

INVESTIGACIÓN BÁSICA

Toxicidad y efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina y su modulación por azul de metileno. Comparación con L-arginina, nitrito y nitrato

Martha Elena Bravo Ávila,* Juan Manuel Araujo Álvarez,*,** Arturo Bustamante Quezada,* José Guadalupe Trujillo Ferrara,*

Resumen

El óxido nítrico es sintetizado a partir de L-arginina, reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa, esta molécula de vida efímera participa en varios procesos como: regulación de presión arterial, citotoxicidad y comunicación celular. Un gran número de sus acciones son inhibidas por azul de metileno, inhibidor de la guanilato ciclase. Moléculas análogas a la L-arginina con grupo guanidino libre, pueden funcionar como aportadores de óxidos de nitrógeno y tener acciones semejantes al óxido nítrico. En este trabajo se reporta el efecto hipotensor y toxicidad aguda de oxoborolidinona de L-arginina comparativamente con L-arginina, nitrito y nitrato, y su modulación con azul de metileno. La dosis letal media, en rata Wistar, para oxoborolidinona fue 169.0 ± 5 mg kg⁻¹ vía intraperitoneal y la dosis hipotensora media 10 nmoles kg⁻¹ vía femoral; ambos parámetros fueron desplazados claramente a la derecha por el pretratamiento con azul de metileno, juzgado por las dosis letal y dosis efectiva medias, la oxoborolidinona tuvo un efecto más potente que la L-arginina y nitrato pero semejante a nitrito. En todos los casos, excepto para nitrato, los efectos fueron modulados por azul de metileno, lo que sugiere que los efectos estudiados son mediados vía óxidos de nitrógeno.

Palabras clave: Óxido nítrico. Oxborolidinona de L-arginina. Óxido nítrico sintasa.
Key words: Nitric oxide. Oxborolidinone of L-arginine. Nitric oxide synthase.

* Depto. de Bioquímica. Lab. de Bioquímica Médica I y Sección de Graduados. Escuela Superior de Medicina, IPN. Plan de San Luis y Díaz Mirón Casco de Santo Tomás, México D.F. C.P. 11340.

** Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, C.P. 04960 México D.F.

Correspondencia:

Dr. José G Trujillo Ferrara. Departamento de Bioquímica. Laboratorio de Bioquímica Médica I y Sección de Graduados. Esc. Sup. de Med, IPN. Plan de San Luis y Díaz Mirón, Casco de Santo Tomás, México D.F., C.P. 11340. Teléfono y fax: 57296000 ext.62744 E-mail:gtuji@servet.sm.ipn.mx

Recepción: 12 de octubre de 2000

Aceptado: 13 de diciembre de 2000

Summary

TOXICITY AND HYPOTENSOR EFFECT OF OXBOROLIDINONE OF L-ARGININE AND ITS MODULATION BY METHYLENE BLUE AS COMPARED TO L-ARGININE

Nitric oxide is synthesized by constitutive oxide nitric synthase from the guanidine group of L-arginine. L-arginine, oxoborolidinone of L-arginine, nitrite and nitrate showed dose-dependent hypotensive effects after injection via the femoral vein in Wistar rats.

The hypotensive effects were shifted to the right after treatment with methylene blue, which is a synthetic phenothiazine inhibitor of guanylate cyclase.

Oxborolidinone of L-arginine had high hypotensive effects with an effective half dose of 10 nmoles kg⁻¹ and of μ moles kg⁻¹ for methylene blue. Methylene blue also attenuated the toxic effects of all the tested compounds.

(Arch Cardiol Mex 2001; 71:193-198).

Introducción

Desde que Furchtgott reportó que la vasodilatación es mediada por un factor relajante derivado del endotelio (EDRF),¹⁻³ se ha intensificado su estudio y se encontró que la naturaleza química del EDRF y sus propiedades farmacológicas son idénticas a las del óxido nítrico ($\bullet\text{N} = \text{O}$) que se forma a partir del grupo guanidino,⁴ de la L-arginina en el endotelio vascular, por acción de una enzima dependiente de calcio, la óxido nítrico sintasa ($\bullet\text{N} = \text{O}$ sintasa) presente en mamíferos. El $\bullet\text{N} = \text{O}$ difunde a partir de las células de origen a las células vecinas, en donde se une al grupo hemo^{5,6} de la guanilato ciclasa, activándola para producir guanosín monofosfato cíclico (GMPc).

