

UN TEST BIOLOGICO PARA EL CARDIAZOL

OSCAR ESPINAL

*Departamento de Farmacologia, Facultad de Medicina,
Universidad de San Marcos.*

En la actualidad existen diversos métodos químicos para la determinación cualitativa (14) y cuantitativa (8, 15) del cardiazol. En ciertas circunstancias, especialmente cuando se trata de descubrir cantidades sumamente pequeñas de esta droga en líquidos orgánicos, se requieren métodos biológicos. Se ha empleado el ratón, que es sensible aún para 1 mgr. por vía intraperitoneal (14) o sea a la dosis de 50 mgr. $\times$ Kgr. de peso.

Los estudios que se han verificado sobre la acción del cardiazol en los artrópodos revelan que estos organismos son mucho más sensibles que los vertebrados inferiores (4) y se ha sugerido su empleo en el bicdosaje de ciertos analépticos de este tipo (5). Entre los artrópodos ninguno ofrece más ventajas para estudios de laboratorio que el camarón de río *Palemon gaudichaudii* (sin. *Bithynis caementarius*). Morfológicamente tiene las características del conocido *Astacus fluviatilis* que se describe en casi todos los tratados de Biología y de Zoología. Este crustáceo es sensible al cardiazol no sólo a dosis muy pequeñas sino que presenta el mismo tipo de reacciones nerviosas que los mamíferos superiores (4 y 5). Por este motivo hemos estudiado en detalle su sensibilidad al cardiazol y las variaciones estacionales y térmicas de la misma.

MÉTODO

Se seleccionaron camarones cuyo peso variaba entre 10 y 20 grs. A los que tenían el mismo peso, con variaciones no mayores de un gramo, se les inyectó la misma dosis de cardiazol en los músculos abdominales. Se utilizó una solución de cardiazol al 1%. Los resultados se agruparon en cuatro series: 1, ninguna reacción; 2, estado de excitación motriz; 3, convulsiones clónicas; 4, convulsiones tónico-clónicas.

Por las observaciones estadísticas sobre el dosaje biológico de medicamentos practicadas en miles de animales por TREVAN y VAN WIJNGAARDEN se sabe que el número de animales experimentados tiene gran importancia. "La experimentación fisiológica de acuerdo con las deducciones estadísticas, precedentes, dicen PENAU & SIMONNET (12), permiten fijar en 30 el número de animales que conviene poner en experiencia para obtener una respuesta fisiológica precisa". Esta conclusión es válida ya se trate de la dosis mortal mínima o mejor todavía de la dosis eficaz. L. D. 50 (dosis letal) de un tóxico o de un cardiotónico, o de una respuesta fisiológica mortal del todo o nada, como la dosis eficaz de insulina que provoca, por ejemplo, el 50% de convulsiones en un grupo de 30 ratones". Aplicando este criterio a la acción convulsivante del cardiazol sobre el *Palemon gaudichaudii*, hemos empleado por lo menos 30 animales, en general 60, para la determinación del efecto de cada dosis, y de cada punto de las curvas. Así, sólo para la determinación de la curva 1 que corresponde al cuadro 1, fueron utilizados 700 camarones. Por supuesto, cada uno de los resultados obtenidos gracias a este procedimiento sólo tiene valor para una temperatura determinada (temperatura del agua) y para una estación, pues existen en estos animales variaciones fisiológicas estacionales.

El biodosaje verificado con el método que acabamos de reseñar no está libre de crítica. En general, todo biodosaje o determinación de la toxicidad de un medicamento que se funda en inyecciones individuales, adolece de muchos factores de error, siendo los principales la determinación del peso, que de hacerse con gran exactitud haría al procedimiento sumamente laborioso y no práctico; y la determinación de la dosis individual referida al peso, pues aún utilizando jeringas muy bien calibradas es prácticamente imposible inyectar —sobre todo teniendo en cuenta las pequeñas dosis que estos animales requieren— exactamente la dosis individual; pero esta objeción se puede aplicar a todos los biodosajes que utilizan pequeños animales (ratones, ranas, etc.).

