

Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza
(Prof. F. Grande)

Ineficacia de la ditizona como agente diabético en el perro

por V. Alcalde, A. Colás, F. Grande y V. Peg

(Recibido para publicar el 2 de agosto de 1952)

En 1950, el investigador japonés I. Kadota, describió el efecto diabético de la oxina (8-hidroxiquinolina) y de la ditizona (difeniltiocarbazona) en el conejo, como resultado de sus investigaciones acerca de la producción de diabetes experimental, utilizando una serie de compuestos orgánicos que poseen la propiedad común de ser capaces de reaccionar con el zinc.

Entre los seis compuestos orgánicos empleados por el autor japonés, sólo los dos mencionados cuerpos desarrollaron acción diabética, lo que parece indicar que la sola capacidad de reaccionar con el cinc no es bastante para conferir propiedades diabéticas a una sustancia. Pero además, a diferencia de lo que parece ocurrir con la aloxana, la inyección intravenosa de oxina o de ditizona no produce efecto diabético más que en algunas especies animales, y hasta el presente sólo se han comunicado efectos positivos en el conejo. Las experiencias publicadas por Grande y Oya en 1950 demuestran que la oxina no posee acción diabética evidente en el perro, e incluso en el conejo los resultados son mucho menos demostrativos que los publicados por Kadota. Debe señalarse, además, que las variaciones glucémicas que se producen en las primeras horas después de la inyección de la oxina no son completamente superponibles a las que se observan después de la inyección de aloxana, hecho que, a nuestro juicio, debe ser tenido en cuenta.

La falta de acción diabética de la oxina en el perro ha sido descrita también en el reciente trabajo de Root y Chen (1952).

Estos autores observaron diabetes pasajera después de la inyección de 50 mg. de oxina por kilogramo de animal en tres de treinta y dos conejos inyectados. La oxina no fué diabetógena en otras especies como la rata, el gato y el cobayo. El efecto es, pues, mucho menos acusado que el señalado por Kadota.

Por lo que respecta a la ditizona, Root y Chen dicen que es posible producir con ella diabetes en el conejo si se consigue inyectar cantidad suficiente; pero no describen su efecto en el perro.

Es fácil comprender la importancia del estudio de la acción diabetógena de otros compuestos químicos, para tratar de explicar el mecanismo de acción de la aloxana y el modo de producción del síndrome diabético causado por la inyección de esta última sustancia. Por ello hemos considerado importante estudiar el efecto de la ditizona sobre la regulación glucémica del perro, con ánimo de establecer las posibles relaciones entre el efecto de esta sustancia y la acción diabetógena de la aloxana.

Los resultados obtenidos hasta el presente han sido completamente negativos, y en nuestras condiciones experimentales la ditizona no produjo en ningún caso diabetes, aunque sí hemos observado variaciones glicémicas iniciales que recuerdan en parte a las descritas por Kadota en el conejo.

La negatividad de los resultados obtenidos, primero con la oxina y ahora con la ditizona, constituye, a nuestro juicio, un argumento contrario a la tesis sostenida por Kadota y, en este sentido, consideramos justificada su publicación en la situación actual de la investigación.

Material y métodos

Los experimentos que vamos a describir han sido realizados todos en perros normales sometidos a un ayuno por lo menos de veinticuatro horas antes de la administración de la ditizona. Esta sustancia se inyectó siempre por vía intravenosa, utilizando la vena safena y en forma de solución al 0,25 % en solución amoniacal al 0,5 %. La solución amoniacal fué calentada a 70° durante dos horas, llevándola luego hasta la ebullición, para expulsar el exceso de amoníaco. Para descartar el efecto que el amoníaco que quede en la solución puede tener en los resultados, se hicieron una serie de experimentos testigo en los que se inyectó solución amoniacal de idéntica concentración y tratada de igual manera; pero sin ditizona. Las soluciones se filtraron inmediatamente antes de la inyección, que se practicó a la velocidad media de 40 cc. por minuto, inyectando con un dispositivo de presión.

Las muestras de ditizona empleada fueron en dos casos, de procedencia alemana (marcas Schuchardt y Merck) y, en otros dos,

marcas nacionales (Doesder y Riser). Todos los productos tenían el mismo punto de fusión y análoga solubilidad, aunque la ditizona Schuchardt dejaba un ligero residuo insoluble no observado con las otras muestras.

