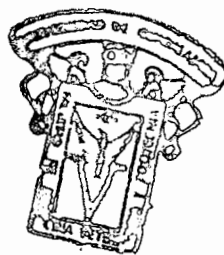


UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

ALTERACIONES EN CERÉBRO, CEREBELO E HIGADO DE RATAS
TRATADAS CON DIFENILHIDANTOINATO SODICO: ESTUDIO
BIOQUIMICO-ESTRUCTURAL (PARTE I, BIOQUIMICO).

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

RAMON IGNACIO RIVERA CHAVEZ

ASESOR: DR. PEDRO GARZON DE LA MORA

GUADALAJARA, JAL. JUNIO DE 1986

A MIS QUERIDOS PADRES,
quienes con cariño y paciencia
han compartido conmigo el camino
de mi formación académica y
espiritual.
Gracias por su confianza
e inquietarme a seguir adelante.

A MIS HERMANOS: ADRIANA, LORENA,
ARMANDO, JORGE, ANTONIO y LUIS,
quienes con su apoyo, orientación
y cariño han hecho posible la
realización de una de las metas
más importantes de mi vida.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Y PROFESORADO, por permitirme
ser miembro de esta Máxima
Casa de Estudios, ya que en ella
están los Maestros de quienes
aprendí tanto.

Agradezco infinitamente al
DR. PEDRO GARZON DE LA MORA, quien
con entusiasmo y perseverancia
asesoró el desarrollo de esta
investigación.

Para la Q.F.B. y amiga
SONIA MARIA ROMAN M.,
agradezco sinceramente su
valiosa dirección y
asistencia durante la
realización de esta tesis.

Para el Maestro y amigo
M. en C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA,
por su orientación y cooperación
durante el desarrollo de esta
investigación.

Con cariño y respeto a mis compañeras
de la Unidad de Investigación
Biomédica de Occidente, IMSS:
M. en C. ALICIA NAVARRO RUIZ,
M. en C. CONCEPCION ALMODOVAR CUEVAS,
Q.F.B. BLANCA ESTELA BASTIDAS RAMIREZ,
por brindarme su ayuda y amistad.

A MI JURADO:
M.V.Z. JAVIER HERNANDEZ RIVERA
M.V.Z. JOSE DE JESUS CASTANEDA S.
M. en C. LUIS G. VILLA MANZANARES
M.V.Z. JAIME VELASCO PADILLA
M.V.Z. DONAJI RUTH SANCHEZ GONZALEZ

A mis amigos y compañeros,
por su amistad, confianza
y sus consejos.



ALTERACIONES EN CEREBRO, CEREBELO E HIGADO DE RATAS
TRATADAS CON DIFENILHIDANTOINATO SODICO: ESTUDIO
BIOQUIMICO-ESTRUCTURAL (PARTE I, BIOQUIMICO).

La fase correspondiente al estudio bioquímico (PARTE I) fue realizado por el pasante en MVZ, Ramón Ignacio Rivera - Chávez, en la División de Bioquímica Farmacológica de la - Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

La fase correspondiente al estudio estructural (PARTE II) fue realizado por el pasante en MVZ, Juan Carlos Ochoa González, en el Laboratorio de Investigación Científica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de - Guadalajara.

I N D I C E

	Pag.
I. ANTECEDENTES	1
- Introducción	
- Epilepsia de los Animales Domésticos.	
- Manifestaciones Clínicas de la Epilepsia Animal.	
- Diagnóstico y Tratamiento de la Epilepsia Animal.	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
III. HIPOTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
V. PROCEDIMIENTO	21
- Diseño Experimental	
- Material	
- Metodología	
VI. RESULTADOS	35
VII. DISCUSION	39
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. REFERENCIAS	43



I. ANTECEDENTES

Introducción

Las enfermedades que afectan al sistema nervioso central pueden agruparse en padecimientos orgánicos y funcionales, de los cuales únicamente los primeros manifiestan cambios estructurales. En los animales domésticos, las enfermedades de orden funcional más importantes son la epilepsia y la histeria (1).

La epilepsia animal aún es un problema en la clínica veterinaria a pesar de numerosas investigaciones debido a las múltiples manifestaciones de ésta, aunado además, a la observación a menudo muy breve de la evolución de la crisis convulsiva, la imposibilidad de establecer los elementos subjetivos experimentados por los enfermos y el carácter fortuito de las respuestas proporcionadas de parte de los propietarios al interrogatorio. Además, es necesario distinguir entre la epilepsia y otras enfermedades que cursan con un síndrome epileptiforme como los síncope, los accesos de anemia cerebral, las "neurosis" de parto, la tetania de lactación, las crisis vasculares paralíticas intermitentes, los síntomas de excitación exagerada o de dolor violento y sobre todo, las psicosis con comportamiento atípico en crisis de repetición y los múltiples incidentes

de la inflamación del sistema nervioso central.

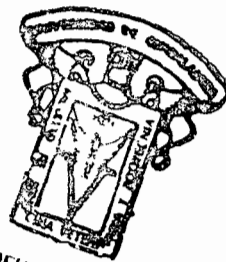
Asimismo, tanto en la epilepsia humana como animal, - existe el problema de que ninguna terapia farmacológica ac tual es totalmente curativa, por lo tanto, los medicamen- tos que se emplean solo controlan la sintomatología del su jeto. Consecuentemente, los fármacos anticonvulsionantes- se administran durante períodos muy prolongados, lo cual - origina efectos tóxicos primarios; éstos, al igual que en- el humano, se inducen tanto en animales domésticos como de experimentación. De aquí se deriva la necesidad de reali- zar estudios bioquímicos y morfológicos en modelos anima- les con la finalidad de precisar dichos efectos tóxicos. - La información procedente de estas evaluaciones permitirá- una mejor terapia farmacológica ya sea en los animales do- mésticos o en el humano, para evitar la presentación de - los efectos tóxicos.

Epilepsia de los Animales Domésticos (2).

A pesar de la gran analogía que existe entre la epi- lepsia animal y humana, la epilepsia espontánea en anima- les domésticos ha sido objeto de menos estudios experimen- tales, de tal manera que las descripciones clínicas son - bastante numerosas. A partir de 1948, los estudios efec- tuados en epilepsia animal permitieron definir y clasifi- car las formas clínicas de la epilepsia en los carnívoros-

apoyándose en la clasificación aceptada en dicha época para el humano. Asimismo, los estudios anatómicos realizados posteriormente permitieron considerar la localización anatómica de las lesiones que se encuentran en la génesis de las crisis convulsivas.

En Medicina Veterinaria se considera que la epilepsia es una enfermedad del sistema nervioso central manifestada por crisis convulsivas (las crisis no convulsivas son difíciles de evaluar), repentinas e intermitentes de evolución rápida e indefinidamente prolongada, que comprende síntomas sensitivo-sensoriales, psíquicos y neurovegetativos. Esta definición permite distinguir la epilepsia de las crisis epileptiformes, término empleado para designar manifestaciones particulares sintomáticas de una excitación sensorial importante, como el dolor, el prurito o una actividad psíquica desordenada que tiene sus repercusiones sobre la actividad motora. En la Tabla 1 se enumeran algunas enfermedades comunes en los animales domésticos que presentan en su sintomatología crisis convulsivas.



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

TABLA 1

CUADROS CLINICOS QUE PRESENTAN CRISIS CONVULSIVAS

Infecciones bacterianas:	Rinoamigdalitis contagiosa.
Infecciones virales:	Rabia, Moquillo, Encefalopatía viral.
Infecciones micóticas:	Criptococosis
Infecciones parasitarias:	Cisticercosis, Ascaridiasis.
Neoplasias cerebrales	
Traumatismos cerebrales	
Intoxicación:	Plantas vegetales, agentes químicos diversos.
Trastornos metabólicos:	Hipoglucemia, desequilibrio electrolítico, anoxia cerebral, tetania del parto.
Deficiencias nutricionales:	Piridoxina, ácido pantoténico, calcio, fierro.