RESULTADOS

Inmediatamente después de la inyección se observa colapso (pérdida de movimientos y equilibrio) que sólo dura 5 u 8". Si no experimenta ataque el animal se incorpora y durante 3 o 4' se manifiesta muy agitado (rápidos movimientos de las patas ambulatorias y pleópodos). No se considera esta reacción entre los resultados positivos. Las dosis muy pequeñas no producen agitación.

Dosis mayores producen convulsiones clónicas en los músculos abdominales, las que duran 5 o 10". Dosis aún más fuertes producen convulsiones tónicas y clónicas; las primeras se observan en las grandes pinzas y en las patas ambulatorias, que se contraen en extensión y flexión respectivamente. Los músculos abdominales también suelen contracturarse en flexión cuando la reacción es más intensa. El ataque sólo dura breves segundos (5 ó 10"), pero con dosis muy fuertes puede llegar hasta 30 ó 50". Al fin de la reacción se presenta evacuación de glándula verde.

La dosis convulsivante mínima (v. tabla I) se encontraría entre 10 y 15 mgr. $\times$ Kgr. de cardiazol. La fig. 1 se refiere a la relación de dosis y reacción teniendo en cuenta tanto las convulsiones tónicas como las clónicas (convulsiones totales).

Si se tiene en consideración que se trata de inyección intramuscular este resultado es muy notable e indica que el *Palemon gaudichaudii* posee una sensibilidad extraordinaria para el cardiazol. En efecto, las dosis liminares para el perro y por vía endovenosa están comprendidas también entre 10 y 15 mgr. $\times$ Kgr. (6). Si se tiene en cuenta que las relaciones entre las dosis intravenosa e intramuscular son, según BIEH-

TABLA I

Número de Experimentos	Cardiazol mgr. $\times$ Kgr.	Convulsiones (% Total)	Convulsiones Tónico-Clónicas %	Convulsiones Clónicas %
30	5	0	0	0
60	10	0	0	0
60	15	25-25	5	20
90	20	66-67-64	0-0	66-67-36
60	25	39-43	4-0	35-43
60	30	80-88	53-51	27-37
60	35	91-85	60-55	31
60	40	100-84	83-76	17-8
60	45	93-97	64-87	33
60	50	100-100	82-90	17-10
60	55	100-100	80	20
30	60	100	79-95	21-5
30	70	100	84-83.7	16-16.3
30	80	100	100	
30	90	100	100	

LER (1) de 1 a 2.7 o de 1 a 3.5, el camarón de río es 2 o 3 veces más sensible que el perro (y posiblemente también que el hombre) a este analéptico. Este resultado es en sumo grado paradójico pues el atropodo posee una masa de tejido nervioso referida al peso corporal mucho menor que el mamífero. Este caso es una importante excepción a la regla de que las dosis activas de los convulsivantes, y de otras drogas que actúan sobre el cerebro, se encuentran en estricta correspondencia con el desarrollo relativo (número de gramos de peso cerebral por kilogramos de peso corporal) de dicho órgano (v. el ejemplo de la acción convulsivante de la cocaína, citado por ZUNZ).¹

¹ E. ZUNZ : "Éléments de Pharmacodynamie Spéciale", pag. 120. Paris, 1932.

Existe, sin embargo una diferencia notable entre las curvas de la acción convulsivante del mamífero y del atrópodo. En el primero rápidamente se obtiene la dosis máxima (D. C. 100), de suerte que toda la curva está comprendida entre las cifras 10 y 20 (mgr. $\times$ Kgr.). En el caso del atrópodo es preciso llegar a 80 mgr. $\times$ Kgr. para obtener convulsiones tónico-clónicas en el 100 % del total de casos estudiados (v. tabla I y fig. 2). En otros términos, la zona manejable es muy reducida en el mamífero y muy amplia en el atrópodo.

