



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

24.

"ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE FESCDIPINA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
ILDA CECILIA ALMANZA FUENTES

ASESORA INTERNA:

M. en C. LUISA MARTINEZ AGUILAR

ASESORA EXTERNA:

M. en C. LILIANA FAVARI PEROZZI

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

199
7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT°N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio de la toxicidad de fescodipina.

que presenta la pasante: Ilda Cecilia Almanza Fuentes
con número de cuenta: 9056964-5 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 10 de Septiembre de 1996

PRESIDENTE

Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez

VOCAL

M.en C. Luisa Martínez Aguirre

SECRETARIO

Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galazzo

PRIMER SUPLENTE

Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz

SEGUNDO SUPLENTE

Q.F.B. Ma. Virginia Oliva Arellano

Leticia Zúñiga Ramírez
L. Martínez Aguirre
Eugenia R. Posada Galazzo
Martha Patricia Zúñiga Cruz
Virginia Oliva Arellano

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo brindado mediante el proyecto SC-006796

A M. en C. Lilitana Favari Perozzi, por las facilidades otorgadas para realizar parte del desarrollo experimental en el Laboratorio de Toxicología Hepática del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

A M. en C. Luisa Martínez Aguilar y M. en C. Lilitana Favari Perozzi por la confianza que depositaron en mí al asesorar este proyecto y transmitirme mediante sus consejos parte de su amplia experiencia.

A M. en C. Enrique Angeles Aguiar por su paciencia y facilidades prestadas en el área de campo del Laboratorio de Diseño de Fármacos.

A Las Profesoras que integran el jurado por sus valiosas opiniones encaminadas a mejorar en mucho el contenido y presentación de este trabajo.

A B.M. Ma. Teresa García Camacho y Antonio Sánchez Trujillo por su valiosa cooperación durante el desarrollo experimental de este trabajo.

A M.V.Z. Yolanda Romero Sánchez por las facilidades prestadas en el Laboratorio de histopatología de Medicina Veterinaria en FECS-Campo 4.

DEDICADA A:

*Mi abuelo: Hilario Fuentes Vega.
por su cariño y sabios consejos.*

*Mi primera amiga: Mi madre
Cleotilde Fuentes Rosas.*

*A todos ustedes familiares, amigos y compañeros que han formado
parte importante de mi vida.*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE GRÁFICAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Enfermedades cardiovasculares	4
3.1.1 Frecuencia e importancia	4
3.1.2 Factores etiológicos y predisponentes	4
3.1.3 Tratamiento	5
3.2 Antagonistas de la entrada de calcio	5
3.2.1 Mecanismo y sitio de acción	6
3.2.2 Clasificación	6
3.3 Compuestos relacionados con nifedipina: Dihidropiridinas	7
3.3.1 Uso clínico	7
3.3.2 Farmacocinética	8
3.4 Susceptibilidad del hígado	9
3.5 Principales reacciones hepatotóxicas	9
3.5.1 Necrosis zonal o centrolubulillar	9
3.5.2 Reacciones tipo hepatitis viral	10
3.5.3 Reacciones colestásicas	11
3.5.4 Reacciones diversas	12
3.6 Marcadores del daño hepático	13
3.6.1 γ -glutamil transpeptidasa (GGT)	13
3.6.2 Fosfatasa alcalina (FA)	14
3.6.3 Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)	14
3.6.4 Bilirrubinas	15
3.6.5 Glucógeno	15
3.6.6 Lipoperoxidación	16

3.7	Pruebas toxicológicas	17
3.7.1	Pruebas de toxicidad aguda	18
3.7.2	Pruebas de toxicidad subcrónica	19
3.7.3	Pruebas de toxicidad crónica	20
4.	MÉTODOS	22
4.1	Pruebas de toxicidad	22
4.1.1	Pruebas de toxicidad aguda en ratones	
	Determinación de la DL ₅₀	22
4.1.2	Pruebas de hepatotoxicidad en ratas	23
4.2	Determinaciones bioquímicas	27
4.2.1	Determinación de la actividad de γ - glutamil transpeptidasa	28
4.2.2	Determinación de la actividad de Fosfatasa Alcalina	30
4.2.3	Determinación de la actividad de Transaminasa glutámico- pirúvica	32
4.2.4	Determinación de Bilirrubina Total	34
4.2.5	Determinación de Bilirrubina Directa	35
4.2.6	Determinación del contenido de Glucógeno hepático	36
4.2.7	Determinación del contenido total de proteínas	37
4.2.8	Determinación del grado de Lipoperoxidación	38
5.	RESULTADOS	40
6.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
7.	CONCLUSIONES	53
8.	APÉNDICE 1	54
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

No.	TITULO.	
1	Determinación de <i>γ glutamil transpeptidasa</i> en sueros de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	41
2	Determinación de <i>Fosfatasa alcalina</i> en sueros de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	41
3	Determinación de <i>Transaminasa glutámico pirúvica</i> en sueros de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	42
4	Determinación de <i>Bilirrubina directa</i> en sueros de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	43
5	Determinación de <i>Bilirrubina total</i> en sueros de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	43
6	Determinación de <i>Glucógeno</i> en hígado de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	44
7	Determinación de <i>Lipoperoxidación</i> en hígado de ratas tratadas con fescdipina y sus respectivos controles	44

ÍNDICE DE FIGURAS

No. 1	Hepatocitos de rata control	48
No. 2	Hepatocitos de rata sometida a un tratamiento agudo con <i>fesclipina</i> .	48
No. 3	Hepatocitos de rata sometida a un tratamiento subcrónico con <i>fesclipina</i> .	49
No.4	Hepatocitos de rata sometida a un tratamiento crónico con <i>fesclipina</i>	49

ABREVIATURAS

ABS	<i>Albumina bovina sérica</i>
BEC	<i>Bloqueadores de la entrada de calcio</i>
Ca²⁺	<i>Ion calcio</i>
CCOV	<i>Canales de calcio operados por voltaje</i>
esp	<i>Cantidad suficiente para</i>
dl	<i>Decilitro</i>
DHP	<i>Dihidropiridina</i>
DL₅₀	<i>Dosis letal cincuenta</i>
FA	<i>Fosfatasa alcalina</i>
GGT	<i>Gamma glutamil transpeptidasa</i>
HCl	<i>Ácido clorhídrico</i>
KOH	<i>Hidróxido de potasio</i>
L	<i>Litro</i>
M	<i>Molar</i>
MgCl₂	<i>Cloruro de magnesio</i>
mg kg⁻¹	<i>Miligramo por kilogramo de peso</i>
min	<i>Minuto</i>
ml	<i>Mililitro</i>
mM	<i>Milimolar</i>
mmol	<i>Milimol</i>
N	<i>Normal</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sodio</i>
nm	<i>Nanómetro</i>
nmol	<i>Nanomol</i>
pH	<i>Potencial hidrógeno</i>
p.ej	<i>Por ejemplo.</i>
sol	<i>Solución</i>
rpm	<i>Revoluciones por minuto</i>
TBA	<i>Ácido tiobarbitúrico</i>
TCA	<i>Ácido Tricloroacético</i>
TGP	<i>Transaminasa glutámico pirúvica</i>
Vol	<i>Volumen</i>
µg	<i>microgramo</i>
µl	<i>microlitro</i>
µmol	<i>micromol</i>

RESUMÉN

Fesclipina es un compuesto que recientemente fue sintetizado en los laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Pertenecce al grupo de las 1,4-Dihidropiridinas y al ser valorado su efecto farmacológico en animales de laboratorio presento efecto vasodilatador, antiarritmico y fue capaz de expulsar calcio de la mitocondria.

Con el presente trabajo se intento determinar la DL_{50} para el compuesto (en ratones y ratas) y también se evaluó la hepatotoxicidad aguda, subcrónica y crónica en ratas cepa Wistar (machos de 250 g. de peso), mediante la determinaciones bioquímicas de γ -glutamyltranspeptidasa, fosfatasa alcalina, y transaminasa glutámico pirúvica, bilirrubinas, glucógeno y lipoperoxidación, también se realizaron cortes histopatologicos de hígado. Todo esto como parte de las pruebas preclínicas que deben realizarse a todo fármaco que se intenta administrar en el hombre.

Con los resultados obtenidos se concluyó que *fesclipina* posee un amplio margen de seguridad ya que a dosis tan elevadas de 300 mg kg^{-1} no causo la muerte a los ratones y con una sola dosis de 600 mg kg^{-1} solo provoca alteración de las bilirrubinas y el glucógeno en ratas, por lo que queda clasificado como un compuesto *liggeramente tóxico*. Y al administrar una dosis terapéutica de 3.1 mg kg^{-1} diariamente por 6 meses no causa ningún tipo de daño hepático.

1. INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos han mostrado que las enfermedades cardiovasculares están entre los principales problemas de salud en el mundo, a pesar de la disponibilidad de medicamentos nuevos y del avance en el conocimiento de los mecanismos patogénicos y factores de riesgo involucrados en ellas (hiperlipidemia, hipertensión, abuso del tabaco y ritmo de vida acelerado, principalmente).¹

Los fármacos antagonistas del canal de calcio han ganado gran aceptabilidad para el tratamiento de una variedad de desórdenes cardiovasculares. Los fármacos de la clase de las dihidropiridinas son especialmente atractivas para el tratamiento de la hipertensión y la angina de pecho, por su selectividad vascular, su perfil de efectos secundarios y su farmacocinética que permiten una sola dosis diaria.²

Felodipina, Isradipina y amlodipina son los fármacos más recientes de la clase de las dihidropiridinas, son efectivos antihipertensivos pero no han demostrado claras ventajas sobre otros antagonistas de calcio de la clase de las dihidropiridinas.^{3,4}

Felodipina es un compuesto que lleva este nombre porque fue sintetizado en los laboratorios de la *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*, pertenece al grupo de las 1,4-dihidropiridinas y al ser valorada su acción farmacológica en animales de laboratorio resultó que presenta efecto vasodilatador, efecto antiarritmico y además fue capaz de expulsar Ca^{2+} de la mitocondria.⁵

Por lo tanto, el procedimiento a seguir una vez que el compuesto ha pasado satisfactoriamente las pruebas de selección y perfilamiento, consiste en proponer estudios preclínicos de toxicidad que provean datos para valorar las posibilidades de riesgo al emplear el compuesto para el uso humano.⁶

Se han formulado varios procedimientos aplicables a las pruebas de toxicidad que incluyen estudios agudos subcrónicos y crónicos. La principal diferencia entre ellas es la dosis empleada y el lapso de exposición del compuesto, todas requieren de grupos de animales sanos, alojados en condiciones apropiadas.⁷

Los principales tipos de información que se derivan del estudio preclínico de toxicidad son: 1) Toxicidad aguda: efectos de grandes dosis únicas hasta un nivel letal (DL₅₀) y 2) Toxicidad subcrónica y crónica: efectos de dosis múltiples, de especial importancia si se contempla el uso prolongado del fármaco en el hombre.⁷

Es sabido que el hígado juega un papel central en el metabolismo de la mayoría de las sustancias orgánicas por lo que se debe casi obligatoriamente considerar la posible hepatotoxicidad de los nuevos agentes terapéuticos.⁸

2. OBJETIVOS

- 1.- **Apreciar la importancia que tienen las pruebas toxicológicas primarias en el desarrollo de un nuevo fármaco.**
- 2.- **Determinar la DL_{50} y el Margen de seguridad de la FESCDIPINA.**
- 3.- **Evaluar la hepatotoxicidad aguda, subcrónica y crónica de FESCDIPINA.**
- 4.- **Establecer las ventajas (referentes a la toxicología) de fescdipina sobre otros fármacos del grupo de las dihidropiridinas.**

3. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedades cardiovasculares

3.1.1 *Frecuencia e importancia*

El que hoy en día, merced a la higiene y terapéutica, la población humana de los países civilizados alcance un promedio de vida de 68-70 años, permite que acontezca una mayor morbilidad y letalidad por cardiopatías. Estudios epidemiológicos han mostrado que las enfermedades cardiovasculares están entre los principales problemas de salud en el mundo. En México, según cifras del Sistema Nacional de Salud, en 1992 la principal causa de mortalidad fueron las enfermedades crónicas cardiovasculares con un 13.5%.⁹

3.1.2 *Factores etiológicos y predisponentes*

Junto a la hipertensión, la arteriosclerosis es el factor etiológico más nocivo para el corazón. Los factores de riesgo que predisponen a la enfermedad coronaria aterosclerótica favoreciendo así el desarrollo hacia el infarto de miocardio, son la hiperlipidemia, abuso del tabaco, stress y exceso de trabajo principalmente, posiblemente ello está también favorecido por el ritmo de vida actual, de mayor inquietud y desgaste, además de el tipo de alimentación que acostumbra la mayoría de la población mexicana.¹⁰

3.1.3 Tratamiento

El tratamiento clínico de este tipo de padecimientos se realiza en base a diversas clases de fármacos, en México se cuenta con los siguientes grupos:¹¹

- 1.- Diuréticos.
- 2.- Agentes con acción en el sistema nervioso.
- 3.- Betabloqueadores.
- 4.- Bloqueadores alfa 1.
- 5.- Vasodilatadores directos.
- 6.- Antagonistas de calcio.
- 7.- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
- 8.- Inhibidor de la serotonina.
- 9.- Betabloqueadores con efecto vasodilatador.
- 10.- Antagonistas específicos no peptidos de los receptores de angiotensina II.