Cabe mencionar que el substrato anatómico y las causas de la epilepsia continúan siendo muy difíciles de precisar en la mayoría de los casos, tanto para los animales domésticos como para el humano.

La importancia de la epilepsia en los animales domésticos varía en función de la especie y su frecuencia. Esta enfermedad se presenta más comunmente en la especie canina, seguida de la bovina, equina y porcina. También se observa en aves, especialmente canarios, loros y gorriones. Asimismo, existen cepas de diferentes especies anima

les susceptibles de presentar crisis convulsivas inducibles experimentalmente por estímulos físicos y químicos.

Manifestaciones Clínicas de la Epilepsia Animal (2)

Las manifestaciones de las crisis epilépticas en todos los mamíferos domésticos pueden estudiarse en función de sus características clínicas, etiológicas y electroencefalográficas.

Los tipos de epilepsia descritos en los animales domésticos son las crisis tónico-clónicas, parciales, psicomotoras y crisis de ausencia.

Las crisis tónico-clónicas se caracterizan por pérdida de la conciencia y rigidez de las extremidades, movimientos de pedaleo, salivación, incontinencia urinaria y fecal. Las crisis parciales cursan con signos localizados, como giro de la cabeza, espasmos de una extremidad sin pérdida de la conciencia. La crisis psicomotora es una condición paroxística que se caracteriza por bravura, histeria e ira.

Además, hay que mencionar la presencia de las manifestaciones premonitorias a la crisis, muy visibles en el animal cuando existen y que pueden preceder a cualquier forma de epilepsia.

Las manifestaciones premonitorias de la crisis tónico-clónicas se caracterizan por cambios de la conducta. El perro puede manifestar síntomas previos desde algunas horas, hasta un día antes de la crisis, acompañado de trastornos en el comportamiento caracterizados por una irritabilidad o una excitación anormal. Asimismo, se observan trastornos sensitivos como la hiperestesia y en ocasiones pueden observarse perturbaciones vegetativas como diarrea, vómitos o polaquiuria.

Otras expresiones más comunes son la tristeza, inquietud y miedo, además, el animal puede quejarse, turbarse, perder el sentido de los hábitos adquiridos y del adiestramiento y lanzarse a una carrera desenfrenada o bien presentar un estado de obnubilación o extravío. La mayoría de las veces, estas manifestaciones psíquicas están entrecortadas o acompañadas por una actividad motora más o menos ordenada, por ejemplo: bostezos, temblor de un miembro, parpadeo, marcha hacia adelante, movimientos de retroceso hasta el apoyo en algún obstáculo, galope rápido evitando o no los obstáculos. Una masticación rápida convulsiva durante un breve instante interrumpe la fase premonitoria, el animal se tambalea y sobreviene la crisis.

La observación de una fase premonitoria en el cerdo es rara, sin embargo, es clásico describir un prodromo que antecede a las crisis. En el curso de ésta, el cerdo pare

ce abatido e inquieto, gruñe permanentemente, camina de modo automático, golpea objetos con la cabeza o el morro, desarrollando después una ataxia locomotora hasta la pérdida del equilibrio, preludio de la fase tónico-clónica de la crisis.

La epilepsia en el caballo en ocasiones se anuncia por determinados signos particulares. El animal se muestra apático y lento en el trabajo, como si estuviera bajo el peso de una gran fatiga; cuando se le estimula, se irrita, sacude la cabeza, se agita convulsivamente y se niega a caminar, pateo con los miembros posteriores, la vista se le debilita y poco a poco la enfermedad se pronuncia de modo más claro.

La crisis tónico-clónica empieza de manera distinta según la especie considerada; el perro se pone rígido, tambalea y cae; el caballo y el buey parecen estupefactos y espantados, tiemblan y caen súbitamente, como un peso muerto, o también permanecen algunos segundos inmóviles y tiesos, mascando, con los ojos fijos y extraviados, las pupilas dilatadas, la respiración es difícil y luego sobreviene la caída. En cuanto al cerdo, cae como fulminado o bien da unos saltos breves sobre sus miembros rígidos.

El período tónico tiene como particularidad en el animal la posición de la cabeza, que está echada hacia atrás-

sobre el cuello, así como el porte de las orejas y de la cola, y la separación de los miembros.

Las contracciones clónicas difieren poco de un animal a otro; el caballo presenta movimientos desordenados de los miembros, que están replegados sobre el vientre y luego se proyectan con violencia; agita la cabeza en todas direcciones; las mandíbulas están animadas de movimientos de masticación verticales y horizontales, y la salivación es abundante. En los carnívoros, los miembros presentan movimientos de pedaleo convulsivos, pero armonizados en el sentido de una acción que recuerda el andar rápido, con gran amplitud de los gestos, lo que constituye una característica de la epilepsia de los carnívoros. Sin embargo, el cerdo puede presentar las mismas manifestaciones.

Al final de la crisis los animales quedan asténicos y suporosos. Los músculos se contraen espasmódicamente durante algunos instantes y luego cesan; aparece taquicardia, la respiración es ruidosa, estertórea y la saliva fluye en sangrentada.

Durante este período de estertor pueden reaparecer los fenómenos psíquicos; el caballo se moverá tal vez lentamente en círculo y ejecutará movimientos automáticos. En el perro se presentan con frecuencia "alucinaciones" que lo impelen a ladrar, huir, defenderse contra un objeto ima

ginario o atacar objetos o personas próximas; pero con mayor frecuencia se trata de un período de confusión y de estupor con ataxia locomotora, hipoexcitabilidad e hiperestesia y, en ocasiones, existe manifestación de prurito imperioso; en algunos casos, un sueño poscrítico que dura varias horas.

Las crisis parciales localizadas son bastante raras - en el animal si se exceptúan las formas faciales o cefálicas, que van acompañadas de movimientos clónicos rápidos - de los músculos de la cara y de la masticación, con pérdida de la conciencia más o menos completa, permaneciendo el animal de pie. Ciertas crisis convulsivas localizadas en determinados grupos musculares como los músculos del cuello o del hombro, que se traducen por temblores, mioclonas o contracciones intermitentes, son sin duda expresión de las crisis parciales. Sin embargo, estas impresiones pueden ser totalmente subjetivas.

Las crisis parciales han sido observadas en los pájaros afectándose una sola ala y luego un lado entero del cuerpo, así como también crisis con parálisis y temblores paroxísticos.

Las crisis psicomotoras que afectan al perro se traducen como una crisis del psiquismo acompañada de manifestaciones motoras de formas particulares y de trastornos vege

tativos, mientras que el estado de conciencia permanece alterado. Los trastornos psíquicos se traducen a menudo por un rasgo dominante, el miedo, que causa la impresión de un pánico incomprensible, desordenado, susceptible de sobreponerse a todos los instintos de conservación; este aspecto-dominante es el causante de la designación de "enfermedad del miedo".

En los casos de las crisis psicomotoras se han descrito numerosas variantes; la forma alucinatoria, en cuyo transcurso el perro parece reaccionar contra algo que le impresiona o le da miedo, con aspecto asustado y agresivo, los miembros distendidos, las pupilas dilatadas y los ojos fijos; la forma ansiosa en la que domina el miedo, ladrando el perro ante un peligro imaginario o refugiándose o escondiéndose en un movimiento de fuga y de sustracción al miedo circundante; la forma procursiva que impele al perro huir desenfrenadamente y correr hasta el agotamiento en línea recta, sin ocuparse de los obstáculos; la forma ambulatoria llamada a veces giratoria, que provoca movimientos de locomoción automáticos; la forma vertiginosa, en la que los animales atáxicos tropiezan y pueden dar la impresión de concentrarse en su inquietud.

Las crisis de ausencia en Medicina Veterinaria representan formas incompletas de las crisis tónico-clónicas, con pérdida del estado de conciencia o cuando menos cierto

grado de obnubilación. Se consideran como ejemplos de crisis de ausencias, numerosas variantes clínicas, como los temblores generalizados, las mioclonas rápidas, los movimientos convulsivos clónicos sin fase tónica previa, y las crisis convulsivas y tetánicas de la perra parturienta. Así pues, esta concepción de crisis de ausencia es diferente en el animal a la descrita en medicina humana.