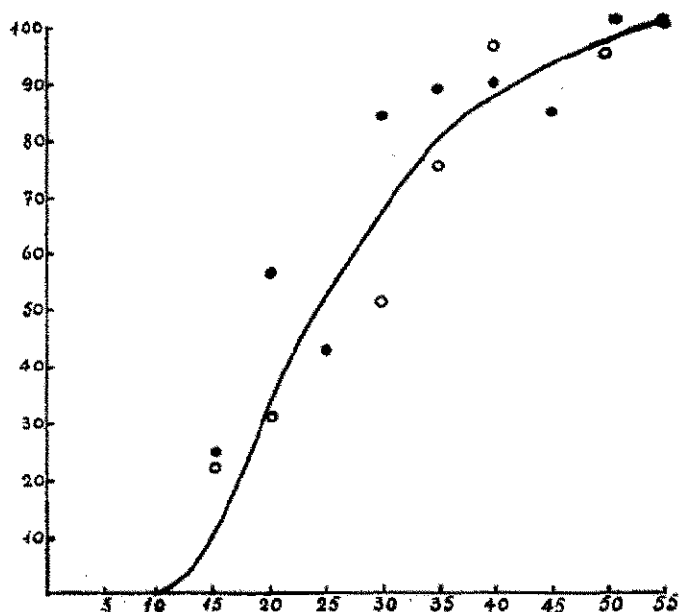
Existe además otra diferencia muy importante. En los mamíferos superiores (perro u hombre) el ataque cardiazólico está regido, con muy raras excepciones por la *ley del todo o nada*; son raros los casos en que el ataque queda reducido sólo a convulsiones clónicas, siendo la regla que el ataque se manifieste típicamente o que no se presente del todo. En el atrópodo esto no ocurre, se manifiestan una serie de reacciones disociadas. Así, examinando la tabla I advertimos que en gran número de casos sólo se presenta un ataque clónico, por lo cual hemos creído conveniente tabular por separado las dos reacciones. Si las consideramos en esta forma, existe una aparente relación de antagonismo entre ellas, observándose en la tabla I que mientras que los ataques tónico-clónicos aumentan con la dosis, los ataques exclusivamente clónicos disminuyen.

En relación a la utilidad del camarón de río como medio para descubrir muy pequeñas cantidades de cardiazol es necesario considerar independientemente dos hechos. En primer lugar la notable sensibilidad de este crustáceo a la droga, que permite revelar la presencia de muy pequeñas cantidades. En este sentido el camarón de río es superior al ratón que hasta hoy se ha empleado como test biológico para descubrir cantidades muy reducidas de cardiazol en líquidos orgánicos. Para un camarón de 10 grs. de peso solo se requiere 0.5 mgr. de cardiazol para producir convulsiones en el 100 % de casos; y cantidades aún mucho menores (hasta 0.15 mgr.) aunque con resultados menos constantes. En el grillo común se pudo obtener reacciones convulsivas con 50 γ de cardiazol (5). Por consiguiente este crustáceo y otros atrópodos ofrece mejores resultados que los vertebrados para descubrir cantidades muy pequeñas de aquel analéptico.

Los resultados que acabamos de referir se refieren exclusivamente a las reacciones obtenidas durante el verano y a la temperatura de 23 o 24°C. La misma investigación practicada en invierno, a temperaturas algo inferiores (18°C) reveló algunas diferencias. La sensibilidad del crus-

táceo al cardiazol es algo menor en estas circunstancias (v. figs. 1 y 2) aunque la diferencia no es tan notable como era de esperar.

Los mismos grupos de camarones que se utilizaron en esta serie de experimentos fueron mantenidos, por lo menos por media hora, a la temperatura de 24°C, es decir, a la temperatura estival, y luego sometidos al mismo ensayo con el cardiazol. En algunos casos se observó un aumento significativo en la frecuencia de convulsiones; pero el resultado no



*Convulsiones tónico-clónicas producidas por el cardiazol en el *Palemon Gaudichaudii* (total de reacciones convulsivas). Abscisa, dosis; ordenada, frecuencia de reacciones. Cada punto de la curva corresponde al resultado de 30 o 60 experimentos. Los puntos negros indican los resultados obtenidos durante el verano (temperatura del agua 24°C), y los círculos los resultados obtenidos durante el invierno (18°C).*

fué constante y por el momento es conveniente no generalizarlo, en espera de nuevas observaciones.

