

196
290.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**TOXICIDAD AGUDA DE CASIOPEINA II POR
ADMINISTRACION INTRAVENOSA EN RATONES.
ESTUDIO ANATOMOHISTOLOGICO**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista
por

GERARDO FEDERICO QUIROZ ROCHA

Bajo la asesoría de: MVZ Eugenia Candanosa A.
Biól. Ma. Isabel Gracia M.
Dra. Lena Ruiz A.



MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: Por todo el esfuerzo que han hecho para darme una formación, por su amor, su amistad y sus estímulos, porque esta es mi pequeña retribución a su gran herencia, mi educación. Por enseñarme a valorar lo que esta meta significa y serle siempre fiel.

A MI HERMANA GEORGINA: Mi mejor apoyo en los momentos difíciles y mi mejor compañera en los agradables. Mi mejor ejemplo de lo que se logra con empeño y mi bióloga consentida.

A JOSE LUIS NAVARRETE H.: Un orgullo saber que es de la familia.

A MIS ABUELITOS: Como un recuerdo a todo lo que me enseñaron y heredaron todos y cada uno.

A MIS TIOS: Por poder contar con ustedes como otros padres.

A MIS PRIMOS: Amigos siempre.

A MIS ASESORES

Isabel: Porque este trabajo es tanto mío como tuyo.

Lena: Gracias por compartirme una pequeñita rebanada de este, su enorme pastel.

Eugenia: Ojalá todos tuvieran alguien tan desinteresado con quien contar.

Héctor Sumano: Aunque no asesor oficial, sus consejos son siempre útiles.

A MIS AMIGOS: Sin tener que mencionarlos, todos ellos saben lo que agradezco poder contar con ustedes.

A LA CLINICA DAKTARI: en especial al Dr. Aureliano Flores C., por todo lo que ahí aprendí, por darme su confianza y dejarme demostrarme que esto es lo mío, por su apoyo en las buenas y en las malas. Nunca dejaré de agradecerse los (a los tres).

A DIOS Y A LOS ANIMALES: Porque gracias a ellos le encuentro sentido a la vida.

Mamá: ¿Porque el mar no se cansa.....?!

AGRADECIMIENTOS

DR. HÉCTOR SUMANO L.: Por darme una confianza no merecida y abrirme las puertas hacia esta investigación. Por esa invaluable voluntad de ayudar a los que nos iniciamos en la profesión.

BIOL MA. ISABEL GRACIA M.: Por su apoyo, sus conocimientos, sus puntadas, por hacer muy grato todo este tiempo, por enseñarme a querer al proyecto.

DRA. LENA RUIZ A.: Por ser un poco maestra, un poco consejera y como una segunda madre de todo el grupo, Por poderme sentir grato de conocer a una gran investigadora.

MVZ EUGENIA CANDANOSA A.: Por enseñarme que hacer investigación cuesta trabajo, pero deja muchas satisfacciones.

MVZ MABEL C. TINOCO M.: Por ser la culpable de haber tenido la gran fortuna de conocer y participar en este proyecto. Porque sufrimos y gozamos juntos tantas cosas durante la realización de nuestras tesis. Gracias a tu ayuda fue mucho más fácil.

MVZ GRACIELA TAPIA: Por su ayuda en la parte estadística.

LOS SINODALES DE MI JURADO:

Dr. Rene Rosiles M.

MVZ José Ramírez L.

MVZ Rubén López T.

Por todos sus comentarios y recomendaciones hacia el trabajo.

DEPTO. DE Q. INORGÁNICA Y NUCLEAR, FQ.: Por soportarme tanto tiempo, a todos y cada uno de los miembros del departamento que cooperaron en algo para este trabajo.

DEPTO. DE PATOLOGÍA, FMVZ.: Por el procesamiento de las muestras.

DEPTO. DE MORFOLOGÍA, FMVZ.: Por facilitar el uso de su fotomicroscopio.

A MIS PAPÁS: Por soportarme y tenerme paciencia a que terminara la tesis.

A los ratones utilizados, y a todos esos animales que ceden su vida para que el hombre prolongue la propia.

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	6
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
IV. RESULTADOS.....	15
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	20
VI. LITERATURA CITADA.....	24
VII. FIGURAS Y CUADROS.....	28

I. RESUMEN

GERARDO FEDERICO QUIROZ ROCHA. TOXICIDAD AGUDA DE CASIOPEÍNA II POR ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA EN RATONES. ESTUDIO ANATOMO-HISTOLÓGICO. (Bajo la dirección de MVZ Eugenia Candanosa Aranda, Biol. Ma. Isabel Gracia Mora y Dra. Lena Ruiz Azuara).

Las casiopeínas* son "compuestos de coordinación" con centro metálico de cobre, con actividad citostática y antineoplásica, dichos compuestos han sido diseñados por Ruiz L., y desarrollados en la Facultad de Química, UNAM.

Actualmente se están llevando a cabo los estudios pertinentes para evaluar la toxicología y farmacología de estos compuestos, en el presente trabajo se decidió hacer la determinación de la "Dosis Letal 50 Aguda (DL50)" de casiopeína II por administración intravenosa; así también se procedió a realizar un estudio anatómo-histológico encaminado a reconocer las lesiones causadas por esta administración.

Para la determinación de la DL50 se utilizaron 25 ratones hembra de la cepa NIH con una edad promedio de 10 semanas y 24.04 g, ± 2.06 g de peso promedio, divididos en 5 grupos de 5 animales cada uno, se les administró según grupo las siguientes dosis: 7, 11, 15, 19 y 23 mg/kg de P.C.

Para el estudio anatómo-histológico, se emplearon 44 animales de las mismas características que los anteriores, asignándole a cada uno una dosis y tiempo de sacrificio post-inyección. Las dosis empleadas fueron 10, 13, 16, 19 y 22 mg/kg de P.C., y los tiempos de sacrificio fueron 45', 90', 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas, se incluyeron 4 animales que recibieron sólo el vehículo de la droga para considerarse como controles.

La DL50 obtenida fue de 15.85 mg/kg, que es notoriamente superior a los 8.89 mg/kg de la dosis por aplicación intraperitoneal de la misma droga, lo cual significa una menor toxicidad por esta vía. Los animales que murieron lo hicieron durante las primeras

* Casiopeína: Registro de marca (SECOFI) Número 407543 (1992).

24 horas postinyección, y los demás se observaron hasta el día 14 sin observarse muertes posteriores al tiempo ya mencionado, por lo cual no existe toxicidad tardía de casiopeína II.

En el presente trabajo se concluye que la administración intravenosa de la casiopeína II presenta una menor toxicidad letal que la administración intraperitoneal. No existe toxicidad tardía por la vía intravenosa para esta droga, además de que algunos efectos adversos de su administración son atribuibles al disolvente y no al propio fármaco. En el estudio anatómico-histológico se puede observar que la casiopeína II no causa lesiones macroscópicas aparentes a excepción de congestión pulmonar, a nivel histológico las lesiones más significativas son aquellas que involucran daño vascular siendo los órganos más afectados, en orden de severidad: pulmón, bazo, riñón, cerebro e hígado.

II. INTRODUCCION.

Dada la gran importancia que revisten los procesos mórbidos conocidos en forma genérica como **cáncer** en la salud pública y animal desde hace mucho tiempo, y principalmente en décadas recientes al convertirse en una de las causas de mayor mortalidad a nivel mundial (36) y tercera en importancia en México (39) donde, 1 de 5 personas mueren a consecuencia de algún tipo de neoplasia, diversos grupos multidisciplinarios en todo el mundo se han dado a la tarea de desarrollar métodos prácticos para ser empleados en la detección, prevención, cura y control de dichos padecimientos. Es sabido que las tres formas principalmente utilizadas son: cirugía, radioterapia y quimioterapia (36); y recientemente se han puesto en práctica varias más, entre ellas: inmunoterapia, terapia génica, crioterapia y termoterapia (41), así como la combinación de 2 o más de estas.

El uso de drogas para buscar el tratamiento de tumores ya sea como terapia única o en combinación con alguna otra forma de tratamiento es muy antigua, teniéndose datos del uso de sustancias para esta finalidad desde hace 500 años o más; pero la "era moderna" de la terapia antineoplásica se da en nuestro siglo a partir de la década de los 40's (7) con la aparición de los antagonistas del ácido fólico, a partir de esta época se incrementó grandemente el desarrollo a nivel mundial de varios medicamentos con esta finalidad.

Al ser la quimioterapia, la técnica de más amplia diversificación en la época actual por involucrar las posibilidades que aporta el descubrimiento y diseño de una infinidad de compuestos (29), lleva a determinar una serie de normas internacionales de evaluación de fármacos con potencial anticancerígeno, encaminados a establecer lineamientos para poder designar a alguno de estos como apropiado para su uso colectivo en la medicina práctica (4, 12).

El interés de los investigadores en descubrir o diseñar nuevos compuestos con potencial antineoplásico radica en poder obtener mejores cualidades que las de los que se

emplean en estos momentos como son: mayor actividad contra diferentes tipos de cáncer, selectividad de cada compuesto a tumores específicos, así como la reducción de sus efectos tóxicos secundarios, como por ejemplo resistencia cruzada, elevada muerte celular de tejidos sanos altamente mitóticos y daño a órganos donde se lleva principalmente a cabo el metabolismo o eliminación de estos compuestos (27, 29).