Diagnóstico y tratamiento Clínico de la Epilepsia Animal.

Para establecer el diagnóstico clínico de epilepsia en los animales domésticos es importante obtener una descripción clara de las manifestaciones clínicas de la crisis convulsiva. Dicha descripción deberá incluir el reconocimiento del carácter general o focal de la crisis, así como de la presencia de movimientos tónicos o clónicos, y además, trastornos de la conciencia (1).

Asimismo, es determinante descartar la presencia de enfermedades de diversas etiologías que cursan con crisis convulsivas. La evaluación clínica del animal se apoya en características tales como la especie, edad, duración de la crisis, frecuencia y tiempo de recuperación. Finalmente puede recurrirse a estudios radiográficos y electroencefalográficos (3).

El tratamiento de la epilepsia necesariamente es sin-

tomático en virtud de que la causa de la misma permanece desconocida.

Los fármacos antiepilépticos constituyen una clase especial de anticonvulsionantes capaces de suprimir las crisis epilépticas a dosis que originan poca o ninguna acción sedante. El empleo de pruebas de selección en animales de experimentación ha permitido el desarrollo de varios fármacos antiepilépticos eficaces, tales como difenilhidantoína, carbamazepina, primidona, fenobarbital, valproato de sodio, etc.

La elección de un fármaco antiepiléptico depende del tipo de epilepsia y de la respuesta del individuo. El fármaco se administra a dosis crecientes hasta que desaparecan los episodios o se presentan efectos tóxicos. Una combinación de dos fármacos muchas veces resulta más eficaz que dosis elevadas de un solo medicamento. Cuando un fármaco resulta poco o nada eficaz, debe suprimirse gradualmente y al mismo tiempo substituirse por dosis crecientes del otro. La supresión brusca de un fármaco antiepiléptico parcialmente eficaz muchas veces origina un estado epiléptico. (4)

La difenilhidantoína (DFH) es un ejemplo de los diversos fármacos seleccionados como el mejor antiepiléptico de 70 compuestos relacionados en 1948. Fue sintetizado en -

1922 en una búsqueda de hipnóticos que pudieran tener venta ja sobre los barbitúricos, pero para entonces fue rechazado porque sus acciones hipnóticas eran débiles (5)

La DFH es un ácido orgánico débil de peso molecular - de 252.26 y un pK de 8.3. Difícilmente se disuelve en - - . agua, pero fácilmente lo hace en álcalis y solventes orgánicos. La solubilidad aparente en el plasma es aproximadamente de 75 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C, debido a la unión de las proteínas - con el exceso del fármaco (6). Su absorción desde el intestino, después de su administración oral, queda limitada por su baja solubilidad en el líquido acuoso luminal. Sin em-- bargo, cuando se ingiere la sal sódica de difenilhidantoína (DFH-Na), ésta penetra al sistema circulatorio, luego se - acopla a las proteínas plasmáticas y alcanza niveles cere-- brales dentro de un lapso de minutos después de su aplica-- ción intravenosa (7).

El DFH-Na se metaboliza por la función mixta del sistema de oxidasas hepáticas. Entre los metabolitos aislados, - predomina la p-hidroxifenitoína, también se forman en pequeñas cantidades de un dihidrodiol, un catecol y un o-metilca tecol, excretables por la orina como metabolitos más pola-- res que el DFH-Na; o bien, como conjugados con ácido gluco-- rónico. La excreción urinaria de DFH-Na sin cambios, se -- aproxima al 5% (8).

Los primeros estudios sobre la distribución del DFH - aplicado intravenosamente en ratas, señalan que las concentraciones de este fármaco en hígado, riñón y glándulas salivales son mayores que las correspondientes a cerebro o - niveles plasmáticos; lo cual revela que estos tejidos pueden ser considerados como competitivos con el cerebro para la captación de fármacos durante el período inmediato a la administración.

El DFH-Na que ingresa al hígado se metaboliza rápidamente y sus metabolitos son eliminados por la bilis y subsecuentemente por el tracto intestinal. Una pequeña cantidad de DFH y sus metabolitos se excretan por las heces - - cuando el fármaco se inyecta por vía endovenosa. En cambio, cuando el fármaco se administra por vía oral, se excreta un 10% de DFH sin cambios por el tracto gastrointestinal. Este porcentaje de DFH además de sus metabolitos - pasan a la sangre y posteriormente se excretan por la orina o son distribuídos por varios órganos. (9)

El DFH-Na no es un anticonvulsionante general, como - el fenobarbital; no se emplea en el tratamiento de emergencia por envenenamiento con fármacos convulsionantes o crisis tetánicas. Su actividad anticonvulsionante ocurre después de la administración de varias dosis del fármaco. (10)

En los humanos, los efectos terapéuticos clínicos e -

intoxicación inducidos por el DFH-Na están relacionados con los niveles sanguíneos del fármaco (11). Cuando las concentraciones séricas de DFH-Na son superiores a 20 $\mu\text{g/ml}$ y durante una exposición prolongada, aparecen manifestaciones tóxicas inducidas por el fármaco; en cambio a concentraciones entre 10-20 $\mu\text{g/ml}$, la toxicidad es baja (12). Las reacciones tóxicas en el humano, frecuentemente reflejan trastornos en los sistemas ventricular-cerebelar y se manifiestan por ataxia, nistagmus, diplopia y temblor. Otras manifestaciones tóxicas incluyen neuropatía periférica, anemia megaloblástica, hipocalcemia, osteomalacia secundaria a la deficiencia de vitamina A, hirsutismo, acné, hiperplasia gingival, etc. (13).

Los estudios post-mortem en hígado y cerebelo de pacientes epilépticos que recibieron DFH-Na durante un período prolongado revelan datos de necrosis hepáticas y daño de las células de Purkinje, respectivamente. A pesar de ello persiste la duda si el cambio degenerativo de estas células es ocasionado exclusivamente por el fármaco en sí. Los estudios histopatológicos realizados en hígado de rata, después de la administración intraperitoneal de DFH-Na durante períodos prolongados mostraron la aparición de vacuolas claras en el citoplasma de los hepatocitos, así como cuerpos parecidos a lisosomas, citosegresomas, cuerpos residuales y gotas de lípidos (14).

A pesar de los efectos colaterales indeseables reportados durante la administración prolongada de DFH-Na, este fármaco sigue siendo el compuesto de elección para el control de las crisis tónico-clónicas; por lo tanto, continúa mereciendo la atención de estudios amplios con el propósito de conocer su mecanismo de acción y poder disminuir sus efectos colaterales, así como para desarrollar fármacos - con núcleo químico semejante.



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

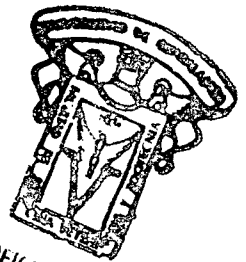
A pesar de que el DFH-Na es un excelente antiepiléptico para el control de crisis convulsivas, se ha observado que causa efectos colaterales tales como ataxia, nistagmus, hiperplasia gingival y hepatitis cuya patogenia aún no se ha definido.

Por otra parte, se piensa que las crisis convulsivas por sí mismas y el estado de hipoxia cerebral transictal son capaces de ocasionar daño cerebelar que explican la ataxia y el nistagmus en los individuos epilépticos. Sin embargo, han surgido evidencias post-mortem, en donde se asocia el uso prolongado de este fármaco con el desarrollo de cambios degenerativos cerebelares. Asimismo, la ingestión del DFH-Na se asocia con la aparición de alteraciones funcionales hepáticas, que en ocasiones llegan a manifestarse como hepatitis fulminantes.

Por lo tanto, es importante realizar estudios de celularidad con el propósito de precisar si el DFH-Na induce cambios degenerativos tisulares asociados con el uso prolongado de este fármaco, así como en función de los niveles séricos del mismo.