Los métodos empleados para la determinación de la glucemia fueron el de Folin-Wu, y en algunos casos el de Hagedorn-Jensen. Todos los valores representan medias de determinaciones dobles. Las curvas de tolerancia consistieron, de acuerdo con lo descrito por Oya y Grande (1944), en la administración de un gramo de glucosa por sonda gástrica, por cada kilogramo de animal. Se toman muestras de sangre venosa inmediatamente antes y, a los treinta y sesenta minutos de la sobrecarga. Inmediatamente después de esta última toma de sangre se practica una nueva sobrecarga de otro gramo de glucosa por kilo de animal, repitiendo la toma de muestras de sangre a los treinta y sesenta minutos de la misma.

Resultados

La inyección de ditizona en la forma descrita y a dosis comprendidas entre 25 y 100 mg. por kilo de animal produce, en el perro, un cuadro de excitación pasajera, seguido de un período más o menos largo de postración y adinamia. A poco de iniciarse la inyección, los animales vomitan y defecan, y muestran notable midriasis. Hacia el fin de aquélla suelen presentarse crisis convulsivas pasajeras, de violencia variable, que, en general, ceden al cabo de algunos minutos para dejar paso a un período de postración, al que antes aludimos.

El comportamiento de los primeros animales inyectados fué muy parecido, y todos murieron, al cabo de cuatro o más horas, con un cuadro de edema agudo de pulmón, que se presentó, a veces, súbitamente, cuando el animal se encontraba en estado de aparente normalidad. El edema pulmonar se manifestó de modo muy parecido en todos los animales: El perro comienza a estar intranquilo, y rápidamente se desarrolla una disnea cada vez más manifiesta; en este momento, el animal, que ejecuta movimientos respiratorios violentísimos, sufre a modo de accesos de tos que, a veces, van seguidos de la aparición de espuma en la boca y nariz. Este signo suele preceder muy de cerca a la muerte, que sobreviene en el curso de muy pocos minutos. La mayor parte de los animales del primer grupo de nuestras observaciones murieron entre las cuatro y nueve horas, sobreviniendo en todos ellos el cuadro de edema pulmonar con notable brusquedad, y ocasionando la muerte del perro en muy pocos minutos. La autopsia practicada inmediatamente demostró en todos estos casos un pulmón enor-

TABLE I
Resultados de las experiencias de inyección de ditizona en perros

Perro número.	Ditizona mg. kg.	Resultado Tiempo después inyección)	Diabe- tes	Edema pulmo- nar	Observaciones
1	30	Muere a las 4 horas	—	Sí	
2	50	" " " 9 "	—	Sí	
3	50	" " " 8 "	—	Sí	
4	30	" " " 4 "	—	Sí	
5 b	100	" " " 4 "	—	Sí	Inyectado anterior- mente dosis menores
6	30	" " " 3 días	No	Sí	
8	30	Sobrevive	No	No	
8 a	50	"	No	No	El mismo animal que en 8.
8 b	75	"	No	No	El mismo animal que en 8.
9	75	Muere a las 5 horas	—	Sí	
14	75	" " " 8 "	—	Sí	
15	75	Sacrificado a las 24 horas	No	No	
16	75	" " " 24 "	No	?	
17	75	" " " 24 "	No	Sí	
18	75	" " " 26 "	—	?	Pulmones congestivos
20	100	" " " 30 "	—	?	" "
21	100	" " " 30 "	—	?	" "
22	100	Muere a las 15 horas	—	?	" "
25	75	Sacrificado a los 8 días	No	No	Pulmón de aspecto normal.
26	70	Muere a las 22 horas	—	?	Pulmón hemorrágico aumentado volumen.
29	75	Sacrificado a las 24 horas	—	?	
33	75	Muere a las 32 horas	No	Sí	
34	75	Sacrificado a los 6 días	No	No	
35	75	" " " 9 "	No	No	Ligera congestión pulmonar.
36	100	" " " 3 "	No	No	
37	100	" " " 30 "	No	No	

Los animales 1 a 14 inclusive, fueron inyectados con Ditizona «Schu-
hardt»; los 15 a 22 y el 29 con Ditizona «Doesder»; el 25 y 26 con Diti-
zona «Merck», y del 33 en adelante con Ditizona «Riser».

