

1988-1

REG. 79125911

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"EFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE EL TAMAÑO DE CEREBRO,
CEREBELO Y CRECIMIENTO CORPORAL EN RATAS".

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

BERTHA RUIZ MADRIGAL

GUADALAJARA, JALISCO.

MAYO 1992



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección

Expediente

Número

C. BERTHA RUIZ MADRIGAL
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE EL TAMANO DEL CEREBRO, CEREBELO Y CRECIMIENTO CORPORAL EN RATAS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la Dra. Mercedes González Hita.

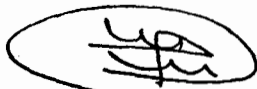
A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
"AÑO DEL BICENTENARIO"
Guadalajara, Jal., 16 de Marzo de 1992.
EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

[Firma manuscrita]
C. CARLOS BEAS ZARATE

EL SECRETARIO



M. EN C. MARTIN PEDRO TENA MEZA

c.c.p.- La Dra. Mercedes González Hita; Directora de tesis.pte.-
c.c.p.- El expediente del alumno.

CBZ>MPTM>Cglr.

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E :


Por medio de la presente comunico a usted que la
C. BERTHA RUIZ MADRIGAL, pasante de la Licenciatura en
Biología ha concluido satisfactoriamente el trabajo de
Tesis titulado: " EFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE EL TAMAÑO DE
CEREBRO, CEREBELO Y CRECIMIENTO CORPORAL EN RATAS ", bajo mi
dirección

Por lo anterior solicito a Ud. su autorización a fin de
programar la presentación de su examen de Tesis y
Profesional

Sin otro particular aprovecho esta oportunidad para
enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara., Jal. 7 de Abril 1992.



MERCEDES GONZALES HITA
PROFESOR INVESTIGADOR DE
LA FACULTAD DE MEDICINA.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA
DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DEDICATORIAS

No hay palabras con que poder decir lo que mi corazón y mi agradecimiento quisiera entregar.

A MI PADRE

Que en mis recuerdos permanecera tu rostro, tu presencia, siempre fuerte y siempre atenta cuando yo de ti necesitaba.

A MI MADRE

Que con amor y ternura mi camino supiste diseñar, y que por mis sueños me enseñaste a luchar y mis errores enfrentar.

Gracias por darme lo más importante de ustedes quienes con cariño y paciencia han compartido conmigo el camino de mi formación profesional y espiritual.

A MIS HERMANOS

Vicente, Ma. Luisa y Daniel, gracias por su apoyo y confianza e inquietarme a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Y profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, que participaron en mi formación académica.

A LA DRA. MERCEDES GONZALEZ HITTA

Por su valiosa dirección y asistencia durante la realización de ésta tesis.

AL DR. PEDRO GARZON DE LA MORA

Por sus conocimientos y facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A la M. en C. BLANCA ESTELA BASTIDAS RAMIREZ

Le agradezco inifinitamente, ya que con su apoyo y orientación ha hecho posible la realización de una de las metas más importantes de mi vida.

A la M. en C. ALICIA NAVARRO RUIZ

Por su cooperación y asistencia durante la realización de este trabajo.

A la D.F.B. Ma. TERESA VILLANUEVA MICHEL

Por su inapreciable ayuda y por brindarme su amistad.

Con cariño y respeto a mis compañeros del Departamento de Investigación Científica de la Facultad de Medicina, por sus consejos, confianza y amistad.

EFFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE EL TAMAÑO DE
CEREBRO, CEREBELO Y CRECIMIENTO CORPORAL EN RATAS.

I N D I C E

	PAGS.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
HIPOTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	24
MATERIAL Y METODOS	25
CALCULOS	36
RESULTADOS	38
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATC	ácido tricloroactico
°C	grados centígrados
DFA	difenilamina
FB	Fenobarbital
gr	gramos
hrs	horas
IUA	índice de utilización de alimento
Kg	kilogramos
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
nm	nanómetros
PAC	extracto de proteínas ácidas
PALC	extracto de proteínas alcalinas
pg	picogramos
seg	segundos
SNC	sistema nervioso central
SSF	solución salina fisiológica
µg	microgramos

I N T R O D U C C I O N

El Fenobarbital (FB) es un fármaco perteneciente al grupo de los barbitúricos. En 1912 se introdujo el FB al mercado farmacéutico con el nombre de Luminal y fué empleado eficazmente en el tratamiento de la epilepsia (19).

Actualmente, el FB se sigue empleando como una droga anticonvulsionante efectiva para el control y tratamiento de la epilepsia tónico-clónica parcial y generalizada tanto en adultos como en niños (49). Además de su acción como antiepiléptico, el FB tiene efectos sedantes y anestésicos, los cuales se observan cuando se administran dosis más elevadas que las requeridas para ejercer su efecto antiepiléptico.

El FB se emplea en la clínica pediátrica en el tratamiento de diversos síndromes neurológicos asociados con crisis y desórdenes convulsivos (49).

La dosis de FB comúnmente empleada en el tratamiento de la epilepsia es de 1 - 3 mg/kg en adultos y de 2 - 3 mg/kg en niños. Dosis mayores producen nistagmo y ataxia.

También se ha reportado que la administración crónica de FB puede causar anemia megaloblástica y osteomalasia (19).

En cuanto a la vía de administración del FB, la que normalmente se emplea en el tratamiento de la epilepsia es la vía oral, aunque también es frecuente que se administre por la vía parenteral.

El FB también se emplea en mujeres embarazadas en el manejo de la preeclampsia (39). Se conoce que los barbituratos cruzan la barrera placentaria y permanecen en el sistema del feto por períodos largos (16). Así, un sujeto puede recibir tratamiento con FB desde edades muy tempranas o estar expuesto al medicamento aún antes del nacimiento y por períodos prolongados.

El sistema nervioso central (SNC) en los mamíferos presenta la etapa de crecimiento acelerado casi al final del desarrollo, cuando en la mayoría de los tejidos ya han ocurrido estos períodos críticos de máximo crecimiento.

El SNC en desarrollo, al igual que otros tejidos, es particularmente vulnerable de sufrir daño permanente como resultado de desviaciones en los niveles óptimos de hormonas, vitaminas y nutrimentos; ó bien, como resultado de la exposición a sustancias químicas, ya sean medicamentos ó agentes tóxicos (18).

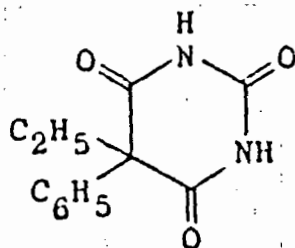
El tema de la exposición temprana a FB y sus efectos sobre el SNC en desarrollo ha sido objeto de múltiples investigaciones.

Aún está por resolverse hasta qué momento la célula nerviosa ya diferenciada llega a ser resistente a la acción del FB. El presente estudio se ha diseñado con el objeto de ampliar la información acerca de los efectos adversos del tratamiento crónico con FB sobre el SNC, en etapas posteriores al desarrollo crítico.

ANTECEDENTES

1. FENOBARBITAL

El Fenobarbital (FB), ó Acido 5-etil,5-fenilbarbitúrico, es uno de los más valiosos depresores del SNC. Se presenta como cristales cuyo peso molecular es de 232.23 y su punto de fusión es de 174 - 178 °C . Un gramo se disuelve en aproximadamente un litro de agua, 8 ml de álcali, 40 ml de cloroformo, ó 13 ml de éter. La sal sódica es muy soluble en agua. Su estructura química es la siguiente (40):



Este fármaco pertenece al grupo de los barbitúricos, compuestos derivados del ácido barbitúrico ó malonilurea. El ácido barbitúrico fué sintetizado en 1864 por Adolfo Von Baeyer al realizar la condensación del ácido malónico con la urea. Se dice que el nombre de estos fármacos proviene del hecho de que la síntesis se realizó precisamente el día de Santa Bárbara (patrona de los oficiales de artillería). Von Baeyer fusionó la palabra "Bárbara" con "urea", y de aquí surgió el término "barbitúrico" .

El primer barbitúrico hipnótico fué utilizado en medicina en 1903 por Fisher y Von Mering, con el nombre de Veronal, el cual corresponde al ácido dietilbarbitúrico (12). Posteriormente en 1912, Hauptman introdujo el uso de FB con el nombre comercial de Luminal para el control de crisis epilépticas cuando advirtió que un paciente tenía menos crisis después de que se le administraba FB como sedante. Pronto se extendió su uso al observar que era más efectivo que los bromuros y que otros procedimientos entonces disponibles para el control de crisis epilépticas (20).

El FB fué el principal antiepiléptico hasta 1937, año en que se descubrió la Difenilhidantoína. Aún en la actualidad, el FB es ampliamente utilizado como una droga anticonvulsionante efectiva para el control de la epilepsia tónico-clónica parcial y generalizada, tanto en adultos como en niños (49). Tiene efectos sedantes y anestésicos al administrarse dosis más elevadas que las requeridas para ejercer su efecto antiepiléptico. Su uso no provoca dependencia ni intoxicación a las dosis anticonvulsionantes usuales (21).

En la clínica pediátrica se emplea como agente profiláctico de la hiperbilirrubinemia neonatal(41), en el tratamiento de cólicos y diversos síndromes neurológicos infantiles relacionados con desordenes convulsivos (49). Es utilizado asimismo en el tratamiento de la preeclampsia, en mujeres embarazadas (39).

a) ABSORCION

El FB es un ácido débil cuyo pKa es de 7.4 (24), lo cual significa que a pH mayor ó menor, predomina la forma no ionizada del fármaco. Como es bién sabido, la absorción de cualquier fármaco es mayor cuando éste se encuentra en su forma ionizada.