En virtud de que los estudios de celularidad con un enfoque bioquímico y morfológico no pueden realizarse en

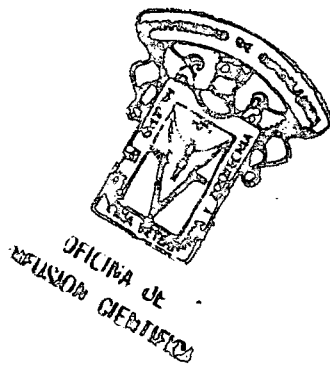
el humano ni en el animal doméstico necesitamos acudir a -
los modelos de experimentación en animales de laboratorio-
para lograr tales propósitos.



OFICINA DE
EXTENSION CIENTÍFICA

III. HIPOTESIS

El difenilhidantoinato sódico ocasiona lesiones tisulares que son evidentes por cambios morfológicos y bioquímicos del sistema nervioso central e hígado, a dosis que corresponden a niveles séricos superiores al rango terapéutico.



IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los efectos que potencialmente induce el difenilhidantoinato sódico sobre tejidos de ratas, en función de los niveles séricos.

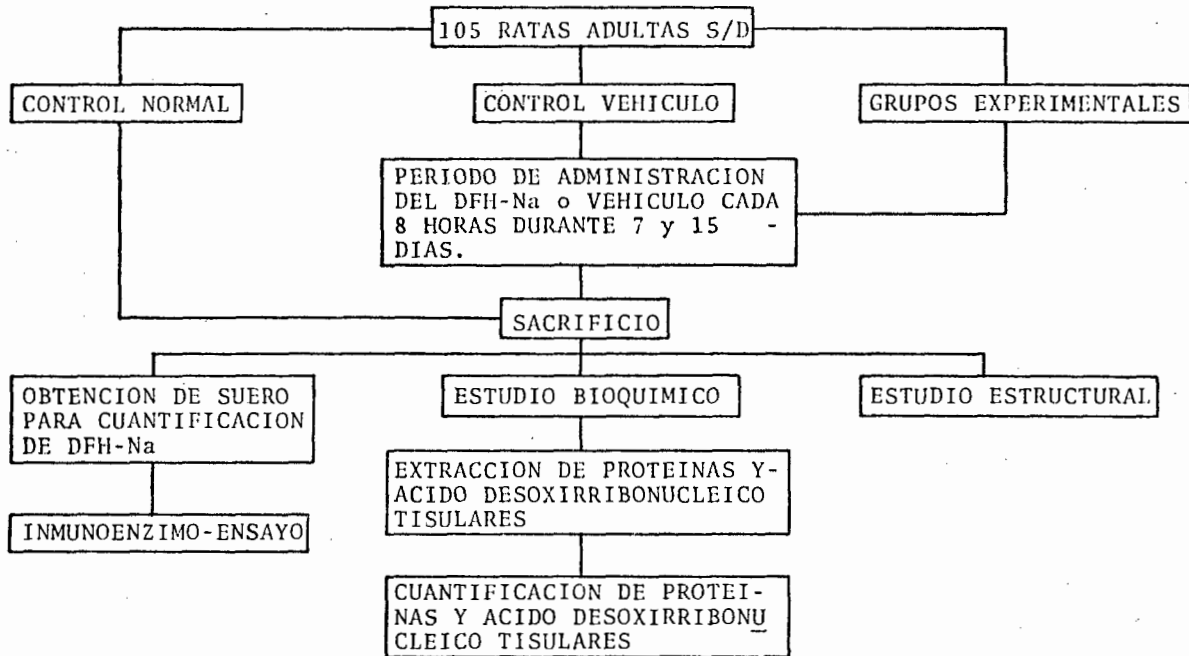
OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Cuantificación de los niveles séricos de difenilhidantoinato sódico al final de cada período de experimentación (7 y 15 días).
2. Extracción y cuantificación de las proteínas de cerebro, cerebelo e hígado al término del período de experimentación de 7 y 15 días.
3. Extracción y cuantificación del ácido desoxirribonucleico de cerebro, cerebelo e hígado al finalizar el período de experimentación.
4. Observación histopatológica de cerebro, cerebelo e hígado de las ratas tratadas con difenilhidantoinato sódico, así como de sus respectivos controles mediante técnicas de microscopía óptica.

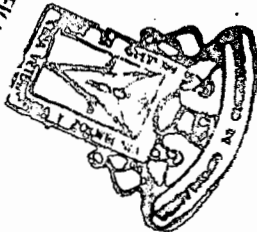
V

P R O C E D I M I E N T O

DISEÑO EXPERIMENTAL



OFICINA DE
RECORDS CONTROL



MATERIAL

1) Material biológico

105 ratas Sprague Dawley adultas

2) Material Farmacológico

Hidantoina, RUDEFSA

Vehículo, RUDEFSA

Sal sódica de 5,5,-difenilhidantoina, SIGMA

Vehículo preparado en el laboratorio: propi-

lenglicol 2 ml; alcohol etílico, 0.53 ml;

agua destilada, 2.47 ml.

3) Reactivos Químicos

Acetaldehído 0.2%

Acido acético glacial

Acido clorhídrico (HCl)

Acido desoxirribonucleico (ADN)

Acido perclórico 60%

Acido sulfúrico

Acido tricloroacético 5% (TCA)

Agua destilada

Albúmina bovina

Carbonato de sodio 2% (Na_2CO_3)

Cloroformo-metanol 2:1

Cloroformo metanol 1:2 5% agua

Difenilamina

Eosina
Etanol absoluto
Etanol 96°
Eter sulfúrico anhidro
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)
Glutaraldehido
Hematoxilina de Harris
Heparina
Hidróxido de amonio
Hidróxido de sodio 0.1N (NaOH)
Hidróxido de sodio 1 N
Hielo
Parafina
Procaína
Reactivo de Folin Ciocalteu-fenol 1:1
Solución de Hartmann
Solución salina 0.85% (SSF)
Sulfato de cobre 0.5% (CuSO_4)
Tartrato doble de sodio y potasio 1%
Tiopental sódico
Xilol

4) Cristalería

Agitador de vidrio de 15 cm
Balones aforados de 50 y 100 ml

Frascos de vidrio de 20 ml con tapón de plástico.

Frascos color ambar de 4 litros

Gradilla para 40 tubos de ensaye

Homogeneizador Pyrex 19 x 150

Pipetas aforadas de 1 y 2 ml

Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml

Pipetas semiautomáticas de 50, 100, 250 y 500 ul

Tubos de centrífuga graduados de 50 ml

Tubos de policarbonato para centrífuga de 50 ml

Tubos de ensaye de 13 x 100

Tubos de 50 ml con tapón esmerilado

Vasos de precipitado de 50, 250 y 1000 ml

5) Material de Curación

Agujas hipodérmicas

Algodón

Gasas

Jeringas desechables de 1 y 5 ml

Navajas de bisturí

Palangana metálica

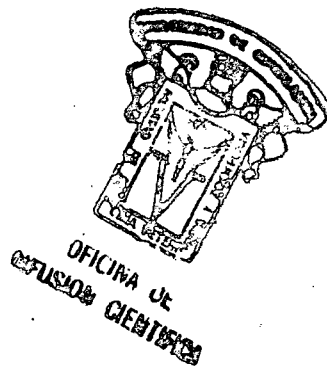
6) Equipo e Instrumentos

Balanza analítica Chyo Jupiter modelo C3-200

Bomba Peristáltica

Baño de Flotación
Cánula esofágica
Cámara de anestesia
Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5 de
 alta velocidad
Centrífuga Sorvall GLC-2
Espectrofotómetro Coleman modelo 6/20A
Estuche de disección
Fuente de poder para homogeneizar Mighty
 Midgely Stirrer
Guillotina
Histokinete
Microscopio óptico Rossbach
Microtomo de rotación
Osmómetro Automático
Platina de calentamiento Corning PC-35
Refrigerador
Vórtex-Genie

- 7) Otros
Cinta masking
Lápiz graso
Pinzas Mohr
Mangueras de hule
Reloj con segundero
Tabla de disección



METODOLOGIA

Para la realización de este estudio se emplearon 105 - ratas adultas de la cepa Sprague Dawley (S/D), de ambos - - sexos, cuyo peso corporal oscilaba entre 200 y 300 gramos. - Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales de - bioterio y alimentación "ad libitum" de agua y Chow Purina- para roedor.