Cabe hacer mención sobre algunos tipos específicos de cáncer en la clínica de la especie humana, que pueden ser tratados a base de quimioterapia, así como algunos que no lo son (5):

TUMORES CURABLES POR LA QUIMIOTERAPIA

Niños

Leucemia Aguda Linfoblástica
Retinoblastoma
Enfermedad de Hodgkin
Tumor de Wilms
Rabdomiosarcoma
Sarcoma de Ewing
Tumores Germinales
Linfomas
Linfoma de Burkitt
Neuroepiteliomas

Adultos

Coriocarcinoma uterino
Carcinoma de testículo
Carcinoma de ovario
Enfermedad de Hodgkin
Sarcoma Osteogénico
Rabdomiosarcoma
Sarcoma de Ewing
Leucemia Aguda
Cáncer de Pulmón

TUMORES NO CURABLES CON QUIMIOTERAPIA

(Excelente paliación y calidad de vida)

Carcinoma de Vejiga
Leucemias Crónicas
Mieloma Múltiple
Linfomas
Carcinoma Gástrico
Carcinoma de Cérvix
Sarcomas
Insulinomas

Tumores de Cabeza y Cuello
Carcinoma de Endometrio
Carcinoma Suprarrenal
Meduloblastoma
Carcinoma de la Próstata
Glioblastoma
Carcinoma de Mama
Carcinoide

Así también tenemos que existen tipos de cáncer de interés veterinario que pueden ser tratados con quimioterapia entre los que están (19):

TUMORES EN LOS QUE LA QUIMIOTERAPIA TIENE MAYOR ACTIVIDAD

Tumor venereo trasmisible	Leucemia linfocítica crónica
Linfoma canino	Leucemia mielógena crónica
Mieloma canino	Linfoma felino
Micosis fungoide	

TUMORES EN LOS QUE LA QUIMIOTERAPIA TIENE MODERADA ACTIVIDAD

Sarcoma de células gigantes	Fibrosarcoma
Hemangiosarcoma	Carcinoma mamario felino
Adenocarcinoma tiroideo	Carcinoma de células escamosas

TUMORES EN LOS QUE LA QUIMIOTERAPIA TIENE MENOR ACTIVIDAD

Leucemias agudas canina y felina (linfoblástica y mieloblástica)	Linfoma cutáneo
Tumor de próstata	Osteosarcoma
Melanoma	Tumor de ovario
Carcinoma tonsilar	Tumor primario de pulmón
Tumor de vejiga	Tumor pancreático
Adenocarcinoma gástrico	Adenocarcinoma mamario canino
	Tumor cerebral

La distribución en porcentajes de acuerdo al sitio de presentación de neoplasias (benignas y malignas) más frecuentes son (23):

PERRO.-	SITIO	PORCENTAJE DE INCIDENCIA
	Piel	20%
	Glándula mamaria	12%
	Hemolinfático	10%
	Tejidos blandos	9%
	Cabeza y Cuello	7%
	Cavidad oral	6%
	Oseos	5%
	Perineal	5%
	Testículos	4%
	SNC	1.5%
	Pulmonar (primario)	1%

GATO.-	SITIO	PORCENTAJE DE INCIDENCIA
	Hemolinfático	48%
	Piel	7.5%
	Cabeza y Cuello	7%
	Tracto alimenticio	6%
	Glándula mamaria	5%
	Cavidad oral	5%
	Tejidos blandos	3.5%
	Óseo	3%
	SNC	1%

ANTECEDENTES.

A partir del desarrollo de los compuestos de aplicación quimioterapéutica, internacionalmente se ha tomado la conveniencia de clasificar a todos ellos en 6 grupos básicos dependiendo de su mecanismo de actividad antineoplásica, y estos grupos son: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides de plantas, hormonas y drogas misceláneas.

Para cada uno de los grupos de quimioterapéuticos tenemos a los siguientes compuestos (19):

AGENTES ALQUILANTES

Ciclofosfamida*
 Cloranbucilo
 Mostaza nitrogenada
 Trietilentiofosforamida
 Busulfán
 Melfalán*
 Dacarbasina
 Cisplatino*

ANTIMETABOLITOS

Metotrexato*
 6-Mercaptopurina
 6-Tioguanina
 5-Fluorouracilo
 Citosina arabinósido*

ALCALOIDES DE PLANTAS

Vincristina*
 Vinblastina

HORMONAS

Prednisona
 Dietilestilbestrol

ANTIBIOTICOS

Doxorubicina*
Bleomicina
Actinomicina

MISCELANEOS

L-asparginasa*
o,p'-DDD
Hidroxiurea

*Son los agentes más comunmente utilizados en oncología veterinaria (23).

En la actualidad, un grupo encabezado por Ruiz L., ha sintetizado una serie de compuestos de coordinación (11, 31, 32, 37 y 38); que han sido registrados con el nombre de Casiopeínas* (Figura 1), estas han sido diseñadas buscando la posibilidad de su interacción con el ADN; así mismo han sido sometidas ya a una serie de pruebas iniciales incluidas en los protocolos internacionales para el cernimiento de compuesto potencialmente antineoplásico, con lo que se ha podido comprobar que tienen la capacidad antineoplásica apropiada; las que a la fecha han cubierto el mayor número de pruebas para ser consideradas como una adecuada opción para el tratamiento de procesos cancerosos son las denominadas casiopeínas I, II y III**, dichas pruebas incluyen:

1.- Evaluación citostática *in vitro* sobre cultivo de linfocitos humanos sanos, con resultados comparables e incluso superiores a la mayoría de los quimioterapéuticos de uso comercial. Los resultados de estos ensayos muestran que las casiopeínas son capaces de detener la mitosis en la primera división después de su administración (28).

2.- Evaluación antineoplásica *in vitro* empleando clones tumorales humanos de cáncer cérvico-uterino de pacientes del INCa, obteniéndose resultados comparables a la actividad de mitomicina C y cisplatino. Así como clones tumorales murinos (14 y 15).

* CASIOPEÍNA: (SECOFI) Registro de marca número 407543 (1992).

** Casiopeína I.- Patente: Dirección general de invenciones, marcas y desarrollo tecnológico (SECOFI) registro número 18801-120579, USA Patent Apr. 21 (1992), Pat. number 5,107,005. Ruiz A.L. Process to obtain new complexes to be used as anticancer drugs. Type A., CEE en trámite, Japón en trámite.
Casiopeína II.- Patente: registro número 18802-120580, EUA, CEE y Japón en trámite.
Casiopeína III.- Patente: en trámite
Casiopeína IV.- En preparación.

3.- Evaluación citostática *in vivo* cuantificando el índice mitótico en ratón. En este caso, de acuerdo con las dosis y vías de administración empleadas no se ha visto una respuesta importante hacia estas casiopeínas (30).

4.- Evaluación citostática *in vivo* cuantificando el intercambio de cromátidas hermanas en ratón (30).

5.- Pruebas de potencial mutagénico *in vitro* (prueba de Ames y cromosoma ensayo) (33).

6.- Pruebas para evaluar mutaciones somáticas en *Drosophila melanogaster* (8).

Los resultados de los ensayos mutagénicos *in vitro* e *in vivo* muestran ligera actividad mutagénica de estos compuestos. Esto nos confirma la hipótesis de que interaccionan con el ADN, no obstante las mutaciones son fundamentalmente de tipo puntual por lo que el daño es más fácilmente reparable.

7.- Pruebas de actividad antineoplásica *in vivo* empleando los modelos tumorales murinos recomendados por el Cancer Chemotherapy National Service Center del National Cancer Institute, USA. Los resultados observados en este panel de evaluación para algunas casiopeínas sobrepasan en gran medida los requerimientos exigidos por los protocolos internacionales. En este caso se han empleado las casiopeínas I, II y III en esquemas de tratamiento de dosificación única, intermitente y crónica; presentándose sobrevividas que van de 16 hasta 200% dependiendo de la casiopeína y esquema de tratamiento (16, 20, 24 y 34).

8.- Pruebas de la interacción de distintos compuestos de la familia de las casiopeínas con ADN, identificadas por electroforesis en gel de agarosa (35).

Al ser los resultados anteriores, en conjunto satisfactorios, dieron la pauta para iniciar los estudios toxicológicos; así pues se hizo la determinación de las dosis letales 50 agudas (DL50) de las tres casiopeínas en ratón por aplicación intraperitoneal, y la evaluación de administración intravenosa en ratones (20), así como la evaluación de la toxicidad aguda de la casiopeína I en perros (13), el resultado en este caso nos revela una

situación clínica favorable, ya que la dosis letal por vía intravenosa en bolus, resulta ser inocua cuando la aplicación es por goteo lento.

Todas las pruebas anteriores, así como las que se lleven a cabo subsecuentemente están circunscritas a las distintas fases del proyecto, las cuales se enmarcan en un flujograma (Figura 2) en el que se muestra la interacción de dichas fases, actualmente se está realizando la fase de farmacología y toxicología. Las áreas de la ciencias médicas antes mencionadas, están íntimamente ligadas por compartir varios intereses, como son mecanismos de absorción y eliminación, las formas de acción, los principios de tratamiento y las relaciones dosis-respuesta (40).

Los estudios toxicológicos incluyen pruebas para observar las alteraciones funcionales y estructurales, tanto por separado, como en su interrelación, además en los casos necesarios dependiendo del medicamento también las de tipo conductual (25). Estos estudios deben llevarse a cabo en especies de diferente escala evolutiva, con el registro de los efectos agudos, subagudos, tardíos y crónicos que puedan presentarse.