Actualmente la disponibilidad de nuevos fármacos principalmente del tipo calcioantagonista y del tipo inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina provee a la clínica con alternativas adicionales para estos pacientes.¹²

3.2 Antagonistas de la entrada de calcio

Los antagonistas de la entrada de calcio incluyen fármacos de uso clínico tales como el verapamil, la nifedipina y el diltiazem constituyendo así una clase bien establecida de agentes farmacológicos de uso común para tratar varias condiciones clínicas incluyendo hipertensión, angina de pecho y arritmias. Estos fármacos disminuyen la presión sanguínea bloqueando la entrada del ion calcio lo que provoca relajación y dilatación del músculo liso vascular, principalmente en arteriolas. También mejoran los síntomas de la angina de pecho al aumentar el flujo sanguíneo en el miocardio por medio de la vasodilatación de las arterias coronarias y reduciendo la demanda de oxígeno; además disminuyen la contractibilidad del miocardio.²

3.2.1 *Mecanismo y sitio de acción*

Los calcioantagonistas actúan inhibiendo el flujo de calcio hacia la célula a través de canales de calcio dependientes del voltaje específicos localizados en la membrana celular. Los canales de calcio son glicoproteínas alargadas y extendidas en la membrana que funcionan como válvulas para iones selectivos. Ellos forman un poro que abre y cierra para permitir el movimiento de calcio en la dirección de un gradiente de concentración electroquímico.¹³

3.2.2 *Clasificación*

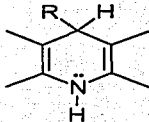
Los fármacos calcioantagonistas comprenden un grupo químicamente heterogéneo de compuestos que han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud en seis grupos en base a su estructura química y perfil farmacológico.¹⁴

- I. Compuestos relacionados con el verapamil (fenilalquilaminas).
- II. Compuestos relacionados con la nifedipina (dihidropiridinas).
- III. Compuestos relacionados con el diltiazem (benzotiazepinas).
- IV. Compuestos relacionados con la flunarizina.
- V. Compuestos relacionados con la prenilamina.
- VI. Otros, tales como caroverina o perhexilina.

Las primeras tres clases comprenden sustancias altamente selectivas para los canales lentos de calcio, mientras que las otras tres incluyen compuestos que además tienen efecto inhibitorio sobre los canales rápidos de sodio.²

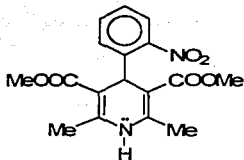
En general los compuestos de las clases I y III ejercen su efecto primordialmente sobre miocardio, en cambio los calcioantagonistas de la clase de los compuestos relacionados con nifedipina tienen mucha mayor afinidad por canales de calcio a nivel vascular, además de ser el grupo que se ha expandido más rápidamente.²

3.3 Compuestos relacionados con nifedipina: Dihidropiridinas



4-Aril-1,4 dihidropiridina

Estructura base



1,4-Dihidro-2,6-dimetil-(o-nitrofenil)-
piridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.

Estructura de *nifedipina*.

Tienen como estructura base la 4-aryl-1,4-dihidropiridina (DHP). Las DHPs son conocidas desde 1882 cuando Hantzsch las utilizó como intermediarios en la síntesis de piridinas. A pesar de su accesibilidad química, fueron de poco interés hasta los años 60's, cuando se descubrió la propiedad vasodilatadora de algunas de ellas. A partir de entonces, han sido sintetizadas un gran número de DHPs e investigadas sus propiedades farmacológicas.^{15, 16, 17}

3.3.1 *Uso clínico*

Las DHPs son bloqueadores muy potentes y selectivos de la entrada de calcio y son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho, isquemia y enfermedades vasculares a nivel periférico o cerebral.^{4, 16}

Las DHPs también han sido objeto de estudios (preclínicos y de investigación básica) como agentes farmacológicos potenciales para otros tipos de padecimientos y usos, como son: profilaxis de la migraña y el fenómeno de Raynaud.^{4, 16}

Gracias a su selectividad vascular las DHPs presentan las siguientes ventajas sobre otras clases de fármacos antagonistas del calcio: ²

a) No tienen efecto sobre el sistema de conducción del miocardio. Por lo tanto, aunque no se usen en el tratamiento de taquiarritmias (como lo son el verapamil y el diltiazem) son mucho más seguras que otros calcioantagonistas en pacientes que toman betabloqueadores y en pacientes con obstrucción del corazón. ²

b) Muchas nuevas DHPs tienen poca o ninguna interacción con otros fármacos (p.ej. digoxina, warfarina, insulina y coumarinas) que son empleadas para el tratamiento de condiciones asociadas. ¹⁸

c) Algunas DHPs tienen efecto diurético, lo cual contribuye a la propiedad antihipertensiva de estos compuestos. ²

3.3.2 Farmacocinética

Se absorben muy bien por vía sublingual, bucal (por ingestión) y por las vías parenterales, dicha absorción alcanza en los primeros dos casos al 90 por ciento, pero sufren un extenso primer paso hepático cuando se administra por vía bucal, por esto en general presentan baja biodisponibilidad. Se combinan con las proteínas en un 90 % y se distribuyen a todos los órganos, especialmente hígado, riñón y pulmón. ¹⁹

Las DHPs se metabolizan extensamente en el organismo, sobretudo en el hígado, por oxidación (deshidrogenación) catalizada por una isoforma del citocromo P-450 denominada P-450_{NF}. Las DHPs se oxidan en primera instancia a sus derivados 1,4-dehidro. posteriormente el metabolismo puede involucrar la hidrólisis de los grupos éster, la hidroxilación del grupo 2 y/o la 6-alquilo, formación de lactonas. la excreción de los metabolitos se realiza principalmente por el riñón, alrededor del 80 por ciento y el resto en heces, dicha excreción es lenta ^{20, 21, 22, 23}

3.4 Susceptibilidad del hígado

El daño hepático inducido por compuestos químicos ha sido reconocido como un problema toxicológico por más de 100 años, ya que el hígado además de ser el órgano mas grande del cuerpo es también el órgano blanco para estos compuestos, son conocidos diversos factores importantes que contribuyen a la susceptibilidad, primero, muchos xenobióticos entran al cuerpo a través del tracto gastrointestinal y después de la absorción son transportados por la vena porta hepática al hígado, de esta manera, el hígado es el primer órgano bañado por las sustancias químicas absorbidas en el intestino. Un segundo factor es una alta concentración de enzimas metabolizantes de xenobióticos, en el hígado, principalmente el sistema del citocromo P-450, aunque muchas biotransformaciones son reacciones de detoxificación, muchas reacciones oxidativas producen metabolitos reactivos que pueden inducir lesiones en el hígado. ²⁴

3.5 Principales reacciones hepatotóxicas.

3.5.1 Necrosis zonal o centrolubulillar

Se produce por los tóxicos directos o específicos del hígado como acetaminofén, ácido valproico, alcohol, cloroformo, fósforo, mercaptopurina, metales pesados, tetraciclinas, tetracloruro de carbono y vitamina A, entre otros. ^{25,26}

La lesión consiste en necrosis de los hepatocitos, en amplias zonas y en ciertas ocasiones, con infiltración grasa en pequeñas gotitas o como grandes gotas que ocupan gran parte del citoplasma y desplazan al núcleo. Se admite que el mecanismo tóxico es el siguiente: ²⁷

El tóxico produce un radical que actúa sobre el retículo endoplásmico con inhibición de los lípidos de las membranas mitocondriales y lisosomas (peroxidación lipídica), originando la salida de sus fracciones enzimáticas.

Los trastornos enzimáticos promoverán la inhibición de la síntesis proteica, mientras que las enzimas lisosómicas inducen la necrosis celular. La falta de síntesis de proteínas transportadoras y de formación de lipoproteínas para la excreción de los triglicéridos, es la causa de acumulación de grasa.²⁷

La lesión hepática inducida por este grupo se caracteriza por:

- 1) Gravedad relacionada con la dosis.
- 2) Reproducibilidad en animales de experimentación.
- 3) El período entre la exposición al tóxico y la aparición del daño es breve y constante.
- 4) Sensibilidad en todos los individuos.
- 5) Se suele acompañar de lesiones en otros órganos, especialmente el riñón.^{27, 28}

3.5.2 Reacciones tipo hepatitis viral

La lesión anatómica es como la de la necrosis centrolobulillar, con la aparición al microscopio de hepatocitos necrosados. Se admite que la reacción es de carácter inmunológico, con un mecanismo similar al del una colestasis intrahepática; sin embargo se ha sugerido que el tóxico podría activar virus latentes y desencadenar el daño hepático.²⁷

Las reacciones son esporádicas, no demostrables con animales de laboratorio y sugieren idiosincrasia del huésped, aunque su incidencia es escasa, la mortalidad es relativamente elevada hasta un 20 % de los casos.²⁶

Este tipo de reacción la originan: amiodarona, aspirina, cloramfenicol, clortetraciclina, cincofeno, dantrolene, halotano, isoniacida, ketoconazol, metroxifurano, metildopa, nitrofurantoina, oxacilina, fenilbutazona, piracinamida, quinidina, estreptomina, sulfonamidas, sulfametoxipiridacina y zoxazolamina.²⁶

3.5.3 Reacciones colestásicas

Consisten en la obstrucción o supresión del flujo de bilis y puede tener causas intrahepáticas o extrahepáticas. La inflamación o bloqueo de los conductos biliares da como resultado una acumulación de las sales biliares como bilirrubina, causando ictericia. También se admite que, en ocasiones, el proceso puede deberse a modificaciones en el equilibrio físico-químico de la secreción biliar y variarse la concentración de los ácidos biliares.^{24,27}

Este tipo de reacción no se puede reproducir por vía experimental, su tasa de mortalidad es casi nula, sólo puede ser circunstancia agravante el tiempo de latencia, que es largo (15 días); no existe relación causa-efecto, sino que dosis bajas pueden inducir cuadros dramáticos en sujetos sensibilizados. Por ello se estima que consiste en una reacción de hipersensibilidad.^{24,27}

