



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*Determinación de la DE50, DL50 y el margen de seguridad del
2,2,2- Tribromoetanol en conejos de la cepa Nueva Zelanda
(Oryctolagus cuniculi)*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA LETICIA RUIZ ASCENCIO



MÉXICO, D.F JUNIO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ANA MARÍA VÁZQUEZ ALVAREZ**

VOCAL: **Profesor: ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ**

SECRETARIO: **Profesor: RUTH BUSTAMANTE GARCÍA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MARTHA LETICIA JIMENEZ PARDO**

2° SUPLENTE: **Profesor: ENRIQUE MORENO SAENZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

BIOTERIO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA; 5° PISO, EDIFICIO “A” FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM

ASESOR DEL TEMA

M. en C Ruth Bustamante García

SUSTENTANTE:

Diana Leticia Ruiz Ascencio

Agradecimientos

Gracias Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mí camino a todas las personas que han sido soporte y compañía durante todo mi periodo de estudio.

A mis Padres

Por darme la vida, un hogar y la oportunidad de estudiar, por sus consejos y el apoyo incondicional y por todo su amor.

A mi Mamá Lety,

Gracias por enseñarme que la vida se emprende con pasión, seguridad y determinación, por haberme educado y apoyado en todo momento, gracias por tus consejos, y el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar el sabio don de la responsabilidad. Por tu ejemplo de valor para salir adelante

¡Por ser mi amiga!

¡Gracias por darme la vida!

¡Eres la mejor mamá que la vida me regalo!

A mi Papá el Doc Ruiz

Papá eres la persona que más admiro. Gracias por tu inteligencia y sabiduría, por tu ejemplo de perseverancia y constancia que te caracterizan y que me has infundado siempre, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, te agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me has brindado para culminar mi carrera profesional.

¡Te quiero mucho!

A mi hermano Dany

Que siempre me has cuidado desde chica, y has sido además de mi hermano un amigo de juegos y ahora de fiestas. Y sobre todo porque siempre me haces reír! ¡Hermanito te quiero mucho!

A mi Familia

A mi tía virgen que ha mantenido la familia unida con esos jueves de deliciosas comidas, y por todas esas risas que son inevitables al platicar contigo, a mi primo Alan que no desaprovecha ninguna oportunidad para molestarme con mis pumas, ahora entiendes por que mi amor por la UNAM! Te quiero mucho primo! A mi primo Isaaquito que siempre tienes cada ocurrencia para hacerme reír, gracias primos por cuidarme de chica.

A dos personas muy especiales que ya no están conmigo, mi tia Caro y mi abuelita Adelina, que me vieron crecer se que desde donde estén aun me cuidan y están conmigo.

A mi mejor amiga

Gabyluuu!! Amiga gracias por todas las experiencias juntas, los viajes, las fiestas, las clases, por reír y llorar conmigo, y por la gran confianza que nos tenemos. Gracias a la universidad nos conocimos desde primer semestre y sé que nuestra amistad continuara por muuuucho tiempo TQM!!

A mis amigos

Alejandro Yeo, mi angelito, que me cuidas desde otro lugar, tengo tantas cosas que agradecerte, gracias por todo el tiempo a tu lado, por todo tu amor, porque siempre estuviste ahí cuando te necesite y me apoyaste en la carrera. Siempre estarás en mi corazón!! Y aunque ya no estés aquí te dedico este logro porque se serias el primero en decirme: Bien hijaa!!

Qbert, Amigo que te puedo decir tantos recuerdos juntos, sabes que te quiero mucho!! Gracias por estar en los momentos más difíciles!! Y estar a mi lado cuando te he necesitado Ya sabes que eres nuestro hermano!! Y siempre seremos los 4 fantásticos Dany, Ale, tu y yo!!

A la banda de Química

A mis amigos de la facultad, Rafa, Paco, Meduz, Chaman, Triana, Pedrito, Gabyluu, Verito, Liliana a todos ustedes por los años juntos, las anécdotas, las fiestas, por ser

compañeros de clases, por todo el tiempo a lado de ustedes en esta hermosa facultad!! Siempre los tendré presentes los quiero!!

A mi asesora Ruth Bustamante

Muchas gracias por su tiempo, dedicación y entusiasmo por guiarme para realizar mi tesis, por todos sus conocimientos, orientaciones, su paciencia y motivación. Por su gran calidad humana, amistad y confianza. Ya sabe que para mí es una de las mejores profesoras de esta facultad.

A mi jurado

Doc Atona muchas gracias por darme la oportunidad de pertenecer al bioterio, por todo su apoyo y estímulo que me dio para seguir adelante, por la exigencia para dar lo mejor de mí, los regaños, los consejos tanto académicos como personales y sobre todo por contagiar su alegría!

Profesora Ana María, gracias por su apoyo en la revisión de mi tesis así como indicarme las correcciones necesarias para poder imprimirla.

A mis amigos del bioterio

Wendy gracias por ayudarme a agarrar a los conejitos, y por las largas charlas acompañadas de el cafecito mañanero, Memo gracias por ayudarme a canalizar a los conejos y por hacerme reír con tus ocurrencias. Pao amiga quien iba a pensar que en el bioterio nos íbamos a conocer y llevar de lujo, nunca olvidare ese divertido congreso en Veracruz, gracias por tu amistad. Don Lázaro gracias por sus pláticas y por sus detalles le tengo una gran estima. Sin dudarle son un gran equipo, nunca olvidare lo bien que la pase en el bioterio los quiero!

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la facultad de

Química

Gracias por brindarme conocimientos, experiencias, y grandes amigos, por ser mi segunda casa. Siempre seguiré siendo alumna de esta facultad, porque gran parte de mi vida ha quedado plasmada dentro de cada aula, laboratorio y rincones de esta facultad.

“Por mi Raza Hablara el Espíritu”

ÍNDICE

	Página
CONTENIDO	
Lista de Abreviaturas.....	8
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tablas.....	11
Capítulo I	
1. INTRODUCCION.....	12
Capítulo II	
2. ANTECEDENTES	13
2.1 La ciencia del animal de laboratorio.....	13
2.1.1 La anestesia en animales del laboratorio.....	14
2.1.2 Definición de anestesia.....	15
2.1.3 Historia de la anestesia veterinaria.....	15
2.2 Tipos de anestesia.....	16
2.2.1. Etapas de la anestesia.....	17
2.2.2. Seguridad de la anestesia General.....	18
2.2.3. Características del anestésico ideal.....	19
2.3 Tribromoetanol.....	21
2.3.1 Propiedades Fisicoquímicas.....	22
2.3.2 Propiedades Farmacológicas.....	23
2.4 Conejos Nueva Zelanda.....	24
2.4.1 Características Generales.....	24
2.4.1.1 Características Biológicas y Fisiológicas.....	27
2.5 Curva Dosis- Respuesta Cuantal.....	28

ÍNDICE

	Página
Capítulo III	
3. OBJETIVO.....	33
Capítulo IV	
4. HIPÓTESIS.....	34
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
5.1 Material.....	35
5.2 Procedimiento experimental.....	36
5.3 Diagrama de Flujo.....	39
Capítulo VI	
6. RESULTADOS.....	40
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIONES.....	49
Capitulo IX	
9. BIBLIOGRAFÍA.....	50
Capitulo X	
10. ANEXOS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ANADEVA	Análisis de varianza
Br	Bromo
Br ₂ CHCHO	Dibromo acetaldehído
CDRC	Curva Dosis Respuesta Cuantal
D.S	Desviación estándar
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DL ₅₀	Dosis letal 50
DT ₅₀	Dosis Toxica 50
E.S	Error estándar
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FLUKA	Fluktuieren de Kaskade (Marca comercial)
g	Gramos
GABA	Acido amino butírico
GABA _A	Receptor del ácido gama amino butírico tipo A
H	Hipnosis
HBr	Acido bromhídrico
IT	Índice Terapéutico
M	Muerte
i/m	Intramuscular
i/p	Intaperitoneal
i/v	Intravenosa

LISTA DE ABREVIATURAS

s/c	Subcutánea
mg/Kg	Miligramos por kilogramo
mL	Mililitros
min	Minutos
MS	Margen de Seguridad
n.s	No existen diferencias significativas
Probit o US	Unidades de probabilidad
U.P.S	Unidades probits de Sedación
U.P.H	Unidades probits de Hipnosis
U.P.M	Unidades probits de Muerte
SNC	Sistema Nervioso Central
SPF	Animales libres de patógenos específicos
TBE	Tribromoetanol
LS	Latencia de Sedación
LH	Latencia de Hipnosis
TR	Tiempo de recuperación

LISTA DE FIGURAS

Número de figura	Página
Figura 1. Estructura química del 2, 2,2-tribromoetanol.....	22
Figura 2. Presentación comercial del 2, 2,2 –tribromoetanol, frasco ámbar para evitar su descomposición.....	23
Figura 3. Conejo Nueva Zelanda <i>Oryctolagus cuniculus</i>	25
Figura 4. Forma correcta de sujeción del conejo.....	26
Figura 5. Curva de distribución de frecuencia.....	29
Figura 6. Transformación de curva sigmoidea de dosis respuesta cuantal (izquierda) en una recta (derecha) mediante la sustitución del porcentaje de respuestas por su probit correspondiente.....	31
Figura 7. Curva dosis- respuesta cuantal, se muestra el cálculo del índice terapéutico, dado por las proporciones entre DL50 y DE50.....	32
Figura 8. Vía de administración intravenosa, introducción de la aguja calibre 27 en la vena marginal de la oreja del conejo.....	38
Figura 9. Latencia de sedación e hipnosis vs dosis de 2,2,2- tribromoetanol, cada barra representa el promedio de latencia (min) \pm E.S * $p < 0.001$	41
Figura 10. Curva Dosis - Respuesta cuantal. U. P. vs log del 2,2,2 – tribromoetanol. Determinación del parámetro DE ₅₀ , DL ₅₀ , DE ₉₉ , DL ₁	43
Figura 11. Curva Dosis sostén para la inducción de la hipnosis. Cada punto representa el tiempo promedio de latencia de hipnosis \pm E.S. N = 6, n.s.....	46

LISTA DE TABLAS

Número de Tabla	Página
Tabla 1. Anestésicos más utilizados en conejos.....	21
Tabla 2. Dosis reportadas de tribromoetanol en diferentes especies.....	23
Tabla 3. Requerimientos nutricionales del conejo como animal de laboratorio.....	27
Tabla 4. Características Biológicas del conejo.....	27
Tabla 5. Enfermedades más comunes del conejo.....	28
Tabla 6. Condiciones de mantenimiento de conejos Nueva Zelanda (<i>Oryctolagus - cuniculi</i>).....	35
Tabla 7. Numeración de conejos de acuerdo al grupo de Dosis.....	37
Tabla 8. Promedio de las latencias de sedación e hipnosis expresadas en minutos.....	40
Tabla 9. Unidades de probabilidad de sedación e hipnosis vs dosis (mg/Kg) TBE donde U.P.H = unidades probit de hipnosis, U.P.M = unidades probit de muerte.....	42
Tabla 10. Resultados obtenidos tras la administración de TBE, a diferentes dosis para determinar la dosis sostén, y obtener una anestesia quirúrgica aproximadamente de 30 min.....	44
Tabla 11. Resultados obtenidos tras la administración continua de TBE con un proceso acelerado de goteo a través de un catéter colocado en la vena marginal del conejo, para probar la dosis sostén de 150 mg/Kg.....	45

