

54-
25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

"ESTUDIO DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA CRÓNICA DEL
COMPUESTO 3,5 DIETOXICARBONIL-4-(3,5-BIS(1-
PIPERIDINILMETIL)-4-HIDROXIFENIL) 2,6 DIMETIL
1,4 DIHIDROPIRIDINA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIBEL ROBLERO GARCÍA

ASESORES:

M. EN C. LILIANA FAVARI PEROZZI
M. EN C. LUISA MARTÍNEZ AGUILAR
M.V.Z. JORGE TORRES MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274957



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Estudio de la toxicidad hepática crónica del compuesto 3,5 dietoxicarbonil
-4-(3,5-bis(1-piperidinimetil)-4- hidroxifenil) 2,6 dimetil 1,4 dihidropiridina.

que presenta la pasante: Maribel Roblero García.
con número de cuenta. 9361387-1 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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Diciembre de 199 8

PRESIDENTE	M. en C. Luisa Martínez Aquilár	<u>L.M.A.</u>
VOCAL	Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez	<u>Leticia Zúñiga R.</u>
SECRETARIO	M. en C. Francisco López Mejía	<u>F.L.M.</u>
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. Virginia Oliva Arellano	<u>V.O.A.</u>
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Cecilia Hernández Barba	<u>C.H.B.</u>

DEDICO ESTE TRABAJO A:

A MIS PADRES:

Virginia García y **Rigoberto Roblero**, por haberme brindado todo su apoyo, comprensión, paciencia y por haber confiado en mí. Gracias a su esfuerzo y sacrificio porque este triunfo no sólo es mío sino también es suyo. Los quiero mucho.

A la **Sra. Julia Hernández** por ser como una segunda madre para mí durante toda mi carrera y por haberme dado un lugar en su familia todo este tiempo.

A la Sra. **Prudenciana Bravo**, mi querida vecinita por su apoyo incondicional y porque siempre confió en mí .

A **Gerardo** por su cariño, paciencia, comprensión, por su ayuda y porque siempre me ha alentado para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS:

Roberto, Kaydet, Herzain, Lucio César, porque me apoyaron en sus posibilidades, porque siempre confiaron en mí y por ser mis hermanos.

A mi abuelita **Eustolia** por su cariño y preocupación por mí.

A la M. En C. **Liliana Favari Perozzi**, por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo de investigación en el Laboratorio 16 del Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, así como por todo su apoyo, por sus conocimientos y consejos los cuales contribuyeron en mi formación académica y profesional.

A **Ma. Teresa García Camacho** y **Antonio Sánchez Trujillo** por su valiosa cooperación durante el desarrollo experimental de este trabajo, por su gran amistad y por alentarme para seguir adelante.

Al M.V.Z. **Jorge Torres Martínez** por las facilidades prestadas en el laboratorio de histopatología de Medicina Veterinaria y por asesorar este proyecto en la parte de histología mediante sus consejos y su amplia experiencia.

Al Dr. **Víctor Pérez Álvarez** por su valiosa asesoría para la realización del tratamiento estadístico de los datos y las gráficas con el programa asistido por computadora y porque siempre estuvo en la mejor disposición de ayudarme.

Al M. En C. **Enrique Ángeles Anguiano** y a todo su equipo de investigación por la participación en la síntesis del compuesto dihidropiridínico ANTI AVI, así como por toda la información proporcionada de este compuesto.

A los integrantes de mi jurado por la disposición para afinar los detalles de este trabajo.

M. en C. **Luisa Martínez Aguilar**

QFI **Leticia Zúñiga Ramírez**

Dr. **Francisco López Mejía**

QFB **Virginia Oliva Arellano**

QFB **Cecilia Hernández Barba**

ABREVIATURAS

ALT	Alanino amino transferasa o Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP)
AST	Aspartato amino transferasa o Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO)
ANTI AVI	3,5-dietoxicarbonil-4-{3,5-bis(1-piperidinilmetil)-4-hidroxifenil} 2,6 dimetil 1,4 dihidropiridina
BD	Bilirrubina Directa
BI	Bilirrubina Indirecta
BT	Bilirrubina Total
DHP's	Dihidropiridinas
DS	Desviación estándar
FA	Fosfatasa Alcalina
GGT	Gamma glutamil Transpeptidasa
g	Gramo
HCl	Ácido Clorhídrico
IR	Infrarrojo
M	Molar
mg/kg	Miligramos por kilogramo de peso
mmol	Milimol
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µmol	Micromol
NaOH	Hidróxido de Sodio
nmol	Nanomol
nm	Nanómetros
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
rpm	Revoluciones por minuto
SCHA	Sin cambio histológico aparente
SME	Error estándar de la media
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético

RESUMEN

Un gran número de fármacos antiarrítmicos ocasionalmente causan daño hepático, colestasis y otros patrones de daño hepático. El grado de daño hepático se puede obtener por medio de la valoración bioquímica del estado funcional del hígado, mediante marcadores de daño hepático.

De ahí la importancia que tiene este trabajo, ya que el compuesto 3,5 dietoxicarbonil-4-{3,5-bis(1-piperidinilmetil)-4-hidroxifenil} 2,6 dimetil 1,4 dihidropiridina (ANTI AVI) es un antagonista del calcio con propiedad farmacológica antiarrítmica y el uso clínico de este fármaco podría ocasionar cierto riesgo en algunos órganos.

El proponer estudios toxicológicos en el desarrollo de un nuevo compuesto provee datos para valorar su seguridad para el uso humano (Meyer D. S., 1985).

Para este estudio se determinaron las siguientes enzimas séricas: transaminasa glutámico pirúvica, gamma glutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina, también se realizó la determinación de bilirrubina plasmática directa (BD) y total (BT). Haciendo la diferencia de BT y BD se obtuvo la bilirrubina indirecta (BI). Posteriormente se sacrificaron a los animales para realizar la valoración histológica de los siguientes órganos: hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón, cerebro, estómago, intestino delgado y grueso.

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho de 200-250 g. de peso las cuales se separaron en 2 lotes, de 10 ratas cada uno marcadas y pesadas y la distribución se hizo al azar. Se alimentaron con alimento especial para roedores y se les dio de beber agua potable *ad libitum*. Se les administró una dosis terapéutica de ANTI AVI de 3.1 mg/Kg de peso del fármaco en agua. La administración se realizó mediante una sonda gástrica, diariamente, por un período de seis meses.

Los resultados obtenidos mostraron que el ANTI AVI presentó una elevación en la concentración de la enzima fosfatasa alcalina así como también un aumento en el grado de lipoperoxidación y de las bilirrubinas, al cabo de los seis meses; sin embargo, en la valoración histológica se encontró que el ANTI AVI no causó ninguna alteración a nivel celular de los siguientes órganos: hígado, pulmón, cerebro, corazón, riñón, estómago, bazo, intestino delgado e intestino grueso.

ÍNDICE

Abreviaturas	Pág. I
Resumen	II
1.0.0. Introducción	1
2.0.0. Antecedentes teóricos	4
2.1.1. Fármacos antiarrítmicos	4
2.1.2. Clasificación de los fármacos antiarrítmicos	7
2.1.3. Criterios para el agente antiarrítmico Ideal	10
2.2.0. Antagonistas de la entrada de calcio	10
2.2.1. Clasificación de los antagonistas de la entrada de calcio	11
2.2.2. Dihidropiridinas	11
2.2.3. Uso clínico	12
2.2.4. Farmacocinética	13
2.3.0. Origen y química del ANTI AVI	14
2.4.0. Reacciones adversas	15
2.4.1. Clasificación de las reacciones adversas	16
2.4.2. Reacciones adversas generales	19
2.5.0. Nociones básicas de toxicología	21
2.5.1. Pruebas toxicológicas	29
2.5.2. Clasificación de las pruebas de toxicidad	30
2.6.0. Marcadores de daño hepático	33
3.0.0. Objetivo	38
4.0.0. Hipótesis	39
5.0.0. Metodología	40
5.1.0. Técnicas bioquímicas	42
5.1.1. Determinación de proteínas	42
5.1.2. Método de la lipoperoxidación	43

5.1.3. Gamma glutamil transpeptidasa	44
5.1.4. Transaminasa glutámico pirúvica	45
5.1.5. Fosfatasa alcalina	47
5.1.6. Determinación del contenido hepático de glucógeno	48
5.1.7. Determinación del contenido hepático de colágena	49
5.1.7.1. Hidroxiprolina	51
5.1.8. Determinación de bilirrubina	53
5.1.8.1. Bilirrubina total	54
5.1.8.2. Bilirrubina directa	55
6.0.0. Resultados	56
6.1.0. Valoración bioquímica	58
6.1.2. Valoración histológica	78
7.0.0. Discusión de resultados	88
8.0.0. Conclusiones	92
9.0.0. Apéndice	93
9.1.0. Prueba t de Student	93
10.0.0. Referencias bibliográficas	94

1.0.0. INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos han demostrado 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, como son hiperlipidemia, hipertensión, abuso del tabaco y ritmo de vida acelerada, principalmente (Pardell H., 1990).

Por lo que es de gran importancia los avances que se hacen actualmente en todas las áreas de la medicina cardiovascular, los cuales ofrecen oportunidades para realizar el descubrimiento, así como el desarrollo de nuevos y mejores agentes para el tratamiento y prevención de estas enfermedades.

El mejor conocimiento de la bioquímica celular y molecular, la elucidación de los mecanismos por los cuales los fármacos nuevos y los ya existentes en el mercado actúan y el desarrollo de alta innovación y tecnología avanzada para la evaluación de los nuevos fármacos, están entre los muchos logros que se han hecho en años recientes (Bristol A. J., 1986). Estos logros han sido de gran ayuda para la contribución del bienestar social con respecto a uno de los problemas más frecuentes dentro de las enfermedades cardiovasculares las "arritmias cardíacas".

Un gran número de fármacos antiarrítmicos ocasionalmente causan daño hepático, colestasis y diversos patrones de daño hepatocelular han sido observados. Además, los antiarrítmicos con propiedades β -bloqueadores como la Profafenona, han sido asociados con daño hepático (Shuff-Werner y col., 1982, Engels y col., 1984, Miyai y col., 1982, Konz y col., 1984). Con la excepción de amiodarona, la cual causa gran elevación en los niveles de AST y ALT en una gran proporción de pacientes a menudo transitoriamente, estas reacciones son idiosincráticas.

En algunos fármacos las reacciones son acompañadas por signos extrahepáticos de inmuoalergia, como es el caso de quinidina y Ajmalina y estos signos están ausentes con otros fármacos (disopiramida).

Todos los agentes antiarrítmicos tienen un efecto inotrópico negativo, esto puede inducir una elevación en la concentración de enzimas en el hígado o una constante ictericia y secundariamente una congestión venosa hepática como la causada por tocaínida y disopiramida.

Möckel (1965) realizó un estudio comparando los agentes antiarrítmicos prajmalina, disopiramida, profafenona, asparteina y el vasodilatador nitroglicerina, encontrando que todos los agentes causaron una elevación de enzimas hepáticas: transaminasa glutámico pirúvico, transaminasa glutámico oxalacética, fosfatasa alcalina y γ -gamma glutamil transpeptidasa en un número de pacientes en un periodo de 10-16 días del tratamiento.

El papel central del hígado en el metabolismo considera la hepatotoxicidad de los agentes farmacológicos, de hecho se sabe que los hepatocitos realizan una tarea fundamental en la captación, transformación y excreción de los fármacos (Spadoni M., 1978).

La actividad de varias enzimas, las concentraciones de varias proteínas y las sustancias sintetizadas o almacenadas por el hígado se utilizan para estimar el estado de este y la integridad de los organelos y membranas hepatocelulares, así como también la capacidad del órgano para sintetizar o convertir metabólicamente diversos compuestos y la capacidad para segregar bilis (Pesce J. y col., 1991).

En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM) existe un grupo de investigadores de la sección de Química Orgánica, el cual ha desarrollado el

fármaco 3,5-dietoxicarbonil-4-[3,5-bis(1-Piperidinil metil)-4-hidroxifenil]-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina (ANTI AVI), que pertenece al grupo de las 1-4-dihidropiridinas y al ser valorada su acción farmacológica en animales de laboratorio resultó presentar un efecto antiarrítmico (Pedraza D. A., 1995).

Se han realizado estudios de toxicidad hepática aguda y subcrónica, Cabral A., (1997) encontró que el compuesto ANTI AVI sólo altera la bilirrubina directa, la bilirrubina total y el glucógeno.

Esto ha despertado un gran interés para desarrollar este proyecto de investigación con la finalidad de pronosticar los efectos adversos del nuevo fármaco, mediante estudios experimentales de toxicidad crónica hepática.

2.0.0. ANTECEDENTES TEÓRICOS

2.1.1. FÁRMACOS ANTIARRÍTMICOS

Los fármacos antiarrítmicos se usan para prevenir y tratar trastornos del ritmo cardíaco que tienen gran morbilidad y mortalidad.

En general, las arritmias cardíacas se pueden considerar procedentes de la conducción anormal o de la iniciación anormal del impulso o de ambos.

Para entender la farmacología de los antiarrítmicos es preciso conocer la electrofisiología cardíaca. La figura 1.0 describe un potencial de acción cardíaco normal a partir de una fibra de Purkinje. El potencial de la membrana celular en reposo es aproximadamente -90 mV, con el interior de la célula electronegativa respecto al exterior.

Este potencial negativo es el resultado, en primer lugar, de un gradiente de K^+ a través de la membrana, mantenido por la ATPasa de $Na^+ - K^+$. Si la célula se estimula adecuadamente hay una rápida entrada de Na^+ a través de los canales específicos de la membrana. Esta despolarización rápida (fase 0) del tejido ventricular corresponde al complejo QRS del electrocardiograma superficial.

Al disminuir la entrada de Na^+ , la membrana celular empieza a repolarizarse (es decir se vuelve más negativa) produciendo la fase 1 del potencial de acción. Además empieza una segunda entrada de corriente, surgida principalmente del movimiento del calcio. Esta entrada de calcio mantiene un estado despolarizado y es el principal responsable de la fase 2 (meseta) del potencial de acción.

Finalmente, las dos corrientes de entrada de Na^+ y Ca^{++} disminuyen y se produce una despolarización rápida (fase 3) como resultado de la salida de K^+ . En resumen, el potencial de acción es una secuencia coordinada de movimientos iónicos, inicialmente, el Na^+ entra rápidamente en la célula, seguido de la entrada

de Ca^{++} y finalmente de la salida de K^+ que devuelve a la célula a su estado de reposo. Varios antiarrítmicos ejercen sus efectos mediante la alteración de esos flujos iónicos.

BASE ELECTROFISIOLÓGICA DE LA ACCIÓN ANTIARRÍTMICA.

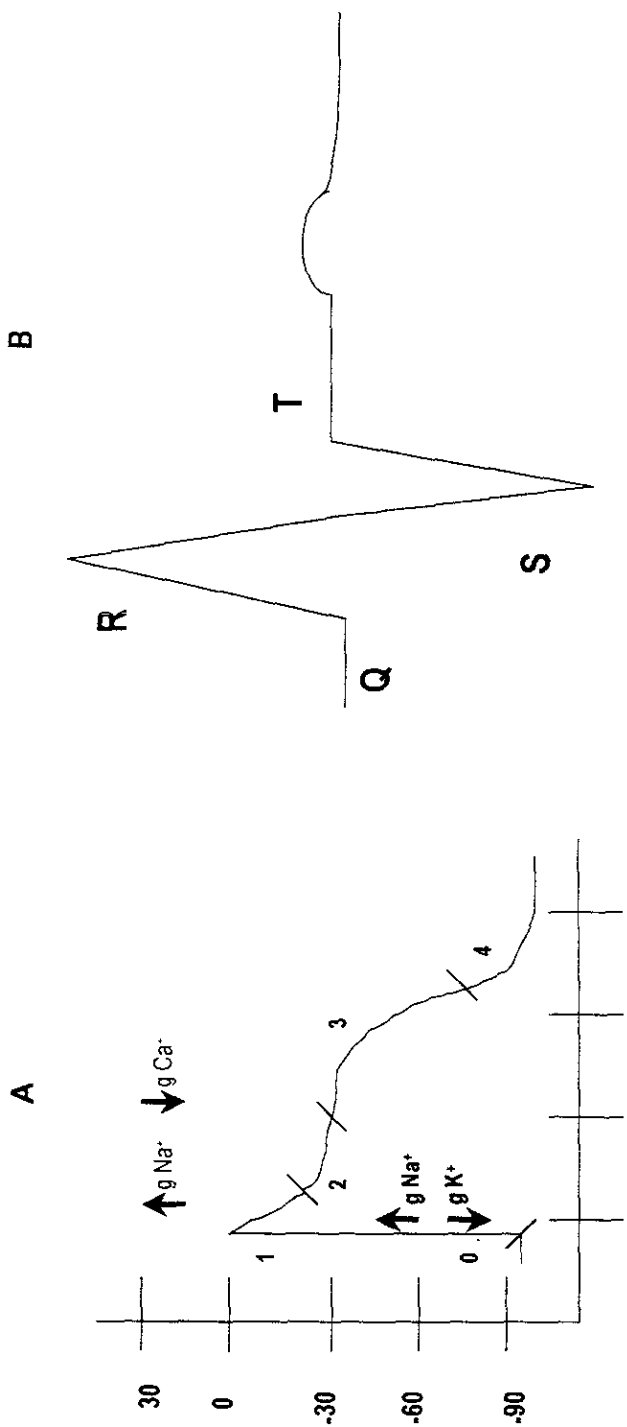
La mayoría de las taquiarritmias son consecuencia de dos mecanismos básicos: actividad focal ectópica y nueva entrada. Con la actividad focal ectópica, un marcapasos potencial dispara independientemente, por un aumento dependiente de la despolarización iónica o porque el potencial de umbral para la descarga se ha hecho más negativo o debido a una disminución del potencial diastólico máximo.

Las condiciones necesarias para una segunda entrada son:

- 1) La vía de conducción debe estar bloqueada unidireccionalmente.
- 2) Debe haber una conducción lenta en una vía alterna hasta un punto más allá del bloqueo.
- 3) Debe haber una excitación retardada más allá del bloqueo.

Con suficiente retraso de la excitación más allá del bloqueo, el tejido proximal a él se puede excitar desde la dirección opuesta y entonces se establece un circuito circular (reentrada). Las diversas clases de antiarrítmicos tienen efectos electrofisiológicos característicos sobre el miocardio (Goth A., 1977) (figura 1).

FIGURA 1.0.



AL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO SE REGISTRA A PARTIR DE LAS FIBRAS DE PURKINJE EN UN ELECTROGRAMA DE ELECTROGRAMA DE FIBRA VENTRICULAR. LAS FASES DEL POTENCIAL DE ACCIÓN SE INDICAN POR 0, 1, 2, 3 Y 4. TAMBIÉN SE INDICAN LOS CAMBIOS PRINCIPALES EN LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA.