Hay dos categorías generales que difieren cuanto a la presentación clínica y las características histopatológicas. Estas reacciones dependen de la dosis, pero existen grandes diferencias en la sensibilidad individual.²⁸

-- *No Inflamatorias*: Probable efecto directo del agente en los mecanismos de la secreción de la bilis y en reacciones inflamatorias. Los fármacos que pueden causar este tipo de reacción son: azatioprina, mercaptopurinas, mestranol, metilestosterona, noretandrolona.²⁸

-- *Inflamatorias*: Inflamación de las áreas porta, con características alérgicas, por ejemplo eosinofilia. Los fármacos que pueden causarla son: clorotiácida, cloropromacina, clorpropamida, estolato de eritromicina, penicilamina, proclorperacina, promacina, sulfadiacina, tiouracilos entre otros.²⁸

3.5.4 Reacciones diversas.

I Hígado graso

La infiltración grasa del hígado es una reacción hepática muy frecuente, sus mecanismos de producción son :

1. Mayor aprovechamiento de ácidos grasos de los depósitos adiposos periféricos.
2. Disminución de la utilización u oxidación de los ácidos grasos por el hígado.
3. Aumento de la síntesis hepática de los ácidos grasos.
4. Mayor esterificación de los ácidos grasos en triglicéridos.
5. Disminución de la secreción o liberación de grasa del hígado. A consecuencia del déficit en la síntesis de proteínas, disminuye la formación y excreción de las lipoproteínas. ^{24, 26, 27}

II Cirrosis

La cirrosis es un proceso reparativo (desde el punto de vista orgánico aunque no funcional); después de una lesión hepática se puede producir una regeneración nodular o reparaciones por cicatrices fibrosas. Éstas se deben bien a colapso del esqueleto del retículo, bien a proliferación del tejido conjuntivo; ambas formas conducen a la fibrosis y más adelante, a la cirrosis. Se caracteriza patológicamente por la presencia de colágeno en la mayor parte del hígado. Originan cirrosis el alcohol, las aflatoxinas, el tetracloruro de carbono, etc. ^{27,29}

III Neoplasias

Las neoplasias del hígado surgen en las células del parénquima hepático o en los conductillos biliares. Se han encontrado neoplasias benignas y malignas en mujeres que acostumbran tomar anticonceptivos orales. ²⁹

IV. Porfirias.

Con este nombre se agrupa una serie de afecciones que se caracterizan por aumento en la síntesis de porfirinas, intermediarias en la síntesis del hem. Como consecuencia aparecen en orina y heces elevados niveles de porfobilinógeno, uroporfirina, coproporfirina, simultáneamente a diversos cuadros clínicos cutáneos (manchas o necrosis), abdominales y neurales.²⁷

Los fármacos capaces de producir un ataque de porfiria son aminofenazona anticonceptivos orales, apronalida, barbitúricos, cocaína, diuréticos mercuriales, fenilbutazona, griseofulvina, quinina, sulfonal, sulfamidas, trional y tolueno.²⁷

3.6 Marcadores del daño hepático

Las pruebas de funcionamiento hepático y especialmente las alteraciones de las actividades enzimáticas en suero, proporcionan en gran número de casos, la primera sospecha de algún trastorno del hígado.²⁸

3.6.1 γ -Glutamyltranspeptidasa (GGT)

Es una enzima que está unida a la membrana celular (enzima intrínseca), cataliza la transferencia del grupo gamma-glutámico del glutatión a un aminoácido o a un péptido que actúa como aceptor. Esta reacción está involucrada en el transporte de aminoácidos a través de la membrana por interacción entre los aminoácidos extracelulares y el glutatión intracelular. La GGT se origina en el riñón, páncreas, hígado, intestino delgado y bazo. Se eleva en hepatitis aguda infecciosa o tóxica, hepatitis crónica subaguda, cirrosis hepática, obstrucción intrahepática y lesión hepática causada por alcoholismo.³¹

Los mecanismos por los cuales se incrementan los niveles de GGT en el suero de pacientes con enfermedad hepática aún no son conocidos, pero la actividad de GGT aumentada en el suero es considerada como el reflejo del aumento de actividad en el hígado.^{31,32}

3.6.2 Fosfatasa alcalina (FA)

Es una glicoproteína, desfosforila selectivamente a proteínas fosforiladas dando como resultado residuos de tirosina. Las fosfatasas alcalinas se originan en el hígado, hueso e intestino delgado, siendo excretadas por la glándula hepática a través de la bilis. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima se incrementa cuando se produce un aumento en la actividad osteoblástica y en ciertas enfermedades hepatobiliares tales como colestasis y regeneración hepática, así como por la administración de algunos fármacos como clorpromacina y metilestosterona.^{32,33}

3.6.3 Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)

Esta enzima es llamada también alanin amino transferasa (ALT) porque cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato, se ha encontrado en varios órganos como el miocardio, el músculo esquelético, el cerebro, el páncreas y el riñón pero su mayor actividad ocurre en el hígado. La elevación en la actividad de la TGP es debida a su liberación a causa de la necrosis celular principalmente.^{32,34}

La utilización de muchos agentes terapéuticos, sobre todo hipotensores, vasodilatadores y antiinflamatorios puede producir discretos y pasajeros ascensos plasmáticos de las transaminasas. El mecanismo de acción es desconocido y la existencia de una verdadera hepatotoxicidad improbable.⁹

3.6.4 Bilirrubinas

Aproximadamente el 85% de la bilirrubina se origina de la destrucción de los eritrocitos viejos por el sistema reticulo endotelial, la hemoglobina es metabolizada dando como resultado el grupo hemo y globina, después el grupo hemo es transformado a biliverdina y hierro; la biliverdina rápidamente es reducida a bilirrubina y de este modo sale a la circulación unida a la albúmina, a este tipo de bilirrubina se le denomina libre, no conjugada o indirecta, esta bilirrubina llega al hepatocito en donde por medio de una serie de reacciones es conjugada dando como resultado la bilirrubina conjugada o directa que es eliminada en la bilis, de ahí pasa al intestino en donde es transformada a urobilinógeno por acción de las enzimas bacterianas.³⁵

Desde el punto de vista anatómico, el aumento de los valores séricos de bilirrubina es prehepático, hepático o poshepático. La ictericia prehepática se debe a la producción excesiva de bilirrubina. En la ictericia hepática puede aumentar la bilirrubina sérica por disfunción cualitativa o cuantitativa de las células hepáticas, por ejemplo en reacciones medicamentosas. La ictericia posthepática se debe a interferencia con la eliminación fisiológica de la bilirrubina.³⁵

3.6.5 Glucógeno

La glucosa aporta la energía necesaria para los procesos metabólicos que ocurren en el organismo. La glucosa se almacena en forma de glucógeno en el hígado de tal forma que cuando es requerida en el organismo se lleva a cabo la glucogenólisis y de esta manera se tiene la glucosa necesaria para los procesos metabólicos.^{32,36}

La energía metabólica es anormal en animales de experimentación con daño hepático, la disminución en el contenido de glucógeno y la disminución de la gluconeogénesis también se ha observado en la cirrosis biliar secundaria.³⁷

3.6.6 Lipoperoxidación.

La lipoperoxidación es un proceso que se lleva a cabo a nivel de las membranas celulares, consiste en una serie de reacciones que se llevan a cabo entre radicales libres y los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas.

En condiciones normales, los radicales libres que se producen en el organismo son captados por los sistemas antioxidantes, pero cuando se origina una producción excesiva de radicales libres por agentes exógenos los radicales libres interactúan con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular para formar radicales lipídicos (ROO), que producen hidroperóxidos (ROOH) y también radicales lipídicos, de esta forma hay una propagación de la cascada peroxidativa que puede consumir gran cantidad de lípidos de la membrana, lo que origina cambios en su permeabilidad y posteriormente muerte celular.^{32, 38, 39}

Se ha postulado que la lipoperoxidación es el mecanismo del daño hepatocelular causado por anfetaminas.⁴⁰

3.7 Pruebas toxicológicas

El uso clínico de cualquier fármaco acarrea con él cierto riesgo. El proponer estudios toxicológicos en el desarrollo de un nuevo compuesto provee datos para valorar su seguridad para el uso humano. El grado de con el cual puede estimarse el peligro depende de la calidad de los datos toxicológicos.⁶

Los principios que se aplican a todos los procedimientos de ensayo toxicológico son:

1) Para que un agente químico produzca un efecto biológico, debe entrar en contacto inmediato con las células en consideración.

2) Para cada sustancia química existe una cantidad por debajo de la cual no produce efecto detectable en ningún sistema biológico, y una cantidad con la cual produce un efecto significativo en todos los sistemas biológicos. Entre estos extremos se encuentra el intervalo de cantidades en el que toda sustancia química ocasionará un efecto significativo en algunos tipos de sistemas biológicos.

3) Las células que tienen funciones parecidas y vías metabólicas similares en varias especies por lo general se verán afectadas de forma parecida por una entidad química dada.

4) Pequeños cambios en la estructura de un agente químico pueden influir en gran manera en su acción biológica.⁴¹

Se han formulado varios procedimientos aplicables a las pruebas de toxicidad, que incluyen estudios agudos, subagudos y crónicos. La principal diferencia entre estas pruebas es la dosis empleada y el lapso de exposición al agente químico. Todas ellas requieren que grupos de animales sanos, alojados en condiciones apropiadas, y que sean expuestos a dosis diferentes de la sustancia química de prueba.^{8, 27}

3.7.1 Pruebas de toxicidad aguda

Se ha definido la toxicidad aguda diciendo que está compuesta por los efectos adversos que ocurren dentro de un breve lapso con posterioridad a la administración de una dosis única o de dosis múltiples administradas en 24 horas.^{7,28}

La prueba involucra la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) del compuesto. El protocolo básico debe ser establecido con el número de animales suficiente para el análisis estadístico, todos ellos progenie de hembras sanas que no hayan recibido tratamiento previo con otros compuestos. Por cuestiones económicas las especies frecuentemente utilizadas son ratones y ratas y los métodos que se pueden emplear para calcular la DL₅₀ son: Método gráfico de Litchfield y Wilcoxon y método de papel cuadrículado de probit logarítmico de Miller y Tainer.^{8,28}

La causa de la muerte involucra generalmente al sistema nervioso, cardiovascular, o respiratorio, los efectos en otros órganos como el hígado o el riñón algunas veces son enmascarados o solo pueden ser detectados con algunas determinaciones especiales como estudios clínicos de laboratorio (hematología, química clínica o pruebas funcionales especiales).⁶

Dado que algunas sustancias químicas producen la muerte en dosis de microgramos y otras pueden ser relativamente inocuas, incluso después de dosis de más de varios gramos, se han establecido categorías de toxicidad en función de las cantidades de sustancia necesarias para producir una acción perjudicial.⁴¹

1. Extremadamente tóxico	1 mg kg ⁻¹ o menos
2. Altamente tóxico	1 a 50 mg kg ⁻¹
3. Moderadamente tóxico	50 a 500 mg kg ⁻¹
4. Ligeramente tóxico	0.5 a 5 g kg ⁻¹
5. Prácticamente atóxico	5 a 15 g kg ⁻¹
6. Relativamente inocuo	más de 15 g kg ⁻¹

Para el farmacólogo el margen de seguridad es el intervalo de dosificación entre la dosis que produce un efecto letal y la que produce el efecto deseado. Este margen de seguridad se expresa como el índice terapéutico y se representa por la relación:⁴¹

$$DL_{50} / DE_{50}.$$

3.7.2 Pruebas de toxicidad subcrónica

El mecanismo por virtud del cual un compuesto provoca la muerte raramente es similar cuando se produce con una sola dosis o después de exposiciones a dosis múltiples, por lo que las pruebas de toxicidad aguda son inadecuadas para prever la seguridad de nuevos fármacos y deben confirmarse con estudios a largo plazo. ⁴²