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

El uso de anestésicos en el área experimental biomédica es de suma importancia debido a que puede ocasionar efectos adversos sobre la calidad de resultados que se están evaluando durante el transcurso de cualquier proyecto de investigación con animales. El auge de la investigación en especies de laboratorio a permitido un incremento del interés por el desarrollo de técnicas y pautas anestésicas que pongan al animal en un estado benéfico para él, esto es utilizando un anestésico adecuado que asegure el mantenimiento y la supervivencia del animal, en condiciones de anestesia, analgesia, y relajación muscular. Es de gran importancia tomar en cuenta las consideraciones éticas, ya que un animal con dolor o estrés puede alterar la calidad de los resultados de una investigación. La anestesiología experimental es una condición inexcusable para el desarrollo científico en materias biomédicas y para el desarrollo de modelos quirúrgicos experimentales. El 2, 2, 2,- Tribromoetanol es un anestésico inyectable, apropiado para procedimientos en animales de laboratorio (ratas, ratones, cuyo y hámster), debido a que induce una rápida anestesia con efectos adversos y secundarios mínimos, por lo que en el presente trabajo se busca escalar el uso del 2, 2, 2 -Tribromoetanol en la especie de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculi*). En México no se utilizan fármacos anestésicos específicos para conejos. Los resultados obtenidos muestran que el 2, 2, 2, - Tribromoetanol (TBE) es un anestésico que puede ser utilizado en conejos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculi*) ya que se tiene un efecto anestésico con una recuperación del 99.9% de los animales evaluados.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 LA CIENCIA DEL ANIMAL DEL LABORATORIO

Es una rama multidisciplinar que contribuye al empleo humanitario de los animales en la investigación biomédica y a la obtención de datos reproducibles imparciales e informativos. Incluye el estudio de la biología de los animales de laboratorio, su manejo y requerimientos ambientales, los procedimientos de estandarización microbiológica y genética, la prevención y tratamiento de enfermedades, la optimización de técnicas experimentales y el avance de la anestesia, analgesia y eutanasia. Los aspectos éticos de la experimentación animal junto con la búsqueda de procedimientos alternativos también se encuentran dentro del dominio de esta ciencia. **(Zutphen, 1994)**

El objetivo principal de la ciencia de animal del laboratorio es contribuir a la calidad de la experimentación animal y al bienestar de los animales.

El termino “experimento con animales” puede aplicarse a cualquier procedimiento científico en el que se utilicen animales, con independencia que sean vertebrados o invertebrados. La cual se convirtió en una cuestión política de primer orden, durante las últimas décadas, en varios países se ha propuesto y aplicado legislaciones sobre la protección de los animales, las cuales ejercen una gran influencia en el desarrollo de la ciencia animal de laboratorio.

La teoría de Russell y Burch se ha convertido en un tema central ya que introduce el “Concepto de las tres R’s como principal directriz para el empleo responsable de los animales en los experimentos. **(Zutphen, 1994)**

- **Remplazo:** Es la sustitución del empleo de los animales vivos por técnicas *in vitro*, modelos, videos, películas, etc. El experimento es sustituido por un procedimiento alternativo que produce el mismo resultado sin la utilización de animales vivos.

- **Reducción:** Se refiere a la disminución del empleo de animales que se necesitan para un experimento dado. Esto se puede conseguir eligiendo procedimientos experimentales apropiados, controlando los factores ambientales y estandarizando la población animal.
- **Refinamiento:** Representa la disminución en la incidencia o intensidad de los procedimientos dolorosos o angustiosos aplicados al animal. El refinamiento puede darse durante la experimentación, mejorando los procedimientos experimentales o los métodos anestésicos para reducir la angustia del animal.

La mayoría de los experimentos con animales se llevan a cabo en el ámbito de la ciencia veterinaria, biológica y medica.

Todos los experimentos deben realizarse con anestesia general o local a menos que se considere que la anestésica es más traumática que el experimento mismo o que es incompatible con los fines experimentales.

2.1.1. LA ANESTESIA EN ANIMALES DEL LABORATORIO

La utilización de anestésicos en animales del laboratorio a través de los años ha permitido establecer cuáles son los mejores agentes anestésicos de acuerdo a la especie, edad, sexo, y condición experimental.

De acuerdo a lo anterior es importante conocer cuáles son los mecanismos de acción, vías de administración, metabolismo, y reacciones adversas de los anestésicos comúnmente utilizados en animales del laboratorio. De esta manera, podremos contar con la opción apropiada de acuerdo a la especie y a su fin zootécnico. Si se tiene un conocimiento correcto del anestésico a utilizar se ayuda a minimizar el tiempo de anestesia y cirugía contribuyendo a la recuperación más rápida del animal.

El objetivo de la anestesia del animal del laboratorio, es evitar que el procedimiento quirúrgico en un modelo experimental pueda ser doloroso o incomodo para el animal, proporcionando un medio éticamente humanitario que reduzca al mínimo el sufrimiento físico y psíquico del mismo. (Villanueva, 2007)

La anestesia suele favorecer la manipulación del animal, proporcionando inmovilidad, y cierto grado de relajación muscular. La hipnosis, y la analgesia son los componentes principales de la anestesia, que inhiben la percepción dolorosa física y psíquica por parte del animal, reduciendo las consecuencias derivadas de la agresión quirúrgica

Por otro lado, la dosificación se basa primero en los efectos, ya sea por sedación, analgesia o anestesia y después a la ruta de la administración; la dosis que se utiliza va de acuerdo a la especie, cepa o raza, edad, porcentaje de grasa en el cuerpo y condiciones generales (estado de salud). (Villanueva, 2007)

También, es muy importante conocer el efecto que pueda tener diversos analítos en el uso de los agentes anestésicos. Este hecho permite contar con información valiosa que reduzca la cantidad de animales utilizados para un proyecto de investigación dado.

2.1.2. DEFINICION DE ANESTESIA

El nombre anestesia deriva del vocablo griego “*a aisthesis*”, teniendo como definición: la privación total o parcial de la sensibilidad (Villanueva, 2007); el cual es un estado de inconsciencia controlada y reversible que se caracteriza por una falta de dolor, memoria y una depresión de los reflejos.

2.1.3. HISTORIA DE LA ANESTESIA VETERINARIA

Los orígenes de la anestesia veterinaria se remonta a épocas antiguas siendo Paracelso uno de los pioneros en este rubro. A continuación se describe en orden cronológico sucesos relacionados con la anestesia veterinaria. (Seymour, 2001 y Jones, 1965)

1540 Paracelso administro éter a pollos.

1540 Henry Hill Hickman administró dióxido de carbono a animales de experimentación mostrando que aliviaba el dolor de la cirugía.

1846 Morton demostró los efectos del éter en humanos, y un año después se empezó a utilizar en perros y gatos. (Olivares, 2008)

1847 James Simpson introdujo el cloroformo al campo de la anestesia el cual fue muy utilizado en Inglaterra durante 100 años. **(Olivares, 2008)**

1915 Hobday publico el libro anestesia veterinaria en el cual dio a conocer la cocaína como anestésico local.

1935 Lundy introdujo un desarrollo considerable en la anestesia con el uso de barbitúricos, pentobarbital, tiopental. Estos anestésicos se popularizaron gracias a Wright. **(Goodman & Gilman, 2003)**

1950 Se produjeron avances considerables en la anestesia veterinaria, principalmente unidos a los desarrollos de anestesia humana.

Un desarrollo específico de la anestesia veterinaria es la utilización de los fármacos α_2 -agonistas de los adrenoreceptores como es el caso de la ketamina. **(Seymour, 2001)**

Sin embargo el estudio y evaluación de fármacos, con efectos anestésicos se ha encaminado primordialmente para el uso humano, a pesar, que su evaluación inicial es en animales del laboratorio, siempre hay respuestas no controladas con respecto al efecto del anestésico, por lo tanto es importante seguir evaluando alternativas y tratar de conseguir un mejor anestésico. **(Olivares, 2008)**

La anestesia se divide en tres categorías principales, las cuales afectan el sistema nervioso y pueden administrarse utilizando diversos métodos. He aquí las principales características de cada tipo de anestesia.

2.2 TIPOS DE ANESTESIA

Existen tres grandes clasificaciones de la anestesia según la zona anatómica implicada:

- **Anestesia general:** Es una depresión global pero reversible, de las funciones del sistema nerviosos central (SNC), lo cual resulta en la pérdida de reacción y percepción de todo estímulo externo **(Goodman & Gilman, 2003)**
- **Anestesia local - regional:** Son fármacos que al aplicarse impiden la conducción de impulsos eléctricos de forma transitoria, originando la pérdida de sensibilidad en una zona del cuerpo.

- **Anestesia Mixta:** Es producida por el empleo de más de un anestésico, provocando la pérdida de la conciencia del paciente.

2.2.1 ETAPAS DE LA ANESTESIA

Teóricamente, la anestesia general se divide en cuatro etapas. Cada una de estas le corresponde una impregnación cada vez mayor de las células nerviosas por el anestésico y signos clínicos particulares que se mencionan a continuación: **(H. Hanquet, 1976)**

- **Etapa de Analgesia (I):** El paciente permanece consciente, pero progresivamente llega a estar indiferente a los estímulos dolorosos. Su sensibilidad se encuentra alterada, pero los reflejos quedan activos y pueden defenderse en contra de estímulos nocivos, aunque sin poderlos interpretar. Esta etapa es de utilidad limitada por que el paciente no coopera, por lo que solo se puede utilizar para tratamientos de abscesos y dentarios.
- **Etapa de Delirio (II):** Se caracteriza por una exacerbación de los reflejos; la respiración es irregular, el paciente muestra estar desorientado, a menudo se acompaña de agitación y excitación motriz. Esta etapa debe de ser evitada lo más rápidamente posible, ya que el paciente puede herirse en el transcurso de esta, por lo que es necesario fijar al paciente con lazos o correas. Una estimulación simpática acompaña este estadio: las pupilas se encuentran muy dilatadas, la presión arterial aumenta y hay taquicardia.
- **Etapa de anestesia quirúrgica (III):** La anestesia se ha establecido, los reflejos superficiales se encuentran abolidos, pero los reflejos profundos y los que están asociados a las funciones vitales permanecen activos. En cambio, los movimientos voluntarios están totalmente ausentes. De modo sucesivo desaparece el reflejo palpebral, y el corneal. La respiración es automática y rítmica, se asemeja a la que se observa durante el sueño fisiológico, debido a que las influencias corticales están abolidas. La frecuencia del pulso y el nivel de la presión arterial que se habían modificado en la etapa de delirio, vuelven a alcanzar sus valores normales.