2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIARRÍTMICOS

En vista de las diferentes acciones sobre el corazón los podemos clasificar en cuatro clases

CLASIFICACIÓN DE VAUGHN WILLIAMS DE LOS FÁRMACOS ANTIARRÍTMICOS		
CLASE	ACCIONES	FÁRMACOS
I	Inhibición del transporte de sodio. Reducción de la velocidad máxima de la fase 0.	*Quinidina, Procainamida, Lidocaína, Lorcaídina, Mexitelina
II	Bloqueo de los receptores β -adrenérgicos	*Propranolol, Sotalol
III	Prolongación de la repolarización. Alteración de la respuesta de la membrana	*Amiodarona, Bretilio
IV	Bloqueo de los canales de calcio.	*Verapamil, Nifedipina

FÁRMACO PROTOTIPO

CLASE I

Los fármacos antiarrítmicos de clase I tienen propiedades anestésicas locales. Lentifican la corriente de entrada de Na^+ y reducen así la tasa máxima de despolarización, lo que se manifiesta como una pendiente más profunda de la despolarización de la fase 0. Estos fármacos también aumentan el umbral de excitabilidad debido a que el potencial de membrana en reposo se hace más negativo comparado con un marcapasos ectópico.

La velocidad de conducción es más lenta y el período refractario eficaz se prolonga. La despolarización diastólica espontánea en las células del marcapasos disminuye y se manifiesta como un aplanamiento de la fase 4.

La propagación del período refractario tiende a abolir la nueva entrada. Estos fármacos suelen incrementar la duración del potencial de acción, pero la lidocaína y sus derivados, así como la difenilhidantoína difieren de otros miembros de la clase por acortar el potencial de acción. La quinidina, la procainamida y la disopiramida también tienen actividad colinérgica.

CLASE II

Los bloqueadores del receptor β -adrenérgico, como el propranolol. Su acción β -bloqueadora es mucho más importante que cualquier actividad anestésica local que pudieran tener. Su modo de acción se relaciona con la depresión de la pendiente de despolarización diastólica espontánea (fase 4).

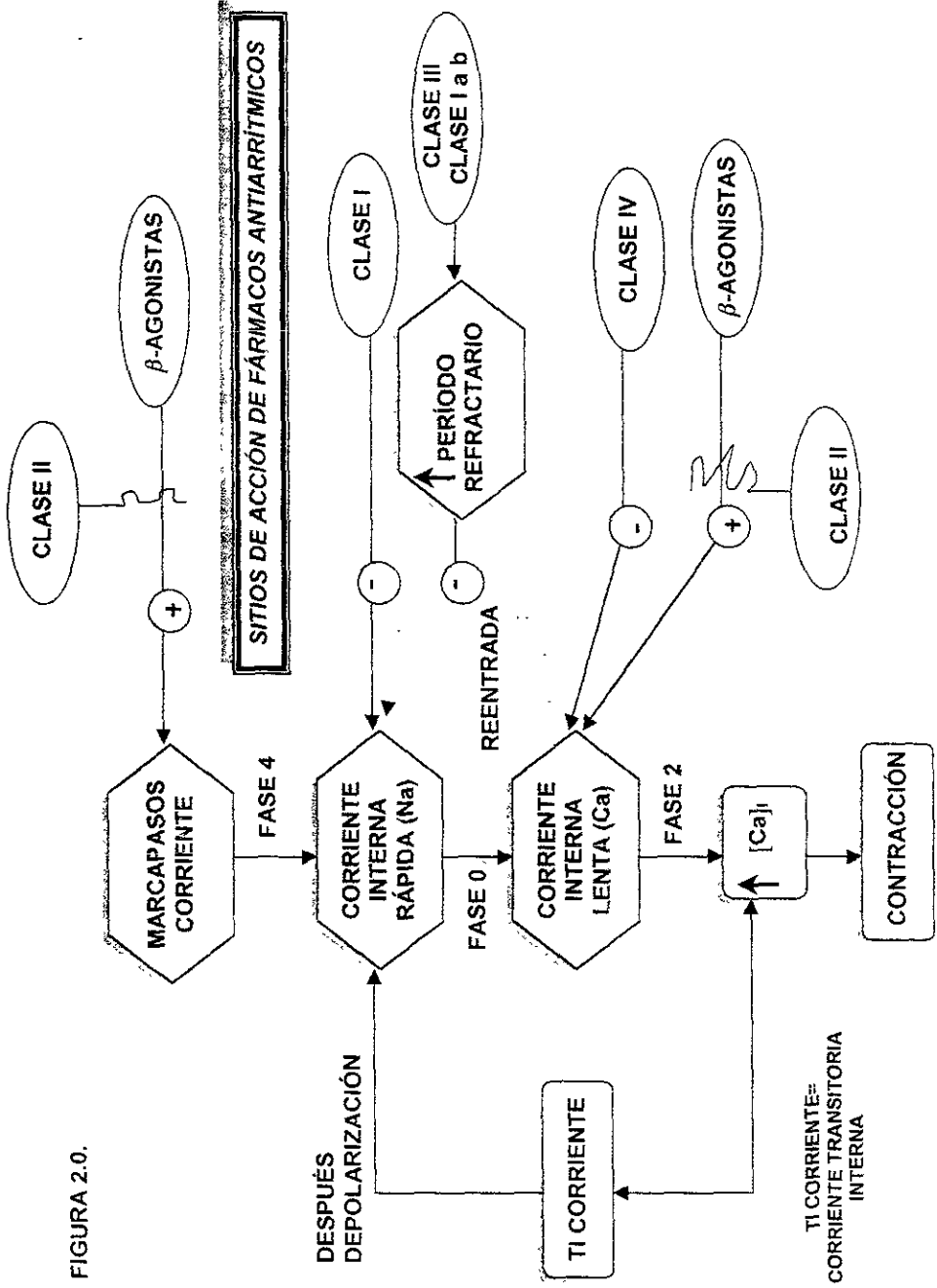
CLASE III

Actúan prolongando el potencial de acción, un efecto asociado con la prolongación del período refractario eficaz.

CLASE IV

Bloquean selectivamente la corriente lenta hacia el interior (respuesta lenta), transportada principalmente por calcio. El Verapamil disminuye la amplitud del potencial de acción en las regiones nodales superior y auriculoventricular media (AV). Estos efectos bloquean la conducción de impulsos prematuros en el nódulo AV (Cedric M. Smith, 1993) (figura 2).

FIGURA 2.0.



2.1.3. CRITERIOS PARA EL AGENTE ANTIARRÍTMICO IDEAL

1. Efectividad en el tratamiento de un grupo de arritmias bien definido.
2. Falta de efectos adversos cardíacos y extracardíacos.
3. Ausencia de interacciones farmacológicas clínicamente significativas.
4. Preparados para uso oral e intravenoso; el preparado por vía oral debe tener un metabolismo mínimo de primer paso.
5. Falta del metabolismo polimórfico genéticamente determinado y clínicamente significativo entre los sujetos.
6. Vida media razonable que permita la administración poco frecuente del fármaco, con el resultado de un mejor cumplimiento por parte de los pacientes.
7. Relativamente poca variabilidad "entre y dentro" de los pacientes, en relación con las propiedades farmacocinéticas.
8. Buena correlación entre su efectividad y su concentración plasmática.

Hasta la fecha ningún agente antiarrítmico reúne todos estos requisitos (Cedric M.S., 1993).

2.2.0. ANTAGONISTAS DE LA ENTRADA DE CALCIO

Los antagonistas del calcio actúan inhibiendo el flujo de calcio hacia la célula a través de canales de calcio dependientes del voltaje específico localizado en la membrana celular. Los canales de calcio son glicoproteínas alargadas y extendidas en la membrana que funcionan como válvulas para iones selectivos. Estos forman un poro que abre y cierra para permitir el movimiento de calcio en la dirección de un gradiente electroquímico (Wingard B. L. y col., 1991).

2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTAGONISTAS DE LA ENTRADA DE CALCIO

Comprenden un grupo químicamente heterogéneo de compuestos y han sido clasificados por la Organización Mundial de la Salud en seis grupos de acuerdo a su estructura química y perfil farmacológico (Hernández G. Z., 1994).

- I Compuestos relacionados con el Verapamil (*Fenilalquilamina*)
- 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 caraverina o perhexilina

Las tres primeras clases comprenden sustancias altamente selectivas para los canales lentos de calcio, mientras que los otros tres incluyen compuestos que además tienen efecto inhibitorio sobre los canales rápidos de sodio (Salerno S.M. y col., 1994).

Aunque más de 35 bloqueadores de calcio se encuentran disponibles clínicamente en el mundo, los más usados son el diltiazem, el Verapamil y un gran número de dihidropiridinas, incluyendo nifedipina, nicardipina, nimodipina, nitrendipina, nisoldipina, amlodipina, isradipina y felodipina (Godfraind T., 1987, Freedman D.D y col., 1987).

2.2.2. DIHIDROPIRIDINAS

Tienen como estructura base las 4-aril-1,4-dihidropiridinas (DHP). Son conocidas desde 1882 cuando Hantzsch las utilizó como intermediarios en la síntesis de piridinas. A pesar de su fácil obtención por síntesis química, no fueron de gran interés hasta los años 60 's cuando se descubrió sus propiedades vasodilatadoras en algunas de ellas (Bristol J. R., 1986).

A partir de entonces, han sido sintetizadas un gran número de DHP's, así como también se han investigado sus propiedades farmacológicas (Vanhouette P.M. y col., 1987, Fleckenstein A., 1983).

2.2.3 USO CLÍNICO

Las DHP's 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 (Nelson E. B. y col., 1986, Bristol J. A., 1986).

Estos compuestos también han sido estudiados e investigados con el fin de encontrar agentes farmacológicamente potenciales para otro tipo de padecimientos y usos, tales como la profilaxis de la migraña y el fenómeno de Raynound (Nelson E. B. y col., 1986, Bristol J. A., 1986).

También podemos mencionar algunas ventajas que ofrecen las DHP's sobre otras clases de antagonistas del calcio:

- ☞ No tienen efecto sobre el sistema de conducción del miocardio. Por lo que aunque no se usen en el tratamiento de taquiarritmias, son mucho más seguros que el Verapamil y el Diltiazem en pacientes que toman β -bloqueadores y en pacientes con obstrucción del corazón (Salerno S.M. y col., 1994).
- ☞ Tienen poca o ninguna interacción con otros fármacos, como por ejemplo digoxina, warfarina, insulina y cumarinas que son empleadas para el tratamiento de condiciones asociadas (Chan J.C.N. y col., 1991).
- ☞ Algunas tienen efecto diurético, lo cual contribuye a la propiedad antihipertensiva de estos compuestos (Salerno S.M. y col., 1994).

2.2.4. FARMACOCINÉTICA

Se absorben muy bien por vía sublingual, bucal y por las vías parenterales, esta absorción alcanza en los primeros dos casos el 90%, pero sufren un extenso primer paso hepático cuando se administran por vía oral, por esto en general presentan baja biodisponibilidad. Se combinan con las proteínas en un 90% y se distribuyen a todos los órganos principalmente en hígado, riñón y pulmón (Litter M., 1986).

Las DHP's son metabolizadas principalmente en hígado, por oxidación (deshidrogenación), catalizada por una isoforma de citocromo P-450 conocida como P-450 NF. Primero se oxidan a sus derivados 1,4-dihidro, posteriormente el metabolismo puede involucrar la hidrólisis de los grupos éster, la hidroxilación del grupo 2 y/o la 6 alquilo y formación de lactonas. La excreción de los metabolitos es lenta, se realiza principalmente por el riñón, alrededor del 60% y el resto en heces (Guengerich F.P. y col., 1991, Ogawa N. y col., 1993, Regardh C.G. y col., 1990).

Podemos mencionar el metabolismo del hidrocioruro de barnidipina, un potente antagonista de calcio. Un experimento realizado por Taramura T. y col. (1996) indicó que esta DHP fue metabolizada extensivamente en hígado y fue catalizada por P450s, encontrando que el metabolismo de barnidipina en rata y perro fueron cualitativamente similares. Los metabolitos fueron generados por los siguientes pasos:

- (a) N-debencilación de la cadena lateral
- (b) Hidrólisis del éster pirrolidínico
- (c) Oxidación del anillo dihidropiridínico al anillo piridínico
- (d) Hidrólisis del metil éster
- (e) Reducción del grupo nitro al grupo amino
- (f) Conjugación del metabolito generado con el ácido glucurónico

2.3.0. ORIGEN Y QUÍMICA DEL ANTI AVI.

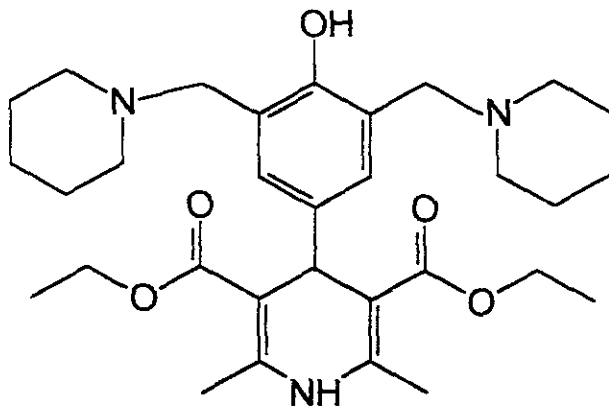
SÍNTESIS

La síntesis se llevó a cabo mediante la reacción de Hantzsch. Para los compuestos de los derivados piperidinil fenólicos se mezcló una proporción molar 1:1:1 de piperidina, formaldehído y el fenol correspondiente y para los compuestos disustituídos la relación fue de 2:2:1. La mezcla de reacción se disolvió en etanol y se sometió a reflujo.

El avance de reacción se evaluó por cromatografía en capa fina. Al término de la reacción la mezcla se concentró. El producto se purificó mediante métodos de purificación comunes como cromatografía en columna, destilación simple, destilación fraccionada y recristalización. Los compuestos purificados se identificaron por métodos espectroscópicos como RMN-¹H, RMN-¹³C, espectrofotometría de masas, IR y en los casos necesarios por difracción de rayos X.

FIGURA 3.0.

Compuesto ANTI AVI (3,5 Dietoxicarbonil-4-{3,5-bis(1-Piperidinilmetil)-4-Hidroxifenil}2,6 Dimetil 1,4 Dihidropiridina).



2.4.0. REACCIONES ADVERSAS

Con el descubrimiento de nuevos fármacos de mayor eficacia es necesario considerar además, de su eficacia terapéutica, (beneficio) la posibilidad de que causen efectos adversos (riesgo).

Después de administrar un fármaco es posible observar dos tipos de acciones, esto es, la acción clínicamente conveniente y beneficiosa que buscó el médico, y los efectos indeseados (que a veces aparecen con los deseados) y que son fenómenos adicionales no buscados originalmente. Estas últimas alteraciones pueden ser dañinas o inocuas y si son lesivas reciben el nombre de reacciones adversas de los fármacos (Glaxo F., 1992, tomado de la OMS, 1985).

Se designan reacciones adversas a las producidas por un fármaco y que no son las que el médico busca, y por el contrario son perjudiciales para el paciente (Litter M., 1992).

Las reacciones adversas son responsables de un alto índice de morbilidad. Se ha estimado que una de cada 1,000 reacciones adversas e interacciones tienen un resultado fatal (Guariano R. A., 1993).

Cerca del 5% de los pacientes que reciben tratamiento médico, sufren reacciones adversas. Casi un 20% de éstas se deben a fármacos nuevos, probablemente, por que se conoce menos sobre su potencial para las reacciones adversas.

La frecuencia de reacciones adversas ha aumentado en años recientes debido al hecho fundamental que cada vez más pacientes ingieren mayor cantidad de fármacos, a menudo por lapsos mayores; se utilizan más fármacos en combinación, sin conocimiento de su farmacocinética y de las enfermedades que se pretenden combatir con ellos (Guariano R. A., 1993).

2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS

Los fármacos pueden provocar diferentes tipos de reacciones indeseables o adversas. Ciertas reacciones pueden ser, en sentido estadístico, fácilmente previsible, en tanto que otras pueden ser difícilmente previsible o inesperadas. Pero previsible o inesperadas, lo que tienen en común es que son indeseables por inconvenientes, por peligrosas y por nocivas (Naranjo P., 1968).

Algunas de estas reacciones son de carácter tóxico y dependen más del fármaco en sí y de sus dosis que del paciente mismo, en cambio otras, dependen más bien del paciente en sí, como las reacciones alérgicas muchas de las cuales son inesperadas. Pero no toda reacción inesperada es de naturaleza alérgica.

Naranjo P. (1968) agrupa las reacciones adversas tomando en cuenta su naturaleza y su mecanismo de producción, en las siguiente categorías:

I-Reacciones de tipo tóxico

- a) Reacciones por intoxicación
- b) Reacciones idiosincráticas

En este grupo se engloban todas aquellas reacciones dependientes, por una parte, de la acción de alta dosis de un fármaco y por otra, de las variaciones cuantitativas de la capacidad de reaccionar de los individuos. Esta variabilidad puede deberse a muchas causas. Unas son adquiridas y por consiguiente pueden ser ocasionales y temporales, otras son de carácter permanente por alteraciones congénitas, por carácter racial o por la presencia de genes atípicos.

II- Efectos colaterales secundarios

- a) Un mismo efecto producido por distintos fármacos
- b) Efectos producidos por un mismo grupo farmacodinámico

Este grupo es muy rico en reacciones, abarca todas aquéllas dependientes de las propiedades farmacodinámicas de los fármacos, y que, a veces, no están directamente relacionadas con sus propiedades terapéuticas.

III- Reacciones por distorsión del metabolismo normal

- a) Por alteraciones enzimáticas
- b) Por deficiencias inducidas

Este grupo corresponde a ciertas reacciones inesperadas con trastornos en apariencia no vinculados a la acción de los fármacos, y que se producen secundariamente a una modificación o distorsión del metabolismo normal inducido por el fármaco.

IV- Reacciones por acostumbramiento

- a) Hábito (dependencia psíquica)
- b) Adicto (dependencia física)

En este grupo las reacciones dependen del acostumbramiento y el desarrollo de dependencia, sea de carácter psíquico o de carácter físico.

V- Reacciones por sensibilización

- a) Reacciones alérgicas:
 - 1) Reacciones de tipo inmediato
 - 2) Reacciones de tipo tardío
- b) Reacciones anafilácticas
- c) Trastornos alérgicos por liberación de histamina

Este grupo está constituido por los trastornos dependientes de variaciones cualitativas de la capacidad de reacción de los individuos. Es el tipo de reacción inesperada. Está condicionada a la sensibilización previa. Es la reacción violenta y a veces fatal, que desconcierta al médico. Una vez que se produjo la primera reacción alérgica, las subsiguientes son previsibles y deben evitarse.

VI- Reacciones fotoinducibles

- a) Fenómenos fototóxicos
- b) Fotosensibilización

Por sus características, se ha colocado en un grupo aparte a las reacciones fotoinducidas. Tienen en común el que la luz, directa o indirectamente condiciona

la producción de la reacción adversa. Por su naturaleza, en cambio, unas son alérgicas y otras de tipo tóxico.

VII- Reacciones teratógenas y embriotóxicas

- a) Efectos teratógenos
- b) Toxicidad embriotrópica
- c) Toxicidad neonatal
- d) Toxicidad selectiva en el recién nacido

Incluye fármacos que al administrarse a la madre embarazada o al recién nacido, pueden provocar una variedad de reacciones adversas como las alteraciones teratógenas.

El doctor Rawlins, diferencia dos tipos de reacciones (Glaxo F., 1993., Remington J.E., 1990):

Predecibles (Tipo A): son las reacciones derivadas de una respuesta aumentada, pero cualitativamente normal, esperable o previsible.