En términos generales, el fenómeno de la absorción, está influenciado por las características del fármaco en cuestión y por las condiciones fisiológicas ó patológicas que presente el paciente, tales como las siguientes:

I.- CARACTERISTICAS DEL FARMACO:

- 1). Vía de administración
- 2). Peso molecular
- 3). Vehículo empleado
- 4). Solubilidad
- 5). Grado de ionización

II.- CARACTERISTICAS DEL PACIENTE:

- 1). Motilidad intestinal
- 2). pH gastrointestinal
- 3). Presencia de parásitos intestinales
- 4). Proceso inflamatorio intestinal

Generalmente los barbitúricos se administran por vía oral y pueden ser especialmente absorbidos por la mucosa gástrica, pero el sitio de mayor absorción es el intestino delgado debido a que su pH se acerca a la neutralidad (27).

La sal sódica de FB es más rápidamente absorbible que la forma ácida (26).

Su absorción puede ser modificada por la presencia de algunas sustancias, como la DL-anfetamina, que retrasa su absorción; ó como el alcohol, que la aumenta.

B) UNION A PROTEINAS Y NIVELES PLASMATICOS

Aproximadamente el 40% del FB se encuentra unido a proteínas; la fracción de fármaco que se encuentra libre es la farmacológicamente activa.

Se recomienda realizar determinaciones periódicas de la concentración sérica del fármaco, aunque éstas generalmente se refieren a la concentración total del fármaco (fármaco libre y fármaco ligado a proteínas). Estos datos reflejan de manera confiable la acción farmacológica. Se alcanza la concentración sérica máxima de 8 a 12 hrs. después de su administración oral (34).

Se ha reportado una concentración sérica de 10-20 µg/ml cuando se ingiere una dosis de 1-20 µg/ml. Su vida media en

el plasma es de 4 días . La vida media de un fármaco es el tiempo requerido para que la concentración sérica máxima descienda a la mitad. El equilibrio entre la ingesta y la eliminación del fármaco se alcanza 3 semanas después de haber iniciado el tratamiento. En el niño se alcanza el equilibrio en un período más corto, debido a que su eliminación es más rápida (26).

c) DISTRIBUCION EN LOS TEJIDOS

El pH del plasma es similar al pKa del FB, por lo cual podemos encontrar una fracción plasmática no ionizada del mismo, liposoluble y capaz de difundir a otros órganos, tales como hígado, músculo, riñon, y pasa la barrera sangre-leche (34).

d) METABOLISMO Y ELIMINACION

La eliminación de un fármaco, generalmente requiere de un proceso de transformación, el cual se lleva a cabo en el hígado.

Como la mayoría de los fármacos son liposolubles, éstos son reabsorbidos en el epitelio tubular renal y posteriormente son transformados en moléculas hidrosolubles en el hepatocito, y de esta manera se favorece su eliminación (43).

La biotransformación sucede en general en 2 fases :

FASE I : En esta fase se pueden añadir grupos hidroxilo, carboxilo, etc, para hacer más polar e hidrosoluble la molécula.

FASE II : Conjugación mediante glucuronidación, sulfonación acetilación u otras reacciones.

Aproximadamente un 15 - 30 % del FB se elimina como tal. El principal metabolito es el p-hidroxifenobarbital (22). El 50 % de este último se encuentra conjugado y el 50 % restante, en forma libre (4). En el hígado se metaboliza por completo de la manera como se describió en la Fase I y Fase II de la eliminación de fármacos (43).

El p-hidroxifenobarbital también es activo pero en mucho menor grado que el FB y también es menos tóxico (22). El FB es el antiepiléptico utilizado en la clínica que posee la vida media más prolongada. Se elimina lentamente por la orina y desaparece del plasma a una velocidad de 11 - 27 % por día, por lo que se obtiene una vida media de 53 -140 hrs (33). La insuficiencia hepática, la insuficiencia renal y la administración simultanea de ácido valproico aumentan la vida media del FB. Cuando se incrementa el flujo urinario ó se alcaliniza el pH de la orina, aumenta la eliminación del fármaco (34).

e) DOSIS

Para el control de las crisis epilépticas, es necesario mantener una concentración sérica de 15- 40 µg/ml.

Por encima de 40 µg/ml comienzan a manifestarse síntomas de toxicidad. Como su vida media es bastante prolongada, no es necesario el empleo de preparaciones farmacéuticas de liberación lenta.

La dosis para adultos es de 1 - 3 mg/kg/día (60-200mg) por vía oral (50 -100 mg 2 ó 3 veces al día).

La dosis para niños es de 2-3 mg/kg/día (15-50 mg. 2 ó 3 veces al día).

El FB sódico se aplica por vía intramuscular ó intravenosa en casos de "status epilepticus" ; o en una dosis para adultos de 200 - 300 mg repetida a las 6 hrs, si es necesario. En el caso de niños se utiliza la vía intramuscular a una dosis de 3 - 5 mg/kg del peso corporal (26).

f) EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL FB (5).

- 1.- El FB tiende a deprimir las excitaciones fisiológicas y aumenta los procesos inhibitorios a nivel neuronal.
- 2.- Disminuye el consumo de oxígeno en el cerebro al administrarse dosis hipnóticas ó anestésicas.
- 3.- Altera el metabolismo de los lípidos provocando así una elevación considerable (15 %) de la concentración sérica de colesterol.

- 4.- Induce el sistema enzimático microsomal hepático. Tal vez el FB es el más activo inductor de las oxidasas que hidroxilan los anillos aromáticos, de tal forma que es capaz de estimular su propio metabolismo.
- 5.- Inhibe la síntesis proteica de la corteza cerebral de manera considerable (40%).
- 6.- Activa los receptores a GABA.

g) EFECTOS TOXICOS

Las manifestaciones tóxicas del FB se pueden dividir en funcionales, bioquímicas y estructurales; y por su duración pueden tener carácter agudo, subagudo ó crónico.

Los principales efectos adversos son : Sedación, somnolencia, y un posible efecto en la función cognoscitiva, alteraciones del intelecto, cambios de personalidad, alteraciones motoras, anemia megaloblástica, anemia aplástica, leucopenia, dermatitis exfoliativa, acné, hipertrichosis, disminución hepática y deficiencia de folatos, principalmente (19).

Estudios encaminados a caracterizar los efectos de la exposición neonatal a FB, han mostrado que la administración crónica de 60 mg/kg de FB durante tres semanas a ratas recién nacidas, causa un retraso significativo en el crecimiento corporal y en el peso de cerebro y cerebelo (36).

En estos estudios, se planteó la posibilidad de que los efectos sobre el crecimiento corporal y del SNC pudieran ser el resultado de desnutrición inducida por un deficiente consumo de alimento debido a que el tratamiento causó un efecto sedante en los animales.

Estudios posteriores de los mismos investigadores, empleando un diseño experimental diferente, apoyan la propuesta de que es el efecto directo del FB sobre el SNC la causa de la disminución en el peso de cerebro y cerebelo y no la desnutrición como inicialmente se sugirió (37).

También se han investigado los efectos de la exposición prenatal a FB sobre el SNC, observándose que la administración de dosis farmacológicas (30-60 mg/kg) del medicamento a roedores en diferentes períodos durante el embarazo induce una destrucción de las células nerviosas, principalmente en la región del hipocampo y del cerebelo (51).

En estos estudios se encontró que los animales recién nacidos presentan un déficit del 30 % en las células de Purkinje, y en el hipocampo se observa un déficit del 15% en las células piramidales. Esta deficiencia celular se ha asociado con la disminución en el peso del cerebro y cerebelo (14).

Se ha encontrado que no existe una correlación entre el período de exposición al FB y el tipo de células nerviosas que sufren daño. La administración de FB durante el período neonatal induce alteraciones en las macroneuronas que se forman en el período prenatal, así como en las microneuronas que se desarrollan posnatalmente. En base a estos resultados, se ha postulado que el FB no solo interfiere con las células en proceso de división sino también con aquellas neuronas ya formadas (50,52).

Además de las alteraciones morfológicas ya mencionadas, la administración de FB tanto antes como después del nacimiento, a dosis relativamente bajas (10 mg/kg) y por períodos cortos (3 días), altera el desarrollo de las dendritas de neuronas posmitóticas. En el hipocampo de la rata se ha observado una reducción en la longitud total de las dendritas y en el número de ramificaciones (17,23). En base a la evidencia experimental obtenida, se ha postulado que la exposición a FB, ya sea prenatal o neonatalmente, induce alteraciones permanentes en la morfología del SNC.

2. DESARROLLO CELULAR EN EL CEREBRO

La mayor parte de las investigaciones acerca del desarrollo del SNC, se han realizado en animales de laboratorio, particularmente en la rata. Ha sido muy difícil, hasta la actualidad, disponer de todos los datos y estudios necesarios en humanos como para armar el "rompecabezas", por razones muy obvias. Se ha observado que existe cierto patrón común en el desarrollo general de los mamíferos, por lo que los estudios en animales de experimentación resultan completamente válidos.

Los mecanismos que controlan la velocidad de división celular, los patrones migratorios de las células y los cambios en la actividad de las enzimas, que conllevan a la composición final del cerebro en el adulto, aún se encuentran en estudio. Durante el período de maduración casi todos los componentes bioquímicos tales como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, se incrementan junto con el tamaño y el peso del cerebro. En la rata la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) cerebral y la división celular en el cerebro, finaliza aproximadamente a los 21 días posnatales y la síntesis neta de proteínas continúa hasta el día 99 de edad posnatal. La síntesis de lípidos se realiza en este período (47). Entonces el número total de células se

logra antes de que se alcance la masa protoplásmica total. Existe una fase en la cual las células ya existentes deben crecer en tamaño para que se lleve a cabo el aumento del volumen cerebral. Todos los órganos no regenerables revelan tres fases distintas de crecimiento. La primera fase se caracteriza por un incremento proporcional en peso, contenido de proteínas y ADN. El número de células se incrementa mientras la relación del tamaño de las células no cambia ; esto es, se lleva a cabo una simple hiperplasia.