En razón a su duración e importancia, la etapa de anestesia quirúrgica se subdivide en cuatro planos:

- **Plano 1:** El tono muscular se conserva y los globos oculares están animados de movimientos diversos
 - **Plano 2:** Los movimientos de los glóbulos oculares desaparecen debido a que todos los pequeños músculos del organismo, incluidos los de los ojos pierden su tono. Las pupilas quedan fijas y contraídas. La respiración se hace profunda debido a la persistencia de la actividad de los músculos intercostales y del diafragma.
 - **Plano 3:** Las pupilas pasan de miosis intensa a un grado medio de dilatación, el reflejo corneal se hace muy débil. Hay cierta reducción de la frecuencia cardíaca y un pequeño descenso de la presión arterial.
 - **Plano 4:** Las pupilas se dilatan cada vez más. Se obtiene una relajación muscular completa y todos los reflejos desaparecen. La respiración es diafragmática; la inspiración es corta y la espiración prolongada y pasiva.
- **Etapa de sobredosis o toxica (IV):** En esta etapa los centros medulares quedan inactivos. El centro respiratorio es el primer afectado y aparece la apnea; sin embargo el corazón continúa latiendo con la mayoría de anestésicos. Si en este momento no se instala una respiración artificial, se produce la muerte del paciente.

En la anestesia general existe cierto riesgo, ya que el paciente puede fallecer. A continuación se mencionara las consideraciones que se deben tener al utilizar un anestésico para minimizar su riesgo.

2.2.2 SEGURIDAD DE LA ANESTESIA GENERAL

Es de vital importancia la monitorización minuciosa del animal durante la inducción, mantenimiento y recuperación de cualquier anestésico general, prestando atención a la frecuencia cardíaca, ventilación y color de las mucosas. (Santervas L, 2008)

Se deben de tener las siguientes consideraciones al utilizar un anestésico en animales del laboratorio:

- Realizar una exploración física del animal para elegir el protocolo anestésico

- Revisarse las dosis de los fármacos inyectables antes de su administración al animal, y asegurarse que la concentración del fármaco introducido en la jeringa es la calculada para el sujeto de experimentación.
- Algunos factores que pueden afectar la respuesta del animal al anestésico es la especie, edad, raza, sexo, estado físico, capacidad hepática, y anestésicos antes administrados.
- Observar al animal durante la recuperación ya que se puede producir espasmos de laringe, convulsiones e hipotermia.

2.2.3 CARACTERISTICAS DEL ANESTESICO IDEAL

La selección de una técnica anestésica adecuada a cada especie y procedimiento tiende a cumplir los objetivos de manejo humanitario de los animales, mínima interferencia en el experimento, y ausencia de complicaciones derivadas de la anestesia que suele implicar que el animal recupere su normalidad fisiológica lo antes posible. (Villanueva, 2007)

Al utilizar un anestésico se tomaran en cuenta los siguientes parámetros:

- Tiempo de inducción
- Tiempo de duración de la anestesia

Un buen anestésico debe reunir las siguientes características: (Villanueva, 2007)

- Facilidad de la aplicación
- Inducción suave
- Toxicidad mínima
- Metabolización y eliminación rápida
- Carezca de efectos secundario o que sean mínimas
- Fácil adquisición y almacenamiento

Es necesario contar con los siguientes criterios que nos permitan tener un mayor conocimiento de la sustancia.

- Características generales
- Estructura química

- Efectos
- Vía de administración
- Metabolismo
- Posología
- Interacciones medicamentosa
- Usos por especie

Cualquiera que sea el anestésico seleccionado, es importante poder controlar la profundidad anestésica para asegurar que el animal no este demasiado anestesiado por lo que esta en peligro de muerte, o poco anestesiado y percibe los estímulos dolorosos.

En la mayoría de los experimentos es necesario, alcanzar la fase quirúrgica, para determinar si el animal esta en este plano se puede evaluar las siguientes respuestas:

- **Reflejo de la estación:** el animal intenta recuperar la posición normal al ponerse boca arriba.
- **Reflejo podal:** retirada y flexión de una extremidad cuando se pellizca un dedo o la piel interdigital.
- **Reflejo palpebral:** parpadeo cuando se toca el canto interno o externo del ojo.

Durante el periodo de anestesia quirúrgica, es importante observar si las funciones vitales del animal son las adecuadas y asegurar que se mantienen dentro de los límites aceptables. La importancia y la complejidad de este control dependerán de la naturaleza y duración del procedimiento experimental. Se puede realizar una evaluación básica del animal mediante la simple observación del color de las mucosas, la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardiaca.

Los problemas que se han detectado al utilizar un anestésico en conejo son: **(Martínez, 2004)**

- Su centro respiratorio es muy sensible a la acción paralizante de los anestésicos.
- El rango entre las dosis anestésica y letal es bastante estrecho.
- La variabilidad entre los individuos ante la acción depresora de los anestésicos convencionales es tan grande que la dosis para lograr la anestesia quirúrgica

deberá tener una base, pero en gran medida deberá suministrarse y comprobar su efecto individualmente.

Tabla1. Anestésicos más utilizados en conejos

Fármaco	Dosis	Vía de administración
Hypnorm + diazepam	0.3 mL/Kg +2 mg/Kg	i/m, i/p, i/v
Hypnorm + midazolam	0.3 ml/Kg +2 mg/Kg	i/m, i/p, i/v
Immobilom	0.025 – 0.05 mL/ Kg	i/m
Ketamina	50 mg/Kg	i/m
Ketamina + acepromazina	75 mg/Kg + 5 mg/Kg	i/m
Ketamina + diazepam	25 mg/Kg + 5 mg/Kg	i/m, i/p
Ketamina + xilacina	10 mg/Kg + 3 mg/Kg	i/v
Metoexitona	10 mg/Kg	i/v
Morfina	5 mg / Kg	i/m, s/c
Naloxano	0.001 – 0.1 mg/Kg	i/m, i/v
Pentazocina	15 mg/ Kg	i/m, s/c
Pentobarbital	45 mg / Kg	i/v
Pentidina	10 mg / Kg	s/c, i/m
Tiopental	30 mg/Kg	i/v
Uretano	1.5 mg/Kg	i/p, i/v
Xylacina	3 mg/Kg	i/m

i/p = intraperitoneal, i/m = intramuscular, i/v = intravenoso, s/c = subcutáneo

Entre más homogéneos genéticamente sean los animales, habrá un mayor control de las variables. El 2, 2,2-tribromoetanol es un anestésico que se está utilizado recientemente en animales del laboratorio, en México no existen estudios reportados al respecto.

2.3 TRIBROMOETANOL

El 2,2,2 tribromoetanol fue descubierto por el farmacólogo Fritz Eicholz. Más tarde Otto Butzengeiger de Wuppertal lo introdujo en la práctica clínica en 1926. Su uso en humanos fue a principios de los años 60. (Núñez, 2008; Goerig, 2002 y Chari, 2001)

El tribromoetanol fue utilizado mucho tiempo en humanos, pero se discontinuó su uso debido a que causaba irritación rectal, depresión inmediata y mostraba mucha variabilidad biológica, sin embargo, en Europa es ampliamente utilizado en roedores. (Martindale, 1973 y Chari, 2001) Es por esto mi interés en evaluar los parámetros farmacológicos (DE_{50} y DL_{50}) para poder ser utilizado en conejos.

2.3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El tribromoetanol (TBE) es un polvo cristalino blanco, con olor característico. Es poco soluble en agua; soluble en alcohol, éter, benceno y muy soluble en hidrato de amileno. El nombre químico para este anestésico es 2,2,2-tribromoetanol, está formado por tres átomos de bromo (Br) y un grupo alcohol $C_2H_3Br_3O$ (Lieggi, 2005)(Figura 1).

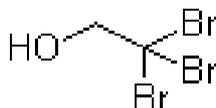


Figura1. Estructura química del 2, 2, 2,-tribromoetanol

Una de las características principales es la introducción de halógenos, la cual aumenta la acción depresora sobre el sistema nervioso central, tal como sucede en el caso del cloroformo. Su peso molecular es de 282.78 g/mol, y posee un punto de fusión de 79-82°C. Debe de ser protegido de la luz (Figura 2) y almacenado a 4°C para evitar su descomposición en ácido bromhídrico (HBr) y dibromoacetaldehído (Br_2CHCHO) ambos productos son fuertemente irritante.(Howard, 1952 y Richard, 2001)



Figura 2. Presentación comercial del 2, 2,2 –tribromoetanol, frasco ámbar para evitar su descomposición

2.3.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

En estudios anteriores se ha demostrado que el TBE en el caso de animales de laboratorio, produce anestesia quirúrgica en ratas y ratones, con buena relajación muscular y un bajo grado de depresión respiratoria. (Flecknell, 1998 y Papaioannou, 1997)

Las dosis que se reportaron para animales del laboratorio de TBE son: (Tabla 2)

Tabla 2. Dosis reportadas de tribromoetanol en diferentes especies utilizadas en el laboratorio (Leary, 1999; Núñez, 2008; Mendoza, 2009)

Especie	Dosis mg/Kg
Ratón	125 i/p
Rata	300 i/p
Gerbo	214 i/p
Hámster	169 i/p
Cuyo	263 i/p

El uso de TBE en estas especies, documentó una baja tasa de mortalidad, así como un margen de seguridad confiable y un adecuado tiempo de hipnosis y recuperación.

El TBE produce una depresión en el sistema nervioso central (SNC). Se ha observado que inhibe la sinapsis en la neurotransmisión mediada por ácido γ -amino butírico (GABA) actuando en los receptores GABA_a β_1 ; sin embargo, se demostró que este mecanismo de acción, inhibiendo la sinapsis es débil, por lo tanto se presume otro camino de acción para efectuar el proceso anestésico, el cual aun se encuentra en investigación. (Krasowski, 2000)

Absorción y Excreción: El TBE se difunde a través de la placenta, se absorbe rápidamente por la mucosa rectal; el 50% de la dosis administrada se absorbe en 10 minutos, y su eliminación es completa por la orina, alrededor de dos horas posterior a su administración (Lumb, 1963).

Uno de los requisitos previos para el empleo responsable de los animales en la investigación biomédica es el conocimiento de las características biológicas de la especie que se va a utilizar, así como de las condiciones necesarias para su manejo. El alojamiento, alimentación y el cuidado de la especie seleccionada deben de ser los apropiados para satisfacer sus necesidades.

A continuación trataremos algunos de los aspectos biológicos y zootécnicos del conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) utilizado en este estudio.

2.4 CONEJOS NUEVA ZELANDA

2.4.1 CARACTERISTICAS GENERALES

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es originario de la península ibérica, desde la cual se expandió al área mediterránea. Existen distintas razas que se diferencian por el color y tipo de pelo. Como animal de laboratorio, la raza más utilizada son conejos Nueva Zelanda, se emplean en pruebas de pirógenos, toxicidad, producción de antisueros,

calibración de productos biológicamente activos y pruebas de irritación en piel, entre otras. (Zutphen, 1994)

Los conejos son una especie fundamentalmente nocturna, se incluían dentro de los roedores, por su similitud con los mismos, pero a partir de 1912 se incluyó taxonómicamente dentro del grupo de los lagomorfos, al ser evidentes las diferencias entre uno y otro orden. (Zutphen, 1994)

Se caracteriza por tener un cuerpo cubierto de un pelaje espeso, de color blanco, cabeza ovalada y ojos grandes. Tiene orejas largas de hasta 7 cm. y una cola muy corta. Sus patas anteriores son más cortas que las posteriores. Mide de 33 a 50 cm. en condiciones afables. (Figura 3) Son muy sociables pero emiten fuertes chillidos cuando están asustados o lastimados.