Las ratas se distribuyeron en 7 grupos de 15 animales- cada uno de la siguiente manera:

GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS DFH-Na (mg/kg)	TIEM PO (días)	CLAVE
I	EXPERIMENTAL	100	7	100/7
II	EXPERIMENTAL	150	7	150/7
III	CONTROL VEHICULO (0.5 ml RUDEFSA)	-	7	CV/7
IV	EXPERIMENTAL	100	15	100/15
V	EXPERIMENTAL	150	15	150/15
VI	CONTROL VEHICULO (0.5 ml LABORATORIO)	-	15	CV/15
VII	CONTROL NORMAL (ni fármaco ni vehículo)	-	-	CN

A los grupos experimentales de ratas (I, II, IV, V) se les administró 100 y 150 mg de DFH-Na/Kg cada 8 horas por - vía oral durante 7 y 15 días, respectivamente.

A los grupos control de vehículo (III, VI) se les administró 0.5 ml de vehículo de RUDEFSA o del preparado en el laboratorio, respectivamente.

Al grupo control normal (VII) de ratas no se les administró ni fármaco ni vehículo.

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de concentración de ADN y proteínas tisulares de cada grupo se realizó la prueba "T" de Student.

Preparación de la solución de DFH-Na

La solución de DFH-Na se preparó a una concentración necesaria para administrarle a las ratas en un volumen no mayor a 0.5 ml, la cantidad de fármaco correspondiente a su peso para cada dosis señalada. Para la dosis de 100 y 150 mg de DFH-Na/Kg de peso se prepararon soluciones de 50 y 75 mg de DFH-Na/ml, respectivamente.

El cálculo del volumen administrado de la solución de DFH-Na se realizó de la siguiente manera:

$$\text{Volumen de la solución/rata} = \frac{\text{Peso de la rata (g)} \times \text{Dosis (mg/kg)}}{1000 \times \text{Concentración solución (mg/ml)}}$$

Administración de la solución de DFH-Na y Vehículo

La administración de las soluciones de DFH-Na y vehícu

lo se realiza de la siguiente manera:

La rata se sostiene con la mano izquierda protegida - con un guante de asbesto. El animal se sujeta firmemente manteniendo la cabeza entre los dedos índice y medio. La cánula esofágica de acero inoxidable (calibre 18) se ensambla previamente en una jeringa desechable de 1 ml y se llena con la cantidad de solución de DFH-Na calculada para cada rata. Con la mano derecha se sostiene la jeringa introduciendo suavemente la cánula por el esófago de la rata. - El émbolo de la jeringa se oprime para introducir la solución de DFH-Na.

Cuantificación de los niveles séricos de DFH-Na (15)

Para precisar los niveles séricos de DFH-Na, al término de cada período experimental (7 y 15 días) se sacrificaron 2 ratas de los grupos 100/7,150/7,100/15 y 150/15, respectivamente.

RATA (sacrificio por decapitación, previa anestesia con éter)



SANGRE (tubo de ensaye)
Reposo 1 hora a temperatura ambiente
separar el coágulo



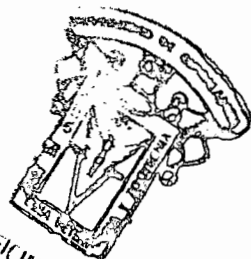
CENTRIFUGACION



2,500 rpm x 15 min

SUERO (separar con pipeta pasteur)

CUANTIFICACION DFH-Na
INMUNOENZIMO-ENSAYO



OFICINA DE
MISIONES CIENTIFICAS

Immunoenzimo Ensayo (EMIT)

El ensayo EMIT (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique) es un método de inmunoensayo empleado para el microanálisis de compuestos específicos en líquidos biológicos. Un fármaco se marca con una enzima y cuando el fármaco enzima-marcada se une al anticuerpo contra el fármaco, la actividad de la enzima se reduce. El fármaco en el suero compete con el fármaco enzima-marcada por el anticuerpo, por lo tanto disminuye la inactivación del fármaco inducida por la enzima. La actividad enzimática se correlaciona con la concentración de fármaco en la muestra y se mide mediante el cambio de absorbancia resultante de la acción catalítica de la enzima sobre el sustrato.

ESTUDIO BIOQUIMICO

Extracción y Cuantificación de Proteínas y Acido Desoxirribonucleico Tisulares (16)

Al término del período de experimentación (días 7 y 15) se sacrificaron 10 ratas de los grupos 100/7, 150/7, CV/7, 100/15, 150/15 y CV/15, respectivamente, así como igual número de animales del grupo CN. Los tejidos disecados fueron cerebro y cerebelo intactos y aproximadamente 1-gramo de hígado.

RATA (sacrificio por decapitación
previa anestesia con éter)

CEREBRO

HIGADO

CEREBELO
(craneotomía)

(laparotomía)

LAVAR SSF fría

Conservar SSF fría en ba-
ño de hielo, eliminar - -
exceso de SSF

PESAR (balanza analítica)


Anotar el peso de cada tejido

CONSERVAR en frascos de vidrio con
10 ml de cloroformo-meta-
nol 2:1 a 4°C.



Posteriormente, dichos tejidos se sometieron al proceso de extracción y cuantificación de proteínas y ácido desoxirribonucleico tisulares.





HOMOGENIZAR (cloroformo-metanol 2:1 4°C)

 Centrifugar 15,000 rpm 4°C x
15 min*



BOTON TISULAR

Desechar sobrenadante   10 ml cloroformo-metanol 1:2 5%
H₂O agitar, reposo 30 min tempe-
ratura ambiente*



BOTON TISULAR

Desechar sobrenadante   15 ml etanol absoluto 2 veces
agitar*



BOTON TISULAR

Desechar sobrenadante   10 ml TCA 5% frío, agitar, 2 veces
refrigerar x 15 min*

BOTON TISULAR

Desechar sobrenadante   15 ml TCA 5%, calentar 90°C en
baño María x 25 min., agitar, en
friar*



BOTON TISULAR

Conservar sobrenadante   10 ml TCA 5%, calentar 90°C en
baño María x 15 min., agitar, en
friar,*

BOTON TISULAR

Conservar sobrenadante   10 ml TCA 5%, agitar,*

BOTON TISULAR

Conservar sobrenadante   10 ml de NaOH 1N aforar a 50 ml -
con agua destilada

Recolectar sobrenadantes
aforar a 50 ml con TCA 5%



EXTRACTO ACIDO 1:50
Cuantificación de proteí-
nas ácidas y DNA



EXTRACTO ALCALINO 1:50
Cuantificación de proteí-
nas alcalinas

REACCION DE LA DIFENILAMINA (Cuantificación de ADN)(16)

El reactivo de la difenilamina se prepara cada vez que vaya a ser utilizado.

Difenilamina	1.5 g
Ac. acético glacial	50 ml
H ₂ SO ₄	1.5 ml
Mezclar	
Acetaldehido	0.5 ml
Mezclar	

Se prepara una solución patrón de ADN que contenga - 100 µg de ácido desoxirribonucleico por cada mililitro de solución.

	PROBLEMA	PATRON	BLANCO
EXTRACTO ACIDO 1:50 (cerebro, cerebelo, hígado)	2 ml	-	-
TCA 5%	2 ml		2 ml
PATRON DE ADN	-	1 ml	-
TCA 10%	-	1 ml	1 ml
Agrega a todos los tubos, 0.17 ml de HClO ₄ al 60% agitar con vortex.			
REACTIVO DE DIFENILAMINA	2 ml	2 ml	2 ml
Agitar con vortex			
Incubar a 10°C durante 45 horas, luego recuperar la - temperatura de laboratorio y leer a 600 nm contra el blan- co. Anotar la densidad óptica (D.O.) del problema y patrón.			