Esta fase termina cuando la velocidad de síntesis de ADN comienza a descender y el contenido de proteínas y el peso continúa aumentando a la misma velocidad, lo cual da lugar a una fase transicional de hiperplasia e hipertrofia simultáneamente, que perdura hasta que la síntesis neta de ADN se detiene. Después, todo el crecimiento se realiza por hipertrofia. El crecimiento termina cuando el peso se estabiliza y la síntesis neta de proteínas se detiene.

El tiempo de proliferación celular en cualquier órgano, se encuentra bajo control genético. Este tiempo varía de acuerdo con la especie. Por ejemplo, en la rata la división celular en el cerebro termina el día 21 posnatal (47). En el Cuyo (*Cavia porcellus*) la división celular cerebral es muy pobre después del nacimiento (32). En contraste, en el

humano, la división celular continúa en el cerebro hasta finalizar el primer año de vida (44).

La enzima ADN polimerasa es esencial para que se realice la síntesis de ADN. En el cerebro de rata, la velocidad máxima de síntesis de ADN es a los 10 días de edad, la cual coincide con la máxima actividad de la enzima (día 6 al 10). Además, la actividad es mayor en aquellas regiones donde la división celular es más rápida (2).

Datos de varios laboratorios indican que para que la división celular continúe durante el tiempo preescrito por la acción del gen, deben existir cantidades adecuadas de la hormona de crecimiento. El mecanismo mediante el cual la hormona de crecimiento estimula la síntesis de ADN se encuentra en investigación (45).

El otro punto de control para la velocidad de síntesis de ADN es la velocidad de síntesis de proteínas en general. Algunos experimentos revelan que antes de que una célula se divida, ésta debe alcanzar una masa crítica. Entonces siguiendo cada división, debe llevarse a cabo una cierta cantidad de síntesis de proteínas antes de que la célula pueda dividirse de nuevo. Algunos experimentos han demostrado que inhibiendo la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ARN) no solamente se inhibirá de manera

secundaria la síntesis de proteínas, sino también la división celular (28). Por tanto, la vía a través de la cual un sinnúmero de estímulos interfieren con la división celular durante el crecimiento, es mediante una disminución de la velocidad de síntesis de proteínas (45). Así, tanto la desnutrición, el hipotiroidismo, la galactosemia experimental y la fenilcetonuria, como otros estímulos endógenos y exógenos que retardan la síntesis de proteínas, dan como resultado una disminución de la velocidad de síntesis de ADN durante el crecimiento proliferativo. Si estos mismos estímulos se aplican al finalizar la fase proliferativa, entonces la disminución de la síntesis de proteínas da como resultado una disminución en el contenido de proteínas por célula ó un tamaño reducido de las células.

Después del día 21 de edad, en que ya ha finalizado la síntesis de ADN en el cerebro de rata, las células continúan acumulando proteínas y lípidos. El contenido de lípidos totales se alcanza un poco después y el contenido total de proteínas alrededor de los 99 días de edad. En el cerebelo la síntesis de ADN se detiene a los 17 días posnatales. La síntesis neta de proteínas realmente no se realiza durante un período corto después de esto y el tamaño de las células cerebelares disminuye.

Esta disminución debido a la edad, probablemente refleja la maduración de células primitivas más grandes en células más pequeñas y maduras. En el tallo cerebral, el número total de células se incrementa a los 14 días de edad. Por lo tanto, existe un enorme incremento en la relación proteína/ADN. Este incremento probablemente no solo refleja un aumento en el tamaño de las células del tallo cerebral sino también el desarrollo, mielinización y crecimiento de los procesos neuronales de otras regiones cerebrales hacia el mismo tallo cerebral. El hipocampo es una area que demuestra un tipo de crecimiento celular, hasta cierto punto, único en el SNC. Existe un discreto incremento en el contenido de ADN entre los días 14 y 17 de vida posnatal. El incremento corresponde a una migración de neuronas desde abajo del ventrículo lateral hasta el hipocampo, la cual ocurre en el día 15 después del nacimiento en la rata (1).

Los últimos arreglos celulares en las diferentes regiones dependen entonces de la velocidad de división celular dentro de una región particular, del momento en que se detiene la división celular, del tipo de células que se están dividiendo y de si las células están migrando ó no hacia ó desde una determinada región.

En el cerebro humano la secuencia de eventos no está tan claramente definida como en el cerebro de rata.

Se sabe que la concentración de proteínas y ARN se incrementa linealmente con el incremento de peso del cerebro hasta alcanzar aproximadamente los 12.5 meses de edad posnatal. El contenido de ADN aumenta rápidamente durante el período de proliferación celular hasta el nacimiento, luego aumenta lentamente hasta los 5 meses de edad (44). Además se ha demostrado que se presentan dos picos en la síntesis de ADN en el cerebro humano (8). El primer incremento se alcanza aproximadamente a las 26 semanas de gestación y el segundo en el nacimiento. Se han interpretado estos resultados como una correlación con la velocidad máxima de división neuronal y la velocidad pico de la división glial, respectivamente. La velocidad de división celular es aproximadamente la misma tanto en cerebro como en cerebelo en la etapa posnatal, y se detiene casi al mismo tiempo en ambas áreas; esto es, entre los 12 y 15 meses de edad (48).

En el tallo cerebral la síntesis de ADN continúa a una velocidad baja pero constante hasta que el individuo cuenta por lo menos, con un año de edad.

Se ha demostrado que durante la vida fetal no solamente se incrementa el peso del cerebro (en una forma lineal) ; sino que también sufre una serie de cambios bioquímicos (9).

La glucólisis se presenta durante el segundo mes de vida fetal; los mecanismos oxidativos aparecen durante el tercer mes; y la actividad y localización de varias enzimas alcanza su patrón de maduración durante el séptimo mes de vida fetal.

Algunos estudios acerca de los lípidos en el cerebro humano, indican que la relación lípidos/ADN se eleva inmediatamente después del nacimiento, y perdura hasta por lo menos los dos años de edad. Esto se refleja en la elevación de la relación colesterol/ADN y fosfolípidos/ADN (35). Por lo tanto, la síntesis posnatal de lípidos sucede a mayor velocidad que la síntesis de ADN. Esto se relaciona indudablemente con la rápida mielinización, la cual está sucediendo durante este período de vida.

El contenido de ADN por célula diploide es constante en cualquier especie, de esta manera es posible conocer el número total de células de cualquier órgano mediante la determinación de su contenido total de ADN y dividiendo éste entre la constante antes mencionada, según la especie de que se trate (10).

Se considera que el cerebro de mamíferos está constituido por células diploides con la excepción de algunas células de Purkinje (que son tetraploides) que se encuentran en cerebelo y en corteza cerebral (30).

Una vez que se ha determinado el número de células, puede calcularse el peso celular promedio, contenido de proteínas por célula o el contenido lipídico, analizando cada uno de estos componentes y dividiéndolo entre el número de células. Esto puede expresarse químicamente como la relación peso/ADN, proteína/ADN, lípidos/ADN. El contenido total de ADN refleja solamente el número de células pero no se puede conocer de esta manera el tipo de células involucradas.

Utilizando estos cálculos es posible obtener datos muy valiosos acerca del desarrollo celular del cerebro, mediante procedimientos que son relativamente sencillos y prácticos.

H I P O T E S I S

El tratamiento crónico con FB induce alteraciones en el crecimiento del cerebro y el cerebelo que no están directamente relacionados con los efectos del fármaco sobre el crecimiento corporal y el estado de nutrición del sujeto.