Su incidencia es mayor si las dosis administradas son elevadas y en ciertos subgrupos de población. En general no son clínicamente graves y producen una mortalidad bastante baja. Puesto que se trata de reacciones habituales y esperadas, normalmente se identifican antes de la comercialización del fármaco.

Impredecibles (Tipo B): son aquellas que no guardan relación con la dosis administrada, y cuya aparición en relación con el momento de la exposición al medicamento es variable. No mejoran al reducir las dosis. Son clínicamente graves, producen una mortalidad alta y se deben a una hipersensibilidad o mecanismo idiosincrático.

Las reacciones de tipo A son tres veces más frecuentes que las de tipo B.

2.4.2. REACCIONES ADVERSAS GENERALES

Reacciones dermatológicas:

La piel se ve afectada por las reacciones farmacológicas. Si bien todos los medicamentos pueden causar alteraciones dermatológicas, en algunos pacientes ciertos agentes lo hacen con más frecuencia que otros, por ejemplo: penicilina, sulfonamidas, bromuros, ioduros, arsénico, oro, quinidina, tiacidas y antipalúdicos (Remington J. E., 1990, Loelb S., 1986).

A medida que se introducen nuevos fármacos en la clínica médica, la lista de los que son capaces de producir reacciones adversas dermatológicas irá en aumento. La mayoría de las reacciones adversas dermatológicas de los fármacos no son bien definidas ni peligrosas. Se desconocen los mecanismos de la mayor parte de las reacciones cutáneas. Por lo general la administración de un medicamento se suspende cuando el paciente presenta una reacción cutánea, aunque esta sea mínima (Loelb S., 1986).

Hepatotoxicidad (daño hepático):

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 más 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 que recibe 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 destoxicantes, muchas reacciones oxidativas producen metabolitos reactivos que pueden inducir lesiones en el hígado (Hodgson E., 1987).

Obstrucción biliar: algunos medicamentos afectan el endotelio de los conductos biliares originando un estrechamiento. La bilis fluye entonces hacia la circulación dando al paciente un tinte icterico (Loelbl S., 1986).

Necrosis hepática: daño de los hepatocitos inducido por fármacos y caracterizado por náuseas, vómitos y dolor abdominal seguido de ictericia (Loelbl S., 1986), entre los fármacos que provocan este daño se encuentra el acetaminofén, isoniacida, metildopa, tetraciclina y ácido valproico (Van B., 1995).

Nefrotoxicidad (daño renal):

Se trata de una degeneración de los túbulos renales inducida por medicamentos, que puede interferir con la excreción de los fármacos. Esto da como resultado un aumento en la toxicidad del fármaco (Loelbl S., 1986).

Ototoxicidad (daño a los oídos):

Da como resultado daño en la porción vestibular, auditiva o en ambas, del octavo par craneal.

Daño vestibular: Se caracteriza por vértigo (sensación de dar vueltas y caída) y nistagmus (movimiento de los globos oculares en forma rápida, rítmica y de un lado hacia otro).

Daño auditivo: Caracterizado por tinnitus (oír campanitas o zumbidos) y pérdida progresiva de la audición. Este efecto puede ser producido por algunos antibióticos como kanamicina y neomicina y diuréticos como son el ácido etacrínico y furosemida (Loelbl S., 1986).

Toxicidad en el sistema nervioso central

Esta toxicidad se caracteriza por alteraciones de la coordinación motora, pérdida de la percepción de distancias, depresión de la conciencia o sobreestimulación, incluyendo convulsiones (Loelbl S., 1986). La depresión se presenta más frecuentemente con barbitúricos, otros sedantes hipnóticos, ansiolíticos y alcohol, la confusión y la demencia se presentan con

antihipertensivos, antipsicóticos, cimetidina, digoxina, diuréticos, sedantes, esteroides y hormonas esteroideas (Van B., 1995).

Algunos medicamentos también interfieren con la transmisión del impulso nervioso en la unión neuromuscular, lo cual da como resultado debilidad muscular (Loelbl S., 1986).

Alteraciones gastrointestinales:

Los medicamentos pueden ocasionar náuseas, diarrea y vómitos por irritación local o como efecto sistémico (Remington J. E., 1990., Loelbl S., 1986).

Discrasias sanguíneas:

La médula ósea de algunos pacientes es particularmente sensible a los fármacos: esto puede traducirse en una producción insuficiente de plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos blancos.

En principio todos los fármacos pueden provocar discrasias sanguíneas en pacientes susceptibles, pero algunos como los antineoplásicos, ciertos antibióticos (incluyendo el cloranfenicol) y la fenilbutazona, son responsables más frecuentes de esta complicación. La agranulocitosis es provocada por alopurinol, anticonvulsivantes, antihistamínicos, antitiroideos, captopril, clorpropamida, procainamida y psicoterapéuticos (Van B., 1995).

2.5.0. NOCIONES BÁSICAS DE TOXICOLOGÍA

Para determinar el grado de peligrosidad de una sustancia con actividad farmacológica es necesario conocer y comprender las bases de la Toxicología, considerando lo siguiente (Nociones Básicas de Toxicología, 1985):

Agente Tóxico: Es aquella sustancia capaz de producir un efecto nocivo sobre los organismos vivos y requiere la interrelación de tres elementos:

- 1) Un agente químico capaz de producir un efecto.

- 2) Un sistema biológico con el cual el agente pueda interactuar para producir el efecto.
- 3) Un medio por el cual el agente y el sistema biológico puedan entrar en contacto e interactuar, de esta interrelación resulta el efecto nocivo.

Clasificación: Anteriormente la clasificación de los agentes tóxicos se basaba en su origen, clasificándolos como:

- ◇ Agente tóxico animal.
- ◇ Agente tóxico vegetal.
- ◇ Agente tóxico mineral.

Una clasificación, de los agentes tóxicos más útiles puede ser realizada según:

- ♥ Su estado físico (gas, líquido y sólido).
- ♥ Su composición química.
- ♥ El uso.
- ♥ El ambiente.
- ♥ El órgano que afecta.
- ♥ Su efecto.
- ♥ Su mecanismo de acción biológica.

La ciencia que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos sobre los organismos vivos es la **Toxicología**. El objetivo principal de la toxicología es establecer el uso seguro de los agentes químicos (Jauge P., 1985).

La acción de un agente tóxico sobre un organismo se traduce en una alteración del estado fisiológico o de salud; por tanto una, intoxicación es una enfermedad. Como tal puede ser considerada bajo un criterio patocrónico, es decir

estimando su curso o evolución en función del tiempo y así podemos clasificarlas en intoxicaciones agudas, crónicas y recidivantes.

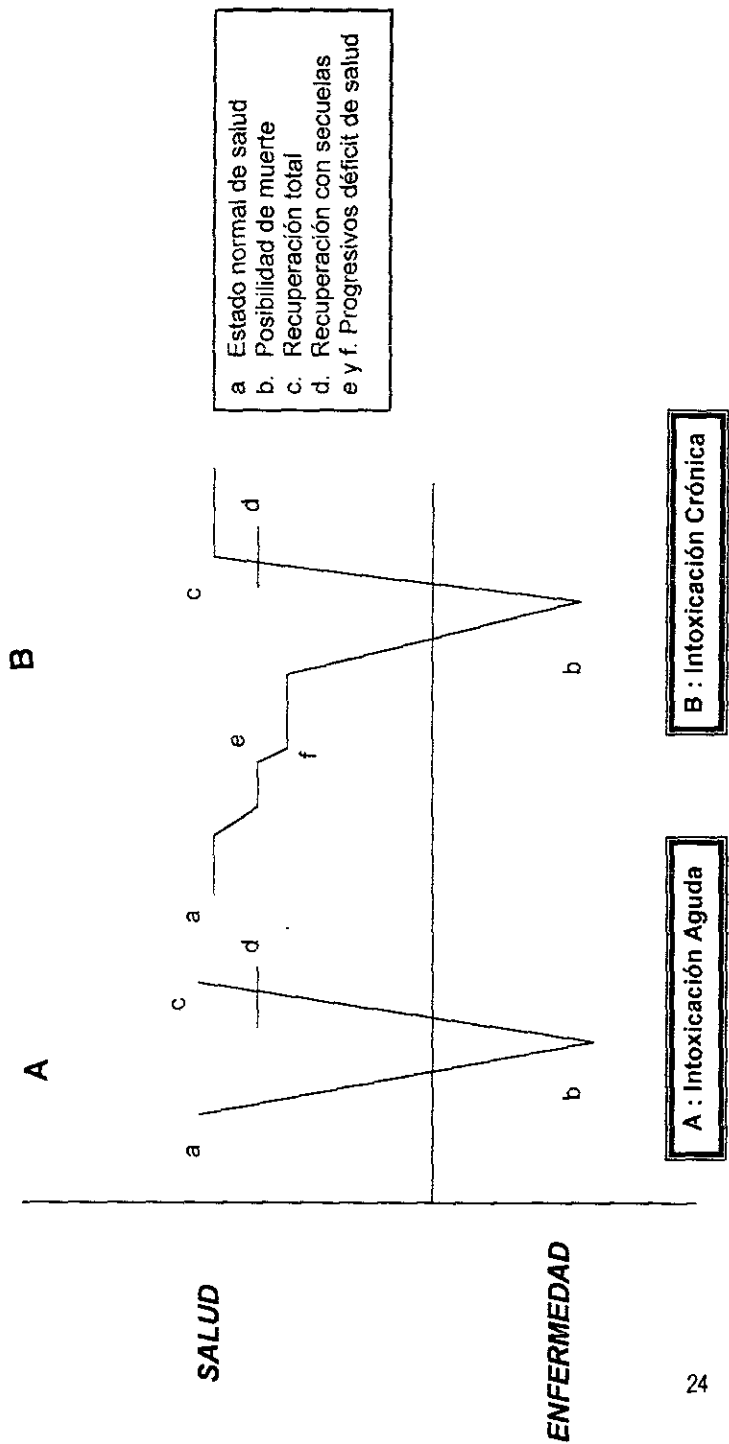
Clasificación de las intoxicaciones:

- ♣ **Intoxicación Aguda:** Consiste en la aparición de un cuadro clínico patológico, a veces dramático tras la absorción de una sustancia química. El caso más representativo es la presentación de los efectos tóxicos antes de las 24 horas de una única administración del agente, la evolución puede llevar al intoxicado a la muerte o a una recuperación total o parcial en la cual quedarán secuelas o lesiones persistentes.

- ♣ **Intoxicación Subaguda:** No es tan sólo un menor daño de gravedad o aparatosidad de la intoxicación aguda sino que a veces sigue un curso subclínico sin que se presente de forma aparente y clara aunque produzca trastornos a distintos niveles biológicos.

- ♣ **Intoxicación Crónica:** Es la consecuente a la repetida absorción de un tóxico, a veces esta absorción se produce en cantidades por sí mismas insuficientes para hacer patentes trastornos tóxicos pero que por acumulación del producto dentro del organismo, normalmente en órganos o tejidos concretos o por suma de efectos lesivos con el transcurso del tiempo lleva a estados patológicos (Ariens E. L., 1987) (figura 4).

FIGURA 4.0.



Muchas veces los trastornos permanecen latentes (subclínicos) hasta que por cualquier causa se manifiestan, ya sea por una baja de la condición fisiológica general (enfermedad), ya sea por una movilización del tóxico de los lugares donde estuviera depositado lo que produciría una intoxicación aguda al aumentar los niveles sanguíneos del agente.

La intoxicación crónica es muy frecuente en nuestros días como consecuencia del mal uso de medicamentos, productos industriales y plaguicidas y de la contaminación ambiental, suele presentar cuadros clínicos difusos, poco claros que frecuentemente inducen a confusión con diversas enfermedades lo cual obstaculiza una terapéutica apropiada.

La repetición de intoxicaciones o intoxicaciones recidivantes, conduce al individuo a estados de deficiencia biológica que se oponen a la recuperación cada vez con mayor intensidad y debido a ello la restitución es en cada caso, más deficiente.

Cualquier efecto tóxico es proporcional a las dosis. Se entiende por dosis a la cantidad de sustancia administrada a un organismo. Se utilizan diferentes tipos de expresiones siendo una de las más importantes la dosis letal 50 (DL₅₀).

Dosis Letal 50: Es la cantidad calculada de un agente químico necesario para producir la muerte del 50 % de los animales en estudio.

El tiempo de observación varía de 24 horas a 4 semanas, recomendándose un período de estudio de 2 semanas, generalmente se expresa en mg o g de sustancia / Kg de peso corporal.

Las sustancias tienen toxicidad diferente así, para producir determinado efecto, la muerte evaluada a través de la DL₅₀ se necesitan dosis diferentes para cada una de las sustancias (Loomis A., 1996).

En base a esto y considerando la dosis letal por vía oral para el hombre, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los compuestos de acuerdo a su toxicidad:

GRADO DE TOXICIDAD.

GRADO DE TOXICIDAD	DOSIS LETAL PROBABLE PARA HUMANO
Prácticamente no tóxico	15 g/Kg.
Ligeramente tóxico	5.0-15 g/Kg.
Moderadamente Tóxico	0.5-5.0 g/Kg.
Muy tóxico	50-500 mg/Kg.
Extremadamente tóxico	5.0 -50 mg/Kg.
Super tóxico	5.0 mg/Kg.

El efecto crítico no es la toxicidad intrínseca de una sustancia sino el riesgo asociado con su uso.

Riesgo: Es la probabilidad de que una sustancia produzca un daño en condiciones específicas de uso. El riesgo se establece con diferentes grados de confianza de acuerdo a la importancia de la decisión involucrada (Repetto M., 1981).

Seguridad: Es la probabilidad de que no se produzca un daño en el uso de una sustancia en condiciones específicas, dependiendo de las condiciones de uso.

Una sustancia muy tóxica puede representar un riesgo menor que una sustancia prácticamente no tóxica.

La exposición a una sustancia química dada es una medida de contacto entre la sustancia y la superficie exterior del organismo. La intensidad de una exposición es función de la concentración de la sustancia en contacto con la superficie exterior del organismo y la duración del contacto (tiempo) (Loomis A., 1996).

Características de exposición :

Los efectos tóxicos se producen en un sistema biológico cuando el agente químico ha alcanzado al receptor apropiado en una concentración y tiempo suficiente como para producir un efecto nocivo. La intensidad de un efecto producido por el agente tóxico depende de la concentración de ese agente en el sitio de acción y en ciertos casos de la velocidad y el tiempo con que esa concentración es alcanzada (Nociones Básicas de Toxicología, 1985).

En general el efecto tóxico está determinado por diferentes factores:

- ◆ **Propiedades fisicoquímicas de la sustancia:** Considerándose entre estas la solubilidad, presión de vapor, constante de ionización, reactividad química, estabilidad, tamaño de partícula y coeficiente de partición.
- ◆ **Factores relativos a la experimentación:** Entre estos factores pueden citarse a las vías de administración y velocidad dosis-vehículo.
- ◆ **Factores biológicos:** Son aquellos relativos a la absorción, distribución, biotransformación, reactividad de receptores, especie, edad, sexo, peso, diferencias genéticas, estado de salud, condiciones metabólicas y estado de nutrición.
- ◆ **Factores ambientales:** Entre estos pueden considerarse a la temperatura, humedad, hora del día, administración simultánea de otros agentes químicos y tensión (estrés).
- ◆ **Duración de la exposición crónica:** Es aquella que se produce por la administración de pequeñas cantidades de un agente químico durante períodos largos, pudiendo aparecer efectos nocivos inmediatamente después de cada aplicación.

Frecuencia de Exposición:

Un factor importante para caracterizar la exposición es la frecuencia con que se administra un agente químico.

El fraccionamiento de las dosis reduce la intensidad del efecto producido. Así, una cantidad de un agente químico que produce un efecto severo cuando es administrado en varias dosis este efecto se reduce o casi no se produce. Esto ocurre debido a que el agente químico es eliminado o biotransformado entre las dosis sucesivas o cuando el efecto producido por cada administración o dosis es revertido antes de la siguiente administración.

Es evidente que con dosis múltiples el efecto producido está influenciado por la frecuencia de la administración y la duración de la exposición.

Cuando un agente químico se acumula en un sistema biológico pueden presentarse efectos adversos. Si la velocidad de eliminación es menor que la velocidad de absorción, el agente tóxico se acumula hasta alcanzar un estado de equilibrio donde ambas velocidades se igualan.

Para llevar a cabo un diseño experimental en un estudio toxicológico hay que considerar los siguientes aspectos:

- * Selección de especies y duración de los estudios.
- * Selección de dosis: El objeto de las pruebas de toxicidad crónica es determinar las pautas de dosis-respuesta y los niveles sin efecto adverso observado, se deben emplear un mínimo de tres niveles de dosis con un nivel superior con la cual se obtenga una toxicidad ligera aunque compatible con la función fisiológica normal y un nivel mínimo del que no hayan de esperarse signos de toxicidad.
- * Pruebas bioquímicas de la función orgánica: Durante las pruebas de toxicidad crónica debieran emprenderse estudios a fin de evaluar la integridad funcional de los distintos sistemas orgánicos.

Se conocen varias pruebas de función hepática. La mayor parte se basan en la determinación de los niveles séricos de enzimas hepáticas que pueden pasar al suero luego de una lesión hepática.

Para las pruebas sistemáticas habituales de la función orgánica en animales grandes se utilizan procedimientos clínicos que permitan medir la concentración de varias enzimas séricas y constituyentes inorgánicos y de otra índole mediante métodos automatizados (Nociones Básicas de Toxicología, 1985).

2.5.1. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.

La extensión con la que se estudia una sustancia química en el laboratorio de toxicología depende en gran manera del uso a que se pretende destinar el compuesto en cuestión. Aquellos compuestos destinados a ser introducidos en seres humanos, como medicamentos o aditivos alimenticios, obviamente requieren un amplio ensayo toxicológico. En el caso de medicamentos, si el compuesto se va a emplear sólo durante cortos períodos, es decir unas pocas dosis, la extensión del ensayo toxicológico es diferente a la de aquellos medicamentos que deben usarse durante largos períodos de tiempo (Loomis A., 1996).

El objetivo primario de las pruebas toxicológicas es determinar los efectos de las sustancias químicas en sistemas biológicos.

Esto puede suministrar información respecto del grado de peligrosidad para el hombre y el medio vinculado con una exposición potencial en relación con un empleo específico de esta sustancia química. El grado de confiabilidad con el cual puede estimarse el peligro depende de la calidad de los datos toxicológicos (Nociones Básicas de Toxicología, 1985).

2.5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD

A lo largo de los años se han diseñado, modificado y mejorado algunos tipos de procedimientos de evaluación de la toxicidad de manera que son generalmente aceptables para la mayoría de los toxicólogos. (Loomis A., 1996).

Se pueden clasificar de la siguiente manera:

Pruebas de Toxicidad Aguda.

El procedimiento inicial consiste en investigar una serie de intervalos de dosis del compuesto en una única especie de animales. Esto requiere seleccionar una vía de administración, preparar el compuesto de una forma adecuada para su administración por la vía seleccionada, y elegir una vía apropiada (Loomis A., 1996).