METODO DE LOWRY (Cuantificación de Proteínas) (17)

Reactivos:

- A. Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N
- B. CuSO_4 al 0.5%
- C. Tartrato doble de sodio y potasio
- D. A 50 ml de reactivo A, se le agregan agitando 0.5 ml del reactivo C y 0.5 ml del reactivo B.
- E. Reactivo de Folin Ciocalteu-fenol diluido 1:1 con agua destilada.

La solución patrón de albúmina se prepara con una concentración de 250 μg de albúmina por cada mililitro de solución.

	PROBLEMA	PATRON	BLANCO
EXTRACTO ACIDO 1:50 (cerebro, cerebelo, hígado)	0.4 ml	-	-
TCA al 5%			0.4 ml
EXTRACTO ALCALINO (1:50) (cerebro, cerebelo, hígado*)	0.2 ml	-	-
AGUA DESTILADA	0.2 ml	-	0.4 ml
PATRON DE ALBUMINA	-	0.4 ml	-
REACTIVO D	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
<p>Agitar muy bien y dejar reposar durante 10 minutos. Al añadir el siguiente reactivo es importante que el tiempo entre la adición y la agitación, no exceda de 4 segundos, ya que la vida media del reactivo en estas condiciones es menor a 8 segundos.</p>			
REACTIVO E	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
<p>Reposar 30 minutos y luego leer en el espectrofotómetro a 550 nm contra el blanco respectivo. Anotar la densidad óptica del problema y patrón (D.O.).</p>			

*dilución 1:10

VI. RESULTADOS

NIVELES SERICOS DE DFH-Na ADMINISTRADO POR VIA ORAL DURANTE
7 y 15 DIAS.

DOSIS	TIEMPO ADMINISTRACION	NIVEL SERICO
100 mg/kg	7 días	28.5 µg/ml
150 mg/kg	7 días	19.4 µg/ml
100 mg/kg	15 días	8.9 µg/ml
150 mg/kg	15 días	9.5 µg/ml



ESTUDIO BIOQUIMICO

GRAFICA 1

Muestra la concentración de proteínas totales encontradas en cerebro de ratas S/D, en las siguientes condiciones experimentales: control normal (CN), control con vehículo - durante 7 días (CV/7), 100 y 150 mg de DFH-Na/kg de peso durante 7 y 15 días (100/7, 150/7, 100/15 y 150/15, respectivamente) y el control correspondiente del vehículo durante 15 días (CV/15). No se observan diferencias estadísticamente significativas a excepción del grupo control que recibió solvente durante 7 días, cuando se compara con el grupo de animales normales ($p < 0.05$).

GRAFICA 2

La concentración de proteínas encontrada en cerebelo de rata tratada con 100 mg de DFH-Na/kg de peso es menor que las cifras detectadas en los animales que recibieron 150 mg de DFH-Na/kg de peso durante 7 días ($p < 0.001$). Asimismo, observamos diferencias entre los controles normales de aquellos que recibieron el vehículo durante 7 días ($p < 0.001$). Se observa una disminución en la cantidad total de proteínas en el grupo de animales control de vehículo durante 7 días, así como una recuperación a cifras normales en el grupo de 15 días ($p < 0.001$). El mismo fenómeno -

se observa en los animales tratados con 100 mg de DFH-Na/kg de peso durante 7 y 15 días.

GRAFICA 3

Se grafica la concentración de proteínas totales en hígado de rata S/D en relación con las variables indicadas con las figuras previas. No se observa diferencias estadísticamente significativas.

GRAFICA 4

En esta gráfica se indica los valores de ADN en cerebro de rata S/D para las variables indicadas. No aparecen diferencias estadísticamente significativas.

GRAFICA 5

La concentración de ADN en cerebelo de rata S/D para las variables indicadas no muestra diferencias estadísticamente significativas.

GRAFICA 6

En hígado se observa que a dosis de 100 y 150 mg de DFH-Na/Kg de peso durante 7 días, los valores de ADN son ma yores que los encontrados para el control de animales norma

les. ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente); así como el grupo correspondiente al control de vehículo ($p < 0.001$).

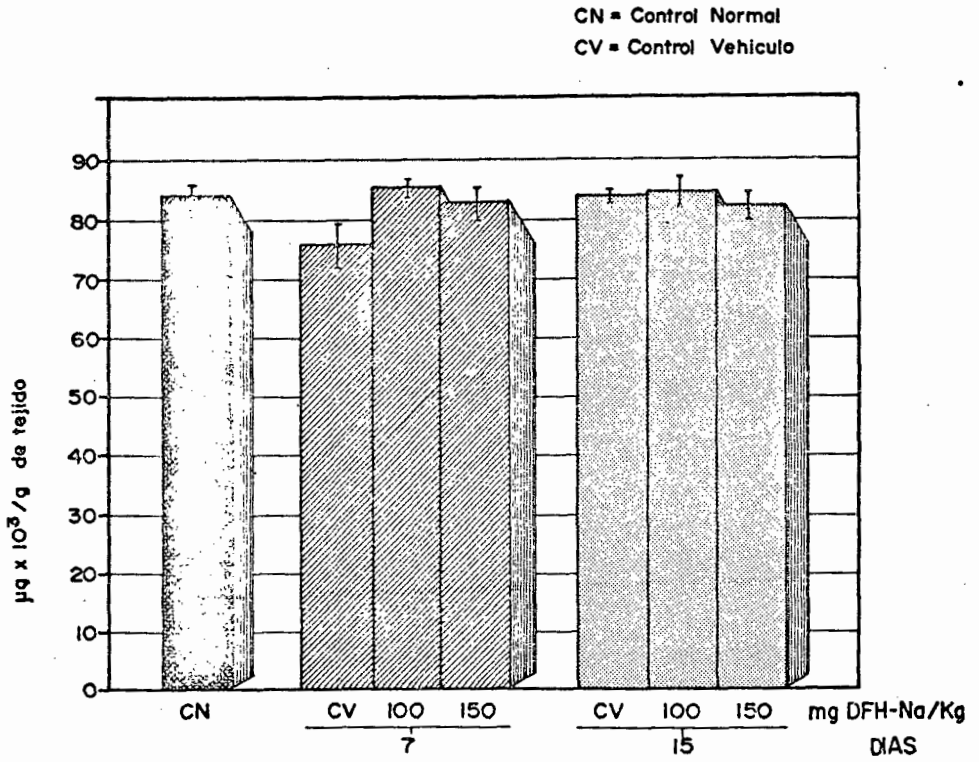
La concentración de ADN es significativamente menor - en los grupos de animales que recibieron DFH-Na a concentración de 100 y 150 mg/kg de peso durante 15 días con respecto al control de vehículo durante el mismo período - - - - ($p < 0.02$ y $p < 0.001$, respectivamente). Sin embargo, con respecto al control normal, estos grupos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados correspondientes al estudio morfológico de esta investigación se encuentran en la PARTE II de esta misma.