El conejo utilizado en el laboratorio debe estar libre de cualquier aplicación de sustancias farmacológicas y clínicamente sano, para poder garantizar la respuesta ante la prueba experimental o de control. Esto demanda un control estricto de los factores ambientales así como una rigurosa higiene, para evitarles estrés y enfermedades.



Figura 3. Conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*)

La manipulación y sujeción del conejo deben ser llevadas a cabo con seguridad, firmeza y gentileza. La más usual consiste en colocar la mano debajo de los miembros posteriores y soportando el peso del animal, con la otra mano se debe sujetar la piel a nivel del cuello para mantener firme al animal. **(Figura 4) (NOM – 062-ZOO-1999)**



Figura 4. Forma correcta de sujeción del conejo

Los conejos de laboratorio requieren de jaulas con las siguientes características:

- El material de las jaulas debe ser resistente, seguro y a prueba de escape. Las jaulas deben de permitir un fácil acceso al alimento y agua. Se recomienda como material: jaula con rejilla de acero inoxidable, con piso de malla de alambre con 1.5 cm de separación.
- Las jaulas deben tener suficiente amplitud y altura para permitir a los conejos movimientos y posturas naturales. **(NOM – 062-ZOO-1999)**

Su alimentación debe cubrir los requerimientos mínimos nutricionales para las etapas de crecimiento, gestación y lactación. **(Tabla3) (NOM – 062-ZOO-1999)**

**Tabla 3. Requerimientos nutricionales del conejo como animal de laboratorio
(NOM – 062-ZOO-1999)**

Proteína cruda	No menos de 16.0%
Grasa cruda	No menos de 2.5%
Fibra cruda	No menos de 14%
Cenizas	No más de 8.0%

2.4.1 CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS

**Tabla 4. Características Biológicas y fisiológicas del conejo *Oryctolagus cuniculus*
(Martínez, 2004)**

Especie	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Genero	<i>Oryctolagus</i>
Familia	<i>Leporidae</i>
Subfamilia	<i>Leporinae</i>
Orden	<i>Lagomorpha</i>
Clase	<i>Mammalia</i>
Subclase	<i>Theria</i> (mamíferos vivíparos)
Peso corporal	2- 4 Kg
Longitud corporal	40 – 50 cm
Tiempo de vida	Aproximadamente 9 años
Madurez sexual	4 y 7 meses
Época de reproducción	Durante todo el año
Tiempo gestación	28 a 33 días
Numero de crías por camada	3 a 9 crías por camada
Requerimiento mínimo de espacio	0.28 m ² y 36 cm de altura por jaula
Temperatura ambiental	16-26 °C
Humedad relativa del medio ambiente	40-60 %

La “agresividad” o “benevolencia” de las condiciones ambientales constituyen factores favorables o adversos, los cuales influyen sobre la conservación de la salud de los animales. Los factores zootécnicos, las medidas profilácticas y las medidas terapéuticas en conjunto determinan en gran medida que los conejos se enfermen o no. **(Harkness, 1983)**

Tabla 5. Enfermedades más comunes en el conejo (Martínez, 2004)

MICROORGANISMOS	FRECUENCIA	PATOGENICIDAD
<i>Clostridium spiriforme</i>	49.9 %	Moderada
<i>Eimeria spp</i>	45.4 %	Baja-alta
<i>Escherichia coli enteropatógena</i>	32.4 %	Moderada-Alta
<i>Rotavirus</i>	19.4 %	Baja
<i>Bacillus piliformis</i>	5.7 %	Alta
<i>Cryptosporidium spp</i>	4.9%	Baja

De los 90 millones de animales de laboratorio utilizados en la experimentación anualmente, en promedio, durante la década de los años 90 en el mundo, aproximadamente 2 millones estaban constituidos por conejos. El conejo de laboratorio se utiliza básicamente en tres ámbitos: docencia, investigación y pruebas de constatación de calidad de productos farmacéuticos. **(Martínez, 2004)**

El empleo de cualquier medicamento depende absolutamente del conocimiento en la dosis correcta, para saber esto es necesario realizar una curva dosis respuesta – cuantales donde veremos los efectos buscados como sedación o hipnosis y los efectos indeseables como es la muerte.

2.5 CURVA DOSIS RESPUESTA – CUANTAL

Las repuestas farmacológicas como sedación, hipnosis y muerte pueden ser consideradas de tipo “todo o nada”, es decir que puede ocurrir o no, a esto se llama una repuesta cuantales. **(Vidrio, Rojas; 1987)**

En un organismo integro un fármaco es capaz de producir mas de una respuesta farmacológica, con lo cual se puede construir curvas de dosis respuesta cuantales y

calcular las dosis efectivas medias correspondientes. Por lo general uno de estos efectos es el deseable o el terapéutico, y los demás suelen considerarse como indeseables o tóxicos. Como resultado sabremos si una sustancia es útil como agente terapéutico. **(Vidrio, Rojas; 1987)**

La dosis efectiva para la acción deseable debe de ser inferior a la correspondiente a cualquiera de los efectos indeseables.

También pueden utilizarse las curvas dosis respuesta cuantales para generar información al respecto al margen de seguridad que debe esperarse de un fármaco en particular administrado para producir un efecto específico. **(Katsung, 2005).**

Al graficar la distribución de frecuencia de respuesta contra el logaritmo de la dosis, se obtiene una curva sigmoidea simétrica. Al sumar estas respuestas, la distribución de las frecuencia acumulativa resultante constituye una curva dosis efecto cuantales (o curva dosis efecto porcentaje) de individuos que presentan el efecto que se grafica en función del logaritmo de la dosis. **(Katsung, 2005) (Figura 5)**

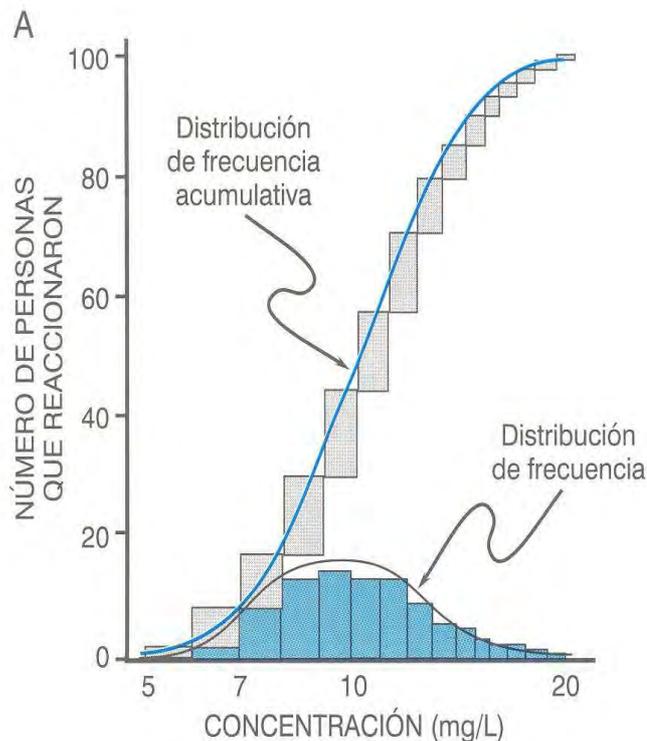


Figura 5. Curva de distribución de frecuencia (Goodman & Gillman, 2003)

Puesto que la curva dosis respuesta cuantil es en realidad una expresión de una curva de distribución normal, la escala de las ordenadas que representan porcentaje de sujetos que responden, puede construirse por una escala probits. **(Figura 6).**

Dentro de los métodos probabilísticos, destaca el método PROBIT (“Probability unit”). El cual permiten el estudio de los efectos adversos de un accidente siempre y cuando se puedan describir mediante funciones de probabilidad.

La metodología PROBIT se basa en definir una unidad de probabilidad (**Y**), cuya relación con la probabilidad (**P**) se expresa mediante la ecuación:

$$P = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \int_{-\infty}^{Y-5} \exp\left(\frac{-x^2}{2}\right) \cdot dx$$

La forma más habitual de expresar la ecuación anterior es:

$$Y = 5 + \frac{\ln(x) - \mu}{\sigma}$$

Donde:

- Y: porcentaje de población afectada.
- x: intensidad del factor causante del daño.
- μ : valor medio de la distribución normal.
- σ : desviación típica de la distribución normal.

Esta última ecuación resulta más fácil de utilizar en la forma:

$$Y = k_1 + k_2 \cdot V$$

Es como normalmente se utiliza en análisis de vulnerabilidad, donde:

- k_1, k_2 : constantes empíricas.
- V : medida de la intensidad del factor causante del daño.

Esta metodología es ampliamente utilizada porque mediante la utilización de las unidades PROBIT permite pasar de una curva de distribución normal a una línea recta, (Figura 6) con parámetros muy fácilmente calculables como DE_{50} , DL_{50} , MS e IT.

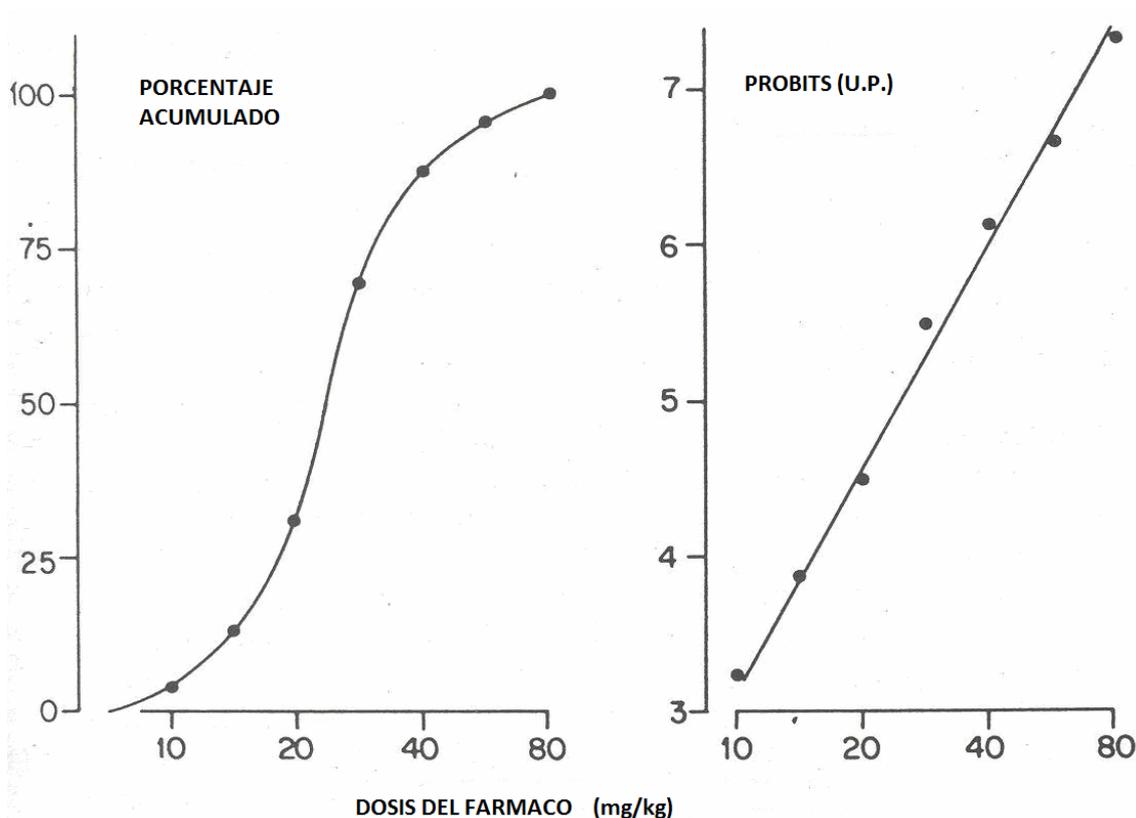


Figura 6. Transformación de curva sigmoidea de dosis respuesta cuantitativa (izquierda) en una recta (derecha) mediante la sustitución del porcentaje de respuestas por su probit correspondiente.