Cuando no se dispone de datos respecto de la toxicidad del agente de prueba, es indicado realizar estudios de toxicidad aguda con el fin de identificar la toxicidad aguda e identificar la toxicidad relativa del compuesto, investigar su modalidad de acción y su efecto tóxico específico y determinar la existencia de diferencias entre especies.

La prueba más común de toxicidad aguda involucra la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) del compuesto (Nociones Básicas de Toxicología, 1985).

Pruebas de Toxicidad Subcrónica.

En general, involucran la exposición diaria o frecuente al compuesto durante un lapso de hasta tres meses aproximadamente (Nociones Básicas de Toxicología 1985).

Cuando la sustancia que se investiga es un medicamento, se evalúan especialmente los efectos farmacológicos (Loomis A., 1996) .

Estas pruebas se llevan a cabo por tres motivos (Hayes A. W., 1989):

1. Descubrir efectos cuantitativos o cualitativos que pudieran haber pasado inadvertidos después de una prueba con dosis únicas.
2. Remedar los planes clínicos probables de dosis múltiples.
3. Estimar la toxicidad de las primeras dosis del fármaco para administrar al hombre.

Los estudios con dosis múltiples buscan determinar si un compuesto actúa como tóxico acumulativo, es decir se fija fuertemente a los tejidos, o si los procesos metabólicos y de eliminación lo expulsan del cuerpo en un tiempo adecuado.

Alternativamente el compuesto y sus metabolitos pueden desaparecer, pero los efectos tisulares de cada dosis adicional pueden persistir, lo que originaría un cambio de la lesión, que pasaría de reversible a irreversible (Nociones Básicas de Toxicología, 1985).

Tradicionalmente se elige a la rata y al perro para esta prueba, debido a su disponibilidad y al gran caudal de información básica.

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.

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*.

Pruebas de Toxicidad Crónica.

Son aquellas en que la sustancia a evaluar se administra a lo largo de una parte sustancial de la vida del animal de experimentación. La naturaleza exacta y la duración de los ensayos crónicos se plantean en función de la naturaleza del uso intencional de la sustancia química. En la actualidad no existe un método que se pueda aplicar universalmente a fin de establecer la duración más adecuada de los ensayos de toxicidad crónica. En el momento en que se toma en consideración una nueva sustancia química para estudios de toxicidad crónica, ya se ha obtenido información con respecto a la naturaleza de su toxicidad (Loomis A., 1996).

Por lo común, las pruebas se realizan con el objeto de establecer "niveles sin efecto adverso observado", que se puedan utilizar para formular las ingestas diarias aceptables (IDA) (Nociones Básicas de Toxicología, 1985, Hayes A. W., 1989).

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 (Loomis A.,1996).

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 (Nociones Básicas de Toxicología, 1985).

2.6.0. MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO

Las pruebas de funcionamiento hepático son útiles en la evaluación y el manejo de los pacientes con disfunción hepática, ya que cumplen varios objetivos (Kaplan M. M., 1993). Además una vez establecida la disfunción permiten reconocer el tipo de daño hepático, las pruebas pueden establecer la severidad de la disfunción y conocer el pronóstico de la enfermedad y a su vez permiten la evaluación de la respuesta al tratamiento y la posible evolución de la enfermedad. Estas pruebas se suelen agrupar en varias categorías generales como (Kaplan M. M., 1993):

a) Marcadores que detectan transporte de aniones orgánicos.

La bilirrubina es uno de los pigmentos biliares producto de la ruptura del grupo hemo de varias metaloproteínas; de los 250-300 mg. de la bilirrubina que se producen diariamente, entre el 70 y 80% provienen de la destrucción de los eritrocitos viejos que son eliminados, el resto de los eritrocitos prematuramente destruidos en la médula ósea o del recambio de otras hemoproteínas como el citocromo P-450, cuyo principal origen es el hígado.

Los pasos iniciales que llevan a la formación de bilirrubina se efectúan en las células retículoendoteliales del bazo e hígado; después de una oxidación y una reducción, esta se une de manera reversible y no covalente a la albúmina y de esta forma es transportada al hígado en donde es captada por el hepatocito y conjugada con una o dos moléculas de ácido glucurónico. A esta bilirrubina se le conoce como bilirrubina directa o conjugada y es transportada posteriormente al canalículo biliar y luego drenada al duodeno a través del conducto biliar y al resto del intestino delgado.

En el íleon distal y colon pierde al glucurónico y se transforma en bilirrubina indirecta, por acción de las β -glucuronidasas bacterianas; posteriormente, también por acción bacteriana es reducida y eliminada como urobilinógeno o bien en su forma oxidada (urobilina). De esta manera se elimina en las heces entre el 80 y el

90%. El restante 10 o 20% de los urobilinógenos se absorben pasivamente a través del sistema porta y son reexcretados por el hígado.

b) Marcadores que detectan daño al hepatocito.

La elevación en la actividad de una enzima dada en el suero, se considera que es el reflejo del incremento de su salida a partir de las células dañadas.

Las determinaciones se agrupan en dos categorías:

1. Enzimas cuyo incremento en suero, refleja daño generalizado del hepatocito.
2. Enzimas que al incrementarse en suero, reflejan colestasis.

1. Enzimas que detectan necrosis hepatocelular:

Se considera que las aminotransferasas o transaminasas son indicadores sensibles del daño hepático (Debroe y col. 1975, Ellis G., 1978) y permiten el reconocimiento de enfermedades agudas hepatocelulares, como la hepatitis.

Las determinaciones de las actividades enzimáticas más frecuentemente empleadas son: alanino amino transferasa o transaminasa glutámico pirúvica, y la aspartato amino transferasa ésta última llamada también transaminasa glutámico oxalacética.

Estas enzimas catalizan la transferencia de los grupos α -amino de la alanina y aspártico al ácido α -cetoglutarico, generándose los ácidos pirúvico y oxalacético, respectivamente. La AST se encuentra en hígado, corazón, músculo esquelético y en menor concentración en riñones, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos y eritrocitos; en tanto la ALT está presente en grandes concentraciones en el hígado (Boyde T. R. C. y col., 1961; Rej, 1978).

El aumento de los valores séricos de ambas enzimas se relaciona con daño o destrucción del tejido rico en aminotransferasas o bien a cambios en la permeabilidad de la membrana que permite su salida. Normalmente ambas transferasas se encuentran en suero y sus valores son menores a 30 o 40 UI/L.

2. Enzimas que detectan colestasis:

Entre estas se cuentan a la fosfatasa alcalina y a la γ -glutamil transepsitidasa.

Fosfatasa Alcalina: Estas enzimas catalizan la hidrólisis de un gran número de ésteres fosfato a pH alcalino, generando un radical orgánico y fósforo inorgánico.

Las fosfatasas alcalinas de diferentes tejidos son isoenzimas porque catalizan la misma reacción pero tienen diferentes propiedades fisicoquímicas. Las fosfatasas se encuentran en diversas partes de la economía, como osteoblastos, membrana canalicular de los hepatocitos, el borde en cepillo de las células mucosas del intestino delgado, de los túbulos proximales del riñón, la placenta y los leucocitos (Kaplan M. M., 1972).

Al parecer en huesos, se le relaciona con los procesos de calcificación, y en otros sitios, con procesos de transporte, aunque su función fisiológica es desconocida (Crofton P. M., 1982). En suero es demostrable la actividad de la fosfatasa alcalina; hay evidencia que en el adulto normal proviene de tres diferentes fuentes: hígado, hueso e intestino, las dos primeras son las más importantes (Kaplan M. M., 1972).

Su vida media es de siete días y su eliminación es independiente de la capacidad funcional del hígado; se desconocen sus sitios de eliminación.

γ -Glutamil Transepsitidasa: Esta enzima cataliza la transferencia del grupo γ -Glutamil de los péptidos γ -Glutamil, tal como el glutatión a otros péptidos y L-aminoácidos.

La enzima está presente en muchos tejidos incluidos los riñones, el páncreas, el hígado, el bazo, el corazón, el cerebro y las vesículas seminales; se considera que participa en el transporte de los aminoácidos, a través de las membranas como parte del ciclo γ -Glutamil (Meister A. y col., 1976). Algunos datos sugieren que la hidrólisis del glutatión es su papel fisiológico, más que la transepsitidación (Shaw L. M. y col., 1979).

La actividad sérica se encuentra elevada en enfermedades hepáticas, de vías biliares y de páncreas, de la misma manera como se ve alterada la fosfatasa

alcalina, leucina aminopeptidasa y 5'-nucleotidasa aunque algunos autores consideran más sensible a la γ -Glutamil transpeptidasa que a las otras (Lum G. y col., 1972).

Peroxidación lipídica:

El oxígeno desempeña un papel muy importante en las células vivas, sin embargo también se ha demostrado que puede ser una de las causas de muerte celular. Durante el metabolismo celular del oxígeno en plantas y animales superiores, la mitocondria produce constantemente una pequeña cantidad de radicales libres. Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen electrones sin aparear en sus orbitales más externos, por lo que son muy reactivos. Suelen reaccionar con proteínas y lípidos alterando las funciones membranales, como en algunas condiciones patológicas y provocar la muerte celular.

Los organismos son casi siempre capaces de atrapar a estos radicales libres, ya que han desarrollado efectivos sistemas antioxidantes, pero si son producidos en exceso, estos sistemas no son tan efectivos.

Los lípidos poliinsaturados son parte estructural de las membranas, incluidas las membranas plasmáticas del retículo endoplásmico y de la mitocondria, las alteraciones a sus propiedades estructurales tienen serias consecuencias sobre la función celular. Se ha considerado que el mayor impacto de los radicales libres es sobre los lípidos, ya que causa peroxidación en ellos, por lo que los métodos para medir el daño causado, generalmente se hacen midiendo sus productos de reacción con los lípidos.

Los radicales libre tienen gran afinidad por los enlaces covalentes ricos en electrones, tales como los de los ácidos grasos poliinsaturados, el resultado es la generación de un radical libre de los ácidos grasos poliinsaturados. Una vez formado el radical, éste tiene varias posibilidades (Muriel P., 1997):

- Pueden tomar una configuración más estable que puede dar lugar a una reacción en cascada de peroxidación lipídica.

- Unirse a otro radical libre lipídico o bien a un antioxidante (atrapador de radicales libres) y formar un complejo no reactivo, y finalmente unirse a lípidos de la membrana, provocando disminución de la fluidez membranal. A causa de la reactividad de los radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados, el proceso suele autopropagarse, por lo que el resultado final, es la ruptura de los componentes integrales celulares, lo que puede facilitar la unión adicional de otros radicales libres o bien de otros productos tóxicos.

c) Marcadores que detectan la capacidad de biosíntesis del hígado:

Glucógeno: El glucógeno tiene un papel muy importante en el hígado sobre el metabolismo de la glucosa, ya que la circulación de la vena porta le permite ser el primer órgano en recibir no sólo los nutrientes absorbidos, sino las hormonas reguladoras del intestino y páncreas.

Una de las funciones metabólicas del hígado es regular los niveles de la glucemia. Los carbohidratos se almacenan como glucógeno en hígado y músculo esquelético en una cantidad alrededor de los 345 g. De esta reserva entre 100 y 110 g se hallan en el hígado, el resto está distribuido en los músculos.

d) Marcadores que evalúan el grado de fibrosis:

La colágena es una glucoproteína que se encuentra en el parénquima hepático, la cápsula de Glisson, el tejido conjuntivo grueso, las fibras reticulares del hígado, el armazón conjuntivo del hígado, los conductos biliares y las placas de hepatocitos. En los casos de daño crónico hepático hay un incremento en la concentración de colágena (Stanley L., 1975).

4.0.0. OBJETIVO:

- Evaluar la toxicidad hepática crónica del compuesto 3,5 Dietoxicarbonil-4-{3,5-bis(1-Piperidinilmetil)-4-Hidroxifenil}2,6 Dimetil 1,4 Dihidropiridina, en rata.

- Analizar histológicamente el efecto de este compuesto dihidropiridínico en hígado, bazo, riñón, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino delgado e intestino grueso.

3.0.0. HIPÓTESIS

- En la medida en que se incrementa el tiempo de administración del compuesto ANTI AVI en ratas Wistar, este puede inducir daño funcional en el hígado ya que el compuesto se metaboliza principalmente en dicho órgano. El daño se puede demostrar mediante las pruebas de funcionalidad hepática y cortes histológicos de órganos como bazo, riñón, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino delgado e intestino grueso.

5.0.0. METODOLOGÍA

1. Se utilizaron 30 ratas Wistar (macho) de 200-250 g de peso las cuales se separaron en 3 lotes, cada lote con 10 ratas marcadas y pesadas, y la distribución se hizo al azar. Fueron alimentadas con alimento especial para roedores y se les dio de beber agua potable *ad libitum*.

┆ Lote #1 (Control): Sin fármaco (sólo se administró el vehículo agua).

┆ Lote #2 (ANTI AVI): Se les administró una dosis terapéutica de 3.1 mg/Kg del fármaco suspendido en agua. La administración fue oral y diaria mediante una sonda gástrica, por un período de seis meses.

2. Al terminarse los tratamientos los animales fueron anestesiados con éter etílico para la toma de muestra de sangre por punción cardíaca:

⊛: Con la obtención de plasma se realizaron las siguientes determinaciones enzimáticas: fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico pirúvica y gamma glutamil transpeptidasa.

⊛: Se realizó la determinación de bilirrubinas directa y total. Se obtuvo la bilirrubina indirecta mediante la diferencia entre la BT y BD.

⊛: Posteriormente se sacrificaron los animales y se tomaron cortes de los siguientes órganos: hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón, cerebro, estómago, intestino delgado y grueso.

- ✂ Los cortes se colocaron en una solución fijadora de formol, para realizar el estudio histológico, mediante la tinción de hematoxilina y eosina.
- ✂ Con el tejido hepático se cuantificaron los contenidos de glucógeno y colágena y se determinó el grado de lipoperoxidación.

5.1.0. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.1.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (Bradford M.M., 1976).

Fundamento:

Este procedimiento se basa en la observación del azul brillante de Coomassie G-250, el cual existe en dos colores rojo y azul.

La forma roja es convertida a la forma azul sobre la unión del tinte a la proteína. El complejo proteína-tinte tiene un alto coeficiente de extinción con una mayor sensibilidad en la medición de la proteína. La unión del tinte a la proteína es un proceso muy rápido (aproximadamente 2 minutos), y el complejo proteína-tinte remanente, dispersado en la solución es estable por un tiempo relativamente largo. De esta manera el procedimiento se hace muy rápido y no se requiere de un tiempo crítico para el ensayo.

Composición del Reactivo de Bradford:

- | | |
|---|--------|
| ◇ Ácido fosfórico al 85% | 100 ml |
| ◇ Alcohol Etilico al 96% | 50 ml |
| ◇ Azul de Coomassie G-250 | 100 mg |
| ◇ Agua necesaria para completar a un litro. | |

Procedimiento:

1. Se toman 100 μ l del homogenado y se llevan a 1000 μ l con agua tridestilada.
2. Se toman alícuotas del homogenado anterior y se llevan a 100 μ l con agua (20 μ l de la dilución anterior + 80 μ l de agua tridestilada).
3. El blanco se prepara con 100 μ l de agua.
4. Se añaden 2.4 ml del reactivo de Bradford.
5. Se lee la absorbancia a 595 nm.

6. Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1mg/ml) con alícuotas de 10,20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ l.

5.1.2. MÉTODO DE LA LIPOPEROXIDACIÓN

(Buege J. A. and Austin S.D., 1978).

Fundamento:

La lipoperoxidación comprende la formación y propagación de radicales lípidicos, el desprendimiento de oxígeno, un arreglo de los dobles enlaces en lípidos insaturados, y la eventual destrucción de los lípidos de la membrana, produciendo una gran variedad de productos de desecho, incluyendo, alcoholes, cetonas, aldehídos y éteres.

Reactivos:

- Tris Hcl 150 mM pH 7.4
- Ácido tricloroacético (TCA) al 15%
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15%

Procedimiento:

1. Se pesan 0.5 g de hígado.
2. Se homogenizan en 5 ml de agua.
3. Se toman 300 μ l del homogenado al 10% y se agregan 700 μ l de Tris-HCl 150 mM.
4. Se incuba a 37°C por 30 minutos.
5. Posteriormente se agregan 2 ml de TBA a 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
6. Se calienta a ebullición por 45 minutos.
7. Se centrifuga a 3000 r.p.m. por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm.

Cálculos

$$C = (A) / (E l)$$

Donde:

A=Absorbancia de la muestra.

l= Longitud de la celda (1.0 cm para el Spectronic 20-D)

E=Coeficiente de extinción del malondialdehído (MDA): $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Se hace una dilución 1:10 del homogenado y se toman 20 μl para determinar proteínas. Se expresa como nmoles de MDA / mg de proteína.

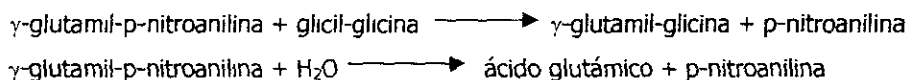
5.1.3. GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA.

(Glosmann M and D.M. Neville, 1972)

Fundamento:

La GGT cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamilo a un aminoácido o péptido (transpeptidación externa) a otra molécula de sustrato (transpeptidación interna) o al agua (hidrólisis).

La reacción es la siguiente:



Esta reacción se lee a 410 nm.

Procedimiento:

De las dos mezclas de reacción que describen los autores, se utilizó la actividad estimulada con glicil-glicina, con un volumen total de reacción de 1 ml.

En cada tubo se pone :

- 400 μl de Tris-HCl 200mM, pH 8.2.
- 100 μl de MgCl_2 200 mM.
- 100 μl de glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
- 200 μl gamma-glutamil-p-nitroanilida 10 mM

- Previa incubación por 10 minutos a 37 °C, se inicia la reacción agregando 200 µl de homogenado o suero.
- Se incuba a 37 °C por 30 minutos y se detiene la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5 M. Se lee a 410 nm.

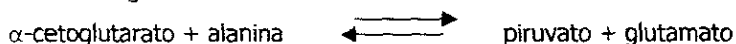
5.1.4. TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA.

(Reitman S. and Frankel S. A., 1957)

Fundamento:

La transaminación enzimática consiste en la transferencia reversible de un alfa aminoácido a un alfa-cetoácido con la síntesis de un segundo aminoácido y un segundo alfa-cetoácido.

La reacción es la siguiente:



Procedimiento:

Se rotulan los tubos blanco y problema para cada muestra.

REACTIVOS	BLANCO (ml)	PROBLEMA (ml)
1. SOLUCIÓN DE SUSTRATO	0.250	0.250
2. SUERO PROBLEMA	----	0.050
3. SE MEZCLA Y SE AGITA SUAVEMENTE, SE INCUBA A 37°C DURANTE 60 MINUTOS.		
4. SE AGREGA EL REACTIVO CROMOGENO	0.250	0.250
5. SE AGREGA EL SUERO PROBLEMA	0.050	----
6. SE INCUBA A 37°C DURANTE 15 MINUTOS		
7. SE DETIENE LA REACCIÓN CON NaOH 0.4 N	2.500	2.500
SE LEEN LOS TUBOS A 515 nm		

PREPARACIÓN DE REACTIVOS
PARA REALIZAR LA CURVA ESTÁNDAR DE TGP.