El $\bullet\text{N} = \text{O}$ es inestable y de vida media breve (6-10 s). Después de formarse, se oxida a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-).

Por otro lado, se han estudiado varios análogos de la L-arginina, algunos de los cuales actúan como inhibidores y otros como sustrato de la $\bullet\text{N} = \text{O}$ sintasa. Por ejemplo, la guanidina monometil L-arginina (N^G-monometil L-arginina, L-NMMA), que inicialmente mostró ser un inhibidor de la formación de NO_2^- y NO_3^- en macrófagos,^{7,8} ahora es ampliamente utilizada para el estudio de esta vía en una variedad de sistemas biológicos.⁹ La L-arginina y sus derivados en el carbono carbonilo como el metil éster de L-arginina, tienen la característica común de conservar libre el grupo guanidino, estos compuestos han mostrado ser sustrato de la $\bullet\text{N} = \text{O}$ sintasa.

Por lo anterior, es posible la síntesis de compuestos derivados de L-arginina, sin modificar el guanidino, en los que se incorporen modificaciones al extremo α -amino y α -carboxilo y que le confieran lipofilia sin perder estabilidad y el reconocimiento de la enzima en pH fisiológico. Las oxoborolidinonas de L-aminoácidos en general y en particular la oxoborolidinona de L-arginina (1), son compuestos neutros con enlace boro-nitrógeno formando un anillo de 5 miembros. Este tipo de compuestos¹⁰⁻¹² es estable a la hidrólisis, a altas temperaturas y en pH de 2-8, lo cual hace que estas sustancias sean potencialmente atractivas para estudios biológicos. Asimismo, se sabe que el azul de metileno^{13,14} inhibe a la guanilato ciclasa y revierte sus efectos por un mecanismo aún no aclarado contundentemente. En este trabajo se sintetizó un compuesto que pudiera ser sustrato de la $\bullet\text{N} = \text{O}$ sintasa, la oxoborolidinona de L-arginina y se caracterizó. Se determinó su toxicidad y se probó su efecto hipotensor, estos efectos se modularon por azul de

metileno y se compararon con L-arginina, NO_2^- y NO_3^- en ratas Wistar.

Material y métodos

Material

Para todos los experimentos, se utilizaron reactivos grado analítico de diferentes marcas: E Merck, Baker, Sigma o Mallinckrodt.

En las pruebas de toxicidad y efecto hipotensor se utilizaron ratas Wistar, hembras o machos con peso aproximado de 250 g (250-300 g). La oxoborolidinona de L-arginina fue sintetizada y caracterizada en nuestro laboratorio por resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno, carbono y boro (^1H , ^{13}C , ^{11}B).

Métodos

1. *Síntesis de oxoborolidinona de L-arginina.* Se disolvieron 3.0 g (17.8 mmol) de L-arginina en 20 mL de agua acidulada a pH 3 (Solución A). Por separado se disolvió 1.418 g (18.92 mmol) de ácido difenil borínico en 100 mL de etanol; se agregó agua acidulada a pH 3 hasta formar una mezcla lechosa y enseguida se extrajo el ácido difenil borínico con éter etílico (Solución B). Se mezclaron las soluciones A y B y se mantuvieron a refljo por 4 horas. El producto se filtró y lavó con hexano.

2. *Caracterización de la oxoborolidinona de L-arginina.* El espectro de RMN del ^{11}B se determinó en un espectrómetro Joel Eclipse + 400 en solución de dimetil sulfóxido-hexadeuteriado (DMSO-d₆) usando $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ como referencia externa. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron con un aparato Joel GSX-270 en solución DMSO-d₆ usando tetrametil silano (TMS) como referencia interna. Los resultados fueron congruentes con la estructura, particularmente del ^{11}B tetracoordinado en +4 ppm.

3. *Toxicidad.* La aplicación de cada compuesto se realizó por vía intraperitoneal para encontrar la dosis letal 50 (DL₅₀), utilizando 10 lotes de 10 animales y un lote testigo.