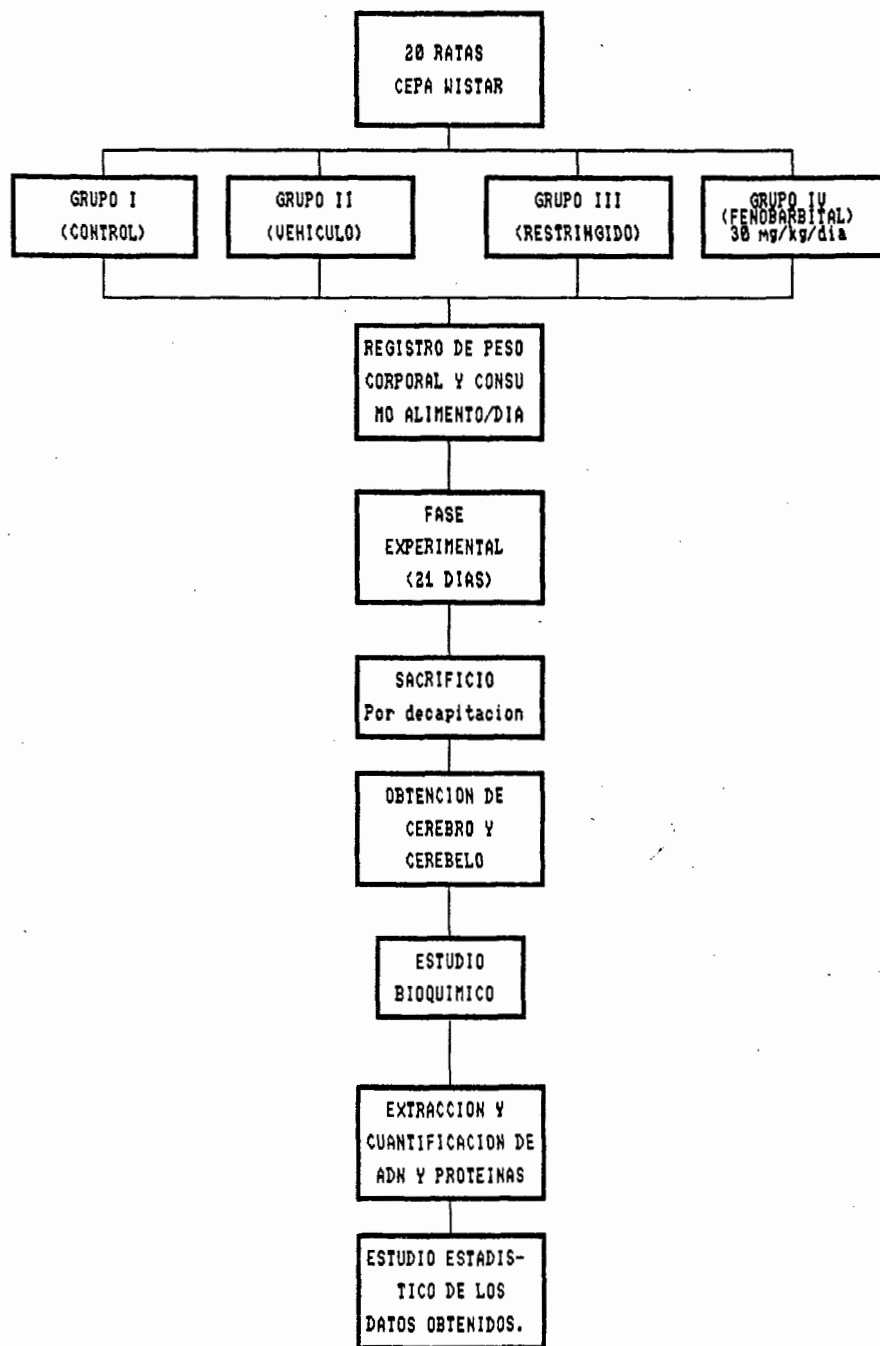
OBJETIVO GENERAL

Identificar los efectos del tratamiento crónico con dosis terapéuticas de FB sobre el peso de cerebro y cerebelo, el crecimiento corporal y el consumo de alimento en ratas de 30 días de edad.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los cambios en el peso de cerebro y cerebelo causados por la exposición a FB durante la etapa posterior al desarrollo crítico del SNC.
2. Determinar el efecto del tratamiento crónico con FB sobre el peso corporal en ratas de 30 días de edad.
3. Registrar las variaciones en el consumo de alimento de las ratas durante su tratamiento con FB.
4. Establecer la correlación entre las variaciones en consumo de alimento, peso corporal, peso de cerebro y cerebelo, así como en la concentración de ADN y proteínas causadas por la exposición a FB.

DISEÑO EXPERIMENTAL



M A T E R I A L Y M E T O D O S

1. REACTIVOS:

Todos los reactivos utilizados en este estudio fueron grado reactivo.

2. SELECCION DE ANIMALES Y DISTRIBUCION POR GRUPOS

Se emplearon 20 ratas macho de la cepa Wistar, destetadas a los 21 días de edad; con un peso aproximado de 92 gr. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas durante una semana antes de iniciar el tratamiento experimental, para su adaptación al nuevo ambiente y se mantuvieron en condiciones óptimas de bioterio con ciclos de 12 hrs luz - 12 horas obscuridad. Se alimentaron con dieta comercial " Nutricubos Purina" y se les porporcionó agua "ad libitum".

El tratamiento experimental se inició a los 30 días de edad de las ratas , y tuvo una duración de 21 días . Los animales se distribuyeron en 4 grupos de 5 ratas cada uno, cuidando que el peso corporal promedio de cada grupo al iniciar el experimento fuera prácticamente el mismo.

GRUPO I : CONTROL

Las ratas pertenecientes a este grupo recibieron agua y alimento "ad libitum".

GRUPO II : VEHICULO

A este grupo le fué administrado propilenglicol al 40% como vehiculo, en un volumen no mayor de 0.5 ml/día en dosis única, por vía oral, recibiendo agua y alimento "ad libitum".

GRUPO III : RESTRINGIDO EN ALIMENTO

Este grupo recibió diariamente alimento, en cantidad igual a la consumida por las ratas del grupo IV.

GRUPO IV : FENOBARBITAL

Este grupo fué tratado durante 21 días con una solución de FB en dosis única de 30 mg/kg, administrada en las mañanas por vía oral.

Durante todo el período experimental se registró diariamente el peso corporal y el consumo de alimento de cada uno de los animales en todos los grupos.

3. PREPARACION DE LA SOLUCION DE FB

La solución de FB se preparó diariamente. El fármaco se disolvió en una solución vehículo preparada con propilenglicol, etanol y amortiguador de fosfatos (Na_2HPO_4 0.05 M.), en una proporción de 40:10:50, a un pH de 7.9.

La cantidad de fármaco administrado a cada rata del grupo experimental se calculó diariamente de acuerdo al peso corporal, ajustando el volumen de la solución a la dosis de 30 mg/kg .

EL cálculo del volumen administrado se realizó de la siguiente manera:

$$\text{Volumen de la solución/rata} = \frac{\text{Peso de la rata}(\text{gr}) \times \text{Dosis}(\text{mg/kg})}{1000 \times \text{concentración solución FB}}$$

4. ADMINISTRACION DE LA SOLUCION DE FB Y DEL VEHICULO

Se ensambló una cánula esofágica de acero inoxidable a una jeringa desechable de 1 ml. y con ella se administró el fármaco a cada rata. La rata se sostuvo con la mano izquierda protegida con un guante de asbesto. El animal se sujetó firmemente, manteniendo la cabeza entre los dedos índice y medio. Con la mano derecha se sostuvo la jeringa, y se introdujo suavemente la cánula por el esófago de la rata. El émbolo de la jeringa se oprimió para introducir la solución.

El grupo II recibió la solución vehículo de igual forma que el grupo experimental.

5. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL

Al término de los 21 días de tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación, introduciendo la rata en una cámara con gasas impregnadas con éter etílico, para anestesarlas ligeramente y facilitar su manejo.

La rata se sacó de la cámara y se depositó sobre una guillotina en donde se sacrificó por decapitación.

Se disecó cerebro y cerebelo por craneotomía, y se separaron por corte transcolicular. Inmediatamente después, los órganos se colocaron en vasos de precipitado de 50 ml con solución salina fisiológica (SSF) fría, y fueron conservados en baño de hielo hasta el momento de ser pesados.

Los órganos extirpados se pesaron en un balanza analítica (Mettler) sobre papel "parafilm", eliminando el exceso de SSF con una gasa seca y limpia. El peso del tejido fresco se registró para posteriormente conservarlo a 4°C en frascos viales de vidrio, con una mezcla de cloroformo - metanol 2:1 (Baker) hasta el momento de extracción para su estudio bioquímico.

6. EXTRACCION DE ADN Y PROTEINAS TISULARES (38).

Los órganos mantenidos en cloroformo-metanol 2:1 se sometieron a homogeneización utilizando un homogenizador con vástago de vidrio (PYREX), teniendo cuidado de conservar el tubo en baño de hielo. El tejido se dispersó al principio en pequeñas cantidades de solvente, luego se colocó en un tubo de centrifuga de policarbonato (Nalgene, USA) de 50 ml. Posteriormente, se lavó el vástago y el tubo con pequeñas cantidades de solvente cuidando de recuperar todo el material hasta obtener un volumen final de 19 ml.

Una vez homogenizados los tejidos, se procedió de la manera siguiente para la extracción de ADN y Proteínas tisulares:

a) Las muestras homogeneizadas en cloroformo-metanol 2:1 y colocadas en tubos de policarbonato de 50 ml se centrifugaron por 15 minutos a 15,000 r.p.m. en una centrifuga Sorvall RC2-B con rotor SS-34, a 4 °C.

b) El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 15 ml de cloroformo-metanol 1:2 más 5% de agua bidestilada, dejándose reposar durante 30 minutos. Enseguida se centrifugó por 15 minutos a 15,000 r.p.m.

c) El botón tisular se lavó 2 veces con 15 y 10 ml de alcohol etílico (Baker) respectivamente, centrifugando 15 minutos a 15,000 r.p.m. y descartando los sobrenadantes en cada ocasión.

d) El sedimento, libre de lípidos se resuspendió 2 veces con 15 y 10 ml respectivamente de ácido tricloroacético (ATC) (Baker) al 5% frío, y se centrifugó por 15 min a 15,000 r.p.m. eliminando posteriormente los sobrenadantes en cada uno de estos lavados.

e) El sedimento se resuspendió nuevamente en 15 ml de ATC al 5% a temperatura ambiente y se colocó en un tubo cónico de vidrio (PYREX) de 50 ml en baño maría a 90 °C, durante un período de 25-30 min con agitación constante. Posteriormente, se dejó enfriar y nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones. El sobrenadante fué transferido a un vaso de precipitados de 50 ml para su uso posterior.

f) El botón tisular se resuspendió en 10 ml de ATC al 5% a temperatura ambiente y se colocó nuevamente en baño maría por 15 minutos, se centrifugó y el sobrenadante se combinó con el anterior.

g) El sedimento finalmente se lavó con 10 ml de ATC al 5% y la solución lavadora se combinó con los anteriores sobrenadantes, siendo aforados a un volumen final de 50 ml con ATC al 5% .

Estos sobrenadantes posteriormente se utilizaron para medir concentración de proteínas ácidas (PAC) y ADN.

h) Al sedimento que quedó de la decantación se le adicionaron 10 ml de NaOH (Baker) 1.0 N y se dejó en reposo durante 24 hrs para su disolución, manteniéndose a 4 °C.

Posteriormente, esta solución se aforó a 50 ml utilizando agua desionizada. En este extracto se midieron concentraciones de proteínas alcalinas (PALC)

7. CUANTIFICACION DE ADN

a) Reacción de la Difenilamina (DFA) (3).

El reactivo de DFA se preparó cada vez que se utilizó, de la siguiente manera:

DFA (Merck)	1.5 gr.
Ac. Acético Glacial (Merck)...	50.0 ml.
Ac. Sulfúrico Conc. (Merck)...	1.5 ml
*Sol. de Acetaldehído (Merck)..	0.5 ml

* Solución de Acetaldehído : 10 ml de Acetaldehído se aforaron a 500 ml con agua destilada y se conservaron en refrigeración.

Se preparó una solución patrón de 100 µg/ml de ADN.

b) Reacción de color : a continuación se esquematiza el procedimiento para desarrollar la reacción de color.