La prueba de toxicidad subcrónica en general involucra la exposición diaria o frecuente al compuesto durante un lapso hasta 90 días aproximadamente. Estas pruebas se llevan a cabo por tres motivos: 1) descubrir efectos cuantitativos o cualitativos que pudieran haber pasado inadvertidos después de una prueba con dosis única; 2) remedar los planes clínicos probables de dosis múltiples y 3) estimar la toxicidad de las primeras dosis del fármaco para administrar al hombre. ⁴³

Los estudios con dosis múltiples buscan determinar si un compuesto actúa como tóxico acumulativo, es decir si se fija fuertemente a los tejidos, o si los procesos metabólicos y de eliminación no lo eliminan del cuerpo en tiempo adecuado. Alternativamente el compuesto y sus metabolitos pueden desaparecer, pero los efectos tisulares de cada dosis adicional pueden persistir: ello originaría un cambio de la lesión, que pasaría de reversible a irreversible. ⁴⁴

Tradicionalmente se elige a la rata y el perro para las pruebas de toxicidad subcrónica, debido a su disponibilidad y el gran caudal de información básica a su respecto, cuando no se dispone de datos sobre el destino metabólico de la sustancia química de prueba en el hombre, se debe seleccionar como especie de prueba aquella que muestra mayor sensibilidad en los estudios agudos, estos estudios deben realizarse con el compuesto que es analíticamente idéntico a el que se intenta emplear para uso humano (diferentes formulaciones o profármacos pueden causar efectos tóxicos distintos).⁵

Por regla general se debe incluir un grupo control al cual se le administra el vehículo de dosificación o un tratamiento simulado. Luego del tratamiento, se debe evaluar la integridad funcional de los distintos sistemas orgánicos mediante pruebas bioquímicas de la función orgánica y examen postmortem. ⁶

3.7.3 Pruebas de toxicidad crónica.

De cualquier manera, las pruebas de toxicidad aguda y subcrónica tienen valor limitado para pronosticar los efectos tóxicos crónicos debido a: 1) Las sustancias químicas pueden producir diferentes respuestas tóxicas cuando se administran reiteradamente durante un periodo de tiempo y 2) durante el proceso de envejecimiento, factores tales como la sensibilidad tisular alterada, el cambio de la capacidad metabólica y fisiológica y la morbilidad espontánea pueden influir en el grado y la naturaleza de las respuestas tóxicas. ⁸

Las pruebas de toxicidad crónica, en las cuales los animales están expuestos la mayor parte de su lapso de vida a las sustancias químicas, han constituido un medio útil para identificar las sustancias de mayor interés desde el punto de vista de la salud pública. Por lo común, las pruebas se realizan con el objeto de establecer "niveles de efecto adverso observado" que se pueden utilizar para formular las ingestas diarias aceptables. ^{8, 28}

Algunos expertos sugieren que un estudio de toxicidad crónica en las especies de animales apropiadas roedores o no roedores podría ser suficiente, bajo las condiciones en las que pueda ser demostrado que la farmacocinética y el metabolismo del fármaco en estas especies son similares a las del hombre.²⁰

Durante las pruebas de toxicidad crónica deben emprenderse estudios a fin de evaluar la integridad funcional de los distintos sistemas orgánicos, además todos los animales deben ser sometidos a autopsia macroscópica a fondo, ya que por lo común las decisiones relativas a la inocuidad de un compuesto se basan en estas observaciones.⁴¹

Por cuanto las pruebas de toxicidad crónica son costosas y requieren servicios y personal especializado, se debe poner gran cuidado en el diseño, la ejecución y la interpretación de los resultados de estos estudios.⁸

4. MÉTODOS

4.1 Pruebas de toxicidad

4.1.1 Pruebas de toxicidad aguda en ratones. Determinación de la DL_{50} .

Se realizaron las pruebas de toxicidad aguda con el objeto de descubrir los efectos tóxicos ocasionados por una sola administración de *fescdipina*. Se emplearon un total de 180 ratones albinos (machos) de 30 a 40 gramos de peso, los cuales fueron proporcionados por el bioterio de los laboratorios Bayer y mantenidos durante la experimentación en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Primeramente se pesaron y distribuyeron a los animales en forma aleatoria. Se formaron 18 grupos de 10 animales cada uno, cada animal fue administrado por vía oral con una dosis única de *fescdipina* seleccionada por progresión logarítmica y estas dosis fueron:

GRUPO	Dosis mg kg ⁻¹	GRUPO	Dosis mg kg ⁻¹
1	0.010	10	1.8
2	0.018	11	3.1
3	0.031	12	6.0
4	0.060	13	10.0
5	0.100	14	18.0
6	0.180	15	31.0
7	0.310	16	60.0
8	0.600	17	100.0
9	1.000	18	300.0

El vehículo empleado para suspender el compuesto en esta prueba fue agua destilada. Posterior a la administración se mantuvo a los animales en observación durante varias horas, registrando cualquier comportamiento anormal en su conducta y/o locomoción, así como la aparición de otros síntomas o su muerte.

4.1.2 Pruebas de hepatotoxicidad en ratas

I Animales de experimentación:

Para realizar estas pruebas, se emplearon ratas albinas de la cepa Wistar, únicamente machos de 200 a 250 g de peso, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional y durante su evaluación toxicológica se mantuvieron en óptimas condiciones de distribución, alimentación y limpieza en el cuarto de la granja que corresponde al laboratorio de farmacología y toxicología hepática de la misma Institución.

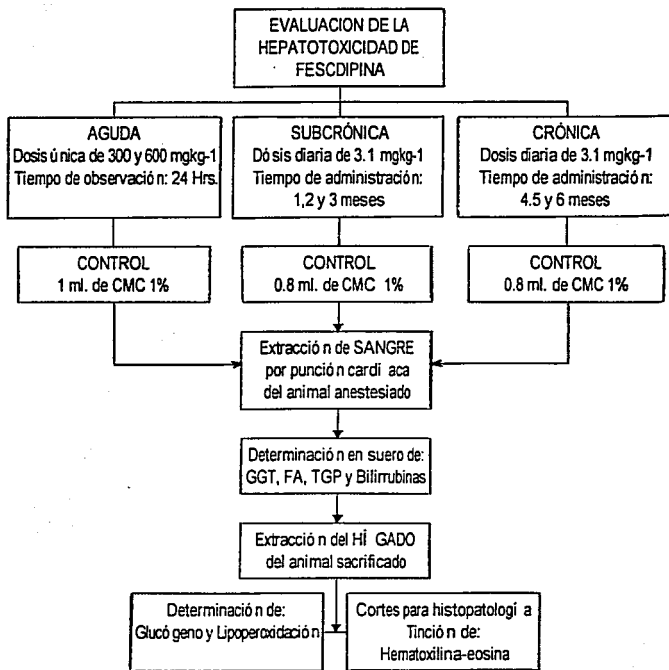
II Equipo y aparatos empleados:

- Balanza granataria con canastilla marca Ohaus.
- Jeringa de 1 ml. con dispositivo para administración oral (sonda).
- Jeringa de 10 ml. con aguja 16 x 32 mm para realizar las punciones cardíacas.
- Cámara de anestesia impregnada con éter etílico.
- Equipo de cirugía completo.
- Centrífuga con refrigeración marca Beckman TJ-R.
- Baño María a 37 °C marca Temperor.
- Espectrofotómetro Spectronic 20 marca Milton Roy Company.
- Micropipetas para medir diferentes volúmenes en microlitros.

III Soluciones y Reactivos:

- *Alcohol etílico absoluto* (Baker Analyzed).
- *Carboximetilcelulosa*.
- *Éter etílico puro* (Baker Analyzed).
- *Reactivo de Bowin*.

Diagrama metodológico



a) Tratamiento agudo

En estas pruebas se emplearon un total de 15 animales los cuales fueron distribuidos al azar en tres grupos de 5 animales cada uno, en este caso se administró vía oral una única dosis de *fescidipina* de 300 y 600 mg kg.⁻¹ al grupo 1 y 2 respectivamente, al grupo número 3 (Control) se le administró por la misma vía 1 ml. del vehículo empleado: carboximetilcelulosa al 1%. Durante 6 horas posteriores a la administración se observó a los animales registrando cualquier comportamiento anormal en su conducta y/o locomoción y esperando la aparición de síntomas o la muerte.

Transcurridas 24 horas posteriores a la administración, en los animales sobrevivientes (tanto controles como tratados) se procedió a obtener una muestra de sangre por punción cardíaca del animal previamente anestesiado con éter etílico. Después se sacrificó a los animales y se les extrajo el hígado, se separaron de él dos porciones de 0.5 g exactamente para realizar las cuantificaciones de glucógeno y lipoperoxidación respectivamente y además se obtuvieron cortes para la realización de los estudios histopatológicos.

Las muestras de sangre y de hígado se mantuvieron desde su extracción hasta su utilización, en refrigeración para evitar alteraciones en las determinaciones bioquímicas, los cortes de hígado para tñir se conservaron en el reactivo de Bowin.

Se obtuvo el suero, centrifugando las muestras de sangre a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, en él se realizaron las determinaciones bioquímicas de bilirrubinas y enzimas marcadoras del daño hepático como son: γ -glutamiltranspeptidasa (GGT) Fosfatasa Alcalina (F A) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP), las porciones de hígado se emplearon para la determinación de glucógeno y lipoperoxidación.

Los cortes que se mantenían en el reactivo de Bowin se lavaron a las 10 horas con etanol al 70% y se conservaron en este hasta que se fijaron y tñieron con la técnica de hematoxilina-eosina.

b) Tratamiento subcrónico y crónico

Para este estudio se emplearon un total de 50 animales los cuales se distribuyeron en 5 grupos de 10 animales cada uno, cuatro animales de cada grupo fueron administrados únicamente con 0.8 ml de carboximetilcelulosa al 1 % (vehiculo). A los seis restantes de cada grupo se les administró diariamente fescdipina por vía oral en dosis de 3.1 mg kg⁻¹ durante los siguientes periodos de tiempo:

No.Grupo	Tiempo de Administración	Tipo de TOXICIDAD
1	1 mes	subcrónica
2	2 meses	subcrónica
3	3 meses	subcrónica
4	4.5 meses	crónica
5	6 meses	crónica

Transcurridos los tiempos de administración diaria, de todos los animales (control y tratados) se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca de los animales previamente anestesiados con éter etílico, posteriormente se sacrificó a los animales y se les extrajo el hígado del cual se obtuvieron muestras para realizar las determinaciones de glucógeno y lipoperoxidación así como algunos cortes para los estudios histopatológicos.

Todas las muestras obtenidas se conservaron en refrigeración hasta que fueron utilizadas. De aquí en adelante se procedió con las muestras de la misma manera que en el caso de las pruebas de toxicidad aguda.

Los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas de los animales tratados se compararon con respecto a los resultados para los animales control empleando la prueba estadística de t de student (ver apéndice 1).

4.2 Determinaciones bioquímicas

En muestras de suero fueron determinadas las enzimas: γ -Glutamiltanspeptidasa, fosfatasa alcalina y transaminasa glutámico pirúvica así como otros compuestos como bilirrubinas. En muestras de hígado se cuantificaron glucógeno y lipoperoxidación.