El signo — indica que las cifras de glucemia no pueden ser consi-
deradas para establecer la existencia de diabetes, cuando han sido tomadas
antes de las veinticuatro horas de la inyección de Ditizona. En animales
muertos o sacrificados, después de este período, el signo indica que no
hay datos en cuanto a la cifra de glucemia en ayunas.

memente aumentado de volumen, que al corte da abundante líquido ligeramente sonrosado y con espuma. Los bronquios y tráquea aparecen también llenos de espuma, y la observación histológica demostró sin duda la existencia de un intenso edema de pulmón.

La producción de edema pulmonar por la ditizona, que no hemos visto descrita en la literatura a nuestro alcance, nos pareció de interés por varias razones, entre otras porque, como es sabido, la aloxana a dosis elevadas, es también capaz de producir edema agudo de pulmón (ver Grande y Oya, 1944). Por ello decidimos continuar nuestros estudios atendiendo no sólo a la producción o no producción de diabetes, sino también al desarrollo del edema pulmonar.

Por lo que respecta al desarrollo de diabetes, es evidente que los animales primeramente inyectados no dieron luz alguna sobre el efecto de la ditizona a este respecto, a causa de la rapidez con que mueren. Sin embargo, cuando se consiguieron animales que soportaron la inyección de ditizona sin mostrar edema pulmonar, o cuando éste se presentó más tardíamente, fué posible ver que en ningún caso se producían alteraciones glucémicas a las veinticuatro horas, suficientes para considerar que el animal se había hecho diabético. En este sentido nuestros resultados son totalmente negativos, como puede verse en la Tabla I, en la que se muestra cómo todos los animales que sobrevivieron por lo menos veinticuatro horas después de la inyección de ditizona y fueron examinados en cuanto a su nivel glucémico en ayuno, no mostraron hiperglucemia. No obstante, de acuerdo con los datos de la literatura, la inyección de ditizona produce en el perro ciertas modificaciones glucémicas pasajeras que merecen ser estudiadas más de cerca. Trataremos, por tanto, de exponer ahora separadamente los dos aspectos que consideramos más importantes de nuestros resultados: es decir, el que se refiere a los efectos de la ditizona sobre la regulación glucémica y el que se refiere a la producción del edema pulmonar por la inyección de dicha sustancia.

EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE DITIZONA SOBRE LA REGULACIÓN GLUCÉMICA

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos en veinte experimentos realizados sobre dieciséis perros normales. Es fácil comprobar en ella que la inyección de ditizona a cualquiera de las dosis empleadas, ocasiona una elevación de la glucemia que suele alcanzar su máximo a la hora de la inyección, y que se mantiene más o menos tiempo. Las cifras que poseemos no permiten establecer una relación cuantitativa entre el efecto y la dosis; pero parece existir una cierta tendencia a señalarse un efecto hiperglucemiante más intenso y duradero en los animales tratados con

dosis más elevadas de ditizona. En ningún caso se demostró hipoglucemia dentro de las ocho horas de observación en los animales estudiados a este respecto; parece, por tanto, que, a diferencia de lo que ocurre con la aloxana, no hay aquí una verdadera fase hipoglucémica. Ninguno de los animales que sobrevivió y pudo ser examinado a las veinticuatro horas de la inyección, mostró hiperglucemia suficiente para ser considerado diabético, y en

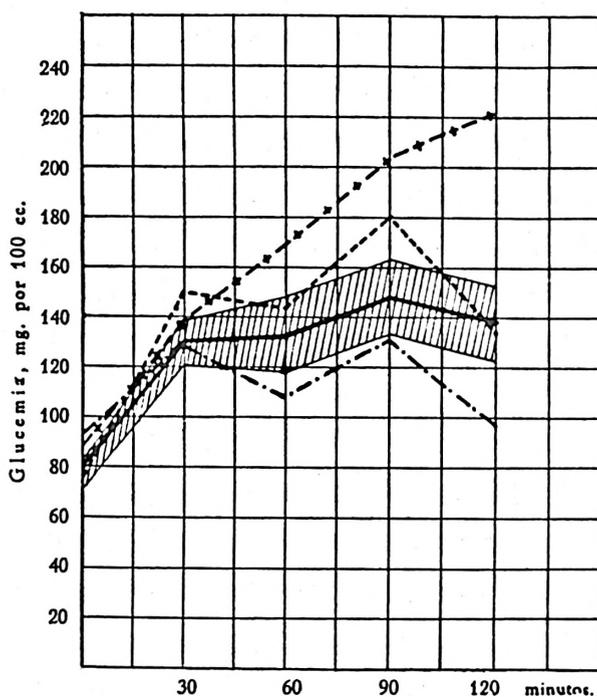


Fig. 1.—PRUEBAS DE SOBRECARGA DE GLUCOSA

(De abajo arriba). Líneas de trazos y puntos: media de 4 perros inyectados con 20-50 mg. de Ditizona por kg. de peso.