La histopatología muestra ser una herramienta de gran utilidad para observar las alteraciones que una sustancia puede causar sobre la estructura tanto intracelularmente, como en su relación intercelular.

A diferencia de las pruebas de cernimiento, *in vitro* e *in vivo*, donde existen protocolos perfectamente establecidos, no hay acuerdos sobre que pruebas deben ser implementadas para la evaluación toxicológica, lo cual causa que existan constantes controversias entre las asociaciones protectoras de animales, órganos legistas, grupos médicos y compañías farmacéuticas (25), por lo tanto, cada grupo de investigación debe decidir cuales son las pruebas que mejor cubren sus necesidades y de las que obtendrá los mejores resultados.

Por lo anteriormente descrito, y en base a los resultados ya obtenidos, se ha decidido complementar los estudios toxicológicos, por lo que en el presente trabajo se llevó a cabo la

determinación de la DL50 aguda de la casiopeína II por vía intravenosa, por ser esta la de elección para efectos terapéuticos de este fármaco, además de ser esta vía la que comúnmente se emplea para los antineoplásicos en general. Así también es conveniente evaluar los efectos que causa esta casiopeína en distintos órganos y tejidos, haciendo la observación tanto macroscópica como microscópica de las posibles lesiones que pudieran producirse, eligiendo como modelo el ratón, por ser una de las especies consideradas en los protocolos preclínicos (4).

Cabe hacer mención que estos últimos estudios sobre toxicología son sugeridos por el INCan (Instituto Nacional de Cancerología), como parte de los estudios previos a su uso experimental en humanos, esto es, para pasar a la fase clínica I en dicha institución; esto fue propuesto al haberse firmado un proyecto de colaboración directa entre dicha institución con la Facultad de Química de la UNAM.

HIPOTESIS.

Al administrar la casiopeina II en ratones de la cepa NIH por vía intravenosa, es posible determinar los efectos tóxicos de ésta, a través de un estudio anatómo-histológico en diferentes dosis incluidas en el rango de ± 6 mg de la DL50.

OBJETIVO.

Determinar la DL50 aguda de la casiopeina II administrada por vía intravenosa, y evaluar por medio de un estudio anatómo-histológico, los efectos tóxicos causados por la aplicación de este fármaco en dosis seriadas entre ± 6 mg de la DL50 aguda en ratones clínicamente sanos de la cepa NIH.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se seleccionaron 69 ratones hembra clínicamente sanos de la cepa NIH con una edad promedio de 10 semanas; fueron alojados en cajas de policarbonato con una superficie de 20.5 cm x 11.5 cm (21), incluyendo 5 ratones por caja; se mantuvieron con agua filtrada por ósmosis inversa y pH ajustado a 2.5 con HCl (18), y alimento peleteado comercial PMI 5001 marca Purina, *ad libitum*. Recibieron ciclos de luz/obscuridad de 12/12 hrs (10).

Se diseñaron dos experimentos, en el experimento 1 se hizo la determinación de la DL50 aguda de casiopeína II por vía intravenosa y en el experimento 2 se administraron distintas dosis para observar las posibles lesiones por efecto de la droga. La casiopeína II fue pesada en balanza analítica para después ser disuelta en agua bidestilada en matraces aforados de 5 mL de capacidad. La vena de elección para la administración de la casiopeína II en ambos experimentos fué la caudal.

Experimento 1.-

Se utilizaron 25 animales, divididos en 5 grupos de 5 animales cada uno, se les administró casiopeína II por vía intravenosa en las siguientes dosis: 7, 11, 15, 19 y 23 $\mu\text{g/g}$ (mg/kg) de P.C. para cada grupo. A partir de la aplicación, los animales fueron observados por 12 hrs. continuas, a las 24 hrs., y posteriormente cada día durante 14 días. Se registró el número de animales muertos haciendo una relación muertos/vivos en cada grupo (22); con estos resultados se realizó una regresión lineal (6), de la cual se obtuvo el dato exacto de la DL50 I.V., considerando para esto sólo los animales que murieron en las primeras 24 hrs.

Una vez obtenida la dosis exacta, fue necesario hacer un ajuste del cálculo con fines prácticos, en la formación de grupos evitando el uso de fracciones decimales. Este ajuste se hizo por aproximación hacia la unidad, y a este valor ajustado se le denominó DL50.

Experimento 2.

Fueron empleados en este experimento 44 animales, los cuales se dividieron en 9 grupos de la siguiente manera:

grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
tiempo	45'	90'	3 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	Control
DOSIS:									
dosis 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dosis 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dosis 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dosis 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dosis 5	1	1	1	1	1	1	1	1	

Cuadro de dosificación

A cada animal se le asignó una dosis diferente y un tiempo de sacrificio post administración del fármaco, dos de estas dosis por debajo de la dosis letal. y dos por encima de ésta, con el objeto de comprobar el comportamiento de la regresión lineal antes obtenida, además de poder hacer una comparación sobre las posibles lesiones por sobredosificación. La aplicación del fármaco fue a base de una solución de casiopefna II a una concentración de $6\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso del grupo control, se les administró a los animales de dicho grupo 0.5 mL de agua por vía intravenosa a cada uno, esto con la finalidad de descartar lesiones que pudieran ser causadas por la propia acción mecánica de la inyección y/o el vehículo.

Al cumplirse el tiempo determinado se sacrificó a los animales por medio de dislocación cervical, y se procedió a realizar la necropsia para observar los daños macroscópicos, haciendo la descripción de estos; después se llevó a cabo la disección de los siguientes órganos y tejidos: bazo, cerebelo, cerebro, corazón, glándula adrenal, hígado, intestino delgado, intestino grueso, médula espinal, ovario, páncreas, peritoneo, piel, pulmón, riñón, útero. Estos fueron fijados en formalina amortiguada al 10% en proporción órgano/formalina de 1:10 durante 24 hrs.

Ya fijados los órganos se procedió a la inclusión de las muestras en parafina (2), efectuando cortes de cada uno de los órganos disecados y procesados automáticamente en

histoquinet. A partir de cada preparación se realizó la tinción de rutina hematoxilina-eosina, una vez obtenidas las laminillas se procedió a hacer la interpretación de las mismas por medio de observación con microscopía óptica. En los casos necesarios se hicieron tinciones especiales.

Para la observación de las laminillas se utilizó como apoyo un manual de histología de ratón (17).

Los resultados fueron capturados en el programa computacional Quattro Pro for Windows, version 5.00 Copyright © 1993, a partir de aquí se importaron al programa SAS (SAS Copyright Software release 6.02 '1985'), donde se elaboró toda la estadística no paramétrica que éste ofrece pruebas estadísticas para posteriormente ser analizada la información.

IV. RESULTADOS.

Experimento 1

Durante la observación de los animales en experimentación se hizo una relación de los signos que estos presentaron postinyección, incluyendolos en un cuadro (cuadro 1). Así también se hace aquí una relación de los tiempos aproximados en que se presentó cada uno de los signos.

		observaciones	controles
♂ 15-30 seg.-	ataxia severa	24/25	4/4
	convulsiones	23/25	3/4
	muerte instantánea	4/25	
♀ 2-5 min.	hiperestesia.	13/25	
♂ 15 min a 3 Hrs.-	debilidad (en ratones que se recuperaron)	14/25	4/4
	signos de dolor	9/25	
♂ 15 min a 12 Hrs *.	-debilidad	14/25	
	hipotermia	12/25	
	postración	10/25	
	hiperestesia	13/25	
	congestión en la región digital	5/25	
	epistaxis	3/25	
	hemorragias vaginales.	5/25	
♂ 12 a 24 Hrs.-	hipotermia	4/25	
	debilidad	14/25	
	postración	7/25	
	ausencia de respuesta a estímulos.	2/25	

* Estos signos solo se observaron en los animales que murieron antes de 12 Hrs.

Para el cálculo de la DL50 se tomaron los siguientes datos:

DOSIS	MUERTOS	VIVOS
7 mg/kg de PC	0	5
11 mg/kg de PC	0	5
15 mg/kg de PC	2	3
19 mg/kg de PC	4	1
23 mg/kg de PC	5	0

En la dosis de 15 mg una de las muertes se presentó a las 25 hrs pero fue incluida como dato para el cálculo ya que fue el único y último animal que murió después de 24 hrs y todos los demás sobrevivieron.

Al hacer la regresión lineal en base a estos datos obtuvimos la dosis exacta de 15.85 mg/kg de P.C. (Figura 3), con lo cual se hizo el ajuste hacia el entero más próximo quedando como 16. Así decimos que la DL50 aguda de la casiopeina II por vía intravenosa es de 16 mg/kg.

Experimento 2

Al administrar el vehículo en los animales control (0.5 mL de agua destilada), por vía intravenosa, se observaron los signos que estos presentaron, los cuales fueron convulsiones y ataxia durante los primeros 15 minutos postinyección, posteriormente debilidad durante 45 minutos más, tiempo después del cual se recuperaron.

Una vez obtenida la DL50 se tomaron 5 dosis en intervalos de 3 mg/kg de P.C. de casiopefina II dentro del rango de ± 6 mg/kg, siendo las dosis seleccionadas 10, 13, 16, 19 y 22 mg/kg. Se realizó la aplicación según el cuadro de dosificación, para posteriormente realizar todo el proceso de preparación de las muestras para histopatología.

La descripción de las lesiones macroscópicas se representan en el cuadro 2.