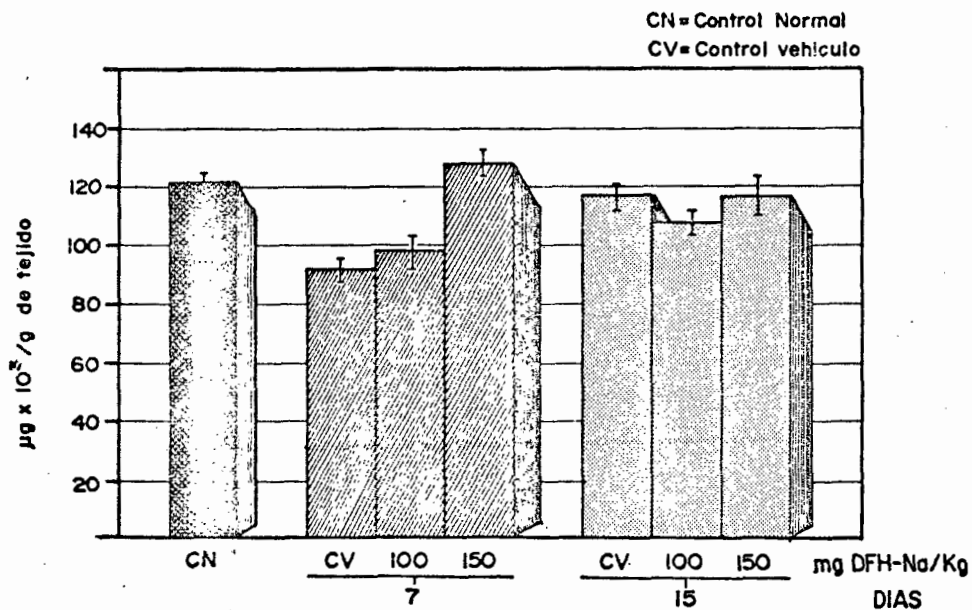
GRAFICA 1

PROTEINAS TOTALES EN CEREBRO DE RATÀ S/D



GRAFICA 2

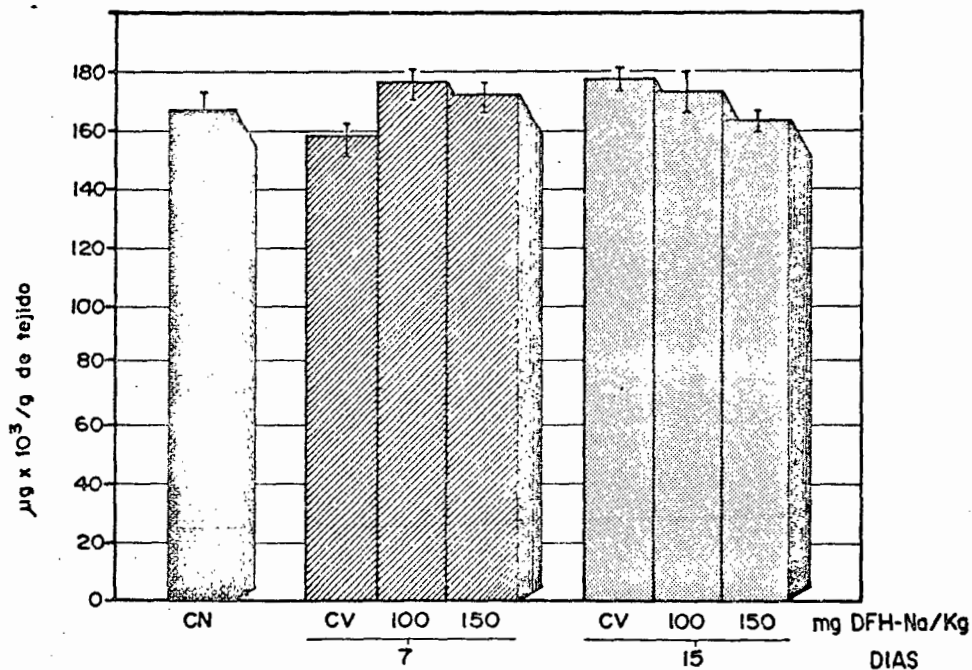
PROTEINAS TOTALES EN CEREBELO DE RATA S/D



GRAFICA 3

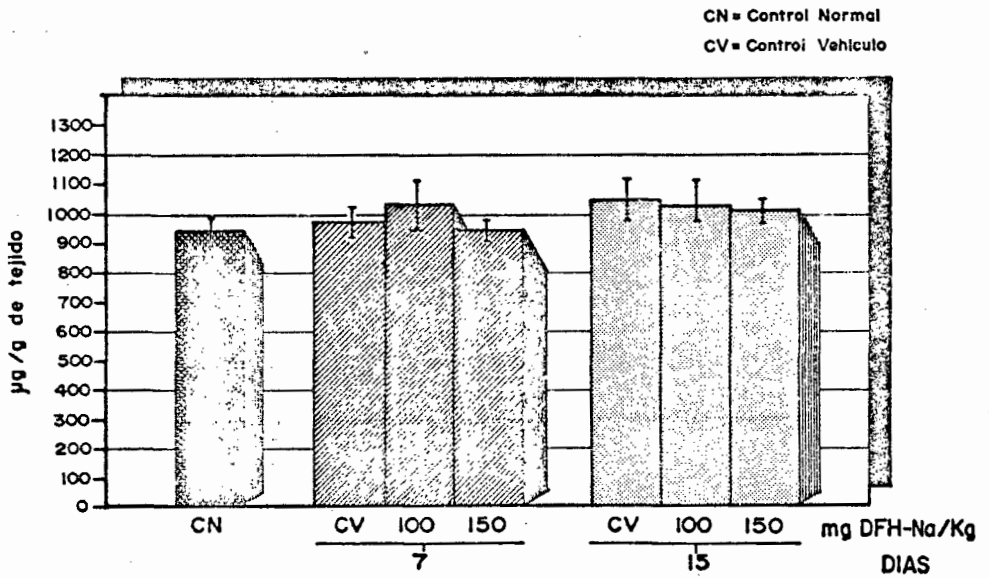
PROTEINAS TOTALES EN HIGADO DE RATA S/D

CN = Control Normal
CV = Control Vehiculo



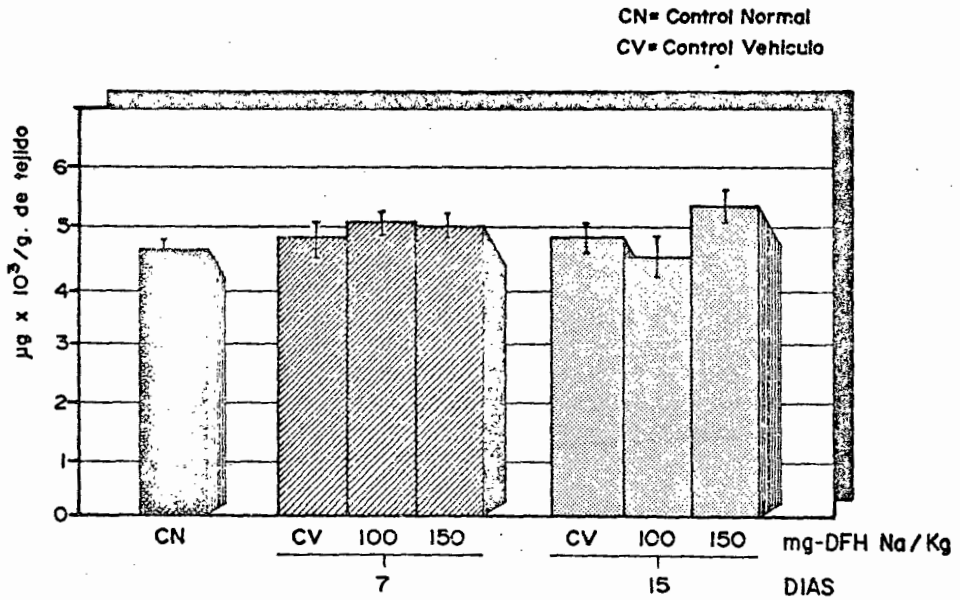
GRAFICA 4

CONCENTRACION DE ADN EN CEREBRO DE RATA S/D



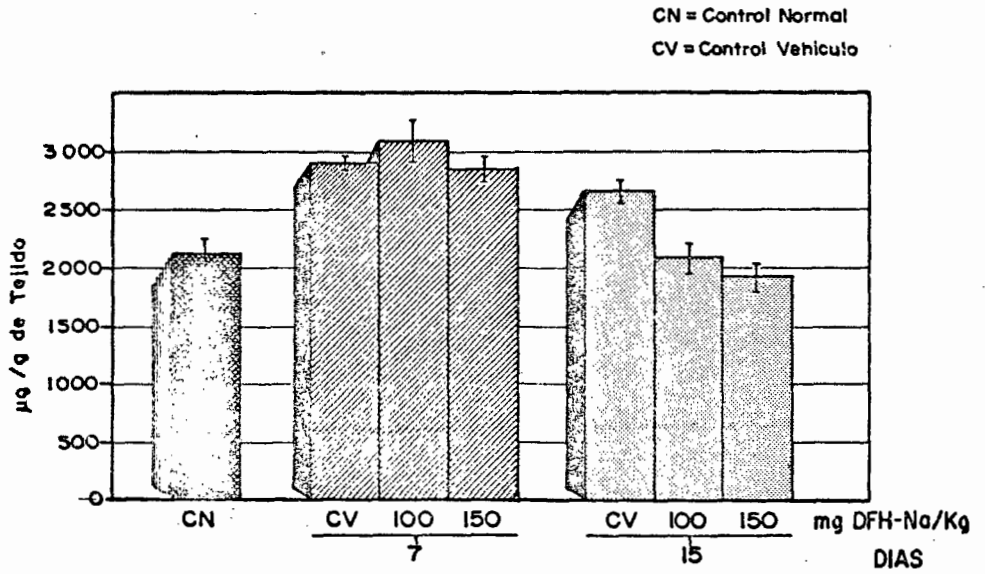
GRAFICA 5

CONCENTRACION DE ADN EN CEREBELO DE RATA S/D



GRAFICA 6

CONCENTRACION DE ADN EN HIGADO DE RATA S/D



VII. DISCUSION

De acuerdo a lo observado en las tres primeras gráficas, el hígado posee mayor concentración de proteínas por gramo de tejido que cerebro y cerebelo, en todas las condiciones estudiadas. El vehículo del medicamento en el grupo control correspondiente se asocia con una disminución en el contenido tisular de proteínas que predomina en cerebro y cerebelo. El efecto del vehículo no resulta significativo con respecto al control en hígado. Paradójicamente, 100 mg/kg durante 7 días de administración del DFH-Na muestra menor concentración de proteínas en cerebelo que la administración de 150 mg/kg durante el mismo período. Sin embargo, requiere de corroboración en virtud de que el mencionado efecto no se observa tan acentuado en el mismo grupo tratado con DFH-Na durante 15 días. La comparación de ambos controles en cerebro y cerebelo definitivamente indica que el vehículo utilizado disminuye el contenido celular de proteínas por mecanismos pendientes de esclarecer. El efecto tóxico del propilenglicol, polietilenglicol y etanol, se ha descrito previamente. Inclusive, este último ocasiona disminución del número de células de Purkinje en pacientes con alcoholismo crónico.

En contraposición a lo que sucede con la administración de DFH-Na por vía i.p., los animales de experimenta-

ción que recibieron este medicamento no mostraron cambios en el contenido de ADN de cerebro y cerebelo, lo cual revela que el medicamento no ocasionó destrucción tisular en ambos órganos, utilizando 100 y 150 mg/kg de DFH-Na durante los dos períodos de administración indicados. Lo anterior coincide con cifras del medicamento en sangre que oscilan dentro del rango normal para ambas dosis.

En hígado, es probable que el daño tisular se manifiesta a 100 y 150 mg/kg administrados durante 15 días, debido a que un incremento en el ADN hepático como se observa a los 7 días, implicaría la necesidad de una proliferación tisular. Es posible que el incremento en las concentraciones de ADN a los 7 días con respecto al control sin vehículo pueda asociarse a un estímulo inductor de síntesis de ADN, según se infiere de los experimentos efectuados en individuos a cuyas heridas se ha aplicado DFH-Na, tópicamente. Por otra parte, la disminución en la concentración de ADN de los diferentes grupos a los 15 días podría atribuirse a la necesidad de evaluar el efecto del vehículo utilizado para disolver el medicamento.



VIII. CONCLUSIONES

1. El DFH-Na administrado durante 7 días por vía oral a dosis de 100 y 150 mg/Kg de peso proporciona niveles séricos más elevados que los obtenidos durante 15 días a las mismas dosis.
2. Este antiepiléptico a dosis de 100 mg/Kg de peso disminuye la concentración tisular de proteínas durante 7 días en cerebelo; pero carece de dicho efecto transcurridos los 15 días de administración del mismo.