Para determinar la toxicidad aguda de la oxoborolidinona de L-arginina, la L-arginina, NaNO_2 y NaNO_3 fueron aplicados a diferentes dosis, utilizando un volumen correspondiente a la centésima parte del peso del animal.

Para la toxicidad aguda de los compuestos de prueba modulada por azul de metileno, previamente a la aplicación de los compuestos se administró azul de metileno a concentración de 4 mg kg⁻¹.

4. *Efecto hipotensor.* Los animales se anestesiaron con uretano al 25%, se realizó disección de tráquea y paquete vascular de cuello, se practicó traqueostomía para asegurar una buena ventilación, se instaló catéter en la arteria carótida y se conectó a un transductor de presión. Para la aplicación de los compuestos se realizó disección de la vena femoral, se colocó catéter y aplicó inmediatamente 0.1 mL (300 UI) de heparina como anticoagulante. Para todos los compuestos de prueba se aplicó un volumen equivalente a la milésima parte del peso del animal a intervalos de 10 minutos y registró descenso de la tensión arterial (TA) en mmHg.

a) Clorhidrato de L-arginina. Se aplicaron las siguientes dosis: en mg kg^{-1} 25, 50, 100, 150, 200.

NaNO_2 , NaNO_3 y oxoborolidinona de L-arginina se utilizaron las siguientes concentraciones: 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} y 10^{-3} M en solución isotónica de cloruro de sodio.

b) Clorhidrato de L-arginina con azul de metíleno. Se utilizó azul de metíleno 10-20 mg kg^{-1} en solución isotónica de cloruro de sodio, administrado previamente a la aplicación del compuesto.

NaNO_2 , NaNO_3 y oxoborolidinona de L-arginina con azul de metíleno. Se utilizó azul de metíleno a la misma concentración, dosis, vía y condiciones que para L-arginina.

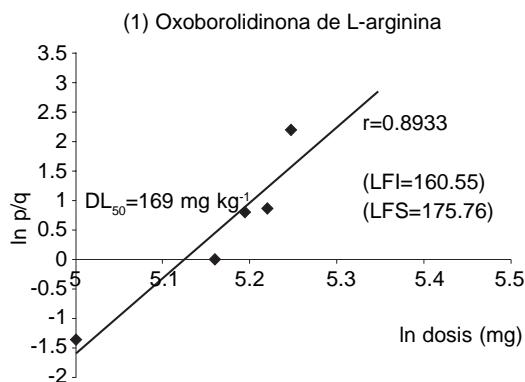
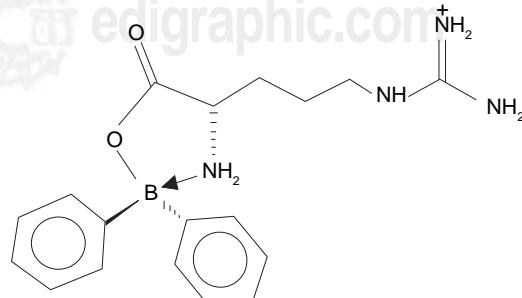
5. *Estadística.* Para el cálculo de toxicidad y efecto hipotensor se utilizó el método de Hill modificado, basado en el método de Lehmann. Se utilizó t de Student para establecer la diferencia entre medias.

Resultados

1. *Toxicidad.* En la toxicidad aguda de oxoborolidinona de L-arginina, L-arginina (*Figs. 1 y 2*), NaNO_2 y NaNO_3 (datos no mostrados), los animales mostraron síntomas semejantes como: contracción de los músculos abdominales, diarrea, flacidez y cianosis. Después de 10 minutos, presentaron somnolencia, respiración agitada y, finalmente, murieron por paro respiratorio.

