg.

Bioassessment of 2-amino-6-iodoacetamide hexanoic acid was done on the postnatal development of syngenic BALB/c mice and in skin healing of Wistar rats and it was shown that AYAH inhibits the growth of syngenic BALB/c mice by the intraperitoneal administration of 15 mg/kg, and decreases the rate of skin healing of Wistar rats by intraperitoneal administration of 10 and 15 mg/kg of AYAH.

BIBLIOGRAFÍA

- Baker, B.R.:** "Non-classical antimetabolites". VIII. "The bridge principle of specificity with exo-alkylating irreversible inhibitors" *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 1155-1161 (1962).
- Jane, J., H. Poso y A. Raina:** "Polyamines in rapid growth and cancer". *Biochim. Biophys. Acta*, **473**: 241-293 (1978).
- Campbell, R.A., D.R. Morris, D. Bartos, G.D. Daves y F. Bartos;** (editores). *Advances in Polyamine Research*, Vol. 1, Raven Press, Nueva York (1978).
- Canellakis, Es y D. Viceps-Madore:** "The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines". *Curr. Topics Cell Reg.*, **15**: 155-202 (1979).
- Fozard, J.R.:** "L-ornithine decarboxylase: an essential role in early mammalian embryogenesis". *Science*, **208**: 505-508 (1980).
- Mamont, P.S.:** "Alpha-metilornithine a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1626-1630 (1976).
- Russell, D.H.:** "Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients". *Nature*, **233**: 144-145 (1971).
- Fessenden, R.J. y J.S. Fessenden:** *Organic Chemistry*, 2a. Ed., Willard Grant Press, Boston, Massachusetts (1982).
- Tyms, A.S. y J.D. Williamson:** "Inhibitors of polyamine synthesis block human cytomegalovirus replication". *Nature*, **297**: 690-691 (1982).
- Du Noüy, L.:** *Le temps et la vie*. Ed. Gallimard, Francia (1963).

- Yáñez, A.R., A.A. Oriol, M.A. Montiel, F.J. Trujillo, V.J. Ordorica, V.M. Ordorica, Z.R. Mendoza, R.G. Ceballos, C.R. García y R.C. Wong:** "Importancia biológica las poliaminas (parte I)". *Acta Médica de la Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional.* Vol. XXI, No. 81. México (1985).
- Iraola, J.R.C.:** "Síntesis del ácido 2-amino-6-yodoacetamido hexanoico, probable inhibidor de la ornitina descarboxilasa". Tesis Profesional de Químico Farmacéutico Industrial. ENCB, IPN. México, D.F. (1985).
- Rodríguez, P.L., R.I. Baeza, A.R. Yáñez y R.C. Wong:** "El ácido 2-amino-5-yodoacetamido pentanoico, un inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa". Comunicación a las Terceras Jornadas Científicas de Graduados del IPN. México, D.F. (1985).
- Méndez, J.D., C. Wong, A.R. Yáñez y J.J. Hicks:** "Inhibición del desarrollo embrionario de la rata por la administración intrauterina de ac. 2-amino-5-yodoacetamido valérico". Comunicación al XV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. A.C. Morelia (1984).
- Yáñez, A.R., F.J. Trujillo, R.G. Ceballos y Z.R. Mendoza:** "Estudio farmacológico del ácido 2-amino-6-yodoacetamido hexanoico". Comunicación al IX Congreso Nacional de Farmacología. Tampico (1985).