Dosis eficaz media (DE_{50}): dosis de una sustancia necesaria para producir un efecto específico en la mitad de la población. (Goodman & Gillman, 2003) (Figura 7)

Dosis letal media (DL_{50}): dosis de una sustancia necesaria para producir la muerte al 50% de la población. (Goodman & Gillman, 2003) (Figura 7)

Dosis toxica media (DT₅₀): es la dosis en la cual se produce un efecto toxico en el 50% de la población. (Goodman & Gillman, 2003)

Índice terapéutico: Señala el grado de selectividad que posee un fármaco para generar los efectos buscados en oposición a los efectos adversos, y este se calcula de la siguiente forma: DL_{50} / DE_{50} . (Goodman & Gillman, 2003)(Figura 7)

Margen de seguridad (MS): Es la relación existente entre la dosis mas baja que produce toxicidad (DL₁) y la dosis mas alta que produce una respuesta terapéutica máxima (DE₉₉) $MS = DL_1 / DE_{99}$. (Goodman & Gillman, 2003)

Las curvas dosis respuesta cuantil indica la variabilidad potencial de la capacidad de respuesta entre los individuos (Katsung, 2005)

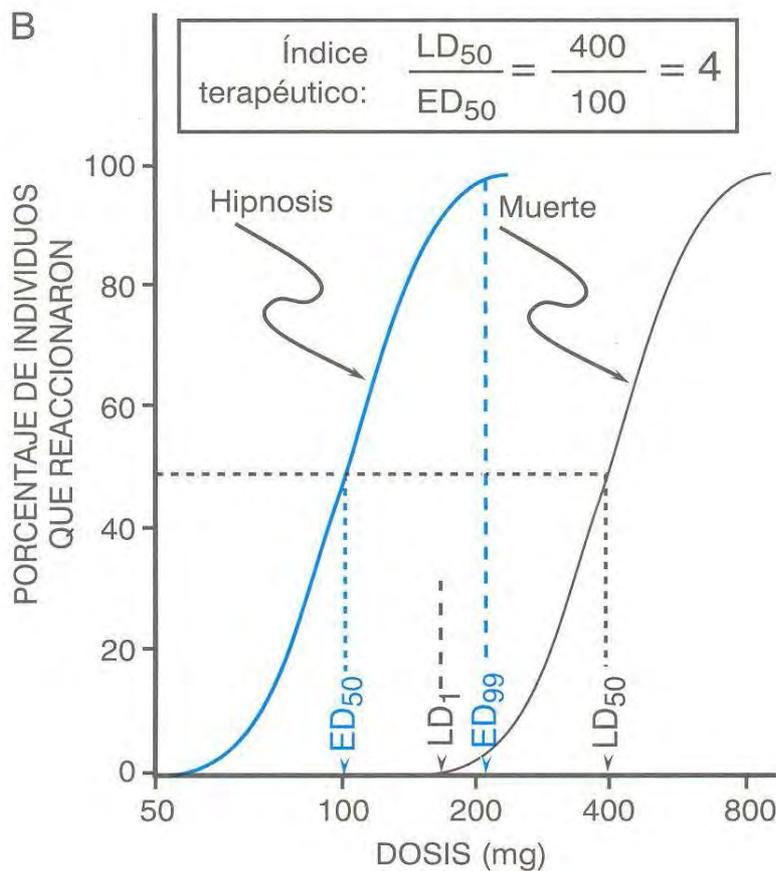


Figura 7. Curva dosis - respuesta cuantal, se muestra el cálculo del índice terapéutico, dado por las proporciones entre DL₅₀ y DE₅₀. (Goodman & Gillman, 2003)

CAPITULO 3

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto anestésico del 2, 2,2- tribromoetanol en conejos de la cepa nueva Zelanda.
- Determinar los parámetros farmacológicos DE_{50} , DL_{50} y el MS del 2, 2,2-tribromoetanol, mediante una curva dosis - respuesta cuantitativa en conejos de la cepa Nueva Zelanda.
- Evaluar si el 2, 2,2- tribromoetanol puede ser un anestésico ideal para conejos.
- Determinar la dosis sostenida para realizar un procedimiento quirúrgico de una duración aproximada de 30 min

CAPITULO 4

HIPOTESIS

- Si el 2, 2,2 –tribromoetanol a mostrado tener un buen efecto anestésico y una recuperación eficaz para las especies ratón, rata cuyo, jerbo, hámster, entonces esperamos que se tenga el mismo resultado en conejos de la cepa Nueva Zelanda, mostrando un margen de seguridad confiable.
- Si determinamos la dosis sostén y logramos obtener una hipnosis prolongada aproximadamente de 30 min, entonces este anestésico será recomendable para realizar un procedimiento quirúrgico.

CAPITULO 5

MATERIAL Y METODO

5.1 MATERIAL

- **Material biológico**

Se utilizaron conejos raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculi*) con un rango de peso aproximada mente 2.5 – 3 Kg.

Los animales empleados en este experimento provienen del Bioterio de la Facultad de Química edificio “A”, y no se sometieron previamente a experimentación.

Las condiciones de mantenimiento son las marcadas en la norma NOM – 062-ZOO-1999 que son las siguientes: (**Tabla 6.**)

Tabla 6. Condiciones de mantenimiento de conejos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculi*)

Alimento	Agua y comida “ad libitum”
Humedad	40-60 %
Temperatura	16-26 °C
Luz/Oscuridad/ Horas	12/12

Nota: “ad libitum” libre acceso al alimento a cualquier hora del día o de la noche. En condiciones “ad libitum”, los roedores y conejos consumen la mayor parte de comida durante la fase oscura (**Beynen, 1992**)

➤ **Reactivos:**

- 2,2,2 - tribromoetanol, pureza 96% (GC) (Fluka) No. de lote: 1306252

➤ ***Soluciones:***

- Solución salina isotónica 0.9%
- Etanol grado reactivo
- Solución TBE 2% ® Fluka

➤ ***Equipo de curación***

- Jeringas desechables (1 y 3 mL) de plástico con aguja de acero inoxidable calibre 27 (Plastipak)
- Equipo para venoclisis con microgotero (Soluten)
- Catéter intravenoso periférico de un solo uso calibre 25 (*Punzocat*)

➤ ***Equipo fijo***

- Marcador indeleble
- Balanza Granatária, OHAUS
- Bascula Torino para 10 Kg
- Cronometro digital
- Vaso de precipitados de 50 mL, Pyrex
- Pipeta volumétrica de 5 mL, Pyrex
- Pipeta graduada de 10 mL, Pyrex
- Espátula de acero inoxidable

5.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La metodología empleada durante la etapa experimental del trabajo fue la medición de latencias para diferenciar cada etapa de la anestesia, a continuación definimos cada una de ellas.

- ***LATENCIA DE SEDACION:*** Es el tiempo transcurrido desde la administración del fármaco hasta que el animal pierde la incardinación motora. (**Bustamante, 2002**)

- **LATENCIA DE HIPNOSIS:** Es el periodo de tiempo desde la administración del fármaco hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento del animal. **(Bustamante, 2002)**
- **DURACION DE LA HIPNOSIS:** Es el periodo de tiempo que va desde la pérdida del reflejo de enderezamiento del animal hasta su recuperación. **(Bustamante, 2002)**
- **MUERTE:** En caso de que el animal no se recupere, pierde el reflejo de enderezamiento, la frecuencia cardiaca y respiratoria dando como resultado el deceso de animal. **(Bustamante, 2002)**

Se siguió la siguiente metodología experimental:

1. Se formaron 8 grupos de manera aleatoria con una **n = 6**
2. Se pesaron y marcaron a los animales para cada una de las dosis de TBE que se mencionan a continuación (**Tabla 7**)

Tabla 7. Distribución de los conejos de acuerdo al grupo y Dosis

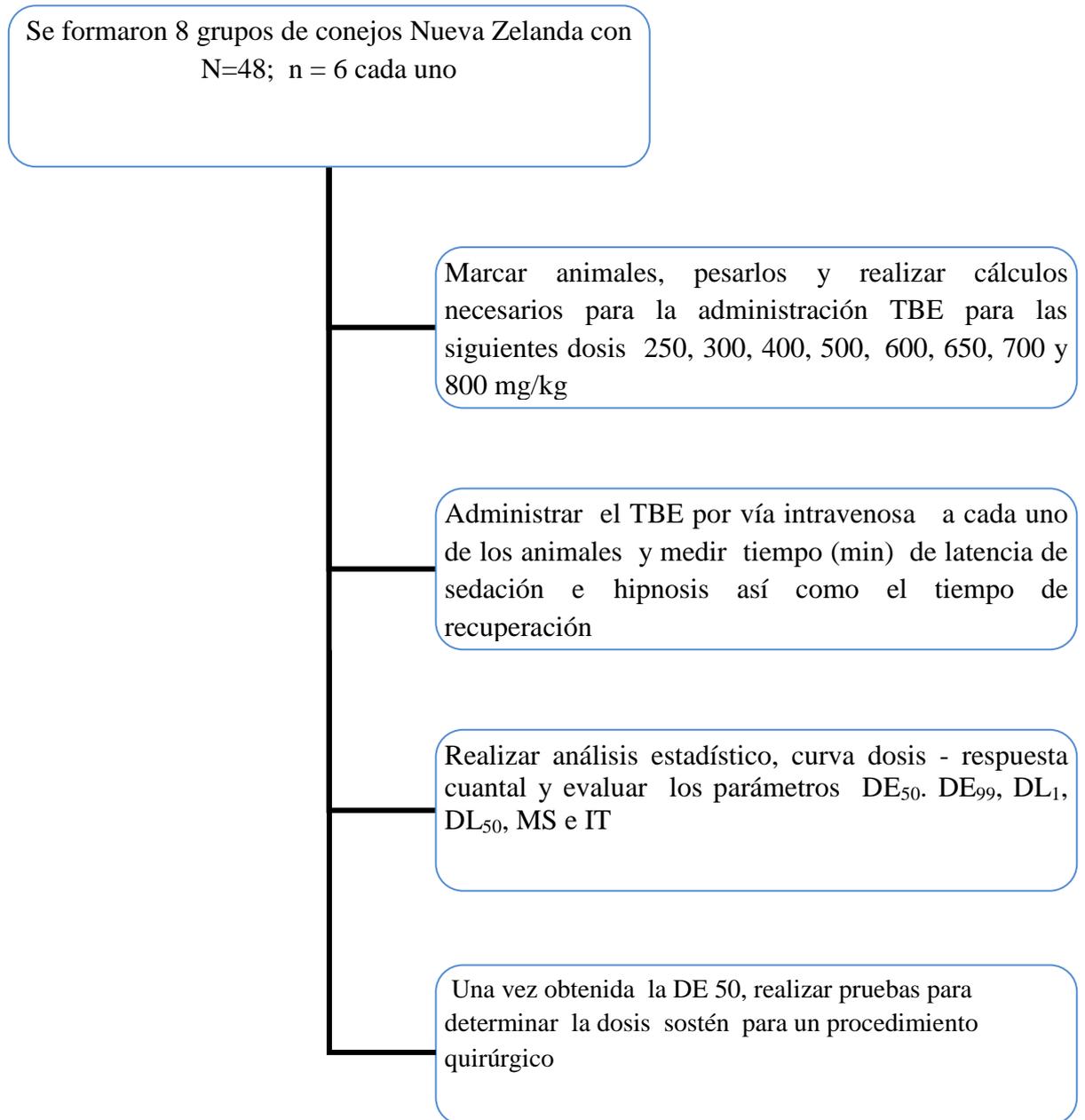
Grupo	Dosis (mg/kg)	Conejo
1	250	1-6
2	300	7-12
3	400	13 – 18
4	500	19 – 24
5	600	25 – 30
6	650	31- 36
7	700	37 – 42
8	800	42 – 49