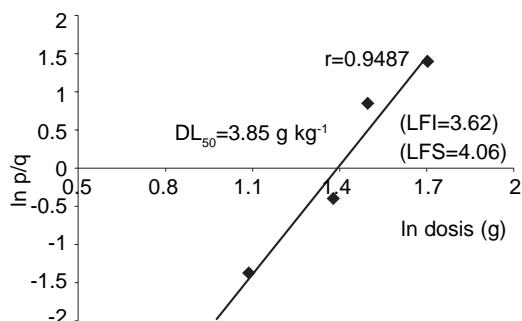
Para el caso de la oxoborolidinona de L-arginina, se obtuvo una DL_{50} de 169.0 mg kg^{-1} de peso corporal (160.50 a 175.76), valor muy cercano al obtenido con NO_2^- , lo que significa una relativa baja toxicidad pero 20 veces más potente que para L-arginina (*Tabla I*).

En la toxicidad modulada por azul de metíleno se obtuvieron curvas con desplazamiento a la



P = Número de animales muertos/Número de animales tratados y $q = 1-p$
 LFI: Límite fiduciario inferior
 LFS: Límite fiduciario superior

Fig. 1. Estimación de la DL_{50} de oxoborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho (230-270 g). La dosis letal media se obtuvo con 169.0 mg kg^{-1} . Determinada por el método de Hill modificado.



P = Número de animales muertos/Número de animales tratados y $q = 1-p$
 LFI: Límite fiduciario inferior
 LFS: Límite fiduciario superior

Fig. 2. Estimación de la DL_{50} del clorhidrato de L-arginina en rata Wistar macho (230-270 g). La dosis letal media se obtuvo con 3.85 g kg^{-1} . Determinada por el método de Hill modificado.

derecha y con la misma pendiente. Sin embargo, la curva obtenida para oxborolidinona de L-arginina observa una pendiente menos pronunciada que en los demás casos; en tanto, con el NaNO_3 se obtuvo una curva dosis-respuesta con diferente pendiente (datos no mostrados).

2. *Efecto hipotensor.* En el efecto hipotensor de oxborolidinona de L-arginina, L-arginina (*Figs. 3 y 4*), NaNO_2 y NaNO_3 (datos no mostrados) se obtuvieron curvas con la misma pendiente. Lo que sugiere, probablemente, el mis-

Tabla I. DL_{50} en rata Wistar vía intraperitoneal.

L-arginina	3.85 g kg^{-1}
NaNO_2 sin azul de metileno	79.58 mg kg^{-1}
NaNO_2 con azul de metileno	114.2 mg kg^{-1}
NaNO_3 sin y con azul de metileno	2.29 g kg^{-1}
oxborolidinona de L-arginina sin y con azul de metileno.	169.0 mg kg^{-1}

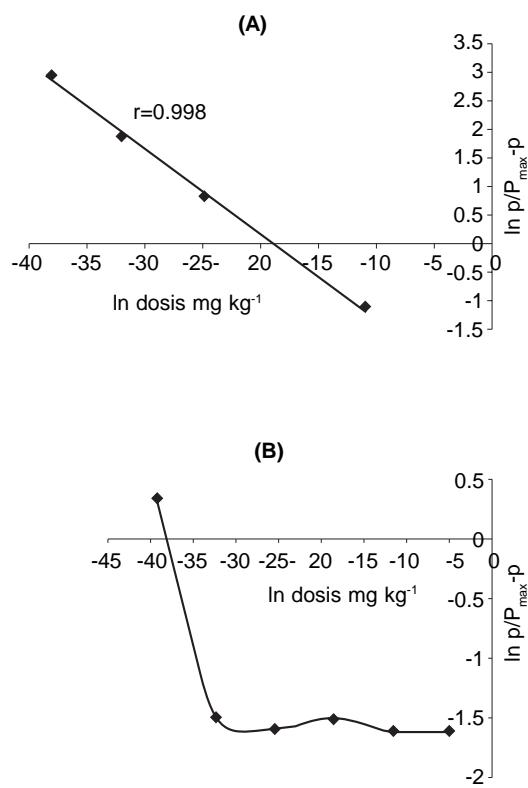


Fig. 3. Efecto hipotensor de oxborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho (230-270 g). Gráfica A sin azul de metileno, gráfica B con azul de metileno, en donde P_{max} es el efecto de la dosis máxima y P es el efecto a diferentes dosis. Determinado por el método de Hill modificado.