Línea continua: media de 52 perros normales (GRANDE y OYA).

Línea de trazos: media de 3 perros inyectados con 75-100 mg. de Ditizona por kg. de peso.

Línea de trazos y cruces: media de 7 perros tratados con 30 mg. de Aloxana por kg. (GRANDE y OYA).

La zona rayada a ambos lados de la línea continua, incluye los valores hasta más y menos tres veces el error standard de la media de los 52 perros normales.

ningún animal de los observados durante períodos más largos, se encontró hiperglucemia significativa. Por esta razón consideramos, como hemos dicho, que la ditizona empleada a las dosis que nosotros hemos utilizado no ejerce en el perro el efecto diabético descrito por el autor japonés en el conejo.

Otra prueba de esta afirmación la tenemos en el estudio de las pruebas de tolerancia a la glucosa practicadas en algunos animales tratados con distintas dosis de ditizona. Según puede observarse en la Tabla III, la glucemia de estos animales en ayuno es normal y las curvas de tolerancia no indican una gran desviación de los valores normales. Si se separan las pruebas obtenidas después

TABLA II
Variaciones glucémicas en los perros después de la inyección de ditizona

Perro núm.	Ditizona mg. Kg.	Glucemia, mg. por 100 cc.										
		Antes Ditizona	Tiempo desoués de la inyección de Ditizona, en horas									
			1	2	3	4	5	6	7	8	24	
1	30	107	185	185	157	—	—	—	—	—	—	—
2	50	95	116	106	145	139	106	107	107	96	—	—
3	50	80	188	177	133	—	119	119	119	90	—	—
4	30	66	99	86	63	—	—	—	—	—	—	—
5	25	61	118	90	71	74	86	63	81	67	91	—
5 a	50	105	138	138	—	134	131	—	120	—	102	—
5 b	100	100	194	—	—	101	—	—	—	—	—	—
6	30	83	171	175	161	—	157	116	110	112	101	—
8	30	100	209	178	172	175	157	148	133	146	102	—
8 a	50	80	97	108	96	—	99	—	—	—	80	—
8 b	75	68	163	—	—	140	—	121	—	113	104	—
9	75	90	164	—	—	188	—	—	—	—	—	—
18	75	113	—	—	—	—	—	157	—	—	113	—
25	75	110	239	199	—	—	—	—	—	—	84	—
26	70	107	222	231	—	—	—	—	—	—	—	—
33	75	124	312	290	—	—	150	—	—	—	—	—
34	75	80	174	143	204	—	—	—	—	—	130	—
35	75	—	174	199	189	—	—	—	—	—	110	—
36	100	86	—	—	115	96	—	110	—	—	101	—
37	100	116	—	—	74	130	—	116	—	—	87	—

de las dosis altas y bajas de ditizona, respectivamente, se ve que las primeras inducen, al parecer (fig. 1), una ligera disminución de la tolerancia; pero no creemos justificado deducir de estos datos que la ditizona haya alterado en nuestros casos la regulación glucémica de manera importante. La dosis de 30 mg. por kilogramo de aloxana, que no se considera habitualmente dibetógena en el perro, produce en este animal una disminución de la tolerancia

mucho más marcada que la que observamos en el grupo de animales inyectados con 75 a 100 mg. de ditizona. (Ver fig. 1.)

PRODUCCIÓN DE EDEMA PULMONAR POR LA DITIZONA

Al lado de la ineficacia diabetógena de la ditizona en el perro, demuestran nuestras observaciones que esta sustancia es capaz de producir edema pulmonar en dicho animal. La producción del edema, sin embargo, no es un fenómeno que se presente de manera sistemática, y dentro de nuestra experiencia no parece guardar relación con la dosis de ditizona, pues aparece en algunos animales

TABLA III

*Pruebas de tolerancia de glucosa en perros tratados con ditizona
(Doble sobrecarga de 1g de glucosa por kg., cada vez)*

	Ditizona mg./Kg.	Glucemia, mg. por 100 cc.				
		Antes sobrecarga	Minutos después primera sobrecarga			
			30	60	90	120
5	26	86	126	110	113	96
5 b	50	90	113	94	120	96
8	30	103	144	90	140	80
8 a	50	93	134	100	150	124
8 b	75	85	191	197	209	175
35	75	70	122	73	150	86
37	100	70	138	166	178	140

con sólo 30 mg. por kilogramo y, en otros, en cambio, no se observa después de la administración de 100 mg. por kilogramo.