Al hacer el conteo de la frecuencia en que se presentan las lesiones macroscópicas observadas durante la necropsia, sólo se consideran importantes las lesiones con un mínimo de 5 casos, con lo que tenemos que hay 2 lesiones en esta situación, y que son: congestión pulmonar con 13 observaciones y edema subcutáneo con 5 observaciones.

En el caso de los controles los hallazgos observados incluyen lesiones como: congestión en miocardio, edema en cerebro, parásitos en intestino delgado y grueso, nódulos linfoides en intestino delgado, lisis de intestino delgado y grueso (Cuadro 3).

También se elaboró una serie de cuadros (cuadros 4 al 11) para cada uno de los grupos según hora de sacrificio, donde se describen las lesiones observadas en cada uno de los ratones

Una vez hecha la relación de lesiones histopatológicas y teniendo su distribución en base a dosis/tiempo se hicieron tablas de frecuencias para cada una de las lesiones, la evaluación directa a partir de estas tablas se llevó a cabo considerando los siguientes criterios:

- Frecuencia de las lesiones.
- presencia de lesiones en controles.

- grado de lesiones de los animales tratados respecto a los controles.

Existen lesiones que por tener poca frecuencia, no presentan una menor relevancia con respecto a las lesiones que se describirán a continuación.

Los hallazgos microscópicos obtenidos después de aplicar el criterio antes mencionado, y que además resultan ser casuísticamente relevantes, considerando un total de 44 casos posibles, son:

1.- Congestión pulmonar	(38 casos)
2.- congestión en bazo	(26 casos)
3.- engrosamiento de las paredes vasculares en pulmón	(24 casos)
4.- congestión en parénquima de riñón	(16 casos)
5.- presencia de megacariocitos en bazo	(16 casos)
6.- congestión glomerular	(7 casos)
7.- congestión en parénquima cerebral	(5 casos)
8.- congestión en hígado	(5 casos)

Para las tres primeras lesiones se presentan casos de grado ligero y moderado, considerándose ambos en el número total de observaciones, para las demás lesiones, sólo se hizo el conteo de los casos con grado moderado. De todas estas lesiones se muestran sus tablas de frecuencias en el cuadro 12, así como impresiones fotográficas de estas (figuras 4 a 9).

El órgano y tejido donde no se observaron lesiones fueron glándula adrenal y músculo esquelético.

Las tablas de frecuencias se procesaron estadísticamente en los programas computacionales descritos en la metodología, con ello se pudo observar que para el caso de las lesiones mencionadas, sólo algunas de ellas presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la dosis empleada, estas son: engrosamiento de las paredes vasculares en pulmón, congestión en parénquima de riñón, presencia de megacariocitos en

bazo y congestión en parénquima cerebral. así mismo la estadística arrojó dos lesiones más, estadísticamente diferentes: degeneración hidrópica en hígado e infiltrado linfocitario perivascular en hígado; pero al aplicar los criterios anteriores y emplearlos para emitir una decisión de la importancia de la lesión, estas dos lesiones no tuvieron una frecuencia elevada como para ser incluidas.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cálculo de la DL50 de casiopeína II por administración intravenosa en ratón es de 15.85 mg/kg. Anteriormente se obtuvo una dosis de 8.89 mg/kg (20) para esta misma casiopeína administrada por vía intraperitoneal, este método está incluido en los protocolos del National Cancer Institute, USA (12). Podemos observar que considerando que la vía intravenosa es la de elección para la mayoría de los antineoplásicos en general (9), la dosis obtenida por esta vía resulta ser significativamente mayor que la calculada por vía intraperitoneal, con lo cual vemos que el fármaco reduce en gran medida su toxicidad. Esta situación resulta ser muy favorable desde el punto de vista clínico.

Durante la administración de la casiopeína II por vía intravenosa se observan signos principalmente nerviosos y hemodinámicos; algunos signos como las convulsiones e hiperestesia, que se presenta durante los primeros 15 minutos post-inyección, también se presentan en los animales control a los que se les administró el vehículo solamente. Este fenómeno es comparable con la intoxicación por agua, donde se observa afección nerviosa, incluido el edema cerebral que se describe más tarde (3).

Todos los animales que murieron, lo hicieron dentro de las primeras 24 hrs. postinyección a excepción de uno de los que recibieron una dosis de 15 mg/kg, el cual murió a la hora 25; este fue el único animal que murió entre las 24 y 25 hrs., además de que fué el último en hacerlo, todos los demás sobrevivieron; por esta razón fué incluido para hacer el cálculo exacto de la DL50 aguda por vía intravenosa. Todos los animales que no murieron no presentaron ningún signo durante los días posteriores hasta el día 14 en que concluyó la observación, por lo cual se dice que la casiopeína II no produce toxicidad tardía.

Analizando las observaciones macroscópicas podemos decir que sólo la congestión pulmonar y el edema subcutáneo, son los hallazgos que pueden considerarse como de

mayor importancia, ya que todos los demás fueron observados en una frecuencia menor de 5 observaciones.

En forma general, los hallazgos microscópicos que se observaron bajo este esquema de dosificación, principalmente fueron por desordenes vasculares hemodinámicos.

Las lesiones atribuibles a la administración de la droga, que se consideran de mayor importancia en base al analisis de su distribución en la tabla de dosificación son:

	Casos	Controles
- congestión en pulmón	38/44	0/4
- congestión en bazo	26/44	0/4
- engrosamiento vascular en pulmón	24/44	0/4
- congestión renal, principalmente en glomérulos.	16/44	3/4
- aumento de megacariocitos en bazo	16/44	2/4
- congestión cerebral	5/44	1/4
- congestión hepática	5/44	1/4

Podemos observar que las lesiones predominantemente se presentan en orden de severidad en: pulmón, bazo, riñón cerebro e hígado.

Para el caso del engrosamiento vascular en el pulmón, esto se da como efecto a los cambios de presiones intra y extravasculares (42). Así mismo se piensa que el aumento de megacariocitos en el bazo se da por un efecto del fármaco sobre la médula osea.

Existen lesiones no atribuibles a la administración de la droga, sino al sacrificio de los animales o su estado general previo al desarrollo del experimento, entre estas se incluyen: congestión en corazón, edema en cerebro, hiperplasia de nódulos linfoides en intestino delgado y grueso, parásitos en intestino delgado y grueso, lisis de intestino delgado y grueso y vaginitis.

En el caso de la congestión en corazón y el edema cerebral, estas lesiones se presentan también en los controles, la primera atribuida al sacrificio, ya que este se da por

dislocación cervical, con el consecuente choque neurogénico (42), y la segunda tiene una etiología relacionada con la administración del vehículo, el cual altera las presiones osmótica e hidrostática a nivel de encéfalo, con la consecuente extravasación de líquido. La presencia de parásitos en intestinos delgado y grueso, evidentemente son un problema no atribuible a la administración del fármaco, y como consecuencia de dicha presencia existe hiperplasia de nódulos linfoides, esta contaminación del lote de animales, se presentó por un mal control por parte del laboratorio que proporcionó a estos, mencionando que se encontraban en buenas condiciones de mantenimiento. La lisis de los intestinos delgado y grueso, se debe a que los animales que la presentaron murieron antes de su hora de sacrificio durante la noche, por lo que se consideran cambios post-mortem, ya que se les realizó la necropsia hasta la mañana siguiente.

El cisplatino, es un quimioterapéutico antineoplásico de amplia difusión clínica, que tiene una estructura química semejante a las casiopeínas, al ser éstos, compuestos de coordinación. Este fármaco presenta efectos tóxicos importantes, entre los que se incluyen el daño renal por necrosis tubular proximal, con degeneración tubular y edema intersticial sin daño apreciable en glomérulos, así como atrofia linfóide en bazo como algunos de sus efectos más inmediatos (1, 5 y 26); en base a los resultados podemos observar que la casiopeína II en dosis única no causa estos daños tóxicos, pero esto deberá ser evaluado al realizar estudios de toxicidad crónica.

En este trabajo se puede concluir que:

- 1.- La toxicidad de casiopeína II es menor al ser aplicada por vía intravenosa que por vía intraperitoneal.
- 2.- No hay toxicidad tardía para este fármaco por esta vía de administración.
- 3.- Las lesiones observadas en los diferentes órganos y tejidos son principalmente por afección al sistema circulatorio.
- 4.- Existe un efecto adverso del disolvente empleado, agua destilada.

Esto nos da la pauta para iniciar los estudios sobre alteraciones funcionales que el fármaco pudiera causar en base a los órganos afectados, sugiriendo que se lleven a cabo en alguna especie de mayor escala evolutiva, ya que existe la limitación de tamaño para que estas pruebas pueden ser llevadas a cabo en ratón con la debida eficiencia. El objetivo de estos trabajos, estaría encaminado a buscar posibles contraindicaciones así como efectos secundarios que pudieran producirse ya en la fase clínica.

También se sugiere hacer el estudio de la toxicidad crónica, ya que sabemos que los esquemas de tratamiento en la práctica clínica requieren de varias administraciones para lograrse un objetivo terapéutico exitoso, en este caso el ratón si puede ser empleado como modelo experimental.

Debemos de recordar que la extrapolación de una especie a otra es riesgosa por lo cual deben ser tomadas las reservas debidas al interpretar los resultados en cada una de las fases del proyecto (40).