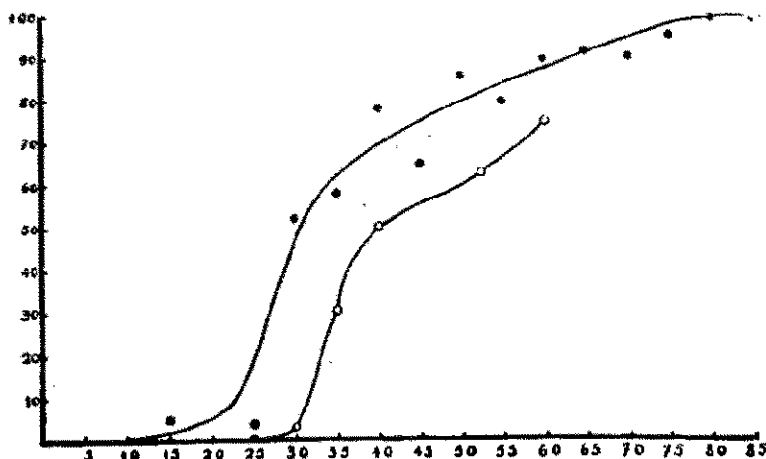
En cuanto a la duración de las convulsiones, se observaron variaciones con la dosis. Para dosis de 40 a 50 mgr. X Kgr. se obtuvo reacciones de 8 o 10 segundos con períodos de latencia de 10 a 15". Para dosis de 120 mgr. X Kgr. la duración media de las convulsiones es de 20" y para la fuerte dosis de 160 mgr. X Kgr. la duración media es de 30

o 35". La cifra mayor registrada en este último caso fué de 60", aproximadamente igual al proceso convulsivo del mamífero.

La resistencia del crustáceo al cardiazol es muy nctable. La zona manejable entre la dosis convulsiva y la letal es muy amplia. Así, para la dosis de 120 mgr. $\times$ Kgr. sólo se obtuvo 2% de mortalidad.

DISCUSIÓN

Por supuesto, en la actualidad existen excelentes métodos químicos para el dosaje del cardiazol : de la precipitación del cardiazol por el bicloruro de mercuric, LEPPERT (11); el método de ZWIKKER (15) funda-



Convulsiones tónicas producidas por el Cardiazol en Palemon gaudichaudii.
Véase detalles en la leyenda de la pág. 1.

do en la formación de un compuesto insoluble con el cloruro cuproso; el método de ESSER & KÜHN (3) que consiste en extraer el cardiazol de los tejidos acidificados con SO_4H^2 con alcohol; el método de HINSBERG (8) aplicable sólo a soluciones puras de la droga, y que consiste en su precipitación por ácido fosfotungstico; el método de cloruro cúprico para precipitar el cardiazol, se utiliza sólo en determinaciones cualitativas. Finalmente, el procedimiento de KOZELKA, NELSON & TATUM (9) para la extracción del cardiazol de los tejidos, los que se someten a la acción de 20 % de ac. acético, se precipitan las proteínas con tungstato de sodio, se extrae el cardiazol con éter y se purifica por microdestilación a

baja presión. Cuando las cantidades halladas son demasiado pequeñas para la determinación de su peso se utiliza el biodosaje. Es decir, a pesar de los diversos métodos químicos el biodosaje es siempre útil.

Existe, no obstante grandes discrepancias de la reacción de los animales al cardiazol. TATUM & KOZELKA (14) propugnan el biodosaje del cardiazol por el ratón, fundándose en el hecho de que 1 mgr. es la dosis convulsivante mínima para un ratón de 20 grs., es decir, a la dosis de 50 mgrs. $\times$ Kgr.