En nuestras primeras observaciones, el cuadro fué tan típico que el diagnóstico de edema pulmonar pudo hacerse con toda seguridad. No obstante, cuando observamos algunos casos dudosos buscamos algún criterio que nos permitiese evaluar la magnitud del edema, recurriendo para ello al cálculo del índice empleado por Luisada, es decir, la expresión del peso del pulmón en tanto por ciento del peso total del animal. De acuerdo con los datos de la literatura, encontramos, como puede verse en la Tabla IV, que el pulmón representa en el perro normal aproximadamente un 1 % del peso total. En cinco casos de edema pulmonar evidente, producido por la ditizona, puede verse que el valor del índice fué de 4,9, llegando a ser de 8,4 en un caso. El valor de este índice, sin embargo, no nos ha parecido decisivo para establecer el diagnóstico del edema pulmonar, ya que cuando dicho índice alcanza

un valor elevado (mayor de 4) todos los demás signos indican claramente la existencia del edema. En muchos de nuestros animales hemos observado un índice ligeramente elevado (1,4 a 2,4); pero el estudio del pulmón no revelaba los demás signos del edema, y el aumento de peso pulmonar parecía deberse, en tales casos, principalmente a congestión sanguínea. Lo que nos parece más curioso de esta observación es el hecho de que sólo algunos animales hayan respondido con producción de edema a la inyección de ditizona. Habiendo usado distintas marcas de ditizona, fué lógico pensar que los distintos productos puedan tener también diferente capacidad para producir el edema, a pesar de que las propiedades de

TABLA IV

Relación entre peso corporal o peso pulmonar en perros normales y con edema pulmonar producido por la inyección de ditizona

Perros normales				Perros con edema pulmonar			
Núm.	Peso total Kg.	Peso pulmón g.	Índice	Núm.	Peso total Kg.	Peso pulmón g.	Índice
19	5,5	43,5	0,8	5	15,0	685	4,5
23	11,0	134,0	1,2	9	5,0	420	8,4
27	10,5	109,0	1,0	14	8,0	400	5,0
30	8,5	83,0	1,0	17	12,5	363	2,9
31	4,5	55,5	0,8	33	7,5	306	4,1
34	11,0	124,0	1,1				
U-1	8,6	107,5	1,2				
Media normales			<u>1,0</u>	Media perros edema pulmonar			<u>4,9</u>

las distintas muestras empleadas (punto de fusión, solubilidad) eran perfectamente comparables. Otro factor que debe tenerse en cuenta, es el factor estacional; y Luisada describe que el edema parece producirse más fácilmente en el verano que en el invierno, lo que este autor pone en relación con la mayor cantidad de sangre que parece contener el pulmón de perro durante el tiempo caluroso. En nuestra experiencia, el edema pulmonar se presentó con máxima intensidad al comienzo del verano de 1951; durante el invierno y la primavera no se volvió a observar ningún caso de edema, y de nuevo volvimos a encontrarlos en el verano del 52; pero en proporción mucho menor que en el verano anterior. Parece, por tanto, que aunque pueda existir una influencia estacional en el desarrollo de este tipo de edema pulmonar, debe haber otros

factores, que aun no conocemos, para explicar nuestras observaciones.

Por lo que respecta a la diferencia entre las distintas muestras de ditizona empleada, no podemos afirmar que sea esta la explicación de los distintos resultados obtenidos; pero, parece indudable que la primera ditizona empleada (de la casa Schuchardt) fué mucho más eficaz como agente productor de edema pulmonar que ninguna de las otras. En contraste con esta diferencia, no parece que exista diferencia alguna en lo que se refiere al efecto diabetógeno, y las cuatro muestras de ditizona ensayadas se mostraron igualmente ineficaces a este respecto.