La casiopeína H ha sido sometida a diversas pruebas de solubilidad, siendo el agua el disolvente de elección par este fármaco hasta el momento, ya que es compatible con el uso biológico, no obstante existen efectos adversos que se observan a consecuencia de la administración de agua destilada como vehículo vía intravenosa, por lo que se sugiere continuar con las pruebas de solubilización, forma y vía de administración del fármaco.

VI. LITERATURA CITADA

- 1.-Aggarwal S.K., Whitehouse M.W. and Ramachandran C.: Ultrastructural effects of Cisplatin., In: Cisplatin. Edited by Prestayko A.W., Crooke S.I. and Carter S. *Academic Press*, New York (1980)
- 2.-Armed Forces Institute of Pathology.: Manual of staining methods. *Lee G. Luna*, Washington. 1968.
- 3.-Blood, D.C., Henderson, J.A., Radostits, O.M.: *Medicina Veterinaria*. 6a. edición, *Edit. Interamericana*, 1987.
- 4.-Bush, H.: Preclinical methodology for the selection of anticancer agents. *Meth. Cancer Res.*, 1: 7, (1967).
- 5.-Chabner, B. A., Myers, C. D.: Clinical pharmacology of cancer chemotherapy, in: *Principles and Practice of Oncology*; edited by Vincent, T., De Vita Jr. and Hellman S. and Rosenberg, S. A. *Lippincott*, U.S.A. 1982.
- 6.-Daniel W.W.: *Bioestadística*. 3a. ed. *Limusa*, México. 1987.
- 7.-De La Garza, J.: *Semblanza Histórica de los Agentes Antineoplásicos. "Cáncer y Quimioterapia" (Perspectivas en México)*. Memorias. *Fac. de Química, UNAM*. (1992).
- 8.-De La Rosa, M.E., Gracia, M.I., Pimentel E. and Ruiz-Ramírez L. and Arenas C.: Mutagenic activity of casiopeine in *Drosophila*. *XXth EEMS Meeting*. *Memories*: 22-27. York, Inglaterra. (1990).
- 9.-De Vita, J. V.: Principles of chemotherapy, in: *Principles and Practice of Oncology*; edited by Vincent, T., De Vita Jr. and Hellman S. and Rosenberg, S. A. *Lippincott*, U.S.A. 1982.
- 10.-Foster H.L., Small J. D. and Fox J.G.: *The Mouse in Biomedical Research*. 1st ed. *Academic Press Inc.*, U.S.A., 1981.
- 11.-Gasque L., Ruiz-Ramirez L. and Moreno-Esparza R: Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10-phenanthroline. *J. Inorg. Biochem.* 48:121 (1992).
- 12.-Geran, Greenberg, MacDonald and Abbott. *Protocols for in vivo Screening Systems*. National Cancer Institute.
- 13.-Gomez D. E.: *Determinación de toxicidad aguda de la casiopefna I en perros*. Tesis de Licenciatura: *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1992.

- 14.-Gomez-Ruiz C., De la Garza J., Arenas F. y Ruiz-Ramírez L. y Gracia-Mora I.: Quimiosensibilidad *in vitro* en células de cáncer cérvico-uterino por efecto de castiopeínas I, II y III. *1^{ra} Jornadas Médicas en Cáncer*. Memorias: Instituto Nacional de Cancerología, México. (1993).
- 15.-Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., Moreno-Esparza R., Díaz D., Gasque L., Huerta L., Mayet L. and Ortiz V. and Lomelf C.: Antineoplastic effect of several transition metal complexes. *Fourth Chemical Congress of North America*, Memories:25-30 . New York, (1991).
- 16.-Gracia-Mora I. and Ruiz-Ramírez L.: The Antitumor Activity of Several Transition Metal Complex. *J. Inorg. Biochem.* 43: 615 (1991).
- 17.-Gude W.D., Cosgrove G.E., Hirsch G.P.: *Histological Atlas of the Laboratory Mouse*. Plenum press. New York (1982).
- 18.-Hall, E. H. and White, W. J. and Lang C. M.: Acidification of Drinking Water: Its Effect on Selected Biologic phenomena in male mice. *Lab. Anim. Sc.*, 30:643-651, (1980).
- 19.-Helfand S.: Principles and Applications of Chemotherapy. *Vet. Clinics of N. Amer. Small Anim. Prac.*, 20:987-1013 (1990).
- 20.-Huerta C. M.: Evaluación antineoplásica de nuevos complejos de coordinación empleando el modelo tumoral murino Sarcoma S180. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Ciencias Químicas*. Universidad Veracruzana. Orizaba, Veracruz. 1992.
- 21.-Line-Petter, W.: The Laboratory Mouse. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Mouse*; Part three, 6th edition. Edited by: T.B. Poolee., 275-308. *Churchill Livingstone Inc*. New York, 1987.
- 22.-Litchfield et Wilcoxon: Détermination de la DL 50 Chez la souris. *Pharmacol. J*, 407-414. Paris. (1970).
- 23.-Loar, A. S.: Principios de Oncología Clínica Veterinaria, 5a Jornada Médica del Departamento de Medicina y Zootecnia para pequeñas especies. Memorias. FMVZ; UNAM. (1990).
- 24.-Mayet C. M.: Cernimiento antineoplásico de nuevos compuestos de coordinación empleando el modelo tumoral murino Melanoma B16. Tesis de Licenciatura. *Fac. de Ciencias Químicas*. Universidad Veracruzana. Orizaba, Veracruz. 1991.

25.-Naranjo, C.A. y Busto, U.E.: Desarrollo de medicamentos nuevos y regulaciones sobre medicamentos. En: Métodos en Farmacología clínica. Editores: Naranjo, C. A., Du Souich, P. y Busto, U.E. *Organización Panamericana de la Salud*, Washington, D.C. , 1992.

26.-Portlock, C.S., Goffinet, D.R.: Manual de Problemas Clínicos en Oncología. *Edit Interamericana*, Madrid, 1983.

27.-Powis, G. and Hacker, M.P.: The Toxicity of Anticancer Drugs *Pergamon press*, USA, 1991.

28.-Ruiz-Ramirez L.: Cytostatic effect of some new complexes. *Symposium on Transition Metal-Nucleic Acid Chemistry Metal Complexes as Drugs*. Memories: 100-103. Toronto, (1987).

29.-Ruiz-Ramírez L.: Diseño y Síntesis de Compuestos Potencialmente Antineoplásicos. "Cancer y Quimioterapia"(Perspectivas en México). *Memorias. Fac. de Química, UNAM.* (1992).

30.-Ruiz-Ramirez L. and Gracia M. I.: Design, synthesis, characterization and *in vivo* antineoplastic tests of a new drug: Casiopeina *4th International Conference of Anticancer Research*, memories: Crete, Greece. (1992).

31.-Ruiz-Ramirez L., Gasque L., Martínez A. and Moreno-Esparza R. and Solans X. Copper (II) Hydrate mixed chelate complexes, Part II *Acta Crystallographica. C48.* 1758-1788 (1992).

32.-Ruiz-Ramírez L., Gasque L., Martínez A. y Moreno-Esparza R. and Solans X. Copper (II) Hydrate mixed chelate complexes, Part III. *Acta Crystallographica. C48.* 1758-1788 (1992).

33.-Ruiz-Ramírez L., Gracia-Mora I., Sumano H., Gomez C., Arenas F., Mayet L., Huerta L., Gomez E., Pimentel E. and Cruces M. and De La Rosa M. E.: Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminar toxicity of Copper (II) New Drugs: Casiopeinas I; II; III. *J. Inorg. Biochem. 51:* 406 (1993).

34.-Ruiz-Ramírez L. y Gracia-Mora I. y De La Rosa M. E.: Evaluación de la actividad antineoplásica de las casiopeinas I, II y III. *IV Congreso Iberoamericano de Química Inorgánica*. Memorias: 270. Guanajuato, México. (1993).

35.-Ruiz-Ramírez L. Gracia-Mora I. and Moreno-Esparza R and Cirigo C.: Study of the interaction between several copper (II) complexes of the Casiopeina's family with DNA. Latin-american Inorganic Chemistry Meeting. Memories: 158. Santiago de Compostela, Spain. (1993).

- 36.-Santos E. y Rodríguez J.: El Cáncer, 2a edición, *Prensa Científica*, España. 1986
- 37.-Solans X., Ruiz-Ramírez L. y Briansó J. L. y Gasque L.: Structure of (1,10-phenanthroline) (salicylaldehydato) copper (II) nitrate. *Acta Crystallographica. C* 43. 428 (1987).
- 38.-Solans X., Ruiz-Ramírez L. Martínez A. y Gasque L. y Briansó J. L.: Structure of Chloro (Glicinato) (1,10-phenanthroline) copper (II) Monohydrate (I) and Aqua (1,10-phenanthroline) (L-phenylalaninato) copper (II) Nitrate Monohydrate. *Acta Crystallographica. C* 44. 628 (1988).
- 39.-Secretaría de Salud.: Anuario 1990. *Sec. Salud*, México 1990.
- 40.-Sumano, L.H. y Ocampo, C.L.: Farmacología Veterinaria. *Edit Interamericana*, México, 1991.
- 41.-Tannock, I. F., and Hill., R. P.: Cellular Basis of Radiotherapy; Immunotherapy and the potential applications of monoclonal antibodies; Hyperthermia. In: *The Basis Science of Oncology*, Edited by: I. F. Tannock and R. P. Hill. 237,326, 337 *Pergamon Press*. New York, 1987.
- 42.-Thomson, R.G.: General Veterinary Pathology. 2th edition, *W. B. Saunders Company*, Philadelphia, 1984.