Desgraciadamente, la reactividad de los animales varía mucho con múltiples factores, y se requiere un procedimiento que permita al mismo tiempo máxima constancia de reacciones y animales muy sensibles. Basta considerar la variabilidad de las dosis convulsivantes encontradas por diversos autores en el cobayo para darse cuenta de las dificultades del problema: 35 mgr. $\times$ Kgr., según HILDEBRANDT & VOSS (7); 40 mgr. $\times$ Kgr. según los mismos autores y SCHUBEL & GEHLEN (13); CAMP (2) y LENDLE (10). El camarón de río (*Palemon gaudichaudii*) es un animal extraordinariamente sensible a los convulsivantes, inclusive al cardiazol. Mientras que para el ratón la dosis convulsivante mínima es de 1 mgr. $\times$ gr. GUTIÉRREZ-NORIEGA (5) demostró que en aquel crustáceo la dosis convulsivante mínima es 50 y $\times$ 10 a 20 grs. Nosotros hemos observado que la dosis convulsivante mínima es de 150 y la máxima (D. C. 100) es de 0.5 mgr. para ejemplares de 10 a 20 grs. Por ser el camarón de río mucho más sensible al cardiazol que la mayoría de los vertebrados inferiores, y por reunir muchas condiciones que permiten utilizarlo en los análisis biológicos, se realizó el presente trabajo.

En resumen, recomendamos al empleo de camarón de río para la determinación de dosis muy pequeñas de cardiazol, pero no para determinaciones cuantitativas. Es posible que un perfeccionamiento del método, en especial la selección de animales del mismo peso, permita esta última aplicación, siempre que se considere a las variaciones estacionales y térmicas.

CONCLUSIONES

Se ha estudiado la sensibilidad del crustáceo *Palemon gaudichaudii* al cardiazol. Se ha demostrado que la dosis convulsivante media (D. C. 50) por vía intramuscular se encuentra entre 20 y 25 mgr. $\times$ Kgr., y la máxima (D. C. 100) corresponde a 50 mgr. $\times$ Kgr. Este organismo puede utilizarse para la determinación de muy pequeñas dosis de cardiazol, pues es relativamente más sensible que los vertebrados superiores.

Pero las variaciones de sensibilidad individual son mayores en el artropodo que en el vertebrado.

Se observó que durante el invierno disminuye apreciablemente la sensibilidad del crustáceo al cardiazol.

CONCLUSIONS

It has been shown that metrazol has convulsant action in *Palaemon gaudichaudii*, a shrimp from the peruvian rivers. The C. D. 50 by intramuscular injection was 25 mgr. $\times$ Kgr., and the C. D. 100 was 50 mgr. $\times$ Kgr. It was found seasonal variations : the suceptibility to metrazol decreases during winter.

BIBLIOGRAFÍA

1. W. BIELHER : *Allgemeinen Zeitschr für Psychiatrie und ihre Grenzgebiete*, v. 116, p. 2, 7940.
2. W. J. R. CAMP : *Journ. Pharm. and Exper. Therp.*, v. 33, p. 81, 1928.
3. ESSER & KUHN : *Dent. Ztschr. für d. ges gerichtl. Med.*, v. 21, p. 474, 1933.
4. C. GUTIÉRREZ-NORIEGA : *Actas de la Segunda Reunión de las Jornadas Neuro-Psiquiátricas Panamericanas*, v. 2, p. 236, 1939.
5. C. GUTIÉRREZ-NORIEGA : *Revista de la Sociedad de Biología de Lima*, v. 1, p. 32, 1939.
6. C. GUTIÉRREZ-NORIEGA : *Revista de Medicina Experimental*, v. 2, p. 75, 1943.
7. F. HILDEBRANDT & J. VOSS : *Münch. Med. Wschr.*, v. 73, p. 862, 1926.
8. HINSBERG : *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.*, v. 192, p. 90, 1939.
9. F. L. KOZELKA, NELSON & H. TATUM : *Journal of Pharm. and Exper. Therp.*, v. 72, p. 123, 1941.
10. L. LENDLE : *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, v. 181, p. 408, 1936.
11. LEPPERT : *Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.*, v. 122, p. 362, 1927.
12. H. PENAU & H. SIMONNET : *Regles generales de l'essai biologique des medicaments*, Paris, 1932.
13. K. SCHUBEL & W. GEHLEN : *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, v. 133, p. 295, 1928.
14. H. J. TATUM & F. L. KOZELKA : *Journ. Pharm. and Exper. Therp.*, v. 72, p. 284, 1941.
15. ZWIKKER : *Pharm. Weekblad*, v. 71, p. 1170, 1934 (cit. Tatum & Kozelka).