Discusión

Los resultados que acabamos de exponer muestran, pues, que la ditizona no ejerce efecto diabetógeno en el perro en nuestras condiciones experimentales. Aun cuando se admita que las dosis elevadas (75-100 mg. por kilogramo) producen una leve disminución de la tolerancia, ésta es mucho menor que la observada con las dosis no diabetógenas de aloxana. Ya señalamos, en efecto, que la dosis de 30 mg. de aloxana por kilogramo no produce una diabetes propiamente dicha; pero sí una disminución de la tolerancia (Oya y Grande), que es mucho más manifiesta que la observada después de la ditizona. Es de señalar que el peso molecular de la ditizona es casi el doble que el de la aloxana; pero, aun teniendo en cuenta esta diferencia, es claro que la acción diabetógena de la ditizona es muchísimo menor que la de la aloxana. No es posible decidir si la inyección de dosis mayores de Ditizona podrá producir diabetes. La dificultad está en que dosis más elevadas que las empleadas por nosotros son casi inaplicables por la necesidad de inyectar grandes cantidades de solución. Así, pues, y con esta reserva, nos parece justificado afirmar que la ditizona no parece capaz de producir en el perro un cuadro diabético comparable al que se obtiene con la aloxana.

Estos resultados, por consiguiente, están en oposición con los descritos por Kadota, y unidos a los obtenidos para la oxina por Grande y Oya y por Root y Chen, constituyen, a nuestro juicio, un sólido argumento en contra de los puntos de vista de aquel autor. El hecho de que los dos reactivos del cinc (oxina y ditizona), en contra de lo descrito por Kadota, no produzcan diabetes en el perro, mientras que la aloxana la produce, parece excluir el papel de la reacción entre el agente diabetógeno y el cinc en la génesis de la diabetes.

Por lo que respecta a la producción del edema agudo de pulmón por la ditizona, es poco lo que podemos añadir. Suponiendo que

sea la ditizona misma y no alguna posible impureza la causa del edema, habría que discutir si éste se produce por un mecanismo nervioso o por acción directa de la sustancia sobre los capilares pulmonares. El hecho de que no hayamos podido prevenir la producción de edema pulmonar por administración de ditizona, tratando al animal previamente por dibenammina, parece una indicación en favor del segundo mecanismo. Nuestra experiencia, no obstante, es, en el momento actual, insuficiente para sustanciar esta cuestión.

Resumen

La inyección de soluciones de ditizona por vía intravenosa, en el perro, a dosis comprendidas entre 30 y 100 mg. por Kg., no produjo diabetes.

En las horas siguientes a la inyección se observó una hiperglucemia pasajera, que desaparece en el curso de seis a ocho horas, sin dar lugar a fase hipoglucémica durante dicho período de tiempo.

En cierto número de casos se observó la producción de edema agudo de pulmón después de la inyección de la solución de ditizona.

Las distintas muestras de ditizona empleadas parecen poseer diferente eficacia como productoras de edema pulmonar; pero son todas igualmente ineficaces para producir diabetes, a las dosis empleadas.

Los resultados obtenidos hablan en contra de la hipótesis de KADOTA respecto al mecanismo de la acción diabética de la aloxana.

Summary

The intravenous injection of Dithizone solutions in doses between 30 and 100 mg of Dithizone per Kg body weight, does not produce diabetes in the dog.

A transitory rise of blood sugar is observed during the first few hours following the injection. The blood sugar comes back to normal values in 6 to 8 hours. No hypoglycemia has been observed during this time.

Injection of Dithizone induced acute lung edema in some of the animals. The different samples of Dithizone were not equally efficacious regarding the production of lung edema, but they were all equally unefective to produce diabetes.

These results are considered to speak against Kadota's hypothesis concerning the mechanism of the diabetogenic action of Alloxan.

Bibliografía

- (1) GRANDE, F., y OYA, J. C. DE: *Rev. Clín. Esp.*, **15**, 262, 1944.
- (2) GRANDE, F., y OYA, J. C. DE: *Reunion. Soc. esp. pat. digest.*, 205, 1950.
- (3) GRANDE, F. y OYA, J. C. DE: II Congreso Internacional de Bioquímica, París, 1952.
- (4) KADOTA, I. J.: *Lab. Clín. Med.*, **35**, 568, 1950.
- (5) LUISADA, A. A., y SARNOFF, S. J.: *Amer. Heart J.*, **31**, 270, 1946.
- (6) OYA, J. C. DE, y GRANDE, F.: *Rev. Clín. Esp.*, **16**, 412, 1945.
- (7) ROOT, M. A., y CHEN, K. K.: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **104**, 404, 1952.