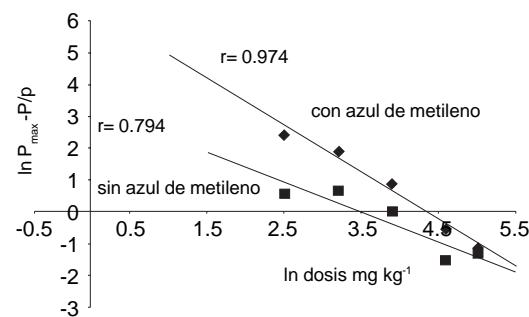


Fig. 4. Efecto hipotensor del clorhidrato de L-arginina en rata Wistar macho (230-270 g). En ausencia de azul de metileno es de 40.44 mg kg^{-1} y en presencia de azul de metileno se obtuvo de 77.47 mg kg^{-1} . En donde P_{max} es el efecto de la dosis máxima y p es el efecto a diferentes dosis. Determinado por el método de Hill modificado.

Tabla II. DE_{50} en rata Wistar vía femoral.

L-arginina sin azul de metileno	40.44 mg kg^{-1}
L-arginina con azul de metileno	77.47 mg kg^{-1}
NaNO_2 sin azul de metileno	$2.06 \times 10^{-9} \text{ mg kg}^{-1}$
NaNO_2 con azul de metileno	$2.2 \times 10^{-6} \text{ mg kg}^{-1}$
NaNO_3 sin y con azul de metileno	$9.32 \times 10^{-9} \text{ mg kg}^{-1}$
Oxborolidinona de L-arg. sin azul de metileno	$1.52 \times 10^{-8} \text{ mg kg}^{-1}$
Oxborolidinona de L-arg. con azul de metileno	saturación, no hay efecto dosis respuesta

mo mecanismo de vasorelajación. Para el caso de la oxborolidinona de L-arginina, el valor de la dosis efectiva 50 (DE_{50}), comparado con NO_2^- y NO_3^- existe diferencia significativa, con el primero no con el segundo.

Para el efecto hipotensor modulado por azul de metileno (*Figs. 3 y 4*), la curva obtenida para la oxborolidinona de L-arginina tiene forma parabólica, que indica efecto no dependiente de la dosis. Comparado con los demás compuestos en los que sólo se atenúa el efecto hipotensor (*Tabla II*), pero existe efecto dependiente de dosis.

Discusión

En relación con la toxicidad aguda, los signos presentados por los animales muestran que es probable que la toxicidad se deba a la generación de óxidos de nitrógeno vía $\bullet\text{N} = \text{O}$ pues se sabe que el grupo guanídino de la L-arginina es precursor de $\bullet\text{N} = \text{O}$ y finalmente éste se oxida a NO_2^- y NO_3^- , todos los animales tratados presentaron clara cianosis.

Cuando los animales fueron tratados previamente con azul de metileno, la semejanza de las pen-

dientes de las curvas y el desplazamiento a la derecha indican que el efecto probablemente se lleva a cabo por el mismo mecanismo; es decir, por activación de la guanilciclasa o reducción de las enzimas ferrohemox⁶ ya que se inhibe con azul de metileno que impide la elevación del GMPc, a diferencia del resultado con NaNO₃ que sugiere que la toxicidad es debida a un mecanismo diferente, juzgado por la diferencia en las pendientes; sus efectos no fueron inhibidos por el azul de metileno.

Del mismo modo, para el caso de la oxoborolidinona de L-arginina, aunque los síntomas presentados por los animales fueron iguales que para los demás compuestos, la curva obtenida sugiere que el efecto tóxico se lleva a cabo por varios mecanismos, tal vez el efecto del compuesto sea a partir de la molécula íntegra pues se sabe que moléculas como la saxitoxina y tetrodotoxina^{15,16} cuya característica común es tener grupos guanidino actúan bloqueando canales de sodio y produciendo una sintomatología similar a la que mostraron los animales de este trabajo, además de cianosis y convulsiones coherentes con efectos vía óxidos de nitrógeno.

Con respecto al efecto hipotensor de L-arginina, NO₂⁻ y NO₃⁻ la similitud de las pendientes obtenidas en las curvas sugieren que el mecanismo del efecto es semejante, es decir vía •N = O → NO₂⁻ y NO₃⁻, lo que podría sugerir una acción por activación de la guanilato ciclase.