REACTIVO	BLANCO	PATRON	PROBLEMA
ATC AL 5%	2.00 ml	---	---
PATRON DE ADN	---	2.00 ml	---
MUESTRA	---	---	2.00 ml
ACIDO PERCLORICO (Merck) 60%	0.17 ml	0.17 ml	0.17 ml

AGITAR PERFECTAMENTE

DFA	2.00 ml	2.00 ml	2.00 ml
-----	---------	---------	---------

AGITAR PERFECTAMENTE

Incubar a 10 °C durante 45 horas, luego se esperó a que los tubos recuperaran la temperatura ambiente del laboratorio y se leyeron a 600 nm. en un espectrofotómetro (Coleman Jr, IIA) contra el blanco. Se registró la transmitancia del problema y del patrón, ajustando a 100 % de transmitancia con el blanco.

8. CUANTIFICACION DE PROTEINAS TISULARES

Método de Lowry (31):

Se utilizaron las siguientes soluciones :

A) Carbonato de sodio anhidro (Monterrey) al 2% en Hidróxido de sodio (Baker) al 0.1 N.

B) Sulfato de cobre pentahidratado (Merck) al 0.5% .

C) Tartrato doble de sodio y potasio (Merck) al 1% .

D) A 50 ml del reactivo A se le agregarn agitando, 0.5 ml del reactivo C y 0.5 ml del reactivo B .

E) Reactivo de Folin - Ciocalteu fenol (Sigma,USA) diluido 1:1 con agua bidestilada.

La solución patrón se preparó a una concentración de 100 µg/ml de albúmina (Sigma, USA).

A continuación se esquematiza el procedimiento para desarrollar la reacción de color.

REACTIVO	BLANCO	ESTANDAR	PROBLEMA
EXTRACTO ACIDO 1:50 (cerebro y cerebelo)	---	---	0.4 ml
ATC AL 5 %	0.4 ml	0.2 ml	---
PATRON DE ALBUMINA	---	0.2 ml	---
EXTRACTO ALCALIND 1:50 (cerebro y cerebelo)	---	---	0.2 ml
AGUA DESTILADA	0.2 ml	---	0.2 ml
NaOH 0.2 N	0.2 ml	0.2 ml	---
PATRON DE ALBUMINA	---	0.2 ml	---

REACTIVO D	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
------------	--------	--------	--------

Agitar muy bien y dejar en reposo durante 10 minutos.

*Reactivo E	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
-------------	--------	--------	--------

Reposar 30 minutos y luego leer en el espectrofotómetro a 550 nm contra el blanco respectivo .

* Al añadir el reactivo E es importante que el tiempo entre la adición y la agitación, no exceda de 4 seg , ya que la vida media del reactivo en estas condiciones es menor a 8 seg.

8. CALCULOS

Para estimar la cantidad de μg de ADN/gr de tejido de cerebro y cerebelo se utilizó la siguiente fórmula :

$$\mu\text{g ADN/ml} = \text{D.O. Problema} / \text{D.O. Patrón} \times P \times F \times 1/x$$

En donde:

D.O. = Densidad Optica; P = concentración del Patrón
(100 $\mu\text{g/ml}$).

F = Factor de dilución (50) y x = Volumen de Muestra
(2ml).

$$\mu\text{g ADN/gr de tejido} = \mu\text{g ADN/ml/G}$$

En donde:

G = Peso del tejido (Cerebro o Cerebelo en gr)

Para estimar la cantidad de Proteínas Totales/gr de tejido en Cerebro y Cerebelo, se utilizó la siguiente fórmula :

$$\mu\text{g PAC./ml} = \text{D.O. Problema} / \text{D.O. Patrón} \times P \times F \times 1/x$$

$$\mu\text{g PALC./ml} = \text{D.O. Problema} / \text{D.O. Patrón} \times P \times F \times 1/x$$

En donde:

D.O. = Densidad Optica; P= concentración del Patrón
(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

F = Factor de Dilución (50) y x = Volumen de la sol. de PAC
(0.4 ml) y x = Volumen de PALC (0.2 ml).

$\mu\text{g PAC ó PALC}/\text{gr de tejido} = \mu\text{g PAC ó PALC}/\text{G.}$

En dónde :

G = Peso del tejido (Cerebro o Cerebelo en gr)

Proteínas Totales = PAC/gr + PALC/gr

9. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la cuantificación de ADN y proteínas, así como consumo de alimento, peso corporal y peso de órganos, se sometieron a cálculos estadísticos para obtener: media aritmética, error estándar y desviación estándar. Posteriormente, estos datos se compararon mediante la prueba "t" de Student, y se obtuvo la significancia estadística.

RESULTADOS

Los resultados de los efectos adversos del tratamiento crónico con FB sobre el crecimiento de cerebro, cerebelo, el peso corporal y el consumo de alimento son los siguientes :

PESO DE CEREBRO Y CEREBELO

El peso de cerebro y cerebelo se empleó como parámetro para evaluar el crecimiento de cada órgano.

La Figura 1 muestra el peso total de cerebro fresco, para los cuatro grupos de animales : Grupo Control, Grupo Vehículo, Grupo Restringido y Grupo Fenobarbital.

Se observó que el grupo Fenobarbital mostró una disminución en el peso total del cerebro del 7% en comparación con el peso de este órgano en el grupo Control; esta diferencia fué significativa en relación a los grupos Control y Vehículo, ($p < 0.01$). La restricción en alimento no causó cambios en el peso total de cerebro. El peso del cerebro en el grupo que recibió Vehículo es prácticamente igual al Control .

En la Figura 2 se muestra el peso total de cerebelo para cada uno de los grupos de animales. Se observó que el cerebelo del grupo Fenobarbital, presentó una reducción del

12% en su peso en relación al grupo Control, misma que resultó significativa en comparación con ambos controles ($p < 0.01$). La restricción alimentaria en este caso fue ligeramente menor que la del grupo control; esta baja del 4% en el peso del cerebelo no resultó significativa. La administración de vehículo no modificó el peso total del cerebelo.

Los pesos de cerebro y cerebelo expresados por 100 gr de peso corporal se muestran en la Tabla I, donde puede observarse que sólo en caso del grupo Restringido, los pesos de ambos órganos por unidad de peso corporal fueron mayores que los de los controles y que los del grupo Fenobarbital.

CONTENIDO DE ADN Y PROTEINAS EN CEREBRO

El contenido de ADN en cerebro y cerebelo se empleó en el presente estudio, como un indicador bioquímico de celularidad, en base a que se ha establecido que el ADN nuclear es un elemento celular muy estable para cada órgano ó tejido; aún en aquellos tejidos donde se presentan diferentes poblaciones de células como en el caso del tejido nervioso; ya que la proporción de cada tipo de células permanece constante a una edad determinada del organismo y por consiguiente el contenido de ADN.

En la figura 3 se muestra el contenido total de ADN en cerebro (μg de ADN/peso total de cerebro fresco), observándose que no hubo cambios apreciables en los 4 grupos de animales.

La concentración de ADN en cerebro (μg ADN/gr de tejido) tampoco mostró diferencias (Tabla II). En cambio, el contenido total de proteínas en cerebro, fué significativamente menor con el tratamiento ($p < 0.001$). El grupo Fenobarbital presentó una baja del 19 %, en el contenido total proteico en relación al control (Fig. 4). La concentración de proteínas en cerebro ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco), también fué significativamente menor con el tratamiento; aunque en menor proporción (11.2%). La cantidad de proteínas expresada por unidad de ADN también fué menor en un 14 % en comparación con el control (Tabla II). La restricción en alimento no causó cambios considerables en el contenido proteico del cerebro (fig 2 y tabla II).

CONTENIDO DE ADN Y PROTEINAS EN CEREBELO

El tratamiento con FB causó una disminución significativa en el contenido de ADN en cerebelo (fig. 5). El grupo Fenobarbital mostró una baja del 27.0 % en el ADN total y del 17.5 % en la concentración de este (μg ADN/gr de cerebelo fresco), como se muestra en la tabla III.

La restricción de alimento también fué ligeramente menor en el ADN total (12%), y en su concentración (9%); cambios que no fueron significativos al compararlos con los controles (tabla III).

El contenido proteico del cerebelo fué modificado por el tratamiento con FB como se indica en la fig 6, siendo ésta menor en un 19.0 % y la concentración bajó 8.2 % en relación a los controles (tabla II).

El grupo Restringido mostró una baja significancia en la concentración de proteínas cerebelares: 17.6 % en cuanto al contenido total y 14.5 % de concentración proteica en relación al grupo control.

CRECIMIENTO CORPORAL

Los cambios en el peso corporal de los cuatro grupos de animales durante los 21 días del experimento se muestran en la fig 7. El incremento en peso corporal del grupo Fenobarbital fué menor progresivamente, a medida que avanzó el tiempo de tratamiento; así, al final del experimento el peso corporal alcanzado por este grupo fué significativamente menor que el de los controles ($p < 0.01$). Tanto el grupo Restringido, como el grupo Fenobarbital, mostraron un crecimiento corporal muy similar. El crecimiento corporal del grupo vehículo fué muy parecido al del control normal.

CONSUMO DE ALIMENTO

La cantidad total de alimento consumida durante los 21 días del experimento por cada grupo, así como la eficiencia de su utilización se resumen en la tabla IV. La ingesta promedio expresada en gramos de alimento consumido en todo el período experimental en caso de los 2 grupos control es similar. La ingesta del grupo tratado fue ligeramente menor que la del control, esta baja del 5% en relación al control, no resultó estadísticamente significativa. El grupo Restringido se alimentó en forma paralela al grupo Fenobarbital, así que la ingesta en ambos grupos fue igual.

El índice de utilización de alimento (IUA), se empleó como un indicador de la eficiencia con que el animal aprovecha el alimento que consume para incrementar su peso corporal. Como se muestra en la tabla IV, el grupo Fenobarbital Consumió una cantidad mayor de alimento que el grupo Control y el Vehículo para incrementar su peso corporal en 1 gr. Esta diferencia del IUA sí resulto significativa en relación a los controles ($p < 0.05$).

EFFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE LA MASA CEREBRAL EN RATA DE 30 DIAS DE EDAD

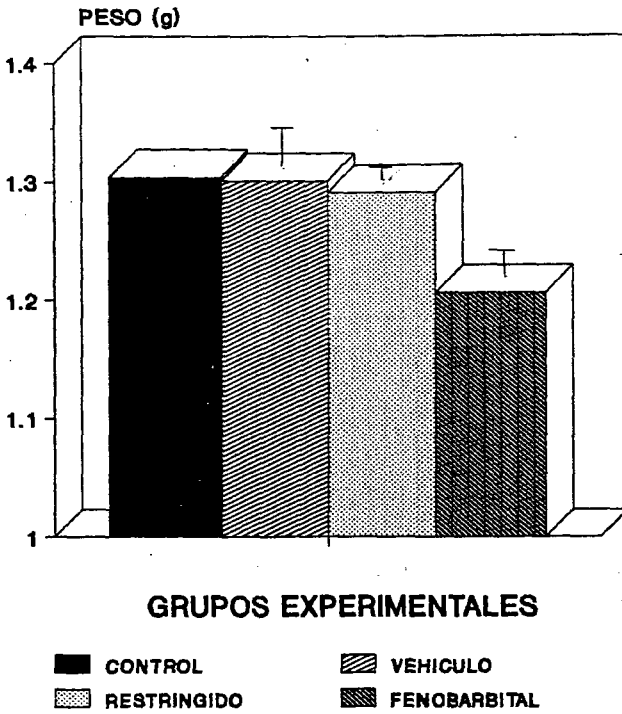


FIGURA 1

FB $p < 0.01$

EFFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE LA MASA CEREBELAR EN RATA DE 30 DIAS DE EDAD

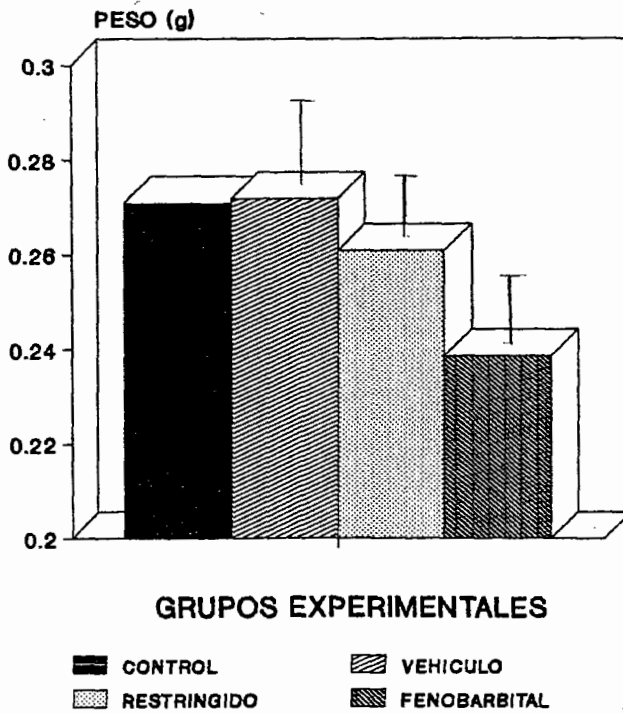


FIGURA 2

FB $p < 0.01$

EFFECTO DE FENOBARBITAL SOBRE EL PESO DE CEREBRO,
CEREBELO Y PESO CORPORAL FINAL.

PESO DE TEJIDO	GRUPO CONTROL (n=5)	GRUPO VEHICULO (n=5)	GRUPO RESTRINGIDO (n=5)	GRUPO FENOBARBITAL (n=5)
CEREBRO				
Peso total (gr)	1.3041 ± 1.53	1.3015 ± 0.044	1.2910 ± 0.022	1.2059 ± 0.036**
Gr. de tejido/100 gr. PC	0.5477 ± 0.0002	0.5496 ± 0.027	0.6138 ± 0.011**	0.5703 ± 0.016
CEREBELO				
Peso total (gr)	0.2709 ± .00009	0.2718 ± 0.021	0.2609 ± 0.015	0.2386 ± 0.016*
Peso g/100 gr. PC	0.1138 ± 0.00008	0.1151 ± 0.087	0.1242 ± 0.091	0.1143 ± 0.074
PESO CORPORAL FINAL (gr)	238.12 ± 0.008	236.46 ± 18	210.36 ± 1.4**	210.08 ± 6.02**

Los valores representan la media aritmetica ± la desviación estandar

*P < 0.05 ** P < 0.01

TABLA I

CONTENIDO DE ADN TOTAL EN CEREBRO DE RATA DE 30 DIAS

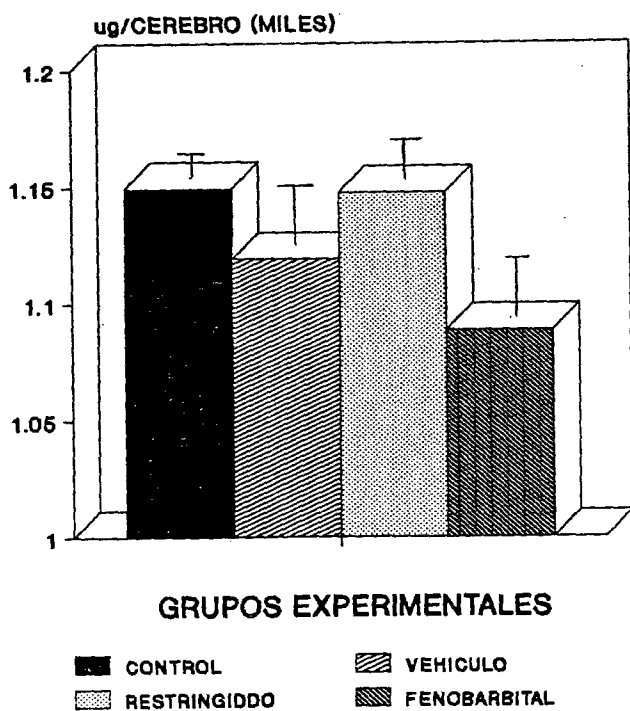


FIGURA 3

CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES EN CEREBRO DE RATA DE 30 DIAS

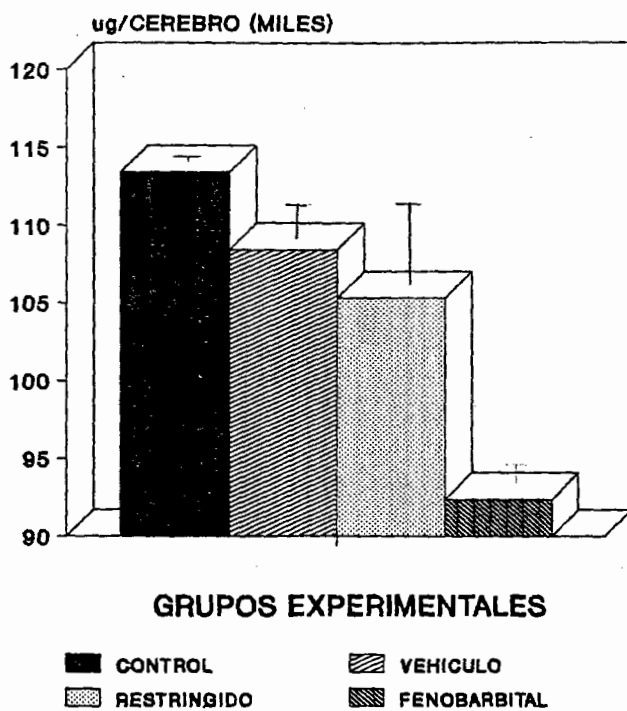


FIGURA 4

FB $p < 0.001$

EFFECTO DE FENOBARBITAL SOBRE EL CONTENIDO
DE ADN Y PROTEINAS EN CEREBRO.

GRUPOS	CONTENIDO	TOTAL DE ADN	CONTENIDO	DE	PROTEINAS
EXPERIMENTALES:	µg/cerebro	(µg/g tejido fresco)	(µg/cerebro)	(µg/g de tejido fresco)	µg/g de ADN
CONTROL (n=5)	1149.48 ± 120.66	881.44 ± 40.87	113408.93 ± 400.61	86963.37 ± 1,826.68	98.66
VEHICULO (n=5)	1119.29 ± 312.35	860.00 ± 56.55	108417.40 ± 2,734.87	83643.84 ± 2,405.73	96.86
RESTRINGIDO (n=5)	1147.62 ± 220.73	888.94 ± 55.17	105301.82 ± 4,879.59	82578.00 ± 2,608.79	91.75
FENOBARBITAL (n=5)	1088.47 ± 355.51	903.42 ± 12.99	92371.30*** ± 2,100.13	77219.32* ± 2,710.51	84.86
* P< 0.05		***P<0.001			

TABLA II

CONTENIDO DE ADN TOTAL EN CEREBELO DE RATA DE 30 DIAS

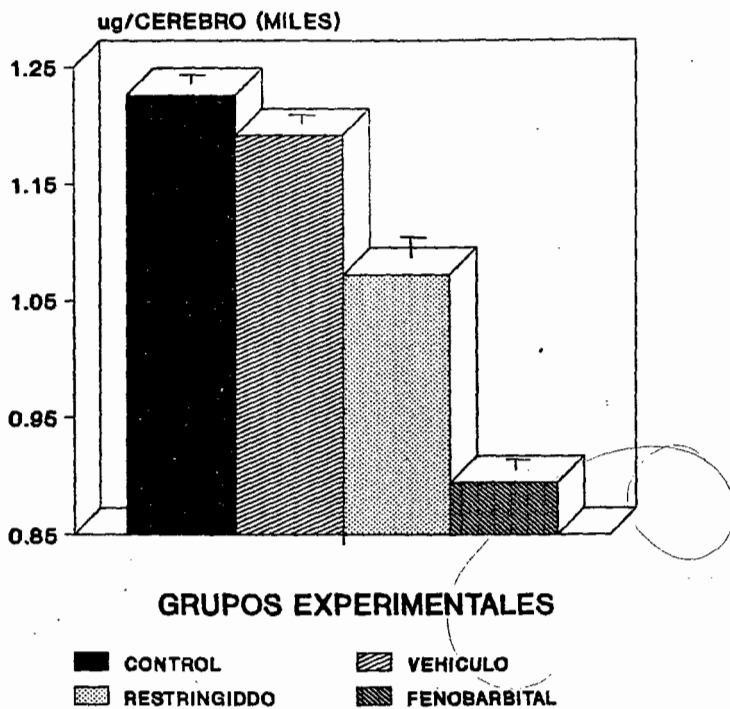


FIGURA 5

CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES EN CEREBELO DE RATA DE 30 DIAS