- * **Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4** : Se mezcla 840 ml de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 ml de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.
- * **Solución de sustrato** : Se disuelven 1.78 g de D/L-alanina y 300 mg de ácido alfacetoglutarico en solución buffer, se añaden 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y se completa hasta 100 ml con solución Buffer. Se conserva a 4 °C durante un mes.
- * **Reactivo Cromógeno** : Se disuelven 200 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1 N caliente y se completa hasta un litro con ácido clorhídrico 1 N, resultando así una concentración de 1mM.
- * **Solución Estándar de Piruvato** : Se disuelve 1 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE TGP

TUBO #	1	2	3	4	5	6	7
SOLUCIÓN SUSTRATO (μl)	250	225	200	145	150	125	100
SOLUCIÓN ESTÁNDAR(μl)	—	25.0	50.0	75.0	100	125	150
BUFFER FOSFATOS (μl)	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
REACTIVO CROMÓGENO (μl)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4 (ml)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
μ MOLES DE PIRUVATO	—	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150

5.1.5. FOSFATASA ALCALINA.

(Berger L., 1963).

Fundamento:

La fosfatasa transfiere un grupo fosfato de un compuesto a otro formando un alcohol y un nuevo compuesto fosfato. Cuando el aceptor del fosfato es el agua, se forma un ortofosfato inorgánico. La actividad óptima de estas enzimas se ejerce a un pH aproximadamente igual a 10.0. La fosfatasa alcalina requiere iones Mg^{2+} y Zn^{2+} para su estabilidad y actividad máxima. El sustrato incoloro es convertido a pH alcalino en el ion p-nitrofenol de color amarillo. La reacción se mide por el aumento de la absorbancia a 410 nm.

Procedimiento:

1. Se mezclan 0.25 ml de buffer de glicina 0.1 M/ $MgCl_2$ 1 mM, pH 10.5.
2. Se agrega 0.25 de sustrato de p-nitrofenilfosfato.
3. Se coloca en baño María a 37°C por 5 minutos.
4. Se añaden 50 μ l de la muestra y se mezcla suavemente.
5. Se incuba por 30 minutos a 37°C.
6. Se detiene la reacción con 5 ml de NaOH 0.02 N y se agita por inversión.
7. Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.

Nota: para el blanco se realiza el mismo procedimiento pero colocando 50 μ l de agua en lugar de la muestra. Se calibra con agua y se lee el blanco.

Preparación del sustrato: 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 ml de agua (es estable 4 semanas en congelación).

CURVA ESTÁNDAR PARA LA FOSFATASA ALCALINA

TUBO #	ml DE LA SOL.(2)	ml DE LA SOL.(3)	μMOLES 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

LOS TUBOS SE LEEN A 410 nm.

Soluciones:

- * p-nitrofenol, solución estándar de 10 μmoles (1)
- * 0.5 ml de solución (1) llevado a 100 ml con NaOH 0.02 N (2)
- * NaOH 0.02 N (3)

Nota: El blanco se hace con 5.5 ml de la solución (3) y se lee a 410 nm.

5.1.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO HEPÁTICO DE GLUCÓGENO

(Russel A. y col., 1955, Hassid W. Z. and Abraham S., 1972)

Fundamento:

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

Procedimiento:

1. Se pesan 0.5 g de hígado en tubos de ensayo grande y se adicionan 1.5 ml de KOH al 30 %, se tapan con caricas y se hierven en baño de agua durante 30 minutos.

2. Después de enfriar se pasa cuantitativamente la solución a un matraz volumétrico de 25 ml, se afora con agua y se agita muy bien.
3. Del matraz anterior se toman de 1 a 4 ml con pipeta volumétrica y se vuelve a diluir con 25 ml de agua.
4. De esta dilución se pone un ml en tubos grandes. Se prepara además un tubo blanco que contenga 1 ml de agua y otros dos con 1 ml de una solución de glucosa estándar (20 μ g/ml).
5. Se prepara una solución de antrona al 0.2 % en H₂SO₄ concentrado. Se añaden 2 ml a cada tubo con ayuda de una bureta agitando suavemente y enfriando sobre hielo.
6. Se tapan los tubos fríos con canicas y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 minutos.
7. Se enfría de inmediato sobre agua con hielo. Se lee a 620 nm.

Cálculos:

$$\mu\text{g de glucógeno en la alícuota} = (20 \times A_m) / (1.11 \times A_s)$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra.

A_s = Absorbancia del Estándar.

1.11 = Factor de extinción molar

Se expresan los resultados como gramos de glucógeno por 100 g de hígado.

5.1.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO HEPÁTICO DE COLÁGENA

(Rojkind M. and González E., 1974).

Fundamento:

Se determinó la proteína colagénica que es la hidroxiprolina, esta se forma por la hidroxilación postsíntesis de residuos de prolina que es la que forma la parte procologénica. Se realiza una serie de extracciones con tolueno para obtener el

pirrol que al ser mezclado con el reactivo de Erlich da como resultado una reacción coloreada que se lee a 560 nm.

Procedimiento:

1. Se pesa 0.1 g de hígado previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
2. Se agregan 2 ml de HCl 6N y se sellan con el mechero ó soplete, para colocarlos a 100 °C en el horno durante 24 horas.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se abre la ampolleta y se coloca el contenido nuevamente al horno a temperatura de 60-80 °C aproximadamente 24 horas o hasta que se seque.
4. La muestra ya seca se resuspende con 2 ml de solución amortiguadora (sol. 1); se agita vigorosamente en el vortex y se vacía en un tubo de ensayo, se lava la ampolleta con la adición de 1 ml de la misma solución. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15 minutos.
5. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, se centrifuga a 3000 r.p.m. por 15 minutos, y si se observa que el sobrenadante no queda claro se repite nuevamente este paso.
6. Se toman 1 ml de este sobrenadante más 1 ml de agua y 1 ml de cloramina T (Sol. 2), se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Transcurridos los 20 minutos, se adicionan 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agita inmediatamente para detener la reacción.
8. Se agregan 6 ml de tolueno y se agita 1 minuto. La fase de tolueno es utilizable para la determinación de prolina y la fase acuosa para la hidroxiprolina.

Nota: Hasta este momento la determinación de prolina e hidroxiprolina es común. De acuerdo al requerimiento se sigue la necesaria. La determinación que nos interesa es la de Hidroxiprolina.

5.1.7.1 HIDROXIPROLINA.

9. Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se cubre y se coloca en un baño hirviendo durante 20 minutos.
10. Los tubos se enfrían 15 minutos (preferentemente en refrigerador). Ya fríos se les adiciona 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
11. De la fase de tolueno se toman alícuotas de 1 ml por duplicado y se les agrega 4 ml del reactivo de Erlich.
12. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción coloreada y se lee a 560 nm.

Reactivos :

▼ **Sol. 1 :** Solución amortiguadora (Relación para un litro de buffer).

Buffer acetato de sodio - ácido cítrico, pH=6.

50 g de ácido cítrico.

120 g de acetato de sodio (3H₂O).

34 g de hidróxido de sodio.

15 ml de ácido acético glacial.

El buffer se mantiene en el refrigerador y es estable por meses.

▼ **Sol. 2 :** Solución de Cloramina T (relación para 10 ml).

0.141 g de cloramina T se mezclan con 2 ml de agua destilada, 3 ml de etilenglicol y 5 ml de solución amortiguadora. Esta solución debe prepararse en el momento de ser usada.

▼ **Sol. 3 :** Reactivo de Erlich.

A. Se toman 27.4 ml de H₂SO₄ concentrado y se agregan lentamente a 200 ml de alcohol absoluto en un vaso sobre hielo.

B. Se pesan 120 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disuelven en 200 ml de alcohol absoluto.

La mezcla ácido-etanol (A) se agrega lentamente y con agitación a la solución (B) en hielo.

La solución puede almacenarse en el refrigerador por varias semanas.

Los cristales que precipitan por el enfriamiento se disuelven calentando la solución y agitándola.

CURVA ESTÁNDAR DE HIDROXIPROLINA.

10 mg de hidroxiprolina (76.26 μmol) se llevan a un volumen de 76.26 ml, resultando una solución que tiene una concentración de 1 $\mu\text{mol/ml}$ = 1 nmol/ μl .

TUBO #	SOLUCIÓN (1 $\mu\text{mol/ml}$) μl	H₂O μl	CONTENIDO DE HIDROXIPROLINA EN nmol
1	10	1990	10
2	20	1980	20
3	50	1950	50
4	70	1930	70
5	100	1900	100
6	150	1850	150
7	200	1800	200
8	300	1700	300
9	400	1600	400
10	500	1500	500
BLANCO	----	2000	----

1. Se colocan en un tubo con rosca y tapón, se les adiciona 1 ml de Cloramina T (Sol. 2) y se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
2. Pasados los 20 minutos se detiene la reacción por la adición de 500 μ l de tiosulfato de sodio 2 M, con 1 ml de NaOH 1 N y con aproximadamente 2 g de NaCl. Se agita inmediatamente (de esto depende que se detenga la reacción).
3. Se agregan 6 ml de tolueno a cada muestra y se agita durante 1 minuto.
4. Se extrae la capa de tolueno, se desecha y el contenido acuoso se cubre con su respectivo tapón y se coloca en un baño hirviendo durante 20 minutos.
5. Se enfrían los tubos y nuevamente se les agrega 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
6. Se toma por duplicado una alícuota de 1 ml de la fase de tolueno y se mezcla con 4 ml de reactivo de Erlich y se agita vigorosamente.
7. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos para desarrollar color. Se lee en el espectrofotómetro a 560 nm.

5.1.8. DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA

(Jendrassik L., and Grof P., 1938, Schellong G. and Col., 1960).

Fundamento:

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

La bilirrubina total en suero o plasma se determina por copulación con ácido sulfanílico diazotado tras la adición de cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. Con la solución II alcalina de Felhing, 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. La bilirrubina directa se mide 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.

Material de muestra:

Suero o plasma no hemolizado.

La estabilidad de la bilirrubina en suero, protegido de la luz, es de 8 horas a temperatura entre 15°C y 25°C y de 16 horas en refrigeración a temperatura entre 2°C y 8°C.

Reactivos:

- ◆ Ácido sulfanílico ($C_6H_2NO_3S$ 29 mmol/ l).
- ◆ Solución de Nitrito de Sodio ($NaNO_2$ 29 mmol/ l).
- ◆ Acelerador (Cafeína 130 mmol/ l, Benzoato de sodio 156 mmol / l, Acetato de Sodio 460 mmol / l).
- ◆ Solución de Felhing II (Tartrato de sodio y potasio 930 mmol/ l, hidróxido de sodio 1.9 mol/ l).

Bien cerrados y a temperatura ambiente, entre 15°C y 25°C, los reactivos se conservan hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

Procedimiento :

5.1.8.1. Bilirrubina Total.

Longitud de onda = 578 nm.

Espesor de la cubeta = 1 cm.

Se prepara un blanco solamente para sueros turbios.

Se pipetea en tubos de ensayo:

REACTIVOS	PROBLEMA	BLANCO
ACIDO SULFANILICO	0.2 ml	0.2 ml
NITRITO DE SODIO	1 GOTA	-----
ACELERADOR	1.0 ml	1.0 ml
SUERO	0.2 ml	0.2 ml
SE MEZCLA Y SE DEJA REPOSAR DE 10 A 60 MINUTOS A TEMPERATURA ENTRE 15°C Y 25°C.		
SOLUCIÓN II DE FEHLING	1.0 ml	1.0 ml
SE MEZCLA Y SE MIDEN LAS EXTINCCIONES ** DE LOS PROBLEMAS DESPUÉS DE 5 A 30 MINUTOS CONTRA AGUA DESTILADA Y EN CASO NECESARIO CONTRA EL BLANCO.		

** Si las extinciones exceden 1.0, deberá diluirse el suero a 1+5 (1:6) con solución salina fisiológica y multiplicarse por 6 el resultado obtenido.

CÁLCULO: Concentración de BT= E X 180 μ mol.

5.1.8.2. Bilirrubina Directa.

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

Longitud de onda = 546 nm.

Espesor de la cubeta = 1 cm.

CÁLCULO: Concentración de BD=E X 240

Se pipetea en tubos de ensayo:

REACTIVOS	PROBLEMA	BLANCO
ACIDO SULFANILICO	0.2 ml	0.2 ml
NITRITO DE SODIO	1 GOTA	-----
SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA	2.0 ml	2.0 ml
SUERO	0.2 ml	0.2 ml
SE MEZCLA INMEDIATAMENTE, SE DEJA REPOSAR A TEMPERATURA ENTRE 15°C Y 25°C.		
A LOS 5 MINUTOS EXACTOS, TRAS LA ADICIÓN DEL SUERO, SE MIDEN LAS EXTINCCIONES DE LOS PROBLEMAS CONTRA EL BLANCO		

6.0.0. RESULTADOS

A continuación se presenta el número de ratas con las que se trabajó con su respectivo peso:

Tabla 1

RATAS CON LAS QUE SE INICIÓ LA EXPERIMENTACIÓN	
LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	PESO (g)
1	219.0
2	234.0
3	202.0
4	249.4
5	225.0
6	145.5
7	186.0
8	181.0
9	220.0
10	204.0
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	PESO (g)
1	237.0
2	231.0
3	262.4
4	263.0
5	249.5
6	227.0
7	238.0
8	210.0
9	200.0
10	281.0

NOTA: El marcado se realizó en la cola del animal.

FECHAS DE MORTALIDAD DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN

Tabla 2

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	FECHA
1	23/08/96
2	13/01/97
5	30/08/96
6	03/09/96
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	FECHA
1	02/11/96
2	13/01/97
5	20/11/96
6	01/12/96
8	16/12/96
9	03/10/97

RATAS QUE SOBREVIVIERON EN LA EXPERIMENTACIÓN.

Tabla 3

LOTE # 1 (CONTROL)		
RATA	PESO CORPORAL (g)	PESO HÍGADO (g)
3	527.31	14.15
4	468.25	16.44
7	508.31	18.90
8	502.83	15.97
9	403.48	10.45
10	472.97	15.68
LOTE # 2 (ANTI AVI)		
RATA	PESO CORPORAL (g)	PESO HÍGADO (g)
3	504.83	16.60
4	447.45	13.82
7	541.00	16.31
10	542.09	16.12

**6.1.0. VALORACIÓN BIOQUÍMICA
(MARCADORES HÉPATICOS)**

PROTEÍNAS
Tabla 4

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	CANTIDAD DE PROTEÍNA mg PROTEÍNA / g DE HÍGADO
3	7.9711
4	7.8010
7	7.8068
8	7.8924
9	7.9790
10	7.7704
ESTADÍSTICA	
MEDIA	7.87
DS	0.0909
SEM	0.0371
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	CANTIDAD DE PROTEÍNA mg PROTEÍNA / g HÍGADO
3	8.0603
4	8.0197
7	7.926
10	7.8364
ESTADÍSTICA	
MEDIA	7.96
DS	0.1001
SEM	0.05

LIPOPEROXIDACIÓN**Tabla 5**

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN nmol MDA / mg PROTEÍNA
3	0.2973
4	0.2957
7	0.2926
8	0.3057
9	0.2970
10	0.3067
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.299
DS	0.00571
SEM	0.0023

LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN nmol MDA / mg PROTEÍNA
3	0.5448
4	0.5399
7	0.5275
10	0.5190
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.533
DS	0.0117
SEM	0.0058

GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA**Tabla 6**

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	ACTIVIDAD DE GGT $\mu\text{mol} / \text{lt min}$
3	24.8169
4	24.6967
7	25.2776
8	25.586
9	24.9210
10	25.5380
ESTADÍSTICA	
MEDIA	25.1
DS	0.381
SEM	0.155
LOTE # 2 (ANTI AVE)	
RATA	ACTIVIDAD DE GGT $\mu\text{mol} / \text{lt min}$
3	25.8265
4	26.8362
7	26.5798
10	26.6759
ESTADÍSTICA	
MEDIA	26.5
DS	0.448
SEM	0.224

TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA**Tabla 7**

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	ACTIVIDAD DE TGP $\mu\text{mol} / \text{lt min}$
3	10.2022
4	10.5989
7	10.1455
8	11.1374
9	10.1172
10	9.8905
ESTADÍSTICA	
MEDIA	10.3
DS	0.45
SEM	0.184

LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	ACTIVIDAD DE TGP $\mu\text{mol} / \text{lt min}$
3	11.1374
4	11.1091
7	10.6840
10	10.4856
ESTADÍSTICA	
MEDIA	10.9
DS	0.321
SEM	0.161

FOSFATASA ALCALINA**Tabla 8**

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	ACTIVIDAD DE FA $\mu\text{mol} / \text{lt min}$
3	69.60
4	68.42
7	71.26
8	69.32
9	67.61
10	66.72
ESTADÍSTICA	
MEDIA	68.80
DS	1.60
SEM	0.654
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	ACTIVIDAD DE FA $\mu\text{mol} / \text{lt min}$
3	137.60
4	131.39
7	132.58
10	130.82
ESTADÍSTICA	
MEDIA	133.1
DS	3.09
SEM	1.545

HIDROXIPROLINA HEPÁTICA

Tabla 9

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	HIDROXIPROLINA HEPÁTICA mg HIDROXIPROLINA / g HÍGADO
3	0.3335
4	0.3220
7	0.3293
8	0.3259
9	0.3363
10	0.3267
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.3290
DS	0.00524
SEM	0.00214
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	HIDROXIPROLINA HEPÁTICA mg HIDROXIPROLINA / g HÍGADO
3	0.3431
4	0.3281
7	0.3250
10	0.3179
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.329
DS	0.01061
SEM	0.00531

GLUCÓGENO HEPÁTICO

Tabla 10

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	GLUCÓGENO HEPÁTICO g GLUCÓGENO / 100 g HÍGADO
3	2.0270
4	2.0760
7	2.1058
8	2.0664
9	1.8892
10	2.0289
ESTADÍSTICA	
MEDIA	2.0300
DS	0.0851
SEM	0.0381
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	GLUCÓGENO HEPÁTICO g GLUCÓGENO / 100 g HÍGADO
3	1.7636
4	1.8460
7	1.7082
10	1.7755
ESTADÍSTICA	
MEDIA	1.7700
DS	0.0566
SEM	0.0283

BILIRRUBINA TOTAL

Tabla 11

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	CONCENTRACION DE BT $\mu\text{mol} / \text{lt}$
3	1.242
4	1.170
7	1.332
8	1.386
9	1.404
10	1.602
ESTADÍSTICA	
MEDIA	1.360
DS	0.1495
SEM	0.061

LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	CONCENTRACION DE BT $\mu\text{mol} / \text{lt}$
3	2.196
4	2.808
7	3.006
10	4.878
ESTADÍSTICA	
MEDIA	2.910
DS	1.1566
SEM	0.5778

BILIRRUBINA DIRECTA

Tabla 12

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	CONCENTRACIÓN DE BD $\mu\text{mol} / \text{lt}$
3	0.4800
4	0.3840
7	0.5280
8	0.4080
9	0.4800
10	0.3600
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.4440
DS	0.0655
SEM	0.0267
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	CONCENTRACIÓN DE BD $\mu\text{mol} / \text{lt}$
3	0.096
4	0.192
7	0.792
10	0.888
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.4920
DS	0.4056
SEM	0.2028