Reactivos empleados:

- *Ácido acético glacial* (Baker Analyzed).
- *Ácido clorhídrico* (Baker Analyzed).
- *Ácido fosfórico -Ácido ortofosfórico-* (Baker Analyzed).
- *Ácido alfaoxaglutárico* (Sigma).
- *Ácido tiobarbitúrico* (Sigma).
- *Ácido tricloroacético* (Merck).
- *Ácido sulfúrico* (Baker Analyzed).
- *Alcohol etílico* (Baker Analyzed).
- *Antrona* (Sigma).
- *Azul de coomassie g-250* (Sigma).
- *Cloruro de magnesio* (Baker Analyzed).
- *2,4-Dinitrofenilhidrazina* (Sigma).
- *Fosfato disódico* (Baker Analyzed).
- *Fosfato monopotásico* (Baker Analyzed).
- *γ -glutamil-p-nitroanilida* (Sigma).
- *Glicil-glicina* (Sigma).
- *Hidróxido de potasio* (Merck).
- *Hidróxido de sodio* (Baker Analyzed).
- *Piruvato estándar* (Sigma).
- *p-nitrofenilfosfato* (Sigma).
- *p-nitrofenol estándar* (Sigma).
- *p-nitroanilina* (Sigma).

Todos los reactivos son del máximo grado de pureza.
Entre paréntesis se anota la casa distribuidora de dichos reactivos.

El único kit de reactivos preparados que se empleo fue:

- **Equipo para la determinación fotométrica de:**
Bilirrubinas (3333 Merck).

4.2.1 Determinación de la actividad de la γ -Glutamyl transpeptidasa

En este método se usó como sustrato la glutamil-p-nitroanilida que en presencia de la enzima γ -glutamyl transpeptidasa y de un receptor del grupo γ -l-glutamyl (como es la glicil-glicina) produce γ -l-glutamilglicilglicina y p-nitroanilina que puede ser cuantificada espectrofotométricamente. ⁴²

Se preparó una curva estándar de p-nitroanilina de la siguiente forma:

Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se disolvieron en 250 ml de ácido acético 1.5 M.

Se graficó la concentración de p-nitroanilina (nmoles) contra la absorbancia.

TUBO	μ l. de sol de p-nitroanilina	μ l. de Agua bidestilada
1	50	1950
2	100	1900
3	150	1850
4	250	1750
5	375	1625
6	500	1500
7	750	1250
8	1000	1000

PROCEDIMIENTO

- 1.- En un tubo de ensayo de vidrio (13 X 100 mm) se mezcla lo siguiente:
 - 400 μ l. de *tris-HCl* 200 mM pH 8.2
 - 100 μ l. de *MgCl₂* 200 mM
 - 100 μ l. de *glicil-glicina* 40 mM pH 8.2
 - 200 μ l. de *g-glutamyl-p-nitroanilida* 10 mM.
- 2.- Se incuba en baño María a 37°C durante 10 min. y se inicia la reacción agregando 200 μ l de *suelo*. Se agita e incuba nuevamente a 37°C.
- 3.- La reacción enzimática se detiene a los 30 minutos agregando 2 ml de *ácido acético* 1.5 M.
- 4.- La absorbancia de cada reacción se determina a 410 nm cuantificandose la *p-nitronilina* producida. La concentración de la enzima se determina por interpolación de la absorbancia en la curva estándar.
- 5.- Los resultados se reportan en μ mol L⁻¹ min.⁻¹ para lo cual se realizó el siguiente cálculo:

CÁLCULO

$$C = \frac{(VR)}{(VS)} \frac{(1 \mu\text{mol})}{(1000 \text{ nmol})} \frac{(1000 \text{ ml})}{(1 \text{ L})}$$

Donde :

- C = Concentración de la enzima (nmol ml⁻¹)
VR = Vol. de reacción (3 ml)
VS = Vol. de *suelo* empleado (0.2 ml)
T = Tiempo de reacción (30 min.)

4.2.2 Determinación de la actividad de la Fosfatasa Alcalina

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el cual absorbe a 410 nm.⁴³

Reactivos:

1.- Solución estándar de p-nitrofenol de 10 mmoles ml^{-1}

2.- 0.5 ml de la sol. 1 se llevan a un volumen de 100 ml con NaOH 0.02 N

3.- NaOH 0.02 N

Curva estándar de Fosfatasa Alcalina

TUBO	Sol. 2 (ml)	NaOH 0.02 N (ml.)	μ moles de sustrato hidrolizado
1	0.5	5.0	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.100
4	3.0	2.5	0.150
5	4.0	1.5	0.200
6	5.0	0.5	0.250

La absorbancia de las mezclas se determinó a 410 nm.

Se graficó la concentración (μ moles de sustrato hidrolizado) contra absorbancia.

PROCEDIMIENTO

- 1.- En un tubo de ensayo de vidrio (13 X 100 mm) se mezclan los siguientes reactivos:
 - 0.25 ml. de *buffer de glicina* 0.1 M y $MgCl_2$ 1 mM pH 10.5.
 - 0.25 ml. de *sustrato de p-nitrofenilfosfato disódico* (0.4 %).
- 2.- Se incuba la mezcla en baño María a 37°C durante 5 min.
- 3.- Se añaden 50 µl de *suero problema* y se incuba nuevamente a 37°C por 30min.
- 4.- Se detiene la reacción adicionando 5 ml. de *NaOH* 0.02 N.
- 5.- Determinar la absorbancia de la mezcla a 410 nm.

La concentración de la enzima se determina por interpolación de la absorbancia en la curva estándar de p-nitrofenol.

Los resultados se reportan en $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ considerando el siguiente:

CÁLCULO

$$\frac{(\text{C})}{(\text{VS}) (\text{T})} \quad (1000 \text{ ml})$$
$$(\text{L})$$

Donde:

C = Concentración de la enzima (μmol).

VS = Vol. de Suero empleado (0.05 ml).

T = Tiempo de Reacción (30 min).

4.2.3 Determinación de la actividad de la Alanin Amino Transferasa sérica (Transaminasa Glutámica Pirúvica T G P)

La actividad de la TGP se determinó por el método de Reitman-Frankel, en el que se midió el complejo formado por el piruvato y la 2,4-dinitrofenilhidrazina que se produce a partir de la alanina y el alfa-oxoglutarato, complejo colorido que absorbe a 515 nm. ⁴⁴

Reactivos empleados:

1.- *Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4*

Se preparó mezclando 840 ml. de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 ml de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.

2.- *Solución de sustrato*

Se disolvieron 1.78 g de D-alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer, se añadieron 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y se completó hasta 100 ml con la solución buffer. Se conservó a 4°C.

3.- *Reactivo cromógeno (2-4 dinitrofenilhidrazina 1 mM)*

Se disolvieron 200 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 1 N caliente y se completó hasta un litro con HCl 1 N.

4.- *Solución estándar de piruvato, (1 $\mu\text{mol ml}^{-1}$)*

Se disolvieron 11 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer.

Se preparó una curva estándar de piruvato de la siguiente manera:

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7
<i>Sol. sustrato (μl)</i>	250	225	200	175	150	125	100
<i>Sol estándar de piruvato (μl)</i>	---	25	50	75	100	125	150
<i>Sol. Buffer de fosfatos (μl)</i>	50	50	50	50	50	50	50
<i>Reactivo cromógeno (μl)</i>	250	250	250	250	250	250	250
<i>NaOH 0.4 N (ml)</i>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

La curva se construyó graficando la concentración en μmoles de piruvato contra absorbancia.

PROCEDIMIENTO

Reactivos	Blanco	Problema
<i>Sol. sustrato D-l-alanina (μl)</i>	250	250
<i>Suero problema (μl)</i>	---	50
Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 60 minutos.		
<i>Reactivo cromógeno (μl)</i>	250	250
Incubar 5 minutos a 37°C		
<i>Suero problema (μl)</i>	50	---
Incubar 15 minutos a 37°C		
<i>NaOH 0.4 N (ml)</i>	2.5	2.5

Se determinó la absorbancia del problema y el blanco calibrando con agua destilada. Restando la absorbancia del blanco a la de la muestra respectiva e interpolando en la curva estándar de piruvato se determinó la actividad de la enzima en μmoles de piruvato.

El resultado, como el de las anteriores enzimas se reportó en $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min.}^{-1}$

CÁLCULO :

$$\frac{(\text{mmol de piruvato})}{(V)(T)} \quad \frac{(1000 \text{ ml})}{(1 \text{ L})}$$

Donde:

V= Volumen de suero problema (0.05 ml).

T= Tiempo de incubación (60 min).

Determinación de Bilirrubinas

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado un colorante azoico que en solución neutra es rojo y azul en solución alcalina. El glucorónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona directamente, mientras que la bilirrubina indirecta libre reacciona solo en presencia de un acelerador.

4.2.4 Bilirrubina total

La bilirrubina total en suero o plasma se determina por copulación con el ácido sulfanílico diazotado tras la adición de cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. Con la solución de Fehling se forma azobilirrubina azul, cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (coloración mixta verde) de manera selectiva por fotometría a 578 nm. ⁴⁵

PROCEDIMIENTO

Reactivos	Problema	Blanco
<i>Acido Sulfanílico</i>	0.2 ml	0.2 ml
<i>Nitrito de Sodio</i>	1 gota	-----
<i>Acelerador</i>	1.0 ml	1.0 ml
Suero (reciente no hemolizado)	0.2 ml	0.2 ml
Mezclar y dejar reposar de 10 a 60 minutos a temperatura ambiente		
<i>Solución II Fehling</i>	1.0 ml	1.0 ml
Mezclar, medir a 578 nm de absorbancia los problemas al cabo de 5 a 30 minutos contra agua destilada y en caso necesario, contra el blanco.		

CÁLCULO

Medición frente a un blanco:

$$\text{Concentración de bilirrubina total} = \begin{matrix} E \times 10.5 \text{ mg dl}^{-1} \\ E \times 180 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \end{matrix}$$

4.2.5 Bilirrubina directa

La bilirrubina directa, principalmente los glucoronidos hidrosolubles de bilirrubina, reaccionan a los 5 minutos sin la adición de acelerador. La bilirrubina libre bajo estas condiciones reacciona más lentamente.

La bilirrubina directa se mide según Schellong y Wende,⁴⁶ sin adición de álcali, como colorante azoico rojo a 546 nm.

La bilirrubina indirecta se obtiene de la diferencia entre la bilirrubina total y la bilirrubina directa.

PROCEDIMIENTO

Reactivos	Problema	Blanco
<i>Acido sulfanilico</i>	0.2 ml	0.2 ml
<i>Nitrito de sodio</i>	1 gota	---
<i>Solución salina fisiológica</i>	2.0 ml.	2.0 ml
<i>Suero reciente no hemolizado</i>	0.2 ml	0.2 ml

Mezclar inmediatamente, dejar reposar a temperatura ambiente.
A los 5 minutos exactos, tras la adición del suero, medir las extinciones de los problemas contra el blanco a 546 nm.

CÁLCULO:

$$\begin{aligned}\text{Concentración de bilirrubina directa} &= E \times 14 \text{ mg dl}^{-1} \\ &= E \times 235 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}\end{aligned}$$

4.2.6 Determinación del contenido de Glucógeno Hepático

Este procedimiento consiste en la digestión caliente de una muestra de hígado conteniendo glucógeno, el cual es hidrolizado con KOH 30% dando como resultado glucosa, que se cuantifica colorimétricamente con el reactivo de antrona.⁴⁷

- 1.- Se pesan 0.5 g de muestra de hígado y se colocan en tubos de ensayo (150 x 15 mm) se añaden 1.5 ml. de una *solución de KOH* al 30% a cada uno de ellos, se hierve en baño de agua durante 30 minutos.
- 2.- Después de enfriar los tubos, la muestra digerida se coloca en un matraz aforado de 25 ml y la muestra se lleva a este volumen con agua tridestilada.
- 3.- De la dilución se toma un ml y se lleva nuevamente a 2.5 ml con agua tridestilada.
- 4.- De la última dilución se toma un ml y se coloca en un tubo de ensayo de 150 X 15 mm, además se prepara un blanco con 1 ml de agua tridestilada y también un *estándar de glucosa* (20 μgml^{-1}).
- 5.- Se prepara la solución de *antrona* al 0.2% en H_2SO_4 concentrado.
- 6.- Los tubos del paso 4 se colocan en hielo y se le añade 2 ml. del reactivo de antrona agitando suavemente.
- 7.- Se tapan los tubos con canicas y masking-tape y se colocan en baño de agua hirviendo durante 15 minutos.
- 8.- Se enfrían en agua fría y se lee la absorbancia de la reacción a 620 nm.