En tanto, la atenuación del efecto hipotensor por el azul de metileno corrobora esta sospecha pues, como ya se mencionó, este compuesto inhibe a la guanilciclasa y por lo tanto la formación de GMPc indispensable para la relajación del músculo liso vascular.

Al comparar estos resultados con los de la oxoborolidinona de L-arginina llama la atención la potencia, es decir, la DE₅₀ del orden η moles kg⁻¹ (*Fig. 3 y Tabla II*), lo que sugiere una mayor biodisponibilidad del grupo guanidino de la molécula, comparada con la de L-arginina. Por otro lado, la tendencia parabólica de la curva puede reflejar un efecto taquifiláctico¹⁶ a dosis repetidas.

Conclusiones

Dado que el efecto de oxoborolidinona de L-arginina es atenuado por el azul de metileno al igual que el de nitrito y L-arginina se sugiere que su acción es vía óxidos de nitrógeno. Estos resultados apoyan la idea original con relación a que la acción catalítica de la enzima •N = O sintasa se localiza en el guanidino y que los compuestos análogos a la L-arginina sin modificaciones en el grupo guanidino son sustrato de la misma, por lo tanto el compuesto sintetizado y probado puede cumplir con estos requisitos.

Queda por dilucidar su efecto en estudios *in vitro* y en órgano aislado para confirmar estos hallazgos, así como el mecanismo de acción.

Referencias

1. FURCHGOTT RF, ZAWADSKI JV: *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature 1980; 288: 373-376.
2. FURCHGOTT RF: *The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs*. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1984; 24: 175-197.
3. MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA: *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine*. Biochem Pharmacol 1989; 38: 1709-1715.
4. PALMER RMJ, RESS DD, ASHTON DS, MONCADA S: *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochem Biophys Res Commun 1989; 153: 1251-1256.
5. INGARRO LJ, ADAMS JB, HORWITZ PM, WOOD S: *Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange*. J Biol Chem 1986; 261: 4997-5002.
6. DOYLE MP, HOEKSTRA JW: *Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins*. J Inorg Biochem 1981; 14: 351-358.
7. MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD, WISHNOK JS: *Macrophages oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate, nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry 1988; 27: 8706-8711.
8. GREEN MLC, WAGNER A, GLOGOWSKI I, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM ST: *Analysis of nitrate, and nitrite (¹⁵N) nitrate in biological fluids*. Anal Biochem 1982; 126: 131-138.
9. TRUJILLO FJG, BRAVO AM, CASTRO MLV, YÁÑEZ AR: *Evaluación Farmacológica de la L-arginina y Óxidos de Nitrógeno*. Congreso Nacional de Farmacología. Dic. 1992. Sn. Miguel Allende, Gto. México.
10. MORIN C: *The Chemistry of Boron Analogues of Biomolecules*. Tetrahedron 50 1984; 44: 12521-12569.

11. VEDEJS E, FIELDS SC, LIN S, SCHRIMPF S: *Asymmetric transformation in Boron Ate complex of Amino Acids.* J Org Chem 1995; 60: 3028-3034.
12. TRUJILLO FJG, CASTILLO HD, SANTILLÁN R, FARFÁN N: *X-Ray Crystallographic study of boroxazolidones obtained from L-ornithine, L-metionine, Kainic acid and 2,6-Pyridinedicarboxylic acid.* J Organomet Chem 1998; 571: 21-29.
13. OKTAY S, ONAT F, KARAHEN F, ALLICAN I, OZKUT U, YEGEN B: *Effect of Methylene Blue on Blood Pressure in Rats.* Pharmacol 1993; 46: 206-210.
14. BRAVO AM, YÁÑEZ AR, TRUJILLO FJ: *Óxido nítrico, un importante regulador biológico.* Acta Médica 1993; 29, 113-114: 15-24.
15. STRYER L: *Biochemistry.* Third Edition. New York. W.H. Freeman & Company, 1988: 1013-1014.
16. PRATT W, TAYLOR P: *Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology.* Third Edition. New York. Churchill Livingstone Inc., 1990: 344-345.