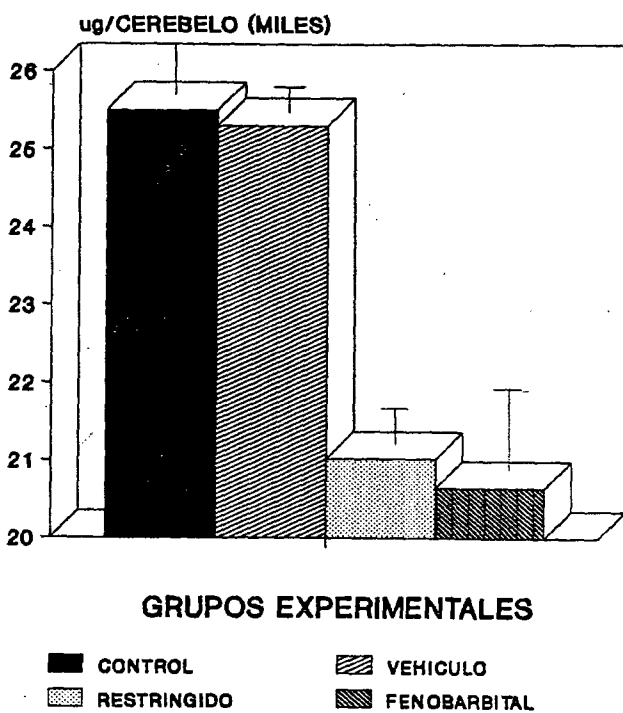


FIGURA 6

EFFECTO DE FENOBARBITAL SOBRE EL CONTENIDO
DE ADN Y PROTEINAS EN CEREBELO.

GRUPOS	CONTENIDO	TOTAL DE ADN	CONTENIDO	DE	PROTEINAS
EXPERIMENTALES:	µg/cerebelo	(µg/g tejido fresco)	(µg/cerebelo	(µg/g de tejido fresco)	µg/g de ADN
CONTROL (n=5)	1225.97 ± 54.67	4545.00 ± 121.05	25508.16 ± 758.89	94160.80 ± 2337.4	20.86
VEHICULO (n=5)	1191.70 ± 1.72	4389.76 ± 235.39	25306.86 ± 599.66	93108.38 ± 1359.4	21.24
RESTRINGIDO (n=5)	1072.19 ± 35.46	4118.51 ± 153.5	21018.904** ± 708.27	80563.06*** ± 2670.15	19.61
FENOBARBITAL (n=5)	894.48** ± 47.66	3749.93 ± 146.38	20644.34** ± 1,278.62	86522.80* ± 2670.15	23.61
	*P<0.05	** P<0.01	***P<0.001		

TABLA III

EFFECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE EL PESO CORPORAL EN RATA DE 30 DIAS DE EDAD

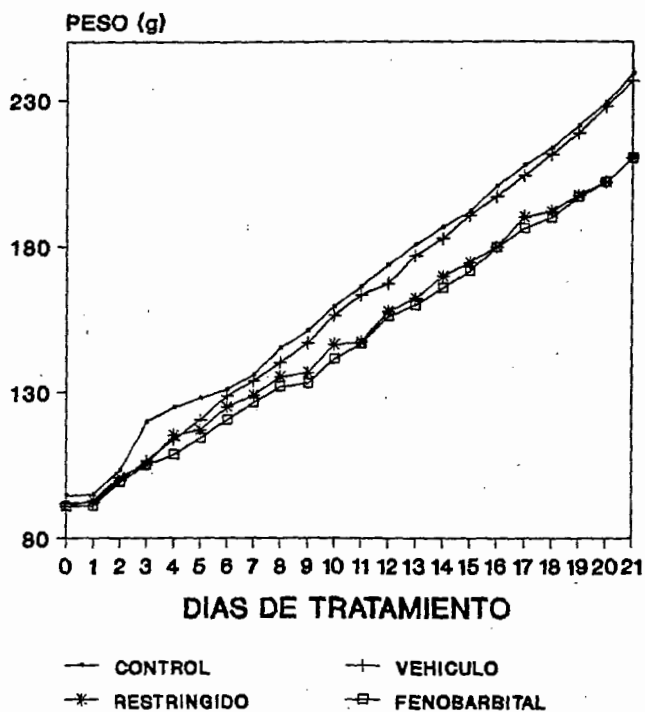


FIGURA 7

FB $P < 0.01$

EFECTO DE FENOBARBITAL EN LA UTILIZACION DE ALIMENTO.			
GRUPOS EXPERIMENTALES	INGESTA DE ALIMENTO DURANTE 21 DIAS EN GR.	INCREMENTO DE PESO CORPORAL DURANTE 21 DIAS GR.	I U A
CONTROL	415.74	145.9	2.86
VEHICULO	416.22	143.96	2.89
RESTRINGIDO	396.3	117.44**	3.37*
FENOBARBITAL	395.06	118.98**	3.32*

I U A: Indice de utilizaci3n de alimento.

I U A: Ingesta (gr)/incremento de peso corporal. * P<0.05 **P<0.01

TABLA IV

D I S C U S I O N

El FB se emplea ampliamente en la clínica pediátrica y en adultos, con diversos fines terapéuticos. Su administración puede durar periodos prolongados, como en caso de su aplicación para el control de crisis convulsivas.

Estudios experimentales han mostrado diversos efectos adversos del FB en el SNC durante las etapas en que se presentan los picos de máximo crecimiento y desarrollo. Schain, Watanabe (36) y Yanai (50) han mostrado que el FB destruye las células nerviosas en proceso de división en el cerebro y cerebelo de la rata recién nacida.

En este trabajo se investigaron los efectos tóxicos de FB en SNC de la rata después del periodo de crecimiento acelerado, siguiendo un diseño experimental similar al empleado por Schain y Watanabe en su estudio con ratas recién nacidas.

A los 30 días de edad, en el cerebro y cerebelo de la rata ya no hay división celular. Como se explicó con anterioridad, la síntesis de ADN termina en el cerebro de la rata a los 21 días y en el cerebelo a los 17 días (47). Después el crecimiento de estos órganos continúa por un incremento en la masa protoplasmática celular, debido principalmente a la acumulación de proteínas, lípidos y

agua. También continúan los procesos de mielinización y crecimiento del arbol dendritico.

Los resultados de la presente investigación muestran que el tratamiento con FB retrasa el crecimiento de SNC en la rata adulta joven, como lo indica la significativa disminución del peso de cerebro y cerebelo.

En el caso del cerebro, la disminución de su peso podría explicarse en base a una baja considerable de la masa protoplasmática acumulada en la célula debida, en parte, a una menor acumulación de proteínas, como lo indican los resultados de la cuantificación de proteínas cerebrales ; la concentración y el contenido total de proteínas en cerebro del grupo tratado con FB disminuyó significativamente.

Por otro lado el contenido total de ADN en cerebro expuesto a FB no se modificó, por lo que la relación proteína/ADN si disminuyó considerablemente; sugiriendo una reducción del contenido proteico por célula.

Por otro lado, la reducción del peso del cerebelo causada por el tratamiento podría ser explicada en base a una disminución de la celularidad, como lo sugieren los resultados de un menor contenido de ADN en el cerebelo y una disminución aunque no tan pronunciada en el contenido de proteínas.

Como se mencionó en la sección de Resultados, el contenido total de ADN se emplea como indicador de celularidad; considerando a éste un parámetro bioquímico confiable aún en tejidos con poblaciones de células poliploides, como es el caso de las células de Purkinje del cerebelo, bajo la consideración de que el número de estas células es mínimo en relación a las otras poblaciones de células diploides y, por tanto, su contribución al contenido total de ADN, también es mínima.

En cuanto a los efectos del FB sobre el crecimiento corporal, los resultados muestran que el tratamiento disminuye la velocidad de crecimiento corporal y debido a esto, hay una baja en el requerimiento de alimento, por lo que la rata tratada consume menor cantidad de dieta que la rata control.

La sola restricción de alimento disminuye la velocidad de crecimiento corporal pero no afecta el peso de cerebro, y cerebelo, tampoco se modifica el contenido de ADN en éstos órganos y, sólo en caso de cerebelo, se presenta una disminución en el contenido protéico.

Schain y Watanabe reportaron que la administración de 30 y 60 mg/kg de FB por vía subcutánea induce sedación en ratas recién nacidas; lo que a su vez causó que las ratas no se alimentaran correctamente.

La dosis de 30 mg/kg empleada en esta investigación, fué elegida en base a los resultados de un estudio piloto previo, en el cual se observó que no hubo efectos sedantes, ni letales. El FB se administró en dosis única por vía oral, disuelto en propilenglicol al 40%. Cada rata recibió vehículo en cantidad no mayor de 2 gr/kg; la cual está muy por debajo de la DL50 del propilenglicol administrado a la rata por vía oral, que es de 28-30 gr/kg. Los resultados no muestran efectos tóxicos relevantes debido a la ingestión de propilenglicol.

Para conocer qué tipo de células son afectadas por el tratamiento se requeriría hacer cuantificación de ADN,ARN y proteínas en fracciones de células purificadas, así como un estudio histológico detallado; lo cual no se realizó en esta ocasión.