CÁLCULO

$$\mu\text{g de glucógeno} = \frac{20 \mu\text{g} \times U}{1.11 \times S}$$

U = Absorbancia de la muestra problema

S = Absorbancia del estándar de glucosa

1.11 = Factor de conversión determinado por Morris para convertir la glucosa a glucógeno .

Los resultados se reportan en gramos de glucógeno (100 g de hígado)⁻¹

4.2.7 Determinación del Contenido total de Proteínas

La determinación del contenido de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Bradford que se basa en la unión de azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. El azul brillante de Coomassie G-250 muestra dos formas de coloración azul y rojo. La forma roja se convierte a azul cuando se une a proteínas.

El complejo colorante-proteína presenta una absorción máxima a 595 nm, el proceso de formación del complejo es virtualmente completo, rápido y permanece en solución por un tiempo relativamente largo (aproximadamente una hora).⁴⁸

Composición del reactivo de Bradford.

- Ácido fosfórico al 85% 100 ml
- Alcohol etílico al 95%..... 50 ml
- Azul de Coomassie G-250..... 100 ml
- Agua tridestilada esp..... 1000 ml

Preparación de la curva estándar

- 1.- Se coloca en tubos de ensayo 13X100 mm 10, 25, 50, 75, y 100 μ g de albúmina sérica bovina (ABS).
- 2.- Se añaden 2.5 ml. de reactivo de Bradford a todos los tubos y se agita.
- 3.- Se lee la absorbancia del complejo a 595 nm en el espectrofotómetro.
- 4.- La curva estándar se construye graficando la concentración de albúmina contra absorbancia.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se toman 100 μl del homogenado de hígado utilizado para la determinación del grado de lipoperoxidación y se llevan a 1 ml con agua tridestilada.
- 2.- De la dilución anterior se toman 20 μl y se agregan a 80 μl de agua tridestilada.
- 3.- Se prepara un blanco que consiste en 100 μl de agua tridestilada.
- 4.- Se añade tanto a los tubos con muestra como al blanco 2.5 ml de reactivo de Bradford.
- 5.- Se agitan y se lee la absorbancia a 595 nm.
- 6.- La concentración de proteínas se determina interpolando la absorbancia resultante en la curva estándar.

Se consideran el contenido de proteínas en 300 ml del homogenado mediante el siguiente:

CÁLCULO

$$\frac{(C)}{(1000 \mu\text{l})} \quad (FD) \quad \frac{(300)}{(20)}$$

Donde:

C = Concentración de proteínas (mg / ml)

FD = Factor de Dilución: 10

4.2.8. Determinación del grado de Lipoperoxidación por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

El método se fundamenta en que dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de malondialdehído (MDA) formando un pigmento rojo, el cual tiene un máximo de absorción en solución ácida a 532 nm. El coeficiente de extinción molar del complejo colorido es de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁴⁹

Reactivos:

- *Tris HCl* 150 mM pH 7.4.
- *Ac. Tricloroacético* (TCA) al 15%.
- *Ac. Tiobarbitúrico* 0.375% en TCA al 15%.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se homogenizan 0.5 g. de hígado con 5 ml de agua tridestilada con lo que se obtiene un homogenado al 10% P/V.
- 2.- Se toman 300 μ l del homogenado y se completa a 1 ml con *Tris-HCl* 150 mM pH 7.4
- 3.- Se incuba a una temperatura de 37°C durante 10 min al término de este tiempo a cada muestra se le adicionan 2 ml de *ácido tiobarbitúrico* (TBA) al 0.375% disuelto en *ácido tricloroacético* (TCA) al 15%.
- 4.- Se incuban los tubos en agua hirviendo durante 15 minutos.
- 5.- Se enfrían y centrifugan los tubos a 4000 rpm durante 10 minutos.
- 6.- El sobrenadante se separa y lee la absorbancia a una longitud de 532 nm.

La concentración (C) se obtiene:

$$C = \frac{E}{\text{Factor de Extinción}} \quad \begin{array}{l} \text{En Espectronic 20} \\ \text{En Coleman} \end{array}$$

(19.2308 nmol MDA) (25.6410 nmol MDA)

El resultado se expresa en nmol MDA (mg de proteína)⁻¹, para lo cual se divide la concentración en nmol de MDA entre el resultado de proteínas de la muestra correspondiente.

5. RESULTADOS

a) Determinación de la DL₅₀

GRUPO	DOSIS DE FESCIPINA (mg kg ⁻¹)	ANIMALES ADMINISTRADOS.	ANIMALES QUE SOBREVIVEN
1	0.010	10	10
2	0.018	10	10
3	0.031	10	10
4	0.060	10	10
5	0.100	10	10
6	0.180	10	10
7	0.310	10	10
8	0.600	10	10
9	1.00	10	10
10	1.80	10	10
11	3.10	10	10
12	6.00	10	10
13	10.0	10	10
14	18.0	10	10
15	31.0	10	10
16	60.0	10	10
17	100.0	10	10
18	300.0	10	10

Todos los animales fueron administrados via oral con una dosis única de *fescdipina* sobrevivieron al tratamiento. La dosis mas elevada que se administro a los ratones fue de 300 mg kg.⁻¹

En rata se administro a 2 grupos de 5 animales cada uno, las dosis de 300 y 600 mg kg.⁻¹ respectivamente y todos los animales sobrevivieron.

b) Pruebas de hepatotoxicidad aguda, subcrónica y crónica.

A continuación se muestran en forma gráfica los resultados que se obtuvieron de las determinaciones bioquímicas, los cuales fueron realizadas únicamente a los animales que se emplearon en el estudio de toxicidad hepática.

Para cada uno de los parámetros determinados sólo se ha gratificado la media y desviación estándar de cada uno de los grupos tratados con *fasciipina*, además se colocaron a su lado los resultados obtenidos para el grupo control con el fin de comparar entre ellos.

En total se determinaron siete marcadores del daño hepático, en las gráficas 1,2 y 3 se muestran los resultados obtenidos para la enzimas: No. 1 γ -glutamyl transpeptidasa, No. 2 fosfatasa alcalina y No. 3 transaminasa glutámico pirúvica.

Las gráficas 4 y 5 corresponden a los pigmentos biliares, bilirrubina directa y bilirrubina indirecta respectivamente.

Las determinaciones bioquímicas efectuadas con muestras de hígado y que también son muy importantes en la detección del daño hepático son: cuantificación de glucógeno y lipoperoxidación, los resultados obtenidos los podemos observar en las gráficas 6 y 7 respectivamente.

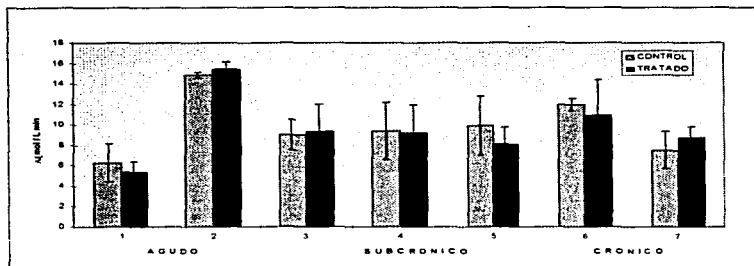
En todas las gráficas los números colocados debajo del eje de las ordenadas corresponden al tipo de tratamiento al que se sometieron las ratas.

No. 1 y 2 tratamiento agudo. Se administró una sola dosis de 310 y 600 mg kg⁻¹ respectivamente y los parámetros fueron determinados a las 24 horas.

No. 3, 4 y 5 corresponden al tratamiento subcrónico, en este caso la dosis administrada fue siempre igual (3.1 mg kg. ⁻¹ diariamente), la diferencia estriba en el tiempo que duro la administración del compuesto, es decir el tiempo al cual se determinaron los parámetros. Para el número 3 fue al transcurrir un mes, para el número cuatro fue a los dos meses y para el cinco fue a los tres meses.

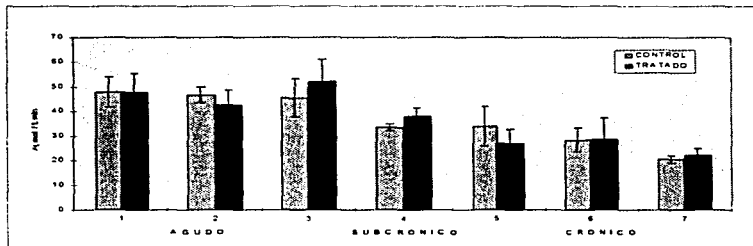
Los números 6 y 7 nos indican los resultados del tratamiento crónico en el cual se administró el compuesto de la misma manera que para el tratamiento subcrónico, solo cambia el tiempo de la administración: para el número seis fueron cuatro y medio meses y para el siete fueron seis meses.

Gráfica No. 1 Determinación de *Gamma glutamil transpeptidasa* en sueros de ratas tratadas con fescipina y sus respectivos controles.



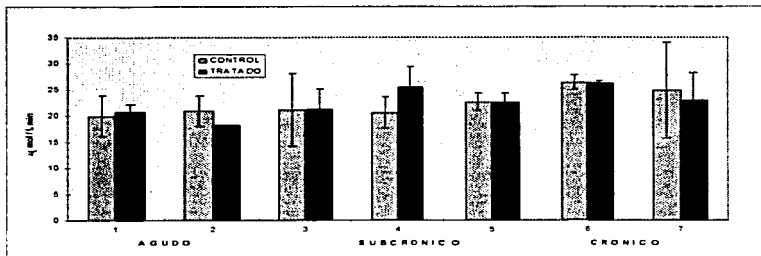
Los animales tratados no mostraron en ningún caso diferencia significativa con respecto a los controles.

Gráfica No. 2 Determinación de *Fosfatasa alcalina* en sueros de ratas tratadas con fescipina y sus respectivos controles.



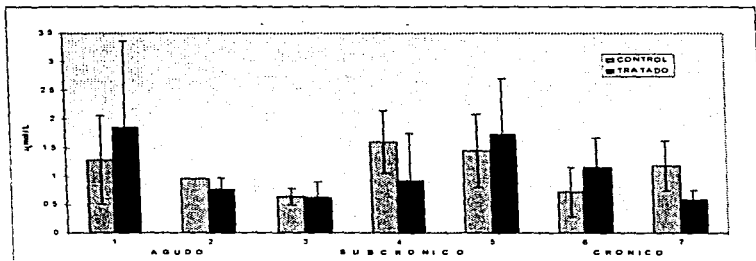
La enzima tiende a disminuir conforme avanza el tiempo del estudio, pero este comportamiento se presenta tanto en animales tratados como en controles, por lo que no se atribuye a la administración del compuesto.