VII. FIGURAS

Y

CUADROS

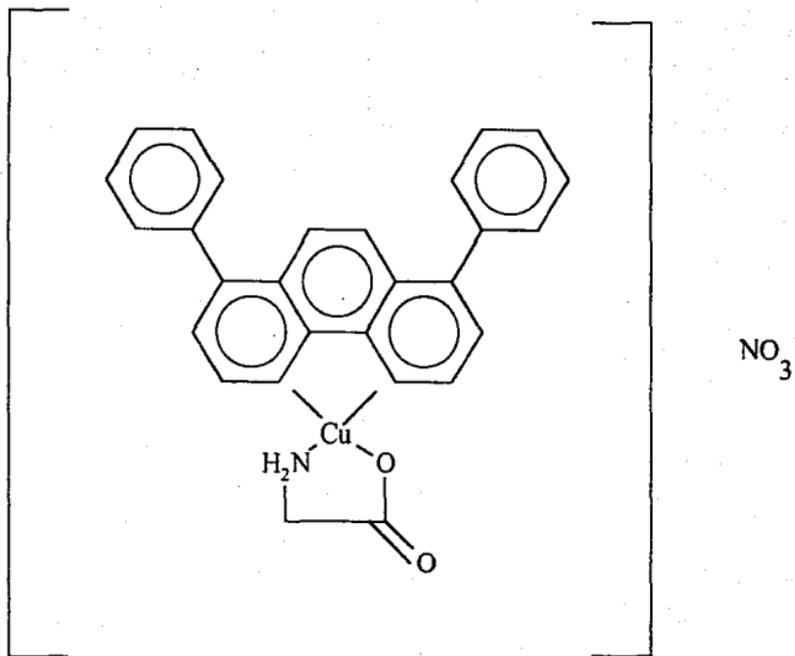


Figura 1.- Casiopeína I (Se presenta este homólogo de la casiopeína II, ya que esta por encontrarse en trámites de patente no es posible hacer su reproducción).

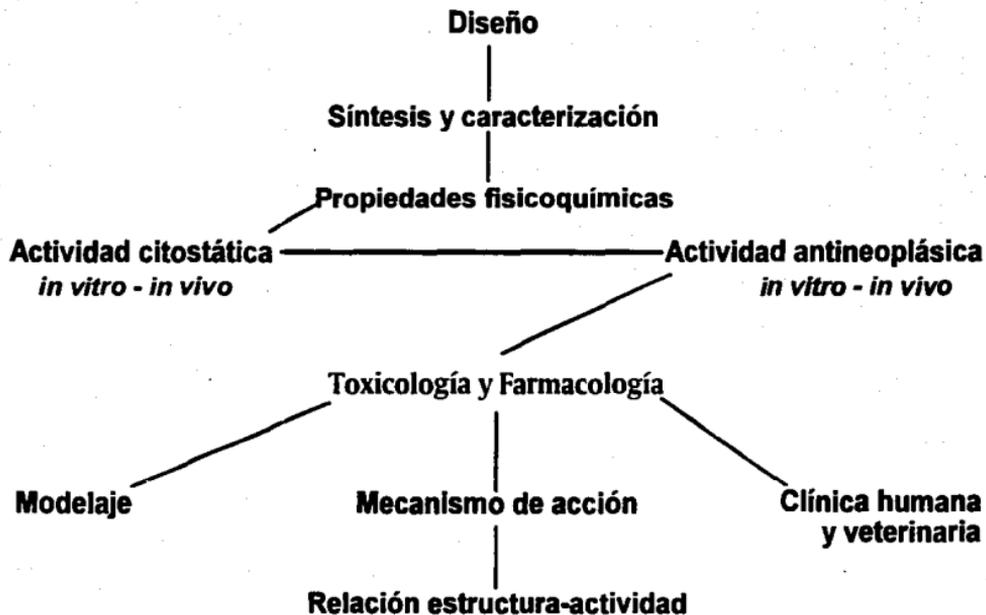
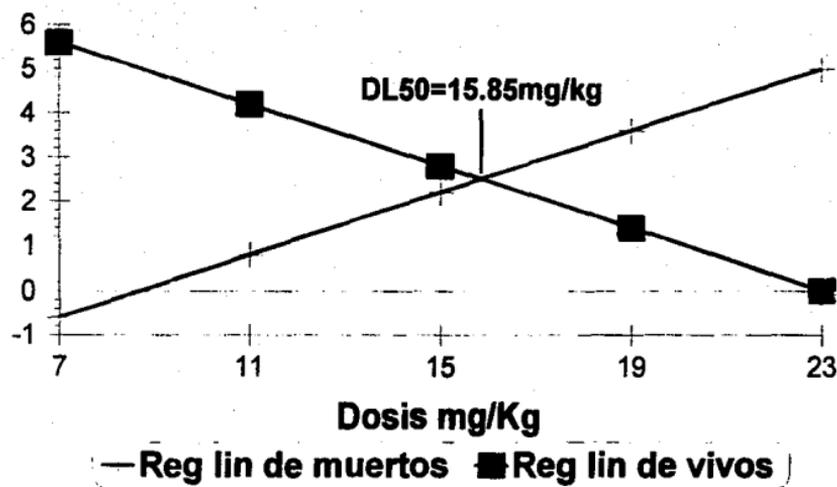


FIGURA 2.-FLUJOGRAMA DE PROYECTO PARA DESARROLLO DE COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS



Ratones NIH (5 dosis 5 animales por dosis)
Figura 3.- DL50 DE CASIOPEINA II
Aplicación intravenosa



Figura 4.- Corte de pulmón en el cual se observa congestión moderada, así como engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos. (H.E. 100X)

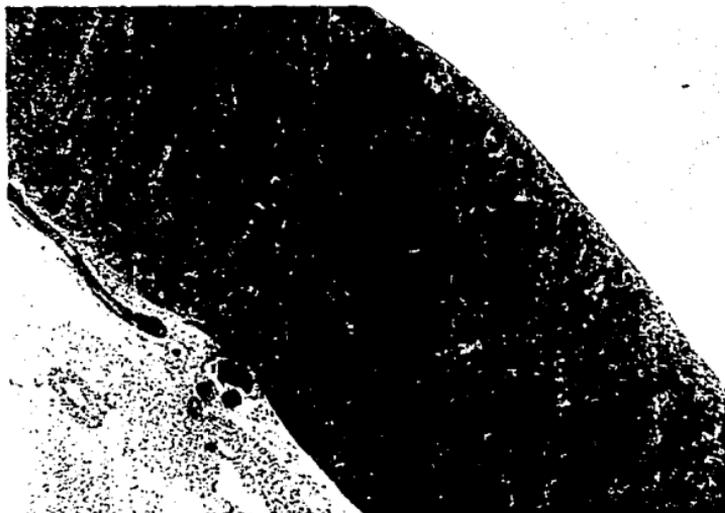


Figura 5.- Corte de bazo en el cual se observa congestión moderada, así como ligera atrofia de nódulos linfoides y un incremento moderado de los megacariocitos (H.E. 25X)

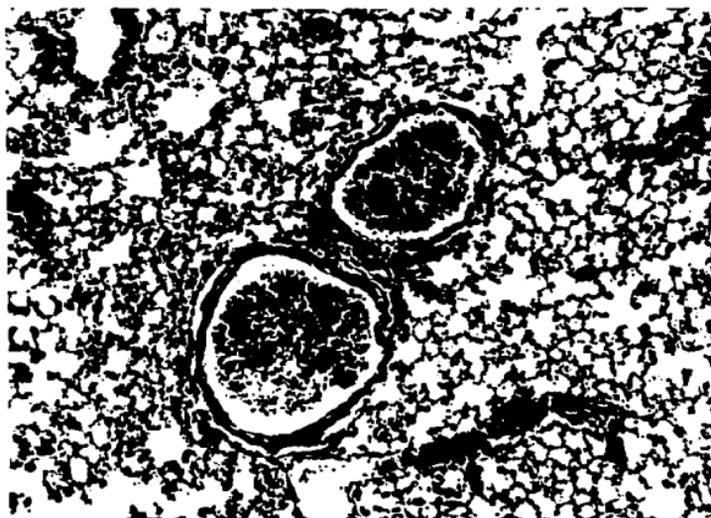


Figura 6.- Corte de pulmón en el cual se observa congestión moderada, así como el engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos.
(Tricrómica de Masson 100X)

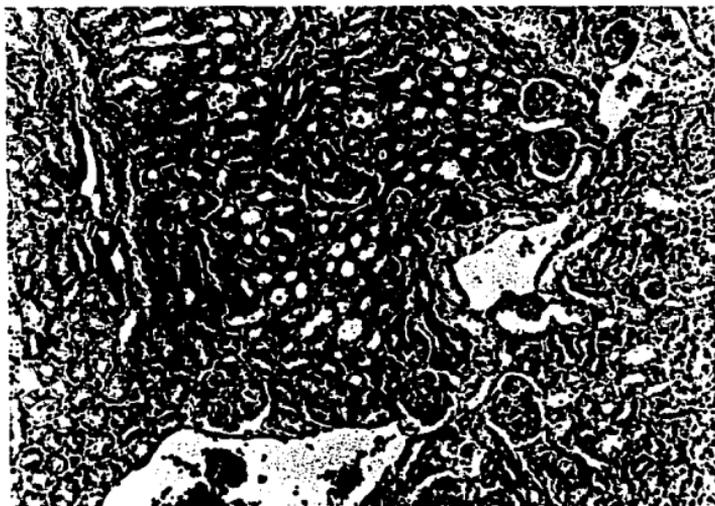


Figura 7.- Corte de riñón en el cual se observa congestión moderada en glomerulos y espacio intersticial. (H.E. 100X)