3. Se efectuó la administración de TBE por vía intravenosa (**Figura 8**) a cada uno de los animales y se midió el tiempo (min) de latencia de sedación e hipnosis causada por el anestésico.
4. A partir de los datos recopilados, se realizó una curva dosis - respuesta cuantitativa y se evaluaron los parámetros DE_{50} , DE_{99} , DL_{1} , DL_{50} , MS e IT.
5. Se llevó a cabo un análisis estadístico, una prueba ANADEVIA con una $p < 0.005$, para saber si existen diferencias significativas entre los grupos evaluados para el 2,2,2 – tribromoetanol.
6. Una vez obtenido los parámetros DE_{50} , DL_{50} , se realizaron las pruebas necesarias para determinar la dosis de sostén para prolongar la duración de la latencia de hipnosis aproximadamente de 30 min o más para poder realizar un procedimiento quirúrgico.



Figura 8. Vía de administración intravenosa de 2,2,2 – tribromoetanol, introducción de la aguja calibre 27 en la vena marginal de la oreja del conejo.

5.3. DIAGRAMA DE FLUJO



CAPITULO 6

RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras administrar el TBE a conejos Nueva Zelanda por vía intravenosa, a las diferentes dosis mencionadas. (**Tabla 8**) en donde se observa que las dosis de 250 a 400mg/Kg hay presencia de la latencia de sedación, sin embargo a partir de 500mg/Kg no fue posible medir este parámetro ya que es inmediata la hipnosis. En cambio para la latencia de hipnosis en la dosis 250 y 300 mg/Kg no se obtuvo este parámetro ya que no llegaron a hipnosis.

La Tabla 8. Promedio de las latencias de sedación e hipnosis expresadas en minutos

Dosis (mg/Kg)	Promedio de latencia de sedación (min)	Promedio de latencia de hipnosis (min)
250	2.72	=
300	3.50	=
400	1.86	2.26
500	-	4.60
600	-	4.67
650	-	6.57
700	-	6.10
800	-	2.5

(-) No se pudo medir debido a que el tiempo de sedación fue muy rápido

(=) No presento hipnosis

Se muestra la grafica de valoración de los periodos de latencia de sedación e hipnosis posterior a la administración de TBE, para los tiempos de sedación, solo se pudo determinar para las dosis de 300 y 400 mg/Kg, ya que a partir de 500 mg/Kg es tan rápido el efecto que cuando se va administrando el anestésico el conejo llega a un estado hipnótico, no existen diferencias significativas entre las dosis **ANOVA (Tukey H = 5.589, g.l = 2, p = 0.061)**.

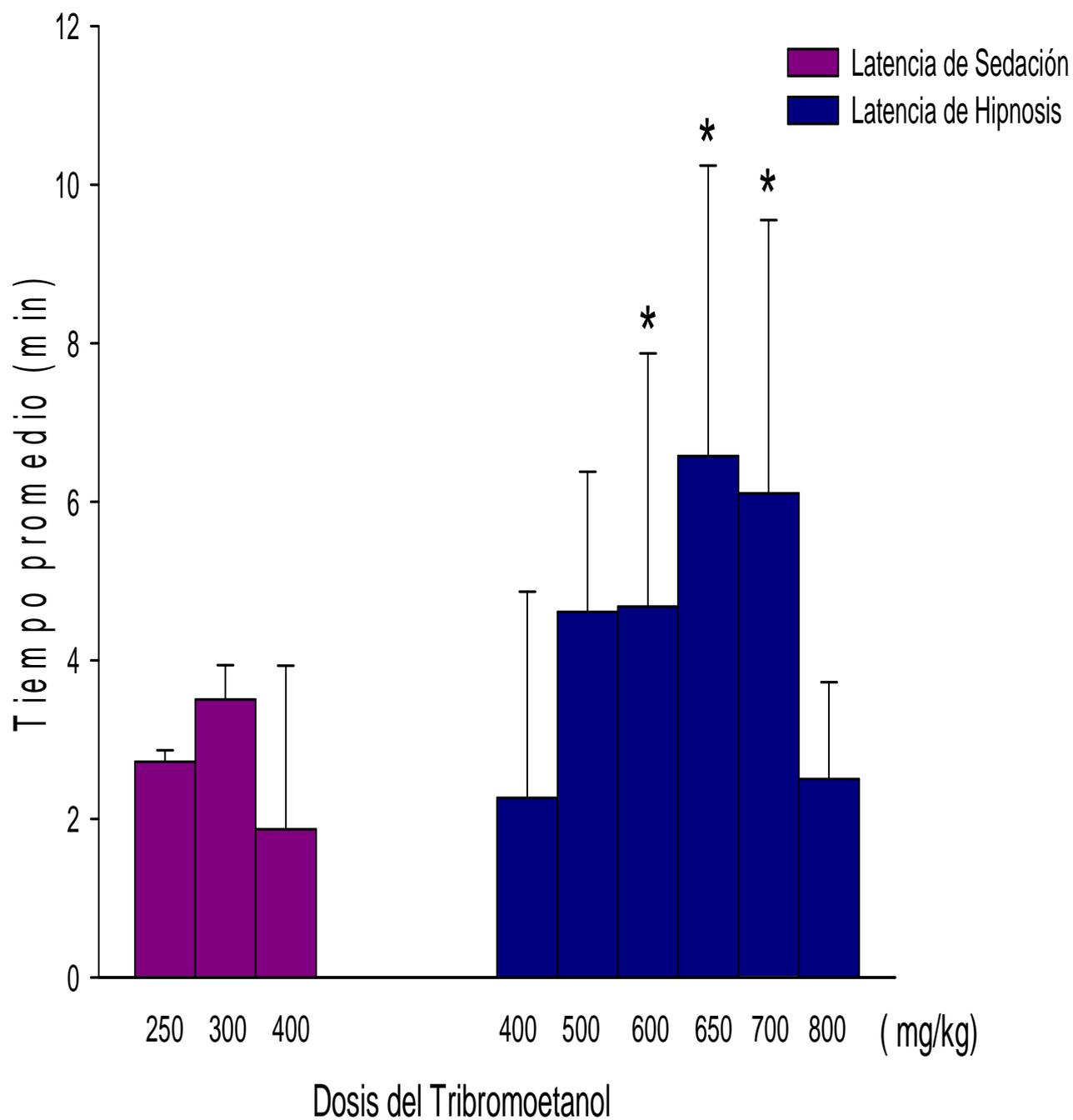


Figura 9. Latencia de sedación e hipnosis vs dosis de 2,2,2- tribromoetanol, cada barra representa el promedio de latencia (min) \pm E.S * $p < 0.001$

A dosis menores de 400 mg/Kg no hay presencia del efecto hipnótico. A partir de la dosis 500 mg/Kg se tiene el efecto máximo, presenciando que a dosis de 800 mg/Kg puede haber muerte. ANOVA (Tukey. $H = 28.948$, $g.l = 7$, $p < 0.001$)

En la tabla 9 se resumen los datos obtenidos de U.P (unidades probits) tras la administración del TBE a diferentes dosis.

Tabla 9. Unidades de probabilidad de sedación e hipnosis vs dosis (mg/Kg) TBE donde U.P.S = unidades probit de sedación, U.P.H = unidades probit de hipnosis, U.P.M = unidades probit de muerte.

Dosis	log dosis	U.P.S	U.P.H	U.P.M
250	2.390	6.450	3.355	3.355
300	2.470	6.450	3.355	3.355
400	2.600	6.450	5.000	3.355
500	2.700	6.450	6.645	3.355
600	2.780	6.450	6.645	4.260
650	2.810	6.450	6.645	4.260
700	2.850	6.450	6.645	4.260
800	2.900	6.450	6.645	5.964