Gráfica No. 3 *Determinación de Transaminasa glutámico pirúvica en sueros de ratas tratadas con fescidipina y sus respectivos controles.*



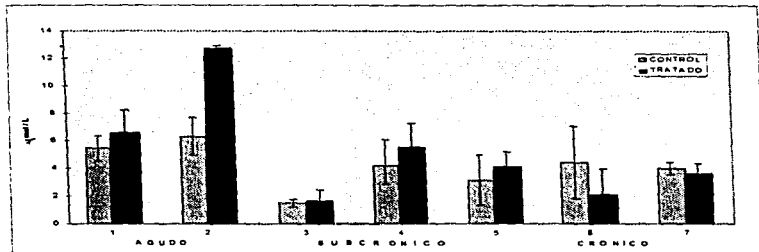
Se obtuvieron valores constantes de la enzima tanto para el grupo tratado como en el grupo control y no se observó diferencia significativa entre ellos.

Gráfica No 4. Determinación de Bilirrubina directa en sueros de ratas tratadas con fesculpina y sus respectivos controles.



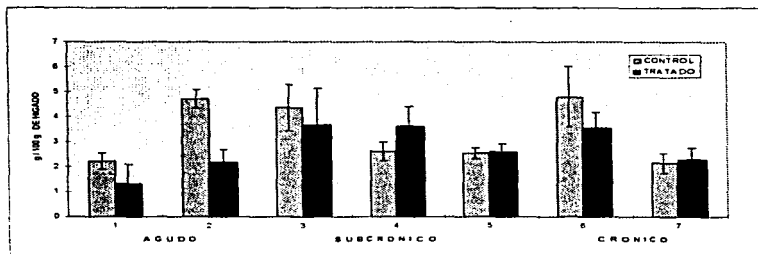
Las desviaciones estándar son muy amplias, sin embargo, en ningún caso se obtuvo diferencia significativa entre los grupos tratados y los controles.

Gráfica No. 5 Determinación de Bilirrubina indirecta en sueros de ratas tratadas con fesculpina y sus respectivos controles.



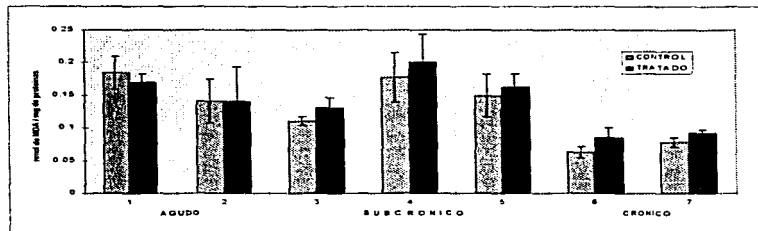
En el tratamiento agudo (Barras No. 2) la administración de fesculpina en dosis de 600 mg kg⁻¹ provoca una elevación significativa de este metabolito.

Gráfica No. 6 Determinación de Glucógeno en hígado de ratas tratadas con fescadipina y sus respectivos controles



Se obtuvo una disminución significativa de glucógeno al administrar 600 mg kg^{-1} de fescadipina. (barras con el No. 2).

Gráfica No. 7 Determinación de la Lipoperoxidación en hígado de ratas tratadas con fescadipina y sus respectivos controles



En esta determinación no se observó diferencia significativa entre los grupos tratados y sus controles.

Figuras

Las fotografías que se muestran a continuación son representativas de los resultados obtenidos al realizar cortes histopatológicos en hígado de los animales en estudio (todos los animales de cada grupo presentaron una histología semejante a la que se expone). Todos los cortes fueron teñidos con técnica de hematoxilina-eosina.

En la figura No. 1 tenemos el corte de hígado de un animal del grupo control, se observan las células típicas de hígado (hepatocitos), la membrana celular delimita su forma poliédrica, su núcleo es central y de color intenso debido a la tinción, el citoplasma tiene un aspecto granular y contiene una gran cantidad de glucógeno. Estas células se disponen en cordones unicelulares llamados trabéculas.

En la figura No. 2 se presentan los resultados obtenidos de un animal del grupo tratado con una dosis de 600 mg kg.^{-1} (tratamiento agudo) podemos apreciar que no existe diferencia con respecto al control (figura No. 1), las células no se han alterado a causa de la administración del compuesto, e incluso podemos observar una célula en mitosis, que es muy común en el hígado ya que los hepatocitos son células con una gran capacidad de duplicación.

De la misma manera , el tratamiento subcrónico y crónico (figura No. 3 y 4 respectivamente) no causaron alteración en las células hepáticas, ya que conservan su citoplasma bien delimitado por la membrana celular y no se presentan huellas de grasa, ni necrosis.

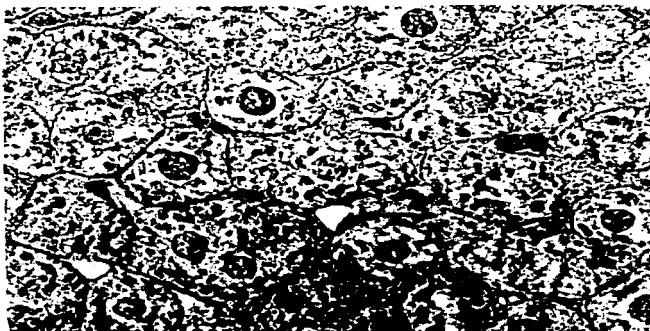


Figura No. 1 Hepatocitos de un animal control. Celulas de forma poliedrica con un nucleo central y citoplasma de aspecto granular. Tincion de hematoxilina-eosina (100X).

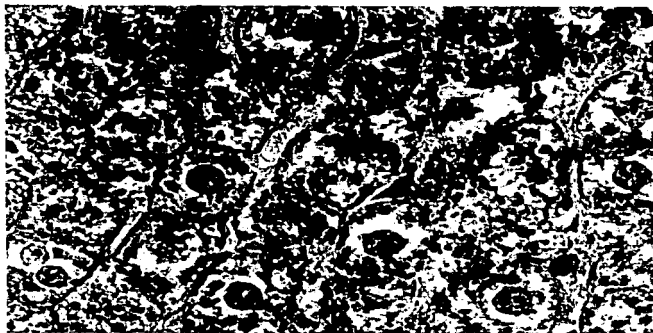


Figura No. 2. Hepatocitos de un animal tratado con fescadipina en dosis de 600 mg/kg. No presenta diferencia con respecto al control. Algunas celulas presentan un doble nucleo. Tincion de hematoxilina-eosina (100 X).

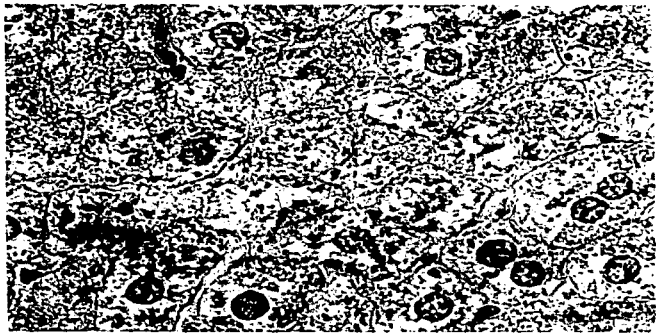


Figura No. 3. Hepatocitos de un animal tratado con *fescudipina* en dosis de 3.1 mg kg^{-1} (tratamiento subcrónico). Algunas células presentan un doble núcleo. Tinción hematoxilina-eosina (100 X).



Figura No. 4 Hepatocitos de un animal tratado durante 6 meses con *fescudipina*, dosis diaria de 3.1 mg kg^{-1} . No presenta diferencia con respecto al control. La administración del compuesto no altera la estructura celular. Tinción de hematoxilina-eosina (100 X).

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A dosis tan elevadas de hasta 300 mg kg.⁻¹ (en ratones) y 600 mg kg.⁻¹ (en ratas), *fescedipina* no causa la muerte, por lo cual no es posible determinar un valor para la dosis letal cincuenta, lo que a la vez nos indica que el compuesto presenta un margen de seguridad bastante amplio cuando se emplea la vía de administración oral. (dosis terapéutica: 3.1 mg kg.⁻¹).

Esto representa una clara ventaja sobre otros antagonistas de calcio, ya que se ha publicado que es frecuente el envenenamiento por la ingestión de dosis elevadas tanto con nifedipina (600 mg) así como con otras de reciente introducción como amlodipina (70 mg) en donde la hipotensión irreversible es una de las principales causas que conducen al paciente a la muerte.(dosis terapéutica: 10 a 30 mg día⁻¹ para nifedipina y 5 mg día⁻¹ para amlodipina).^{46,47}

Del análisis estadístico realizado a los resultados de las determinaciones bioquímicas (ver apéndice 1) se tiene que:

a) Para el caso del tratamiento agudo solo la dosis más elevada de 600 mg kg.⁻¹ de *fescedipina* fue capaz de alterar parcialmente el funcionamiento hepático lo cual se demuestra al encontrar una diferencia significativa en los parámetros de bilirrubina indirecta (t calculada: 9.2405) y glucógeno (t calculada: - 6.3437).

Por lo que *fescedipina* se ubicaría en la categoría No. 4 (*ligeramente tóxico*) de la clasificación dada por Loomis ⁴¹ ya aquí se agrupa a las sustancias químicas que producen una acción perjudicial al administrarlas en dosis de 0.5 a 5 g kg.⁻¹

Aunque creemos que sería difícil que el daño hepático ocasionado por el compuesto se pueda observar en el hombre, ya que la dosis que causó esta alteración fue demasiado elevada, considerando que la dosis terapéutica es de 3.1 mg kg^{-1} , una dosis de 600 mg kg^{-1} representa aproximadamente 200 veces el valor de la dosis terapéutica (42 g. para un individuo de 70 kg.).

b) En cuanto a los resultados obtenidos para el estudio de toxicidad subcrónica y crónica no se encontró diferencia significativa en ninguno de los parámetros cuantificados, ni aún a los periodos de tiempo más prolongados (6 meses), tampoco se observo que *fesclipina* provocara alteración a nivel de hepatocitos .

Es notorio que todas las determinaciones bioquímicas muestran un comportamiento similar, es decir muestran cierta variación pero no una tendencia a disminuir como es el caso de la fosfatasa alcalina (gráfica No. 2) en la cual al finalizar el estudio los valores obtenidos para esta enzima disminuyeron notablemente .

Mediante el análisis estadístico se comprobó que tal comportamiento no es debido a la administración de *fesclipina* ya que se observa tanto en los animales tratados como en los controles, además se demuestra un daño hepático cuando se tiene elevación de la enzima en los animales tratados. Más bien se puede atribuir al tiempo que dura el estudio, es decir durante el proceso de maduración y envejecimiento de los animales, su actividad metabólica y fisiológica cambia, lo que provoca que los valores de algunas enzimas cambien dependiendo la edad. De ahí la importancia de realizar los estudios de toxicidad crónica. "

En los cortes histopatológicos realizados en el hígado de los animales estudiados se demostró que *fescadipina* no provoca modificación de la estructura del hepatocito así como tampoco se observan anormalidades, como necrosis. Las células que presentan doble núcleo se observan tanto en animales control como en los animales tratados (figuras 1 a 4) por lo que no son demostrativas de daño, más bien son representativas de la capacidad de regeneración de las células hepáticas.

No obstante, a pesar de que se ha demostrado que el compuesto no provoca daño hepático en animales de experimentación al administrarlo diariamente por un amplio período de tiempo, de cualquier manera se debe proceder con precaución al administrar en humanos ya que debemos tener en cuenta que existen los fenómenos de hipersensibilidad, donde la toxicidad no depende de la dosis, ni de la duración del tratamiento, así como tampoco es posible reproducir en animales de experimentación.

Asimismo, de los resultados que se han obtenido hasta el momento se deduce que es importante considerar un estudio posterior con el cual se pueda determinar si los parámetros alterados con dosis elevadas vuelven a la normalidad al suspender el fármaco y en qué tiempo lo hacen, además se debe investigar la posible toxicidad tanto aguda como crónica en hembras y también en los demás órganos de los animales tratados (corazón, riñón, pulmones, etc.) para tener así un mayor conocimiento sobre el compuesto y poder asegurar que de ser administrado en el hombre se obtendrá un mayor beneficio y muy poco o ningún riesgo.