BILIRRUBINA INDIRECTA

Tabla 13

LOTE # 1 (CONTROL)	
RATA	CONCENTRACIÓN DE BI $\mu\text{mol} / \text{lt}$
3	0.762
4	0.786
7	0.804
8	0.978
9	0.924
10	1.242
ESTADÍSTICA	
MEDIA	0.916
DS	0.181
SEM	0.0738
LOTE # 2 (ANTI AVI)	
RATA	CONCENTRACIÓN DE BI $\mu\text{mol} / \text{lt}$
3	2.150
4	2.616
7	2.214
10	3.990
ESTADÍSTICA	
MEDIA	2.743
DS	0.8570
SEM	0.4284

CANTIDAD DE PROTEÍNA EN HÍGADO

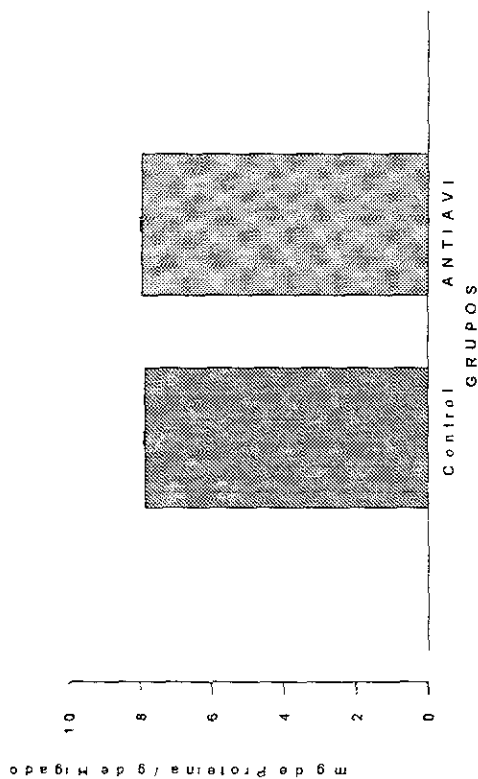


Figura No. 5. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. No hay diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

GRADO DE LIPOPEROXIDACION

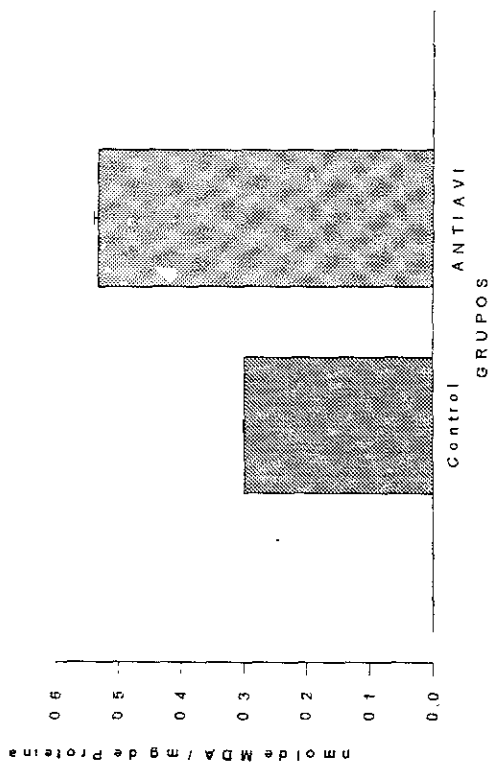
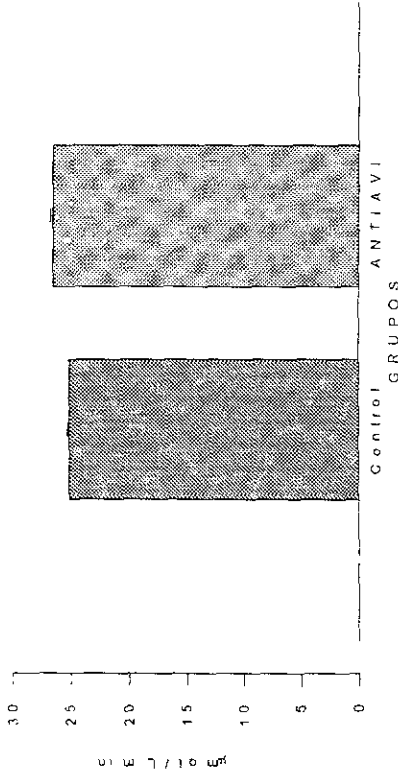


Figura No. 6. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. El grupo control muestra diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

ACTIVIDAD DE LA GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA



Gráfica No. 7. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. No hay diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

ACTIVIDAD DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA

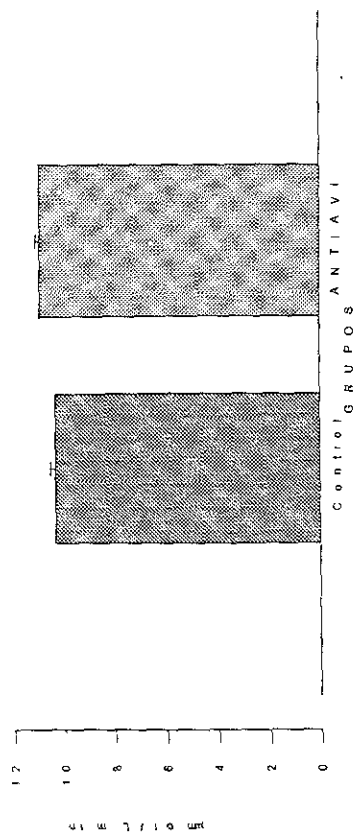


Figura No. 8. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. No se encontró diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA

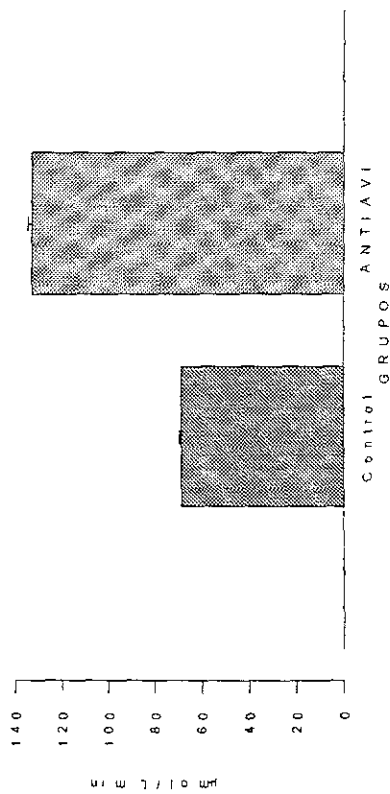


Figura No. 9. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. El grupo control muestra diferencia significativa con respecto al problema, $p < 0.05$.

GLUCÓGENO HEPÁTICO

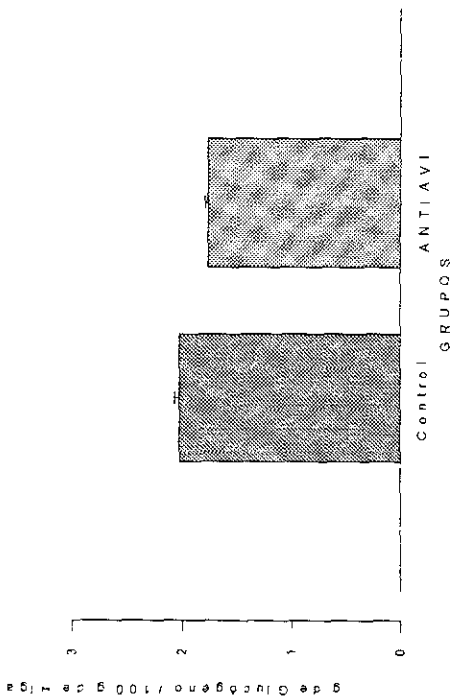


Figura No. 10. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. No hay diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

CONTENIDO DE HIDROXIPROLINA EN HÍGADO

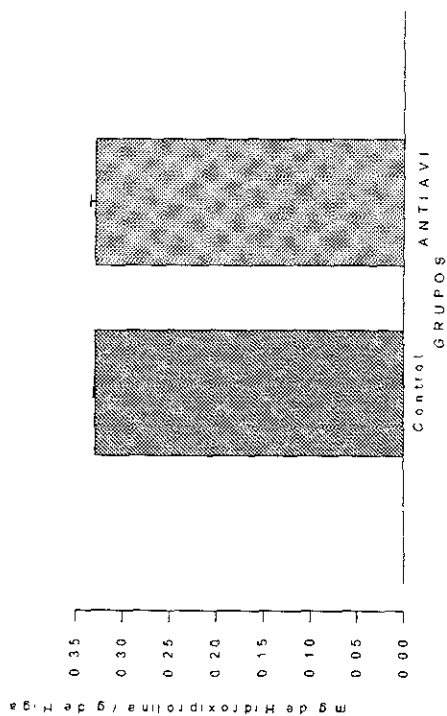


Figura No. 11. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. No hay diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

BILIRRUBINA TOTAL

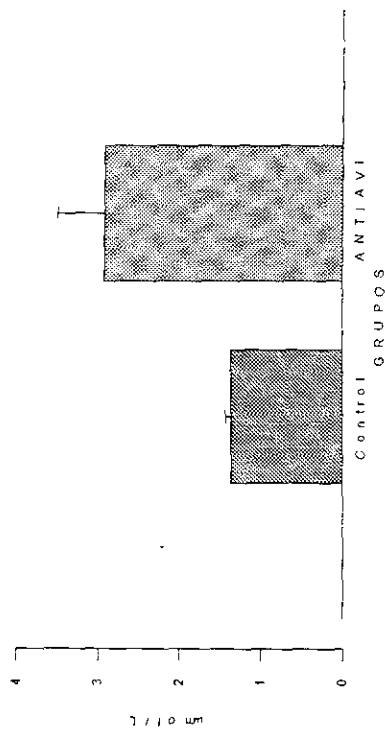


Figura No. 12. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. El grupo control muestra diferencia significativa con respecto al problema, $p < 0.05$.

BILIRRUBINA DIRECTA

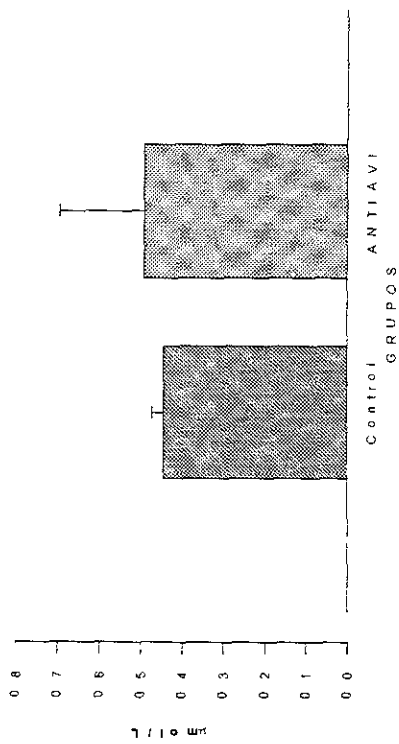


Figura No. 13. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. No hay diferencia significativa con respecto al control, $p < 0.05$.

BILIRRUBINA INDIRECTA

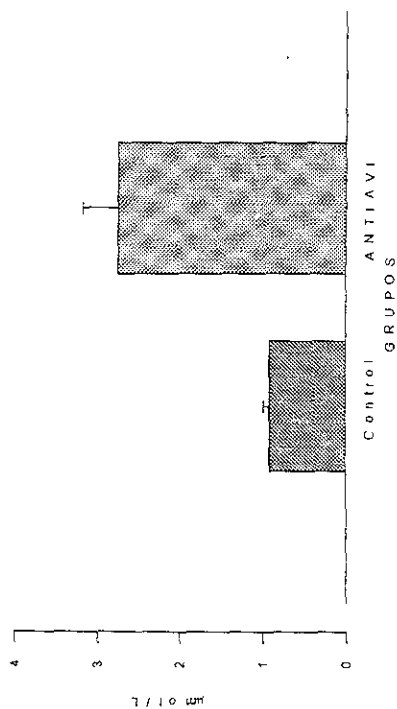


Figura No. 14. Las barras representan la media \pm SEM de seis animales para el grupo control y cuatro animales para el grupo problema. El grupo control muestra diferencia significativa con respecto al problema, $p < 0.05$.

6.1.2. VALORACIÓN HISTOLÓGICA

La valoración histológica se realizó a través de una tinción de Hematoxilina-Eosina, observando los corte histológicos de los órganos en un microscopio compuesto.

A continuación se describirán algunas características fundamentales de tejidos de animales control:

Hígado: En la figura 1A se observa la estructura de las células hepáticas es decir, de forma poliédrica, algunas mononucleadas o binucleadas con su núcleo central o excéntrico.

Cerebro: Se pueden apreciar neuronas de forma estrellada y con un núcleo central, figura 2A.

Pulmón: La figura 3A, presenta los alvéolos pulmonares de forma escamosa y plana con una gran infiltración de macrófagos.

Corazón: Como se observa en la figura 4A, encontramos a las células columnares alargadas conocidas como miocitos con un núcleo excéntrico.

Intestino grueso: Observamos células de tipo columnar con un núcleo ovoide que se encuentra en el centro o en la superficie basal de la célula, figura 5A.

Intestino Delgado: Presenta células columnares y caliciformes con un núcleo central o basal, figura 6A.

Estómago: Apreciamos células columnares con núcleo central o basal figura 7A.

Bazo: En la figura 8A, se aprecia la pulpa roja en la cual existe una mayor cantidad de eritrocitos.

Riñón: En la figura 9A se observa la zona medular y nos muestra a las nefronas con sus asas y los túbulos en sus porciones descendentes y ascendentes.

Se realizó la misma valoración histológica en los animales tratados durante los seis meses con ANTI AVI y no se encontró ningún cambio histológico aparentemente significativo en las formas celulares, ni en las características nucleares entre los animales control y los animales tratados.

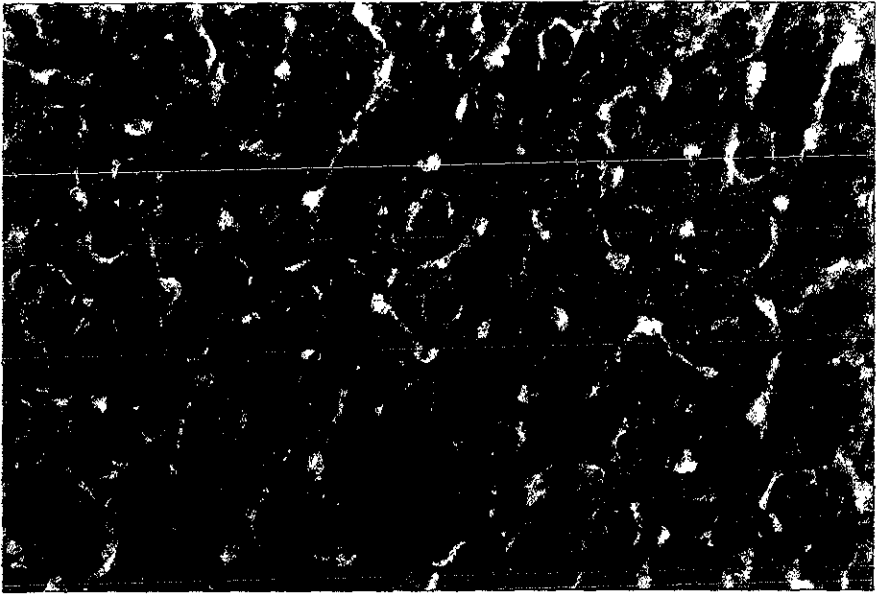


Figura 1A. Hígado control, muestra la estructura normal de las células hepáticas, con un aumento de 40X.

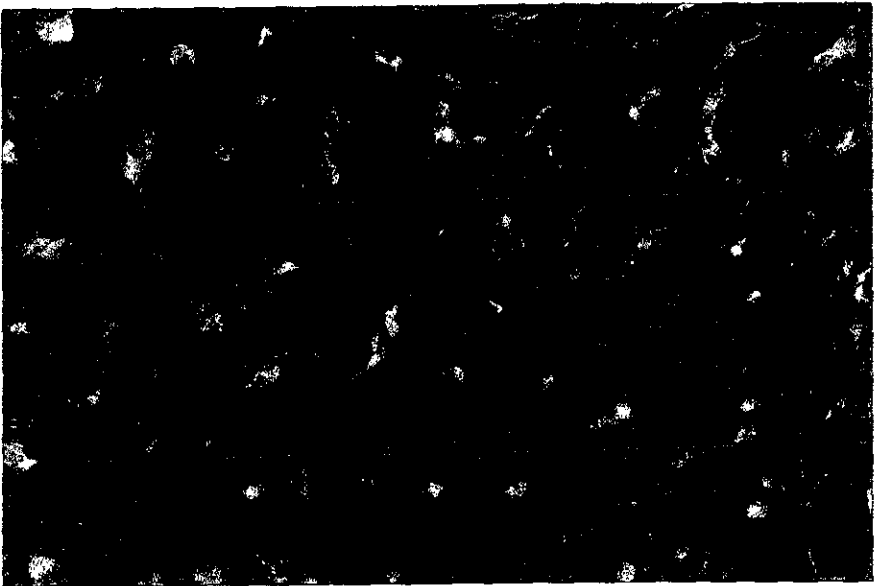


Figura 1B. Hígado tratado con ANTI AVI, muestra la estructura normal de las células hepáticas (SCHA), con un aumento de 40X.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

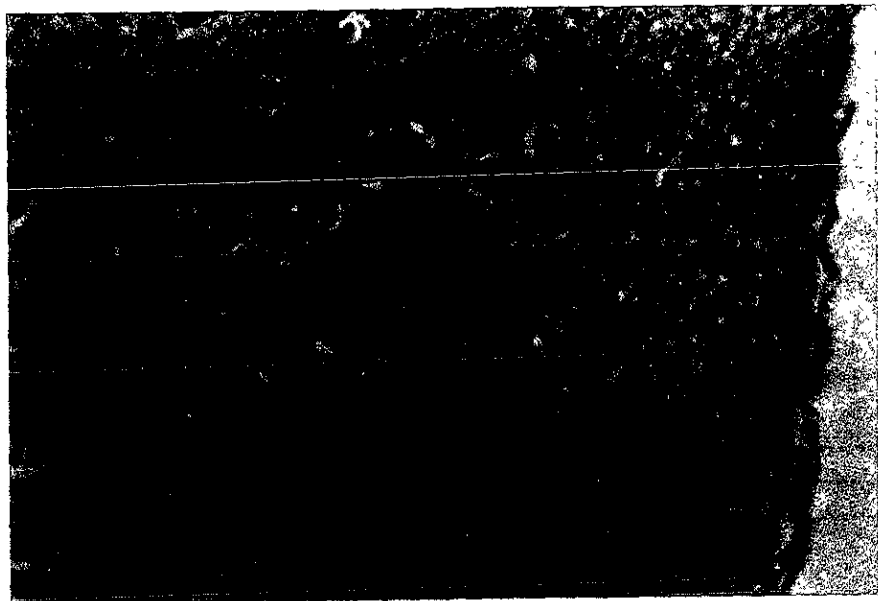


Figura 2A. Cerebro control, se aprecian las células neuronas, con aumento de 40X.