Si bien los resultados mostrados no pueden extrapolarse directamente al humano, sí es conveniente llamar la atención en caso del uso prolongado de FB en edades tempranas y estar alerta sobre posibles efectos tóxicos.

CONCLUSIONES

- 1.- La administración crónica de FB durante el período de crecimiento hipertrófico del SNC retrasa el crecimiento de cerebro y cerebelo de la rata.
- 2.- El tratamiento con FB causa disminución de :
peso de cerebro y cerebelo, contenido de ADN, contenido de proteínas cerebrales, y cerebelares.
- 3.- La velocidad de crecimiento corporal y el consumo de alimento disminuyen por efecto del FB.
- 4.- La sola restricción alimentaria solo retrasa el crecimiento corporal sin modificar el peso de cerebro y cerebelo.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Altman, J. and Das, G.D. (1966). Autoradiographic and histological studies of prenatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.* 126: 337-390.
- 2.- Brasel, J.A., Ehrenkrantz, R.A. and Winick, M. (1970). DNA polymerase activity in rat brain during ontogeny. *Develop. Biol.* 23: 424-432.
- 3.- Burton K. (1955). A study of the conditions and mechanism of the Diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of Deoxyribonucleic acid. 62: 315-322.
- 4.- Butler T.C. (1956). The metabolic hydroxylation of phenobarbital. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 116: 326-336.
- 5.- Dalila Martínez de Muñoz; Modo de Acción de algunos fármacos Antiepilépticos. En: *Epilepsia* 1a. Edición. (1986). Ed. Trillas., pag. 149.
- 6.- Davis, K.J. y Jenner P.M. (1959). Toxicity of three drug solvents. *Toxic. Appl. Pharmacol.* 1: 566, 19.
- 7.- Dobbing, J. (1970). Undernutrition and the developing brain. *Amer. J. Dis. Child.* 120: 411-415.
- 8.- Dobbing, J. and Sands, J. (1970). Timing of neuroblast multiplication in developing human brain. *Nature* 226: 639-640.
- 9.- Duckett, S. and Pearse, A.G.E. (1966). The chemo-architectonic patterns of the cerebral cortex of the embryonic and foetal human brain. In proceedings of the Fifth international Congress of Neuropathology, International Congress Series No. 100, *Excerpta Medica*
- 10.- Enesco, M. and Leblond, C.P. (1962). Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J. Embryol. Exp. Morph.* 10: 530-562.
- 11.- Faingold CL, Browning RA. (1987). Mechanisms of the anticonvulsant drug action. *Eur J Pediatr* 146: 2-7.

- 12.- Fisher, E. and Von Mering, J. (1903). *Ther. Gegw.* 44, 97.
- 13.- Fishman R.H.B. and Yanai. (1983). Long lasting effects of early barbiturates on SNC and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7: 19-28.
- 14.- Fishman R.H.B., Ornoy, Yanai. (1983). Ultrastructural evidence of long lasting cerebellar degeneration after early exposure to phenobarbital in mice. *Exp. Neurol.* 79: 212-222.
- 15.- Gilbert Martin, y Laurence Finberg. (1970). Propylene Glycol: A potentially toxic vehicle in liquid dosage form. *The Journal of pediatrics* 77, 877-878.
- 16.- Gupta C., Sonawane, B.R.; Yaffe S.J. (1980). Phenobarbital exposure in utero: Alterations in female reproductive function in rats. *Science* 208: 508-510.
- 17.- Hannah R.S., Roth S.H. y Spira A.W. (1988). Effect of phenobarbital on purkinje cell growth patterns in the rat cerebellum. *Exp. Neurol.* 100: 354-364.
- 18.- Hannah R.S., Roth S.H. y Spira A.W. (1982). The effects of chlorpromazine and phenobarbital on cerebellar purkinje cells. *Teratology* 26: 21-25.
- 19.- Harvey, S.C. (1987). Hipnóticos y Sedantes, en Goodman y Gilman. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editorial Interamericana Sa. Edición p.p. 87.
- 20.- Hauptmann, A. (1912) *Muench. Med. Wochenschr.* 59, 1907.
- 21.- Heyer E.J. McDonald RL. Barbiturate reduction of calcium-dependent action potentials: correlation with anesthetic action. *Brain Res.* 236: 157-171.
- 22.- Horning, E.C., Horning, M.G. (1971). Metabolic profiles: Gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin. Chem.*, 17: 802-809.
- 23.- Jacobson C.D., Antolick L.L., Scholey R. y Vemura E. (1988). The influence of prenatal phenobarbital exposure on the growth of dendrites in the rat hippocampus. *Dev. Brain. Res.* 44: 233-239.

- 24.-James W. Prichard (1980). Phenobarbital: Introduction en "Antiepileptic Drugs" : Mechanism of Action" Editado por G.H. Glaser, J.K. Penry y D.M. Woodbury, Raven Press,pag. 476
- 25.-Joseph A. Ruddick.(1972). Toxicology, Metabolism and Biochemistry of 1,2, - propanediol. *Tox. Appl. Pharm.*21: 102-11.
- 26.-Julius A. Vidal and Elisabeth H. Gerry.(1977). Cyclic Ureides; Cap. 5. En: *Anticonvulsants* .Ed. Academic Press. New York pg. 151.
- 27.-Kakemi, K.Arita T.Hori R.and Konishi,R.(1967).Absorption and excretion of drugs. XXX. Absorption of barbituric acid derivatives from rats stomach. *Chem.Pharm.Bull.* 15:1534-1539.
- 28.-Karp,Brassel and Winick, (1971).Compensatory Kidney growth after uninephrectomy in adult and infant rats. *Amer.J. Dis. Child.* 121: 186-188.
- 29.-Karunyan, A. y Myron, G.(1978).Central Nervous System Toxicity associated with ingestion of propylene glycol. *J.of Ped.* 93, 515-516.
- 30.-Lapham,L.W.(1968).Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science* 159: 310-312.
- 31.-Lowry,O.H.,Rosebraug N.J;Farr, A. J. y Randall, R.J., (1951). protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 32.-Mandel,P.,Rein,H.,Harth-Edel,S. and Mardell, R. (1964). distribution and metabolismof ribonucleic acid in the vertebrate central nervous system. In *Comparative Neurochemistry*,D.Richter (Ed) Pergamon Press, New York, pp. 149-163.
- 33.-Maynert, E.W.(1972). Phenobarbital, mephobarbital and metharbital.Absorption, distribution and excretion. In: *Antiepileptic Drugs*, edited by D.M. Woodbury, J.K. Penry and R.P. Schmidt,pp 303-310. Raven Press, New York.
- 34.-Roger J. Porter y J. Kiffin Penry. Phenobarbital: Biopharmacology Cap. 29 En: *Antiepileptic Drugs*. editado por G.H. Glaser, J.K.,Penry y D.M. Woodbury, Raven press, New York. 1980. p. 593-500.

- 35.-Rosso, P., Hormazábal, J. and Winick, M. (1970). Changes in brain weight, cholesterol, phospholipid and DNA content in marasmic children. *Amer. J. clin. Nutr.* 23: 1275-1279.
- 36.-Schain R.J. y Watanabe K. (1975). Effect of chronic phenobarbital administration upon brain growth of the infant rat. *Exp. Neurol.* 47: 509-515.
- 37.-Schain R.J. y Watanabe K. (1976) Origin of Brain growth retardation in young rats treated with phenobarbital. *Exp. Neurol.* 50: 806-809.
- 38.-Schneider W.C. (1945). Phosphorus compounds in animal tissue. I. Extraction and estimation of Desoxipentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.* 161: 293-303.
- 39.-Speroff L. (1973). Toxemia of pregnancy-mechanism and therapeutic management. *Am. J. Cardiol.* 32: 582-591.
- 40.-The Merck Index 9th edition, an Encyclopedia of chemicals and drugs pag. 939.
- 41.-Thomas C.R., (1976). Routine phenobarbital for prevention of neonatal hiperbilirrubinemia. *Obstret. Gynec., N.Y.* 47: 304-308.
- 42.-Thomas, J.F. Kesel, R. y Hodge, H.C. (1949). Range finding toxicity test on propylene glycol in the rat. *J. Ind. Hys. Toxicol.* 31, 256-257.
- 43.-Williams, R.T. (1972): Progress report: Hepatic metabolism of drugs *Gut*, 13: 579-585.
- 44.-Winick, M. (1968). Changes in nucleic acid and protein content of the human brain during growth. *Pediat. Res.* 2: 352-355.
- 45.-Winick, M. and Brasel, J.A. (1970). A "Final common pathway" for producing either permanent or reversible alterations in organ growth. In proceedings of VIIIth International Congress of Nutrition, Prague, Aug-Sept 1969, International Congress Series No. 213, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, pp. 202-206.
- 46.-Winick, M. and Grant, P. (1968). Cellular growth in the organs of the hipopituitary dwarf mouse. *Endocrinology* 83: 544-547.

- 47.-Winick, M. and Noble, A. (1965). Quantitative changes in DNA, RNA and Protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Develop. Biol.* 12: 451-466.
- 48.-Winick, M., Rosso, P. and Waterlow, J. (1970). Cellular growth of cerebrum, cerebellum, and brain stem in normal and masramic children. *Exp. Neurol.* 26: 393-400.
- 49.-Wroblewski Bruno A.; Garvin William H. (1985). Once Daily administration of phenobarbital in adults. *Arch. Neurol.* 42: 699-700.
- 50.-Yanai J. y Bergman A. (1981). A Neuronal Deficits after neonatal Exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* 73: 199-208.
- 51.-Yanai J, Rosselli - Austin y Tabakoff B. (1979). Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* 63; 237-244.
- 52.-Yanai J., Woolf M, y Feigenbaum J. (1982). Autoradiographic study of phenobarbital's effects on development of the central nervous system. *Exp. Neurol.* 78: 437-449.