3. El DFH-Na administrado a dosis de 100 y 150 mg/Kg de peso durante 7 días incrementa la concentración tisular de ADN en hígado; en cambio transcurridos los 15 días de administración la concentración de ADN hepático es similar a los valores obtenidos en el grupo control.
4. El vehículo del DFH-Na administrado durante 7 días disminuye la concentración de proteínas tisulares en cerebro y cerebelo pero carece de dicho efecto transcurridos los 15 días. En cambio, el incremento de ADN hepático observado a los 7 días se mantiene durante los 15 días de administración del fármaco.

5. El DFH-Na administrado oralmente podrá ocasionar lesiones que se manifiestan con cambios morfológicos - mínimos; sin embargo, no disminuye la celularidad -- como se infiere a través de la concentración de ADN-tisular.

IX. REFERENCIAS

1. Mayer, K. Diseases of the Brain. En: Canine Medicine Second Edition. Pg 573. Editado por H. Preston - Hoskins, V.M.D.; J.V. Lacroix, D.V.S. American Veterinary Publications, Inc. 1966.
2. Fontaine M. y Leroy, C. Epilepsia Espontánea de los - Animales Domésticos. En Psiquiatría Animal. Pg. 457. Editado por A. Brion y Henri Ey. Siglo Veintiuno Editores S.A. 1968.
3. Hoerlein, B.F. General Brain Disorders. En Canine Neurology, Diagnosis and Treatment. Pg 257. W.B. Saunders Company, 1965.
4. Rally, T.W. y Schleifer, L.S. Drogas Efectivas en el Tratamiento de la Epilepsia. En las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Sexta Edición. Pg. 449. - Editado por Alfred G. Gilman, Louis S. Goodman, Alfred Gilman. Editorial Panamericana, 1981.
5. Vida, J.A. y Gerry E.H. Cyclic Ureides. En Anticonvulsants. pg 151. Editado por Julius A. Vida. Academic Press, 1977.
6. Glazko, A.J. Diphenylhydantoin Chemistry and Methods for Determination. En Antiepileptic Drugs. Editado -

- por D.M. Woodbury, J.K. Penry, R.P. Schmidt. Raven - Press, 1972.
7. Alvin, J.D. y Bush, M.T. Physiological Disposition of Anticonvulsants. En: Anticonvulsants. Pg 116. Editado por Julius A. Vida. Academic Press, 1977.
 8. Dudley, K.H. Phenytoin Metabolism. En Phenytoin - Induced Teratology and Gingival Pathology. Pg 13. Editado por T.M. Hassell, M.C. Johnston and K.H. Dudley. Raven Press, 1980.
 9. Woodbury, D.M., Kemp, J.W. Pharmacology and Mechanisms of Action of Diphenylhydantoin. Psychiatria, Neurologia, Neurochirurgia; 74 Pg 91-115, 1971.
 10. Booth, N.H. Hypnotics, Sedatives and Anticonvulsants. En Veterinary Pharmacology and Therapeutics 4th Edition. Pg 311. Editado por L. Meyr Jones, Nicholas H. Booth, Leslis E. McDonald, AMES, 1977.
 11. Kutt, H. Biochemical and Genetic Factors regulating - Dilantin Metabolism in Man. Ann N.Y. Acad Sci; 704. 1971.
 12. Julien, R.M., Halpern, L.M. Effects of Diphenylhydantoin and other Antiepileptic Drugs on Epileptiform Activity and Purkinje cell Discharge Rates. Epilepsia - 13: 387-400, 1972.

13. Reynolds, E.H. Chronic Antiepileptic Toxicity. A. -
Review. *Epilepsia*, 16: 319-352, 1975.
14. García Estrada, J., Tapia Arizmendi, G., Navarro Ruíz,
A., Feria Velasco, A. y Garzón de la Mora, P. Efectos
del difenilhidantoinato de sodio sobre la estructura -
del hígado y riñón de la rata. *Arch. Invest. Med.* - -
(Mex.) 16(1) 1, 1985.
15. Wisdom, B.G. Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem* 22(8), -
1243-1255, 1976.
16. Schaneider, W.C. Phosphorous compounds in animal -
tissues. I. Extraction and estimation of desoxipentose
nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. -*
Chem 161; 293-303, 1945. .
17. Lowry, H. O., Rosebrough, J.N., Lewis Farr, A., - -
Randall, J.R. Protein measurement with the Folin -
phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265-275, 1951.