7. CONCLUSIONES

Ya que no fue posible dar un valor definido para la DL_{50} de *fescdipina*, si se ha comprobado que posee un amplio margen de seguridad al administrar por vía oral, ya que dosis tan elevadas de 600 mg kg^{-1} no causan la muerte en los animales de laboratorio, esto representa una ventaja de este compuesto sobre otros antagonistas de calcio como nifedipina y amlodipina.

Del estudio de toxicidad aguda se determinó que al administrar *fescdipina* en dosis muy elevadas (600 mg kg^{-1}) se pueden alterar parámetros del funcionamiento hepático como son bilirrubinas y glucógeno, con lo que el compuesto quedaría clasificado respecto a su toxicidad como *ligeramente tóxico*.

Sin embargo al administrar diariamente una dosis terapéutica del compuesto por periodos de tiempo prolongados, estos parámetros no muestran cambios significativos, por lo que se comprueba que *fescdipina* no causa toxicidad hepática como consecuencia de la administración diaria. Aunque también es importante investigar la toxicidad crónica en los demás órganos de los animales (corazón, riñón, pulmones, etc.) y además comprobar que el compuesto se comporta de la misma manera al administrarlo en hembras.

De cualquier manera sabemos ahora que *fescdipina* es un compuesto que además de tener diversos efectos farmacológicos, presenta un amplio margen de seguridad y escasa toxicidad hepática lo hacen aún más atractivo para ser desarrollado como un fármaco de nueva introducción, con lo que se ampliarían las opciones para el tratamiento farmacológico de las enfermedades cardiovasculares que actualmente son causa de muerte de un gran porcentaje de la población mexicana en edad productiva.

8. APÉNDICE I

Prueba t de Student.

A todos los resultados obtenidos de las determinaciones bioquímicas se les realizó el siguiente tratamiento :

1. Tanto para el grupo control como para el tratado se les calculó la media con su respectiva desviación estándar.

2. Se compararon las medias de los grupos (Control contra tratado) mediante la prueba t de Student con un nivel de significancia $p < 0.05$. Suponiendo que los datos constituyen dos muestras aleatorias independientes cada una extraída de una población normal.⁵³

Estadística de prueba :

$$t = \frac{(x_1 - x_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{Sp^2 \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

Donde :

$$Sp^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$(\mu_1 - \mu_2) = 0$$

n_1 = Animales del grupo tratado con fescidipina (5).

x_1 = Media del grupo tratado.

s_1 = Desviación estándar del grupo tratado.

n_2 = Animales del grupo control (3).

x_2 = Media del grupo control.

s_2 = Desviación estándar del grupo control.

Tomando en cuenta que $p < 0.05$ y los grados de libertad son $n-1 = 7$, el valor de t en tablas es 2.3646, tomando una curva de dos colas, por lo tanto :

Si $-2.3646 < t_{EXP} < 2.3646$, no Existe diferencia significativa entre las medias del grupo tratado y el control, es decir, la Administración de *fescidipina* no provoca alteración en el parámetro que se este determinando .

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pardoll H. *Antihypertensive strategy : A current and prospective review.* Am. J. Cardiol. 1990. 65: 2H-5H .
2. Salerno S. M. and Zugibe Jr. F. T. *Calcium channel antagonist. what do the second generation agents have to offer ?.* Posgraduate medicine. 1994. 95 (1):181-190.
3. Walton Ted, Symcs Laura R. *Felodipine and isradipine: New calcium-channel blocking agents for the treatment of hypertension.* Clinical pharmacy. 1993. 12:261.
4. Nelson Edward B, James L. Taylor, Addison A. *Antihypertensive activity of isradipine in humans: A new dihydropyridine calcium channel antagonist.* Clin Pharmacol Ther. 1986. 40:694-697.
5. Pedraza Delgado Ana Libia. "*Determinación del efecto hipotensor de 12 compuestos 1,4-Dihidropiridínicos, utilizando el modelo de presión arterial directa en rata anestesiada*". Tesis de Licenciatura . FESC. UNAM. Cuautitlan izcalli. Edo de México. 1995. p.1-2, 34-42.
6. Meyer D. S. *Modern drug research* Vol 12 . Marcel Dekker, inc. New York USA, 1989 . p. 355-399.
7. Craig Charles, R Stitzel, Robert E. *Farmacología médica* . Editorial Interamericana . México. 1985. p. 89-96 , 297-300.
8. *Nociones basicas de toxicología.* Lecturas complementarias. OMS. 1985 p. 98-119. 145-218.
9. *Canifarma*, Ind. farmacéutica. Año 8, No. 43, Enero-Febrero 1994, p. 48.
10. Domarous A. V. *Medicina Interna* . Tomo I. Editorial Marin. México, 1978. p. 195-250.
11. Hernández y Hernández Héctor. *Prevención del riesgo coronario.* Hospital de cardiología y neumología, Centro Médico Nacional. I.M.S.S, México, 1986
12. Vlasses Peter H. *Advances in the treatment of hypertension.* Am. J. Pharm. 1989. 161:11- 29.
13. Wingard B. Lemuel, et al. *Human Pharmacology Molecular to clinical.* Mosby your Book. USA, 1991

14. Hernández Gallegos Z. "Síntesis, actividad antihipertensiva y susceptibilidad a oxidación microsomal de nuevas 1,4-Dihidropiridinas. (Bloqueadores de la entrada de calcio) y el análisis de sus relaciones estructura-actividad." Tesis doctoral (Farmacología) CINVESTAV. I.P.N. México, 1994 . p. 1-15.
15. Vanhoutte P.M., Paoletti R. *The who classification of calcium antagonist.* Trends in Pharmacol. Sci. 1987. 8:4-5.
16. Bristol Jancs A *Cardiovascular Drugs* . Wiley John & sons Inc. New York, USA. 1986 p. 149-203.
17. Fleckenstein A. *History of calcium antagonist.* Circ. Res. 1983. 52 (suppl. I): 3-16.
18. Chan J.C.N. and Cockram C.S. *Drug-induced disturbances of carbohydrate metabolism.* Adverse Drug React. Toxicol. Rev. 1991 . 10 (1) : 1-29.
19. Litter, Manuel. *Farmacología Experimental y clínica.* 7a. Edición. Librería "El ateneo" editorial, Argentina, 1986. p.766
20. Guengerich, F.P., Brian, W.R., et al. *Oxidation of dihydropyridine calcium channel blocker analogues by human liver cytochrome P-450.* A. J. Med. Chem. 1991 34:1838-1844.
21. Ogawa N., Mizuno K., et al. *Metabolic fate of a new dihydropyridine calcium antagonist, CD-349, in rat and dog.* Xenobiotica. 1993. 23 (7):747-759.
22. Regardh, C.G., Bäämhielm, et al. *Biotransformation of 1,4-Dihydropyridine calcium antagonists.* Prog. Drug Metab. 1990 12: 41-86
23. Toshiro Niwa, Tokuma Yoji, Kikuro and Noguchi Hideyo. *Stereoselective oxidation of nitvadpine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rat and dog liver.* Drug Metab. Dispos. 1989 . 17 (1) : 64-67.
24. Hodgson Ernest, Levi Patricia E. *A Textbook of Modern Toxicology* . Elsevier Science Publishing . New York, USA 1987. p. 168- 172.
25. Hcubi J. E. et. al. *Reye's Syndrome : Current concepts hepatology.* 1987. 7:155.
26. Powell E. E. et. al : *The natural history of nonalcoholic steatohepatitis : A follow-up study of forty-two patients.* Hepatology. 1990. 11: 74.
27. Repetto Manuel. *Toxicología Fundamental.* Editorial Científico-Médica. México, 1987 p. 84.

28. Hayes A. Wallace Ph. *Principles and methods of Toxicology*. Second Edition. Raven Press. USA .1989. p.170-179.
29. Haley Thomas J., Berndt William O. *Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation. New York, USA . 1987. p. 168-172.
30. Krupp Marcus A. *Diagnóstico Clínico y tratamiento*. Editorial el Manual Moderno. México, 1993. p.503- 521
31. Todd-Sanford-davidsohn. *Diagnostico y tratamiento clinico par el laboratorio* . 7a. Edición. Salvat Editores. España, 1988. p 299-329.
32. Harper Harold A. *Manual de Química Fisiologica*. 5a. Edición. Editorial El Manual Moderno. México,1986. p. 190-193.
33. Toda Gotaro, Yusei Ikeda, Makoto Kako, Oka Hiroshi and Oda Toshitsugu. *Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental Study*. Clinica Chemical Acta. 1980. 107:85-96.
34. Hall Robert L. *Laboratory evaluation of liver disease. Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 1985. 15:1.
35. Gallan J. L. *Pathobiology of bilirubin and jaundice* . Semin Liver Dis. 1988. 8:105.
36. Netter Frank H. Colección Ciba de ilustraciones médicas. *Sistema Digestivo. Hígado, vías biliares y páncreas*. Tomo III/3 . Ed. Salvat. México. 1983 .
37. Gaudin C., Braillon A., Selz F., Cuche J.L., Lebrech D., *Free and conjugated catecholamines in patients with cirrhosis*. J Lab Clin Med 1990. 115: 580-582.
38. Horton A. A. *Lipid Peroxidation and Mechanisms of Toxicity*. Department of Biochemistry, University of Birmingham. Birmingham, England, 1987. 18:1.
39. Tribble Diane L., Tak Yee Aw And Dean P. Jones. *The Pathophysiological significance of Lipid Peroxidation in Oxidative Cell Injury*. vol 7. Department of Biochemistry, Emory university School of Medicine. Atlanta Georgia, 1987. 2 : 377-387.
40. Jones A. L., et al. *Hepatocellular damage following amphetamine intoxication*. Clinical toxicology. 1994 . 32 (4): 435-444.
41. Loomis, Ted A. *Fundamentos de Toxicología*. 3a. Edición, Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España. p. 184-190

42. Dragosici B., Ferceni P., Pesendorfer F., Y Wewalka F. G., *Gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP) : Relationship to other enzymes for diagnosis of liver disease. Progress in Liver Diseases* 1976. 5:536-449.
43. Mahler H. R., Y Corders E. H. *Química Biológica*. De. Harper y Row Publishers. Editorial Omega, Barcelona. 1971.
44. Reitman S. Y Frankel S. *A colorimetric method for determination of serum oxalacetic and glutamic piruvic transaminases. Am J. Clin. Pathol.* 1957. 28-56.
45. Jendrassik L. Y Gróf P. *Vereinfachte photometrische methoden zur Bestimmung des Bluthilirubins. Biochem.* 1938. 297:81.
46. SchellongG. y Wende U. *Arch. Kinderheilk.* 1960. 162:126.
47. Hassid W. Z. And Abraham S. *Chemical Precedures for Analysis of Polysaccharides. Biochem.* 1937.
48. Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing trhe principle of protein dye binding. Anal. Biochem.* 1976. 72:248-254.
49. Bucge J. W. y Aust S. D. *Microsomal lipid peroxidation . Methods in enzimology.* 1978. 30:302-310.
50. Hiroshi Takahashi, et.al. *Poxionig caused by the combined ingestion of nifedipine an metoprolol. Clinical toxicology.* 1993 . 31 (4), 631-637.
51. Annelies R. Koch, et. al . *Fatal intoxication with Amlodipine. Clinical Toxicology.* 1995. 33 (3) 253-256.
52. Wayne W. Daniel. *Bloestadística*. Tercera Edición. Editorial Limusa Noriega. México, 1991. p. 242-247.