Figura 8.- Corte de cerebro en el cual se observa congestión moderada. (H.E. 100X)

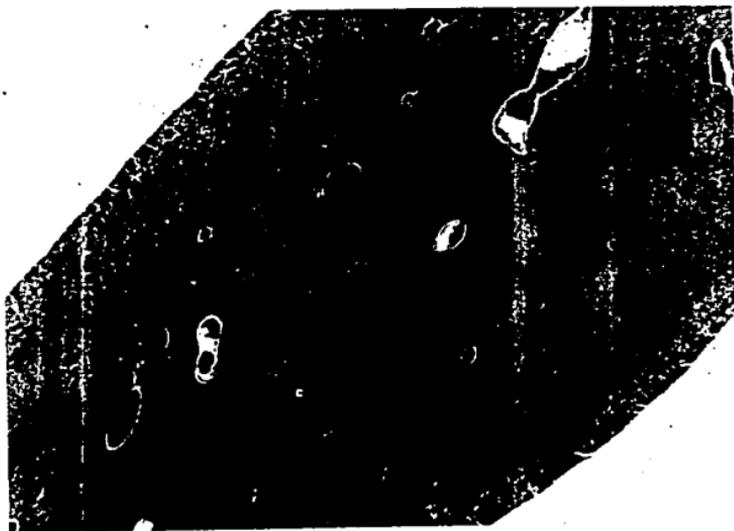


Figura 9.- Corte de hígado en el cual se observa congestión moderada difusa. (H.E. 25X)

Cuadro1.- Dosis letal aguda 50% (DL50) de casoipeína II
Signos observados en cada uno de los ratones

Ratón	DOSIS (mg/kg)				
	7	11	15	19	23
1	1, 2, 4, 5, 6	1, 2, 5, 6, 8	1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 15	1, 2, 3, 4, 7	1, 2, 3, 4, 7
2	1, 2, 4, 5, 6	2, 4, 5, 8	1, 2, 4, 5, 7, 8, 12, 16	1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 15	1, 2, 3, 4, 7
3	1, 2, 5, 6	1, 2, 5, 6	1, 2, 5, 6, 7, 8	1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 15	1, 2, 3, 7
4	1, 5, 6	1, 2, 5, 6	1, 2, 5, 6, 8	1, 2, 1, 8, 12, 13	1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 13, 15
5	1, 5, 6	1, 4, 5, 6	1, 2, 5, 6	1, 2, 7, 8	1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 15

- 1.- Ataxia
- 2.- convulsiones
- 3.- muerte instantánea
- 4.- hiperestesia
- 5.- debilidad
- 6.- signos de dolor
- 7.- hipotermia
- 8.- postración

- 9.- congestión en región digital
- 10.- epistaxis
- 11.- hemorragia vaginal
- 12.- ausencia de respuesta a estímulos
- 13.- hematuria
- 14.- flatulencia
- 15.- muerte antes de 12 horas
- 16.- muerte a las 25 horas

Cuadro 2.- Hallazgos macroscópicos observados durante la necropsia*.

TIEMPO/DOSIS	10 mg/kg	13 mg/kg	16 mg/kg	19 mg/kg	22 mg/kg
45'	--	útero distendido	hemorragias en pared abdominal	útero distendido y congestión pulmonar	petequias en estómago
90'	orina oscura y coágulos en omento menor	--	--	edema subcutáneo	congestión pulmonar
3o	--	congestión en ciego	--	congestión pulmonar e hidrotórax	congestión pulmonar y epistaxis
6o	--	congestión intestinal y pulmonar	congestión pulmonar con áreas de necrosis	útero distendido y congestión pulmonar	congestión pulmonar
12o	--	congestión pulmonar	--	--	congestión pulmonar
24o	--	congestión pulmonar, pseudomelanosis	congestión intestinal y estomacal	autólisis intestinal, congestión pulmonar y pseudomelanosis	--
48o	--	edema subcutáneo, autólisis intestinal pseudomelanosis	edema subcutáneo	--	--
72o	autólisis intestinal, edema subcutáneo	autólisis intestinal y congestión pulmonar	autólisis intestinal, pseudomelanosis	edema subcutáneo, autólisis intestinal y pseudomelanosis	autólisis intestinal e hígado con bordes necróticos
controles	--	--	--	--	--

* todas las observaciones tienen grado ligero

Cuadro 3.- Casiopeina II, aplicación I.V. en ratones;
Hallazgos microscópicos observados en controles

1	2	3	4
-Edema ligero difuso en cerebro -nódulo linfoide sin protusión a la mucosa en intestino grueso -ligero engrosamiento de piel -congestión ligera difusa en médula y glomérulos, foco linfoide perivascular en riñón -edema ligero de útero -congestión ligera difusa en miocardio	-Hiperplasia linfoide ligera en bazo -edema ligero y congestión en meninges cerebelares -congestión ligera difusa y edema ligero en cerebro -congestión ligera difusa en miocardio -dilatación vascular y degeneración hidrópica ligera en hígado -parásitos en intestino delgado	-Edema ligero en cerebro -congestión ligera difusa en corazón -degeneración hidrópica ligera en hígado -congestión ligera difusa en páncreas -congestión ligera difusa en riñón	-Congestión ligera hacia meninges y edema ligero en cerebro -congestión ligera difusa en hígado -parásitos en intestino grueso -dilatación ligera de túbulos, presencia de grasa en pelvicilla renal y congestión ligera difusa en riñón

Cuadro 4.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo I, (45'). Hallazgos microscópicos.

DOSIS mg/kg	
10	Cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero difuso; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero.
13	Bazo.- congestión ligera difusa, hiperplasia linfoide ligera; cerebro.- congestión ligera difusa en meninges; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide ligera; intestino grueso.- hiperplasia linfoide ligera y presencia de parásitos; pulmón.- congestión ligera difusa y engrosamiento vascular ligero.
16	Bazo.- congestión ligera difusa, hiperplasia ligera difusa, presencia de megacariocitos moderada; cerebelo.- congestión difusa moderada, y ligera difusa en meninges; cerebro.- congestión ligera difusa en meninges; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide ligera; intestino grueso.- presencia de parásitos; pulmón.- congestión difusa ligera, engrosamiento vascular ligero.
19	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera; cerebelo.- congestión difusa ligera; cerebro.- congestión difusa ligera, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide ligera, presencia de parásitos, enteritis supurativa ligera; intestino grueso.- hiperplasia linfoide ligera; pulmón.- congestión difusa ligera, engrosamiento vascular ligero, infiltración linfocitaria perivascular moderada; riñón.- congestión moderada difusa.
22	Bazo.- congestión ligera difusa, presencia moderada de megacariocitos; cerebelo.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide ligera; pulmón.- congestión difusa moderada, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa, infiltración linfocitario ligera.

Cuadro 5.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 2, (90'). Hallazgos microscópicos.

DOSIS mg/kg	
10	Bazo.- congestión ligera difusa, hiperplasia linfoide ligera; cerebelo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera difusa en meninges; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide; intestino grueso.- presencia de parásitos; riñón.- congestión ligera difusa.
13	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera; cerebelo.- congestión ligera difusa en meninges; cerebro.- congestión ligera difusa en plexos coroides; hígado.- infiltrado linfocitario ligero, binucleaciones; pulmón.- congestión ligera difusa, dilatación vascular ligera; riñón.- congestión ligera difusa.
16	Bazo.- congestión difusa ligera, hiperplasia linfoide ligera; pulmón.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario perivascular, engrosamiento vascular ligero.
19	Bazo.- hiperplasia nodular ligera; cerebelo.- congestión moderada difusa en meninges; cerebro.- congestión difusa moderada, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa, autólisis; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero, infiltrado linfocitario perivascular; riñón.- congestión ligera glomerular, infiltrado linfocitario perivascular.
22	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera, presencia moderada de megacariocitos; cerebelo.- congestión difusa ligera, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa, autólisis; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero, infiltrado linfocitario perivascular; riñón.- congestión ligera glomerular, infiltrado linfocitario perivascular.

Cuadro 6.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 3, (3 Hrs.). Hallazgos microscópicos.

DOSIS mg/kg	
10	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento ligero vascular, infiltrado linfocitario perivascular; riñón.- congestión ligera difusa.
13	Bazo.- hiperplasia ligera difusa, congestión ligera difusa; cerebelo.- congestión ligera difusa y moderada en plexos coroides; cerebro.- congestión ligera difusa y moderada en plexos coroides; hígado.- degeneración hidrópica ligera, necrosis ligera zonal, congestión moderada ligera; intestino delgado.- necrosis ligera de vellosidades, presencia ligera de parásitos y moco; pulmón.- infiltrado linfocitario perivascular ligero; riñón.- congestión moderada ligera, foco de hemorragia ligera.
16	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera; cerebelo.- congestión ligera difusa y ligera en meninges; cerebro.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa; pulmón.- congestión ligera difusa; riñón.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario perivascular ligero, engrosamiento vascular ligero, arteritis moderada.
19	Cerebelo.- congestión ligera difusa en meninges, cerebro.- congestión ligera difusa en meninges; hígado.- congestión ligera en venas centrales, binucleaciones escasas; pulmón.- congestión moderada difusa, dilatación vascular ligera; riñón.- congestión moderada en glomérulos, vacuolas escasas en túbulos distales.
22	Bazo.- congestión moderada difusa, hiperplasia linfoide ligera; cerebelo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- hiperplasia linfoide ligera, presencia de parásitos; pulmón.- congestión ligera difusa.