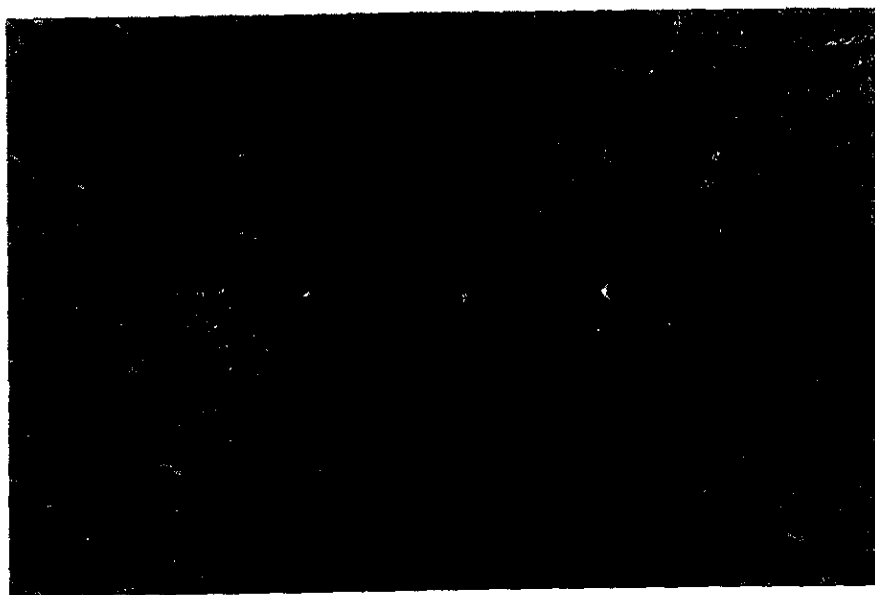


Figura 2B. Cerebro tratado con ANTI AVI, muestra la estructura normal de las células neuronas (SCH), con un aumento de 40X.

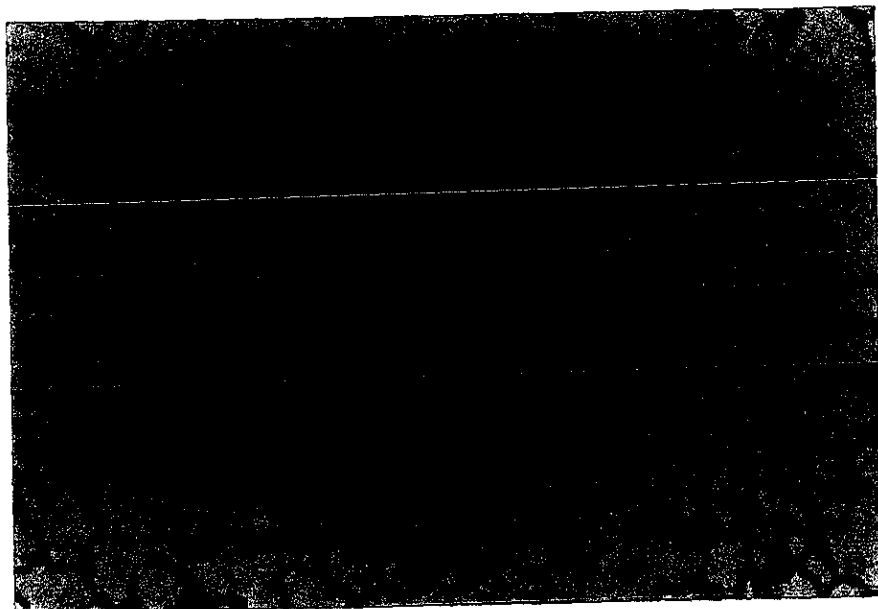


Figura 3A. Pulmón control, se observan células alveolares de tipo escamoso, con un aumento de 10X.

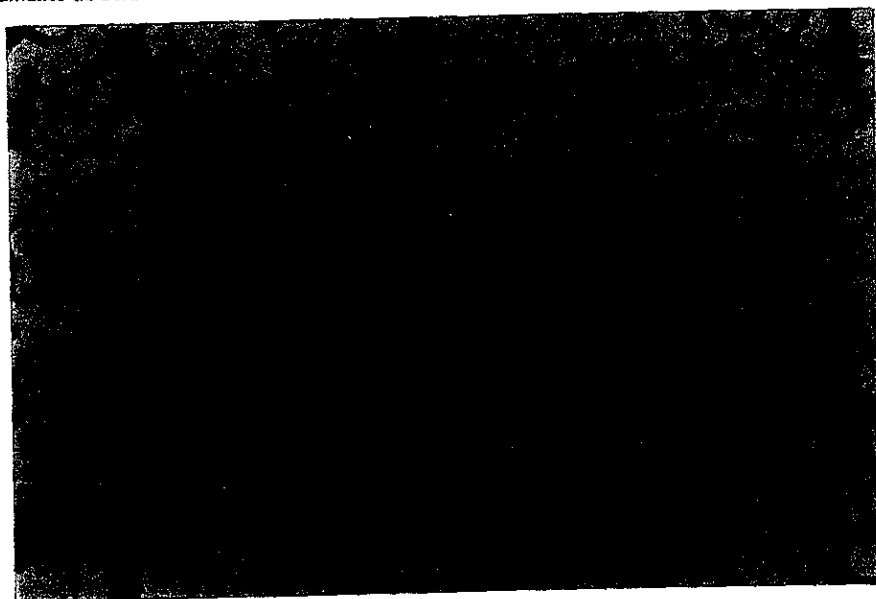


Figura 3B. Pulmón tratado con ANTI AVI, muestra la estructura normal de las células alveolares (SCHA), con un aumento de 10X.

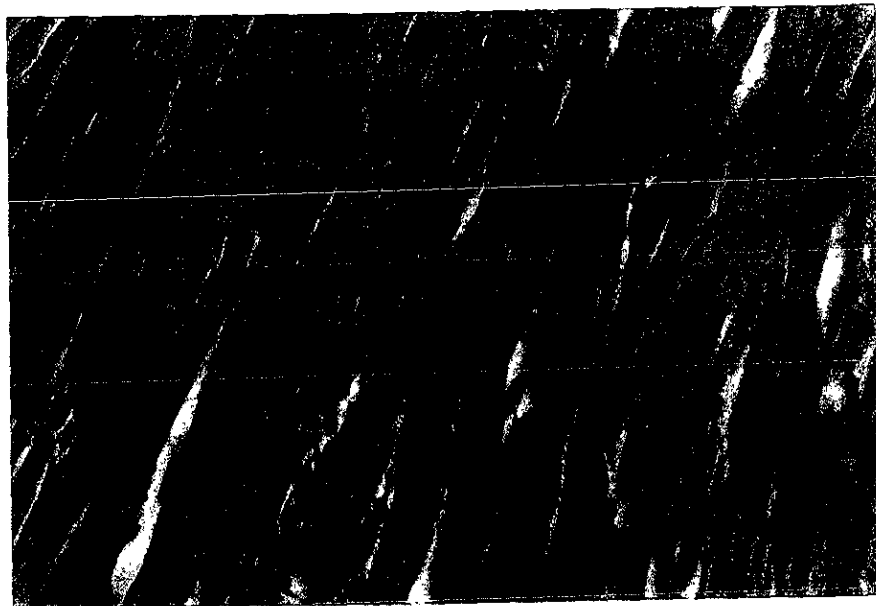


Figura 4A. Corazón control, muestra las células alargadas llamadas miocitos, con un aumento de 40X.



Figura 4B. Corazón tratado con ANTI AVI, los miocitos presentan una estructura normal (SCHA), con un aumento de 40X.



Figura 5A. Intestino grueso control, muestra células de tipo columnar y núcleo ovoide, con un aumento de 40X.



Figura 5B. Intestino grueso tratado con ANTI AVI, muestra la estructura normal de las células intestinales (SCHA), con un aumento de 40X.

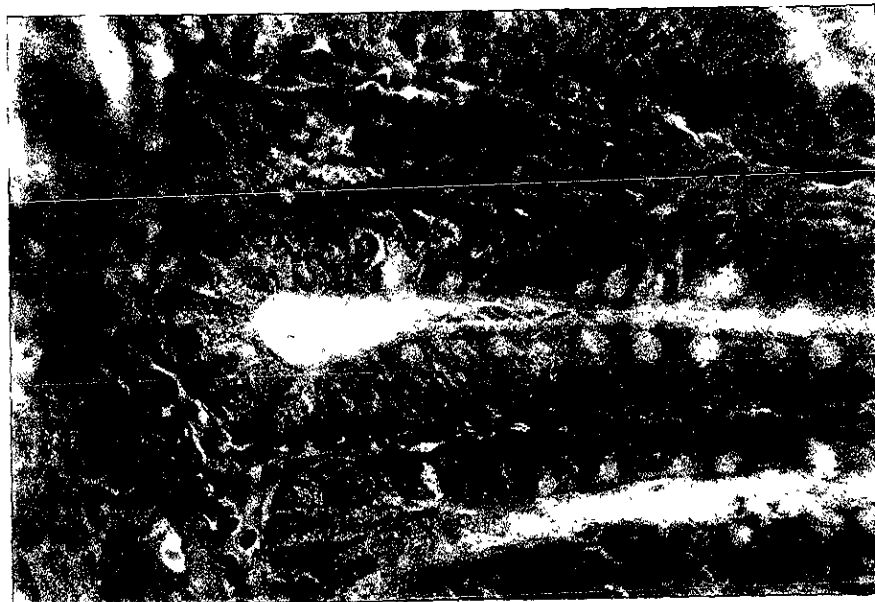


Figura 6A. Intestino delgado control, se observan células columnares y caliciformes, con un aumento de 40X.



Figura 6B. Intestino delgado tratado con ANTI AVI, las células columnares y caliciformes presentan una estructura normal (SCHA), con un aumento de 40X.

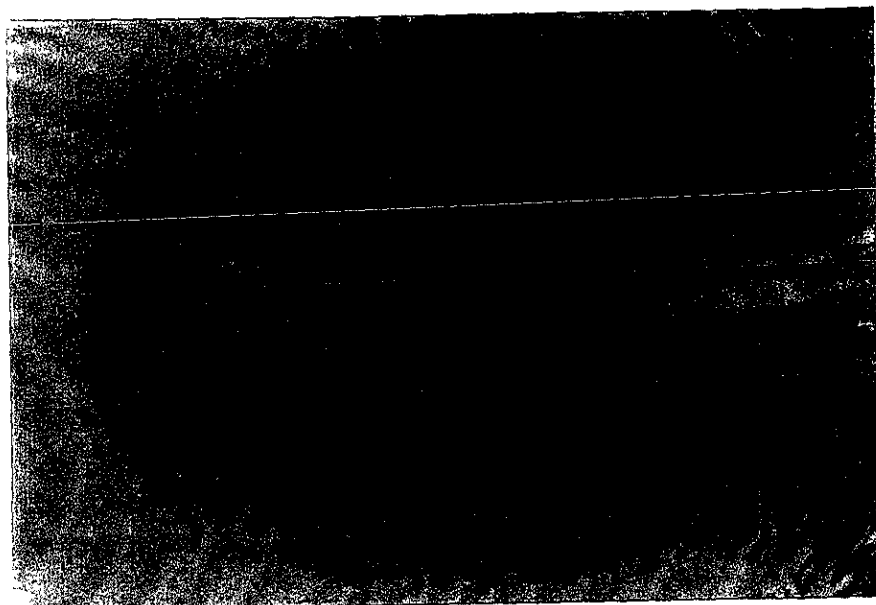


Figura 7A. Estómago control, se pueden apreciar las células columnares, con un aumento de 10X.



Figura 7B. Estómago tratado con ANTI AVI, muestra la estructura normal de las columnares (SCHA), con un aumento de 10X.

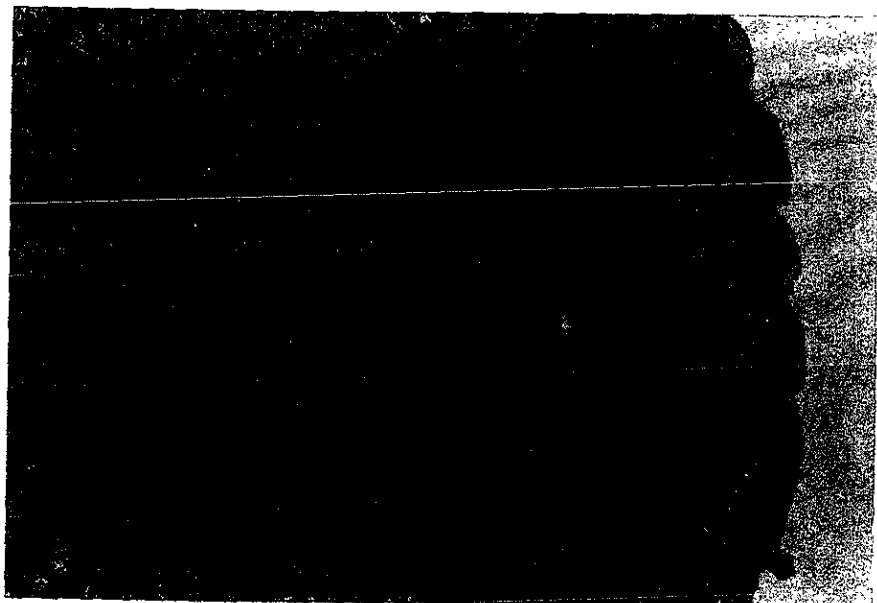


Figura 8A. Bazo control, se pueden apreciar los eritrocitos característicos de la pulpa roja, con un aumento de 10X.



Figura 8B. Bazo tratado con ANTI AVI, muestra una estructura normal (SCHA), con un aumento de 10X.

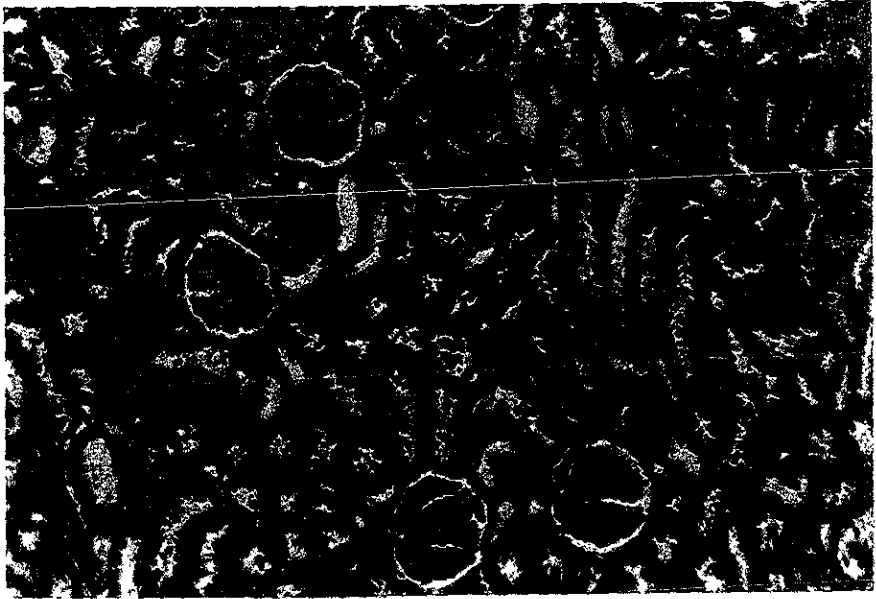


Figura 9A. Riñón control, muestra la estructura característica de las nefronas, con un aumento de 10X.

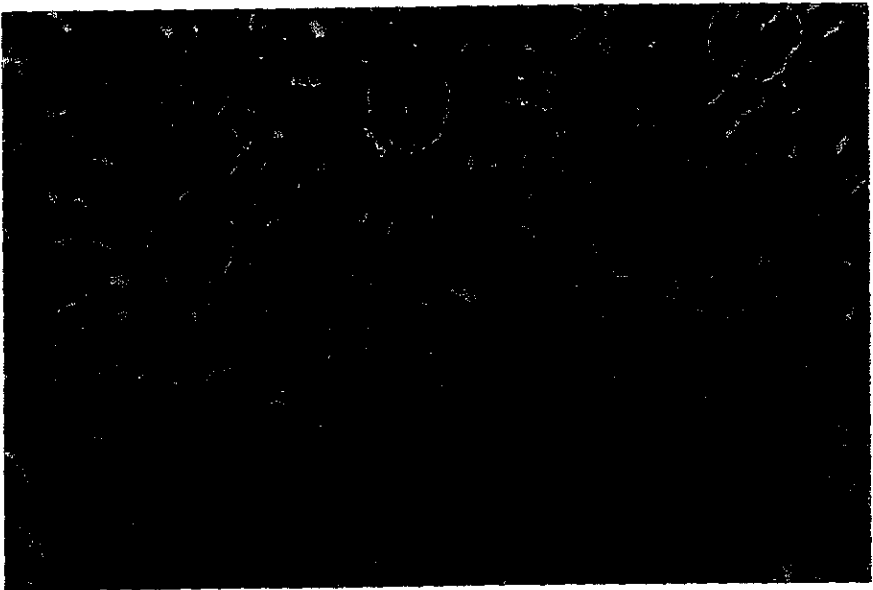


Figura 9B. Riñón tratado con ANTI AVI, muestra la estructura normal de las nefronas (SCHA), con un aumento de 40X.

7.0.0. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De las ratas problema con administración de ANTI AVI murieron el 60 %, la probable causa pudo ser debida a una mala administración del medicamento, porque al ser administrado el medicamento por vía oral, con ayuda de una sonda de metal, es probable que se haya lastimado desde la cavidad oral hasta el tracto respiratorio debido a que la administración se realizaba diariamente y la muerte se presentó en los últimos meses del tratamiento (tabla 2).

De acuerdo a los resultados observados en la valoración bioquímica, se puede decir que:

Los valores de proteínas que fueron determinados (figura # 5), tanto para las ratas control (7.87 mg de proteína / g de hígado \pm 0.09), como para ANTI AVI (7.96 mg de proteína / g de hígado \pm 0.1) no muestran estadísticamente ninguna diferencia lo cual nos indica que esta sustancia parecen no intervenir en la síntesis de proteínas que lleva a cabo el hepatocito.

La lipoperoxidación nos permite conocer el daño que hay a nivel de membrana mediante la generación de radicales libres. Los valores de esta determinación (figura # 6) para las ratas controles fueron (0.29 nmol de MDA / mg de proteína \pm 0.0057) y para el lote de ANTIA VI (0.53 nmol de MDA / mg de proteína \pm 0.01), estos resultados nos indican que estadísticamente hay diferencia significativa y por lo tanto nos proporciona información sobre la generación de radicales libres considerando que se está provocando disminución de la fluidez membranar hepatocelular. A causa de la reactividad de los radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados, el proceso suele autopropagarse, por lo que el resultado final, es la ruptura de los componentes integrales celulares. Sin embargo observando las figura 5 de las células hepáticas en la valoración histológica encontramos que la integridad celular es normal, no hay diferencia con respecto al control, tal vez el

grado de lipoperoxidación no sea lo suficientemente alto para mostrar alguna alteración a nivel celular (hepatocito).