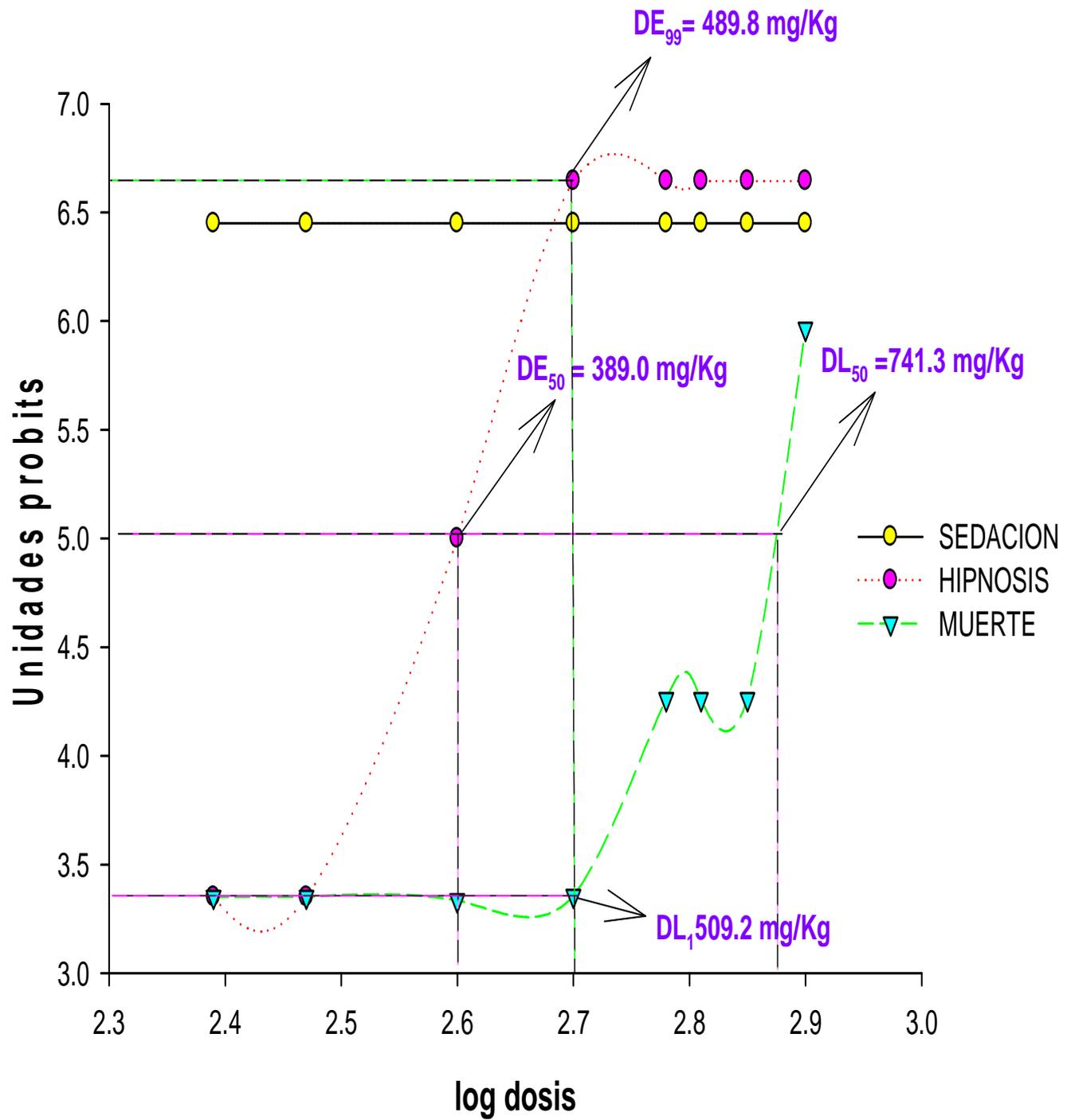


Figura 10. Curva Dosis - Respuesta cuantal. U. P. vs log del 2,2,2 – tribromoetanol.

Determinación de los parámetros DE₅₀, DL₅₀, DE₉₉, DL₁

De la curva dosis respuesta cuantil (**Figura 10**) obtuvimos los siguientes valores:

- 1) **DE₅₀ = 389.0 mg/Kg**
- 2) **DL₅₀ = 741.3 mg/Kg**
- 3) **DE₉₉ = 489.8 mg/Kg**
- 4) **DL1 = 509.2 mg/Kg**
- 5) **MS = 1.039**
- 6) **IT = 1.9056**

Se muestra las pruebas realizadas para la dosis sostén, en donde se utilizo un catéter para la administración continua de 2,2,2 –tribromoetanol.

Los resultados de las dosis y tiempos de la hipnosis obtenidos en lotes pilotos se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Resultados obtenidos tras la administración de TBE, a diferentes dosis para determinar la dosis sostén, y obtener una anestesia quirúrgica aproximadamente de 30 min

Conejo	1	2	3
Peso Kg	2.630	2.550	2.800
1era Dosis	300 mg/ Kg	500 mg/Kg	600 mg/ Kg
Tiempo de Hipnosis	3.50 min	5.40 min	6.40 min
Dosis sostén prueba 1	300 mg/ Kg	150 mg/ Kg	300 mg/ Kg
Tiempo de Hipnosis	5.00 min	3. 57 min	Muerto
Dosis sostén prueba 2	300 mg/kg	150mg / Kg	
Tiempo de Hipnosis	Muerto	6.35 min	
Dosis sostén prueba 3		150 mg/ Kg	
Tiempo de Hipnosis		12. 32min	
Total tiempo de hipnosis		27.34 min	

A partir de estos datos se realizo la replica en un grupo de 6 conejos para saber si existía diferencias significativas y comprobar la dosis sostén. **Tabla 11**

Tabla 11. Resultados obtenidos tras la administración continua de TBE con un proceso acelerado de goteo a través de un catéter colocado en la vena marginal del conejo, para probar la dosis sostén de 150 mg/Kg.

	Conejo 1	Conejo2	Conejo3	Conejo3	Conejo5
Dosis inicio 500mg/Kg	5.50 min hipnosis	8 min hipnosis	6.58 min hipnosis	3 min hipnosis	5.09 min hipnosis
2ª dosis 150mg/Kg	9.95 min hipnosis	6 min hipnosis	4.82 min hipnosis	3 min hipnosis	4.31 min hipnosis
3ª dosis 150mg/Kg	7.85 min hipnosis	5 min hipnosis	5.4 min hipnosis	5 min hipnosis	4.01 min hipnosis
4ª dosis 150mg/Kg	8.2 min hipnosis	5.40 min hipnosis	6 min hipnosis	8 min hipnosis	4.81 min hipnosis
5ª dosis 150mg/Kg				10 min hipnosis	10.78 min hipnosis
Promedio	7.87	6.1	5.7	5.8	5.8
D.S	1.83	1.33	0.657	3.11	2.81
e.s	23.25	21.80	11.52	53.62	48.54

Se muestra la grafica del numero de administraciones y el promedio del tiempo de hipnosis de cada una, se utilizo una n = 5 para cada administración, p = 0.836, n.s

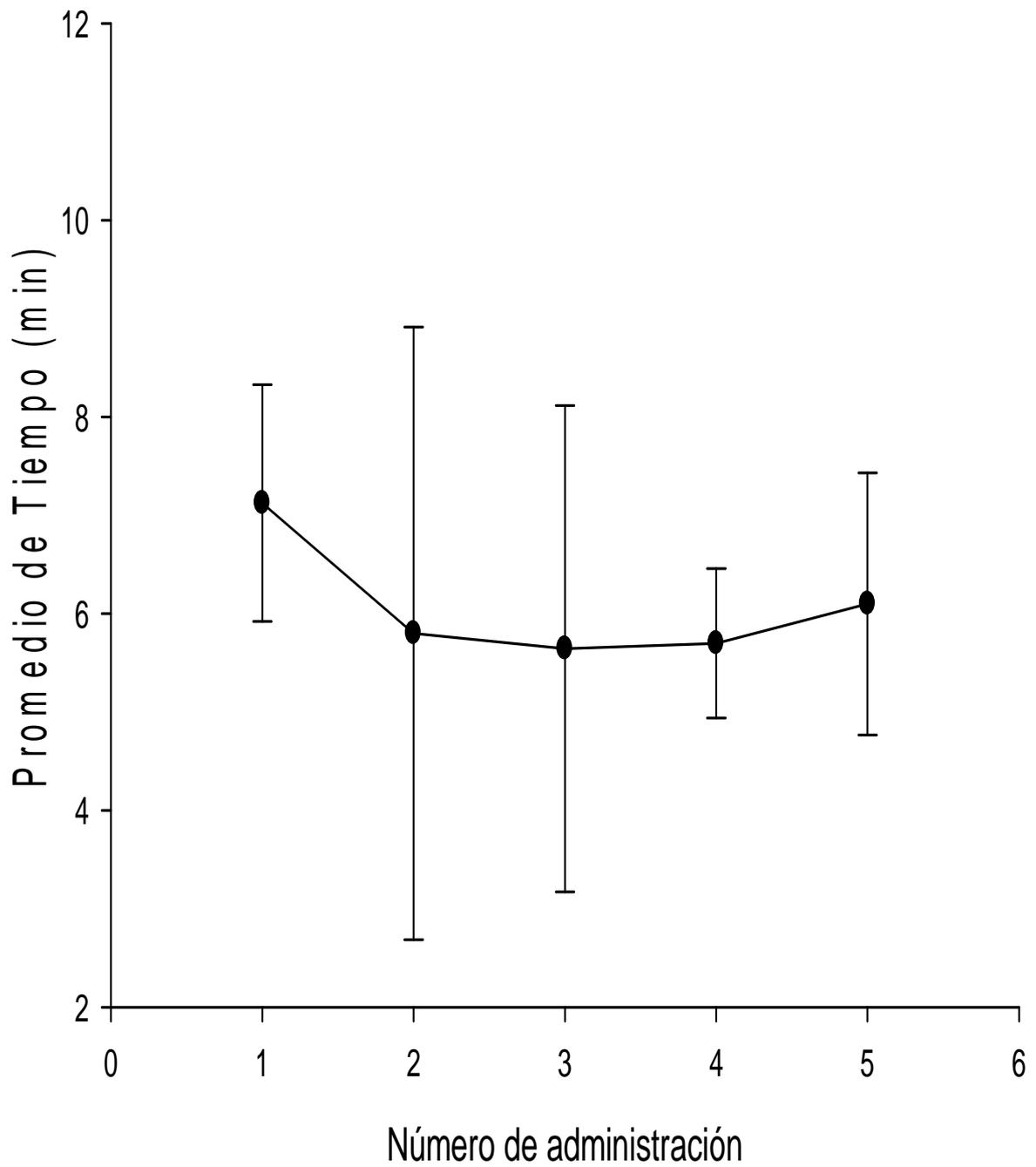


Figura 11. Curva Dosis sostén para la inducción de la hipnosis. Cada punto representa el tiempo promedio de latencia de hipnosis \pm E.S. N = 6, n.s

CAPITULO 7

ANALISIS DE RESULTADOS

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda jóvenes con un peso aproximado de 2 – 2.5 Kg. Las dosis elegidas para el estudio fueron probadas con un experimento piloto, debido a que en la literatura no se reporta ninguna dosis, dado que no se ha utilizado este anestésico para conejo, además cabe destacar que es un anestésico en el cual no se tienen estudios reportados en México.

Al analizar los periodos de latencia de sedación se observó que esta iba disminuyendo conforme se aumentaba la dosis hasta que no se alcanza a percibir esta latencia, el criterio que se utilizó para determinar la sedación fue al notar que los animales casi no se movían y se mostraban muy relajados. A partir de la dosis de 500 mg/kg, se llega casi instantáneamente a la hipnosis, en esta latencia observamos que el tiempo de hipnosis va aumentando conforme se aumenta la dosis, hasta llegar a la dosis letal de 741.3 mg/Kg, donde al realizar el análisis estadístico, en el último grupo evaluado de 800mg/Kg se tomó como 2 min de hipnosis y después se presentó la muerte, cabe destacar que el mayor tiempo de hipnosis que se llega a alcanzar es de 7 minutos a una dosis de 650 mg/Kg, por lo que este anestésico lo clasificamos como ultra corta duración para esta especie.

Notamos que existen diferencias significativas en la duración de la latencia de hipnosis entre las dosis 600, 650 y 700 mg/Kg, Entre las dosis 650 y 700 mg/Kg se observa una disminución de la hipnosis esta diferencia puede ser debida a la infiltración del medicamento al momento de la administración, lo que provocó que la latencia de hipnosis se viera afectada.

Para esta especie el TBE posee un margen de seguridad de 1.039 el cual muestra ser confiable respecto a otros anestésicos que generalmente se encuentran en el mercado los cuales manejan un rango de 0.4 aproximadamente, por lo que se recomienda su uso únicamente si se va a realizar un procedimiento quirúrgico rápido el cual dure menos de 7 min como por ejemplo una punción cardíaca.

Al realizar las pruebas para determinar la dosis sostén obtuvimos que esta es de 150 mg/Kg. La cual debe de ser administrada con catéter a través de goteo acelerado de solución salina, está ayudará a eliminar más rápidamente al anestésico y evitar su muerte. Es recomendable también su uso de esta forma, pero como la hipnosis dura poco hay que estar administrado el anestésico aproximadamente cada 5 minutos, lo que hace incómodo su uso.

Es necesario tomar en cuenta que la administración de TBE debe de ser vía intravenosa, colocando un catéter en la vena marginal de la oreja del conejo, e ir administrando solución salina por goteo, mediante una venoclisis, así se evita la irritación causada en la oreja debida al alcohol, esta observación la note al realizar la primera parte experimental de esta tesis, y en la segunda parte experimental coloque un catéter y los conejos ya no mostraron irritación en la oreja.

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

- El TBE es un anestésico cuyo tiempo para la inducción de la hipnosis es corto así como el tiempo de recuperación.
- Se necesita el doble del la DE₅₀ (389.0 mg/Kg) para llegar a la DL₅₀ (741.3 mg/Kg).
- Es recomendable el uso del TBE en una sola administración, únicamente si el procedimiento quirúrgico dura menos de 7 min. En otro caso no es recomendable.
- Puede ser utilizado por administración continua y se llega a una hipnosis aproximada de 30 min, pero debido a que la duración de hipnosis entre una dosis y otra es corta, es incomodo su uso.
- Posee un margen de seguridad de 1.039 esto nos indica ser seguro y confiable.
- Dentro de las ventajas que este anestésico presenta, es que se prepara a la concentración deseada y así se evita la contaminación de este así como su desperdicio.
- Tomando en cuenta la relación costo/beneficio este anestésico es económicamente accesible.

CAPITULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Beynen AC Ad libitum versus restricted feeding: Pros and cons. *Scand J Lab Anim Sci* 1992; 19: 19 -22.
2. Bustamante R, González ME, Gómez AE, Hernández EH, Herrera L, Amezcua MV, Naranjo EB, Ortiz A, Páez RM, Pérez F, Ponce HA, Silvia G, Vázquez AM, Ventura R. Un interesante contenido Farmacológico para sesiones Experimentales. UNAM, FQ. México, 2002. pp 65 – 67.
3. Committee on care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources, Guide for the care and use of laboratory animals. US Department of Health, Bethesda: NIH Publication No. 85 – 23, 1985.
4. Chaya Gopalan, PhD, Ariel S, Simmons, Ba, Dianne K. Effects of tribromoethanol – medetomidine combination on cycling and ovariectomized Sprague – Dawley. pp 36 – 40. 2007. De Carlos J.M Y Viamonte M. A Farmacología de los anestésicos locales. ANALES Sis San Navarra. 22 (Supl. 2): 11- 18, abril 1999.
5. Chari YT, Burnett JC, Redfield MM. Effects of avertin versus xylazine – ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, July; 281: H1938 – H1945
6. Flecknell PA. Anestesia de Animales de Laboratorio. Introducción Practica para Investigadores y Técnicos. 2. Edición. Editorial Acribia, S.A. España, 19998. pp. 1 – 73.
7. Gilman A, Goodman LS. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª Ed. México. Ed. McGraw – Hill. 2003 pp 55 -60
8. Goering, M. The Avertin Story, American Society of Anesthesiologists. A1172, 2002.
9. H. Hanquet. Manual de Anestesiología. Ed. Toray – Mansson. 1976 pp 43 - 45
10. Harkness JE., Wagner JE. The biology and medicine of rabbits and rodents. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.

11. Howard ME. Modern Drug Encyclopedia and Therapeutic Index. Drug publications, INC. N.Y., 1952. pp 88.
12. Katsung BG. Farmacología Básica y Clínica. Capítulos 2. Receptores de Fármacos y farmacodinamia. Bourne HR, Von Zastrow M. y
13. Krasowski MD, Harrison NL. The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *Br J Pharmacol.* 2000; 129. 731 – 743.
14. Lieggi C.C. et al. An evaluation of reparation methods and storage conditions of tribromoethanol. *Contemp. Lab Anim. Sci* 44 (1), 11 – 18. 2005
15. Litchfield J. T., Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose – effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 96: 99 – 113, 1980.
16. Lumb, W. V. Anestesia veterinaria. México. Ed. Cecsá. 1963. pp 20.
17. Martindale. The Extra Pharmacopeia. Edición 26. The Pharmaceutical PRESS. London, 1973. pp 852 – 854.
18. Martínez Castillo Miguel. Cunicultura. Material de apoyo audio visual. 2 edición División de Educación Continua 2004.
19. Mendoza A. Determinación de la Curva Dosis Respuesta – Cuantal del 2, 2,2 – Tribromoetanol en tres Especies Diferentes Cuyo (*Cavia porcellus*), Gerbo (*Meriones unguiculatus*) y Hámster (*Mesocricetus auratus*). Tesis UNAM 2009.
20. National Research Council. Education and training in the care and use of laboratory animals. Washintong, DC: National Academy Press, 1991.
21. Nevalainen T, Phyhala L, Vopio H M and Vitranen R. Evalatuon of the anaeshesic potency of medetomidine - ketamine convinations in rats, guinea pigs and rabbits. *Acta Vet Scand* 1989; 85: 139 - 143
22. Núñez E. Determinación del Margen de Seguridad e Índice Terapéutico del 2, 2,2- Tribromoetanol en Rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*) administrado por vía intraperitoneal. Tesis. UNAM, 2008
23. Norma Oficial Mexicana NOM – 068- ZOO – 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio. SSA. México, 1999.
24. Norris ML, Turner WD. An evaluation of Tribromoethanol (TBE) as an anaesthetic agent in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim. Sci.* 1993, pp 17, 324 – 329.

25. Olivares B. Estudio Histopatológico tras la Administración Crónica del 2, 2,2-Tribromoetanol en Dos Especies Rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*). Tesis: UNAM, 2008.
26. Papaioannou VE, Fox JG. Efficacy of Tribromoethanol Anaesthesia in Mice. *Lab. Anim Sci.* 1993 Apr; 43(2): 189 – 92.
27. Richard J. Hawleys condensen Chemical Dictionary. Fourtenta editions. USA 2001. pp 583, 584, 1117
28. Santervas L. del 2, 2,2- Tribromoetanol en Rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*), tras la Aplicación Única por Vía Intraperitoneal. Tesis. UNAM, 2008.
29. Seymour, Manual de anestesia y analgesia en pequeños animales. España Ed. S. 2001. pp 2 – 23.
30. Thompson. Early effects of tribromoethanol, ketamine/ xylazine, pentobarbital, and isofurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR. *Comp. Med.* 52 (1), 63 - 57. 2002
31. Vidrio H, Rojas J. Principios de Farmacología General 1 Edición. Editoteal Pronfopab 1987. pp 85 - 91
32. Villanueva O. Guía de Anestésicos más utilizados en Animales del Laboratorio 1 era Edición, ISBN 2 Mayo 2007. pp 23 - 32
33. Zeller W, Meier G, Burki K, Panoussis B Adverse Effects of Tribomoethanol as Used in the Production of transgenic mice. *Lab Anim.* 1998, Oct; (4) : 407 – 13
34. Zutphen L F M, Rozemond H, Beynen A C, eds Animal experimentation: Legislation and education. Proceedings EC Workshop, Bilthoven, the Netherlands, May 22 – 24, 1989
35. 2,2,2 - Tribromoethanol (En línea) Disponible: <http://www.chemyq.com>- 2011
36. 2,2,2- Tribromoethanol (En línea) Disponible: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetai/FLUKA/90710> - 2011
37. 2,2,2 - Tribromoethanol (En línea) Disponible: <http://www.info.med.yale.edu/iacuc/policies/avertin.html>

CAPITULO 10

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de conversión de porcentajes en unidades de probabilidad (probitas)

Se determina el 0% y el 100% de respuesta en unidades de probabilidad (probit) con las siguientes formulas

$$0\% = 0.25/n * 100$$

$$100\% = n - 0.25/n * 100$$

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	===	2,674	2,546	3,119	3,249	3,355	3,445	3,524	3,595	3,659
10	3,718	3,772	3,625	3,874	3,920	3,964	4,005	4,045	4,085	4,122
20	4,158	4,194	4,228	4,261	4,254	4,326	4,357	4,387	4,417	4,447
30	4,476	4,504	4,532	4,560	4,587	4,515	4,642	4,668	4,695	4,721
40	4,747	4,773	4,798	4,824	4,849	4,274	4,900	4,925	4,950	4,975
50	5,000	5,025	5,050	5,075	5,100	5,126	5,151	5,176	5,202	5,222
60	5,253	5,279	5,205	5,332	5,358	5,385	5,413	5,440	5,456	5,496
70	5,524	5,553	5,583	5,613	5,643	5,874	5,706	5,789	5,772	5,806
80	5,842	5,979	5,915	5,954	5,994	5,086	6,080	6,126	6,175	5,227
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
90	6,282	6,287	6,293	5,299	6,305	6,321	5,317	6,322	6,329	6,335
91	6,341	6,347	6,353	6,359	6,366	6,372	6,379	6,385	6,392	6,398
92	6,405	6,412	6,419	6,426	6,433	6,440	6,447	6,454	6,451	6,468
93	6,476	6,483	6,491	6,498	6,506	6,514	6,522	6,530	6,528	6,546
94	6,555	6,563	6,572	6,580	6,589	6,598	6,607	6,616	6,625	6,635
95	6,645	6,653	6,665	6,675	6,685	6,695	6,705	6,717	6,728	6,739
96	6,751	6,762	6,774	6,787	6,799	6,812	6,845	6,838	6,852	6,866
97	6,881	6,896	6,911	6,927	6,943	6,960	6,971	6,995	7,014	7,033
98	7,054	7,075	7,097	7,120	7144	7,170	7,197	7,226	7257	7,290
99	7,326	7,368	7,409	7,457	7,512	7,576	7,662	7,748	7,875	8,090

Anexo 2. Preparación del 2,2,2- tribromoetanol al 2% en alcohol.

Preparación de TBE a concentración 1000 mg/ mL al 2% en alcohol

- 2.5g de TBE
- 12.5 mL de etanol
- 10 mL solución salina isotónica

Preparación de TBE a concentración 300 mg/mL al 2% en alcohol

- 0.75 g de TBE
- 3.75 mL de etanol
- 20.5 mL de solución salina isotónica

PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACION

- I. Pesar la cantidad deseada de TBE, y pasar a un frasco ámbar para evitar su descomposición.
- II. Agregar el etanol indicado, dependiendo de la concentración deseada y disolver todo el tribromoetanol.
- III. Una vez disuelto el tribromoetanol, agregar la solución salina isotónica hasta a completar un volumen final de 25 mL.

Nota: La solución de tribromoetanol debe de ser guardada en refrigeración y en un frasco ámbar después de su uso, así se evitara su descomposición y puede ser utilizada nuevamente sin presentar un riesgo para el animal.