La enzima GGT es un excelente marcador sensible de disfunción hepática, en su determinación (figura # 7) para el control se obtuvo un valor de $(25.14 \mu\text{mol} / \text{L min} \pm 0.38)$ y para ANTI AVI $(26.5 \mu\text{mol} / \text{L min} \pm 0.38)$. Se encontró que no existe diferencia significativa estadísticamente entre el grupo problema, respecto a los valores del grupo control. La actividad sérica de esta enzima se encuentra elevada en enfermedades de vías biliares, de la misma manera como se ve alterada la fosfatasa alcalina.

La enzima TGP, se encuentra en el citoplasma de las célula por lo que una elevación de la actividad de esta enzima en plasma se debe a la ruptura de la membrana plasmática o a una alteración de la permeabilidad de esta. En nuestro caso los resultados (figura # 8) del grupo control $(10.34 \mu\text{mol} / \text{L min} \pm 0.45)$ y del grupo que fue tratado con el compuesto ANTI AVI $(10.85 \mu\text{mol} / \text{L min} \pm 0.32)$, no representan diferencias y con esto podemos decir que la permeabilidad de la membrana no se encuentra alterada y obviamente tampoco sufrió ruptura alguna.

La fosfatasa alcalina presentó (figura # 9), para el grupo control el valor de $(68.8 \mu\text{mol} / \text{L min} \pm 1.6)$ y para el grupo ANTI AVI $(133.09 \mu\text{mol} / \text{L min} \pm 3.01)$. Como se observa en estos resultados los valores de los grupos problema sufren un gran incremento con respecto a los valores del grupo control, hay diferencia significativa con respecto al control. Se observa elevación de esta enzima en enfermedades hepatobiliares.

Se conocen dos tipos de mecanismos para su incremento en suero:

- 1) El daño al hígado que permite la regurgitación de la enzima al suero
- 2) En hígado dañado, particularmente en el caso de la obstrucción hepática la enzima no se puede excretar hacia la bilis.

Esto puede ser asociado con enfermedad obstructiva del hígado como la colestasis (obstrucción del conducto biliar). Existen varios factores que no son muy específicos para indicarnos el porqué de la elevación de esta enzima, después de haber realizado las determinaciones anteriores. A no ser que ciertamente se trate de una colestasis, que es una enfermedad que va acompañada del incremento de esta enzima con un mínimo daño hepatocelular.

En la cantidad de glucógeno hepático (figura # 10) se obtuvieron los siguientes resultados, para el control (2.032 g de glucógeno / 100 g de hígado \pm 0.031) y para el ANTI AVI (1.77 g de glucógeno / 100 g de hígado \pm 0.283), estos valores no mostraron diferencia significativa.

La hidroxiprolina hepática (figura # 11) de origen estructural se cuantifica con la finalidad de observar si aumentó su producción, ya que en algunas enfermedades del hígado como es la cirrosis hepática, la síntesis de esta proteína se ve incrementada. Para el grupo control los valores son de (0.33 mg de hidroxiprolina / g de hígado \pm 0.005) y para el problema ANTI AVI (0.31 mg de hidroxiprolina / g de hígado \pm 0.005). No existe diferencia significativa en los resultados. Por lo que este marcador nos indica que no existe fibrosis hepática y el ANTI AVI no produce aumento de la hidroxiprolina.

Se detectaron (figura # 12) niveles elevados de bilirrubina total. El grupo control presenta (1.356 μ mol / L \pm 0.061) y el ANTI AVI (3.22 μ mol / L \pm 0.578), en estos valores hay diferencia significativa, por lo tanto las determinaciones de bilirrubina conjugada o directa y de bilirrubina no conjugada o indirecta juegan un papel muy importante para determinar el origen de la hiperbilirrubinemia, ya que existe un gran número de mecanismos por los que puede encontrarse aumentada.

La bilirrubina presente en suero corresponde al balance entre la producción y remoción del pigmento, por lo que la hiperbilirrubinemia puede ser el resultado de:

- 1) Una sobreproducción
- 2) Alteraciones en su captación, conjugación o excreción
- 3) Regurgitación por daño en los hepatocitos o conductos biliares

Como se muestra en la figura # 13, la bilirrubina directa no mostró diferencia significativa, siendo los resultados para el grupo ANTI AVI ($0.49 \mu\text{mol} / \text{L} \pm 0.20$), y para el grupo control ($0.44 \mu\text{mol} / \text{L} \pm 0.026$).

Lo que se observa en la tabla 14 entre la bilirrubina total y la bilirrubina directa para obtener la Bilirrubina Indirecta nos da como resultado para el control ($0.91 \mu\text{mol} / \text{L} \pm 0.18$) y para el ANTI AVI ($2.74 \mu\text{mol} / \text{L} \pm 0.43$), estos resultados estadísticamente muestran diferencia, esto podría indicar que hay una sobreproducción o alteración de su captación o conjugación.

En lo que se refiere a la valoración histológica, se encontró que el ANTI AVI no causa ningún daño a nivel celular ya que se puede observar en las figuras que los órganos estudiados presentan una histología normal.

Con estas observaciones también podemos confirmar lo que se menciona anteriormente sobre la mala administración, ya que se observa que el pulmón presentó una gran infiltración de macrófagos, los cuales son células encargadas de eliminar a cualquier agente extraño o invasor. Probablemente al realizar la administración diariamente pequeñas cantidades de fármaco ANTI AVI penetraban al sistema respiratorio hasta llegar al pulmón.

8.0.0. CONCLUSIONES

En la exploración del hígado, las determinaciones de la actividad enzimática, de proteínas y otras sustancias sirven y son de gran utilidad para pronosticar el grado de toxicidad inducido por un fármaco del cual no se tiene conocimiento de su toxicidad y reacciones adversas que este agente puede causar.

De acuerdo a las normas que rige la OMS para determinar el grado de toxicidad de una sustancia no podemos clasificar en que nivel se encuentra el fármaco ANTI AVI, porque no conocemos su DL_{50} . Sólo encontramos elevación en la enzima fofatasa alcalina, bilirrubinas y lipoperoxidación al cabo de los 6 meses. Histológicamente no muestra ninguna alteración a nivel de otros órganos estudiados. El análisis realizado en hígado no muestra ningún daño en el hepatocito.

La localización celular de las enzimas estudiadas, permite dilucidar la naturaleza de la hepatopatía que es originada por el agente tóxico, en este experimento podemos asociarlo con enfermedad obstructiva del hígado como la colestasis (obstrucción del conducto biliar), ya que en esta enfermedad es característico la elevación de la enzima fosfasa alcalina, aumento del grado de lipoperoxidación y elevación de los pigmentos biliares como la bilirrubina con mínimo daño hepatocelular.

Para saber si en realidad este compuesto es causante de esta enfermedad se tendría que hacer una investigación más a fondo y con los principales marcadores enzimáticos así como también histológicos que demuestren argumentos poderosos para tener la certeza que en realidad se trata de una colestasis, ya que las pruebas bioquímicas realizadas en esta investigación, así como las histológicas no pueden darnos un diagnóstico definitivo.

9.0.0. APÉNDICE

9.0.1. PRUEBA t DE STUDENT

Los resultados obtenidos en las determinaciones bioquímicas, fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

- Se calculó la media, el SEM de la media y la DS, para el grupo control y el grupo problema (ANTIA VI).
- Se compararon las medias de los grupos (Control Vs Problema), 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. Esto se realizó con la ayuda de un programa estadístico asistido por computadora llamado *JANDEL SCIENTIFIC*, que cumple y se basa con los principios de la prueba t de Student:

DONDE:

= Animales del grupo tratado con ANTIA VI
= Media del grupo tratado
= Desviación estándar del grupo tratado

Animales del grupo tratado Control
: Media del grupo Control
: Desviación estándar del grupo Control

$$t = \frac{(X_1 - X_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{S_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$\mu_1 - \mu_2 = 0$$

10.0.0. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIENS E. J and Lehmann H. "Introducción a la Toxicología General". Ed. Diana, México, 1987.
- BERGER L. and Rudolph G.N. "Alkaline phosphatase. Standards Method of Clinical Chemistry". Vol. 5, Ed. Meites Academic Press, New York, 1963.
- BEVAN A.J. "Fundamentos de Farmacología". Ed. Harla, 2ª ed., México D.F., 1982.
- BOYDE T.R.C. and Latner R.L. "Starch gel electrophoresis of transaminase in human tissue extracts and serum". Biochem J 82:52, 1961.
- BOWMAN W. C. and Rand M.J. "Farmacología", Ed. Interamerica, 2ª ed. México D.F., 1985.
- BRADFORD M.M. "A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". Anal Biochem 72:248-254, 1976.
- BRISTOL A.J. "Cardiovascular Drugs". Ed. John Wiley & Sons. USA, 1986.
- BUEGE J. A. and Austin S.D. "Methods in enzimology" 30LII:302, 1978.
- BULLE F., Mavier P., Zafrani E.S., Preaux A.M., Lecs M.C., Siegrist S., Dhumeaux D. and Guellaen G. "Mechanism of γ -glutamyltranspeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: a histochemical, biochemical and molecular approach". Hepatology 11, 4: 545-550, 1990.
- CABRAL G.A., "Estudio de la toxicidad hepática de los compuestos 3,5 dietoxicarbonil-4-{3,5-bis(1-Piperidinil Metil)-4-Hidroxifenil}-2,6-Dimetil 1,4 Dihidropiridina y de 4-{{1-(4-Hidroxifenil)-1-metil}etil}-2,6-bis (1-Piperidinil Metil) fenol". Tesis licenciatura F.E.S.C.-UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 1987.
- CEDRIC M. and Smith, M.D. "Farmacología". Ed. Médica Panamericana; México D.F., 1993.
- CORMACK, D.H. Histología de Ham. 9ª ed. Harla, México, 1988.
- CROFTON P.M. Biochemistry of alkaline phosphatase. Gastroenterol 62:452, 1982.

- DEBROE M.E. The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis. Clin Chem Acta 59:369, 1975.
- DELLMAN, H.D. and Brown E.M. Textbook of veterinary histology. 2ª ed. Lea B. Febiger, Ed. Phillis, 1981.
- DEVOS P. and Géry H.H. "A molecular order in the synthesis and degradation of glycogen in the liver", Eur J Biochem 99:161-167, 1979.
- DIFIORI, M.S. Atlas de histología normal, Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1981.
- DOLLE k. E. "Toxicity of antihypertensives" Med. Klin 57:1648, 1962.
- ELLIS G. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. Am J Clin Pathol 70:248, 1978.
- ENGELS A. G. "Mechanish of toxicity and activity of antihypertensives" Fortscher Med 102:53, 1984.
- FLECKENSTEIN A. History of calcium antagonist. Circ Res 52 (Suppl. I): 3-16, 1983.
- FREEMAN D.D. and Waters D.D; Second generation dihydropyridine calcium antagonists. Greater vascular selectivity and some unique applications. Drugs 34: 578-98, 1987.
- GLAXO F., Farmacovigilancia, una responsabilidad compartida. Ed. Rdt. Churchill Livingstone, España, 1992.
- GLOSMANN M. and D. M. Neville. "Gamma-glutamyl transferase in kidney brush border membranes"; FEBS Lett 19 (4): 340-344, 1972.
- GODFRAIND T. Classification of calcium antagonists. Am J Cardiol 59: 11B-23B, 1987.
- GOODMAN, Gilman H. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". Ed. Médica Panamericana; 7ª ed., México D.F., 1986.
- GOTH A. "Farmacología Médica". Ed. Interamericana, 8ª ed, México D.F., 1977.
- GUARINO R. A. New drug approval process. Vol.56, Drugs and the pharmaceutical Sciences, 2ª ed. USA, 1980.

- GUENGERICH F.P. and Brian W.R. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blocker and analogues by human liver cytochrome P-450. Am J Med Chem 22:74-80, 1991.
- HASSID W. Z. and Abraham S. "Chemical Procedures for Analysis of Polysaccharides". Methods of Enzymology 3:34-50, 1957.
- HERNÁNDEZ Gallegos Z. "Síntesis, actividad antihipertensiva y susceptibilidad a oxidación microsomal de nuevos 1-4-DHP's (Bloqueadores de la entrada de calcio) y el análisis de sus relaciones estructura actividad". Tesis doctoral (Farmacología), CINVESTAV I.P.N., México D.F., 1994, pp 1-15.
- HODGSON E. and Levi P. E. "A textbook of modern toxicology". Ed. Elsevier Science Publishing. New York USA, 1987, pp 168-172.
- JAUGE P. "Nociones básicas de toxicología". Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, 1985.
- JENDRASSIK L. and Gróf. P. "Determination of bilirubins" Biochem Z 297:81, 1938.
- KAPLAN M.M. "Alkaline phosphatase". Gastroenterology 62:452, 1972.
- KAPLAN M.M. "Laboratory tests Diseases of the liver". Eds. Schiff L.Schiff and Lippincott ER. 7ª ed. Philadelphia, 1993, p, 108.
- KONZ W.S. "Toxicity of antiarrhythmics", Dtsch Med Wochenschr; 109:1525. 1984.
- KRAHENBUHL S., Talos C., Fisher S. and Reiche J. "Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria". Hepatology 19:471, 1991.
- LARRY M. C., "Laboratory evaluation of liver disease in small animals- part 1". small animal 461-465, 1985.
- LEONARD T.B., Neptun D.A. and Popp J.A. "Serum gamma glutamyl transferase as a specific indicator of bile duct lesions in the rat liver". AJP 116(2):262-269, 1984.
- LINCH J. M. "Métodos de laboratorio". Ed. Interamericana, 2ª ed., México D.F., 1989.

- LITTER M. "Compendio de farmacología". Ed. El Ateneo; 7ª ed. Argentina, 1986, p 776.
- LOEBL S. "Manual de farmacología", Ed. Limusa, México 1982, p 85.
- LOOMIS A.T. and Hayes W. "Essentials of toxicology". Academic Press; USA. 1996.
- LUM G. and Gambino S.R. "Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone". Clin Chem 18:358, 1972.
- MEISTER A. and Tate S.S. "Glutathione and related γ -glutamyl compounds biosynthesis and utilization". Annu Rev Biochem 45:559, 1976.
- MEYER D.S. Modern drugs research, Vol. 12, Marcel Dekker, Inc. New York USA, pp 355-399, 1989.
- MIYAI J. "Antiarrhythmic activity of amiodarone" Exp Mol Pathol 36:333, 1982.
- MORAD M., Naylor W., Kazda S. and Schramm M. "Drugs", Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- Muriel P. "Peroxidation of lipids and liver damage, antioxidants oxidants and free radicals". Eds. Baskin S.I. and Salem H. Taylor & Francis, 1997.
- MURRAY K.R., Mayes A.P. and Granner K.D. "Bioquímica de Harper"; Ed. El Manual Moderno, 13ª ed., México D.F., 1994.
- NARANJO P., "Manual de farmacognosología", Ed. La Prensa Mexicana, México, 1968.
- NELSON E., James B., Taylor L. and Addison A. "Antihypertensive activity of isradipine in humans: A new dihydropyridine calcium channels antagonist. Clin Pharmacol Ther 40:694-697, 1986.
- NISHIHATA T., Ikawa C., Saitoh Y. and Sakai K. "Glycogenolysis in the rat isolated perfused liver as a measure of chemically induced liver toxicity". J Pharm Pharmacol 40:333-336, 1988.
- OGAWA N., Mizuno K., Fukushima K., Suwa T. and Satoh T. "Metabolic fate of a new dihydropyridine calcium antagonist, C.D-349 in rat and dog". Xenobiotica 23(7):747-759, 1993.

- PARDELL H, "Antihypertensive strategies: A current and prospective review". Am J Cardiol 65:2H-5H, 1990.
- PEDRAZA D.A. "Determinación del efecto hipotensor de 12 compuestos 1,4-Dihidropiridínicos utilizando el modelo de presión arterial directa en rata anestesiada". Tesis licenciatura F.E.S.C.-UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 1995.
- PELTA F.R. "Reacciones adversas medicamentosas". Valoración clínica, Ed. Díaz de Santos, S.A. España, 1992.
- PESCE J. and Lawrence A. "Química Clínica". Ed. Médica Panamericana, Argentina 1991.
- PETRIDES A.S., Groop L.C., Riely C.A. and Defronza R.A. "Effect of physiologic hyperinsulinemia on glucose and lipid metabolism in cirrhosis". J Clin Invest 88:561, 1991.
- PLAA L.G. and Hewitt R. W. "Principles and methods of toxicology, detection and evaluation of chemical induced liver injury". Ed. Wallace Hayes New York, 1982.
- POLEY J. R. "Practical approaches to assessing liver function". Pediatric Annals 14(6):423-430, 1985.
- RAYMOND G.D. and Galambos J.T. "Hepatic storage and excretion of bilirubins in man". Am J Gastroenterol 55:135, 1971.
- RANG H. P., Dale M.M., J.M. Ritter, P. Gardner and Col., Pharmacology, Churchill Livingstone Inc. USA, 1995, pp 286-291.
- REGARDH C.G., and Barnhielm G. "Biotransformation of 1,4-dihidropiridina calcium antagonists". Prog Drug Metab 12:41-86, 1990.
- REITMAN S. and Frankl S.A., "A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases". Am J Clin Pathol 28:56-63, 1957.
- REMINGTON J.E. "Farmacía", Tomo II, Ed. Médica Panamericana, 17ª ed., Argentina, 1990.
- REPETTO M. "Toxicología fundamental", Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1981.

- ROJKIND M. and González E. "An improved methods for determination special radioactivities of proline and hidroxyproline". Anal Biochemistry 57:1-7, 1974.
- RUSSELL A. J. and Bloom L. W. "Extractable and residual glycogen in tissues of the rat". AJP 183(3):345-355, 1955.
- SHAW L.M. and Neuman D.A. "Hydrolysis of glutathione by human γ -glutamyl transferase". Clin Chem 27:75, 1979.
- SALERNO S.M. and Zugibe F.T. "Calcium channel antagonists, What do the second generation agent have to offer?", Posgraduate Medicine, 95 (1):181-90, 1994.
- SANFORD T. "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio". Ed. Salvat; 2ª ed., México, 1990.
- SCHELLONG G. and Wende U. "Test of bile acids" Arch K inderheilk 162:126, 1960.
- SCHUFF W.G. "Damage hepatic for antiarrhythmics" Internist Prax 22:475, 1982.
- SPADONI Manlio, "Peligros de los medicamentos", Ed.Continental,España, 1978.
- STRICKER B.H.CH. and Spoelstra P., "Drug – induced hepatic injury". Vol. 1, Ed. Elseiver Science Publishers. Amsterdam, 1985, p. 128.
- SULAKHE J. S.; "The activity of γ -glutamyltranspeptidase in regeneration rat liver"; FEBS Letter 204(2):302-306, 1986.
- TARAMURA T., Tokunaga T., Matsumoto H., Watanabe T. and Higuchi S. "Metabolism of barnidipine hydrochloride, a potent calcium antagonist, in rat and dog". Xenobiotica 26(2):177-87, 1996.
- TOSHIRO N., Yoji T.K., Kikuro H. and Noguchi H. "Stereoselective oxidation of Nilvadipine, a new dihidropyridine calcium antagonists, in rat and dog liver". Drug Metab Dispos 17(1):64-67, 1989.
- VANHOUTTE P.M. and Paoletti R. "The who classification of calcium antagonist". Trends in Pharmacol Sci 8:4-5, 1987.
- WOODMAN D.D. "Assessment of hepatic funtion and damage in animal species". J App Toxicol 8(4): 249-254, 1989.