Cuadro 7.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 4 (6 Hrs.). Hallazgos microscópicos.

DOSIS mg/kg	
10	Cerebro.- congestión ligera difusa y ligera en meninges, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa, necrosis multifocal en vena central; intestino delgado.- presencia de parásitos; ovario.- congestión ligera difusa; pulmón.- congestión ligera difusa; riñón.- congestión ligera difusa, infiltración linfocitaria ligera.
13	Bazo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión moderada difusa, edema ligero; corazón.- congestión moderada difusa; hígado.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario centrilobulillar; intestino delgado.- autólisis, hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión moderada difusa, engrosamiento ligero de vasos; riñón.- congestión difusa ligera y glomerular ligera.
16	Bazo.- congestión ligera difusa, presencia moderada de megacariocitos; cerebro.- congestión moderada difusa, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero; hígado.- congestión moderada difusa, dilatación vascular ligera; intestino delgado.- hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión moderada difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa, dilatación vascular ligera.
19	Bazo.- congestión ligera difusa, hiperplasia linfoide ligera; cerebro.- congestión moderada difusa, edema ligero; hígado.- congestión ligera difusa; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa, dilatación vascular glomerular ligera.
22	Bazo.- congestión ligera difusa, hiperplasia linfoide ligera; cerebelo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera en meninges; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión moderada difusa, presencia de quiste; intestino delgado.- hiperplasia linfoide; intestino grueso.- hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión ligera difusa, dilatación vascular ligera.

Cuadro 8.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 5 (12 Hrs.). Hallazgos microscópicos.

DOSIS mg/kg	
10	Bazo.- congestión difusa ligera, hemorragias difusas moderadas, focos difusos de macrófagos; cerebelo.- congestión ligera difusa, congestión ligera en plexos; cerebro.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa, hígado.- congestión ligera difusa, necrosis multifocal ligera; intestino grueso.- autólisis; peritoneo.- inflamación supurativa ligera; pulmón.- congestión ligera difusa; riñón.- congestión ligera difusa, infiltración linfocitaria ligera.
13	Bazo.- atrofia linfóide ligera, congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero, desmielinización ligera; corazón.- congestión difusa ligera; hígado.- congestión moderada difusa, infiltrado linfocitario pericentral; intestino delgado.- inflamación supurativa ligera en submucosa, autólisis; ovario.- congestión ligera difusa; pulmón.- congestión ligera difusa; riñón.- congestión moderada difusa.
16	Bazo.- congestión ligera difusa, hiperplasia linfóide ligera; cerebelo.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- dilatación vascular ligera; pulmón.- congestión ligera difusa; riñón.- congestión ligera difusa.
19	Bazo.- hiperplasia linfóide ligera; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión moderada en sinusoides; intestino delgado.- presencia de parásitos; intestino grueso.- presencia de parásitos; pulmón.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario peribronquial ligero; riñón.- congestión moderada en médula.
22	Bazo.- hiperplasia linfóide ligera; cerebro.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera en sinusoides; intestino grueso.- presencia ligera de moco; pulmón.- congestión moderada difusa, hemorragias moderadas difusas; riñón.- congestión ligera en médula.

Cuadro 9.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 6 (24 Hrs.). Hallazgos microscópicos.

DOSIS mg/kg	
10	Bazo.- atrofia linfoide ligera, presencia moderada de megacariocitos; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; intestino delgado.- hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión moderada difusa, hemorragias difusas ligeras; riñón.- congestión ligera difusa.
13	Bazo.- congestión moderada difusa; cerebelo.- congestión difusa ligera, edema ligero; cerebro.- congestión ligera difusa; higado.- necrosis multifocal ligera; pulmón.- congestión moderada difusa, infiltrado linfocitario peribronquial, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa, infiltrado linfocitario perivascular.
16	Bazo.- congestión moderada difusa, presencia moderada de megacariocitos; cerebelo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa; intestino grueso.- presencia de parásitos; pulmón.- congestión moderada difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa y glomerular ligera.
19	Bazo.- atrofia ligera difusa, presencia moderada de megacariocitos, congestión ligera difusa; cerebelo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- autólisis, hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión moderada difusa, vasculitis; riñón.- congestión moderada difusa, congestión glomerular ligera.
22	Bazo.- presencia moderada de megacariocitos, hiperplasia linfoide; higado.- infiltrado linfocitario difuso ligero, presencia de absceso; riñón.- congestión moderada difusa, vasculitis.

Cuadro 10.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 7 (48 Hrs.)

DOSIS mg/kg	
10	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera, congestión ligera difusa; cerebelo.- congestión ligera difusa; cerebro.- congestión ligera difusa; corazón.- congestión moderada difusa; hígado.- dilatación vascular ligera, infiltrado linfocitario perivascular, congestión moderada difusa; intestino delgado.- presencia de parásitos; intestino grueso.- presencia de parásitos; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión ligera difusa.
13	Bazo.- congestión ligera difusa, presencia moderada de megacariocitos; cerebro.- congestión moderada difusa, edema moderado; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa, dilatación vascular ligera; intestino delgado.- presencia de parásitos; intestino grueso.- presencia de parásitos; pulmón.- congestión moderada difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa y glomerular ligera.
16	Bazo.- congestión ligera difusa, presencia moderada de megacariocitos; cerebelo.- congestión ligera difusa, edema ligero; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; hígado.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario perivascular; intestino delgado.- hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión moderada difusa, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada difusa, infiltrado linfocitario perivascular ligero; útero.- congestión difusa ligera.
19	Bazo.- hiperplasia linfoide ligera, congestión ligera difusa, presencia moderada de megacariocitos; cerebelo.- congestión ligera difusa, edema ligero, desmielinización ligera; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero, desmielinización ligera; intestino delgado.- presencia de parásitos y moco; pulmón.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario peribronquial; riñón.- congestión ligera difusa, infiltrado linfocitario perivascular ligero.
22	Cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; hígado.- inflamación supurativa ligera; pulmón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero, infiltrado linfocitario perivascular; riñón.- congestión moderada difusa.

Cuadro 11.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones
Grupo 8 (72 Hrs.)

DOSIS mg/kg	
10	Bazo.- congestión moderada difusa, presencia ligera de megacariocitos; cerebelo.- congestión ligera en plexos; cerebro.- edema ligero, congestión ligera difusa; corazón.- congestión ligera difusa, engrosamiento vascular ligero; hígado.- congestión ligera difusa, degeneración hidrópica centrilobulillar ligera; intestino grueso.- hiperplasia linfoide; pulmón.- congestión ligera difusa, zona de colapso; riñón.- hemorragias en cápsula, congestión ligera difusa y glomerular ligera.
13	Bazo.- congestión moderada difusa; cerebelo.- congestión ligera difusa, desmielinización ligera; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa, infiltración linfocitario centrilobulillar; intestino delgado.- autólisis, congestión ligera difusa; intestino grueso.- presencia de parásitos, abundante moco; pulmón.- congestión moderada difusa, engrosamiento vascular moderado; riñón.- congestión moderada difusa y glomerular ligera, dilatación vascular en corteza.
16	Cerebelo.- congestión ligera difusa, congestión ligera en meninges; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa; hígado.- congestión ligera difusa, dilatación vascular ligera; intestino delgado.- autólisis; pulmón.- congestión moderada difusa, dilatación vascular ligera, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada en glomérulos, infiltrado linfocitario perivascular hacia pelvis.
19	Bazo.- congestión moderada difusa, hiperplasia linfoide moderada, presencia moderada de megacariocitos; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; corazón.- congestión difusa ligera; hígado.- congestión ligera difusa, autólisis; pulmón.- congestión moderada difusa, dilatación vascular ligera, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión ligera en glomérulos.
22	Bazo.- hiperplasia linfoide, congestión difusa moderada, presencia moderada de megacariocitos; cerebro.- congestión ligera difusa, edema ligero; corazón.- congestión ligera difusa, hígado.- congestión ligera difusa; intestino delgado.- autólisis, presencia de parásitos y hongos; intestino grueso.- autólisis, presencia de parásitos; pulmón.- congestión ligera difusa, dilatación vascular ligera, engrosamiento vascular ligero; riñón.- congestión moderada hacia pelvicilla y glomerular moderada, arteritis.

Cuadro 12.- Casiopeína II, aplicación I.V. en ratones;
Tablas de frecuencias de las lesiones más significativas

BAZO	CONGESTIÓN									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg		+				+		+	++	
13mg	+		+	++	+	++	++	++		
16mg	+	+		+	+	++	+	+		
19mg				+		+	+	++		
22mg	+		++	+				++		

BAZO	PRESENCIA DE MEGACARIOCITOS									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg	+		+				++	++	++	+
13mg		++	+				+	++		
16mg	++	+	++	++	+	++	++	+	+	+
19mg	+	+		+	+	++	++	++		
22mg	++	++				++		++		

HÍGADO	CONGESTIÓN									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg				+	+	+			+	
13mg	+			++	+	++		+		
16mg					++			+	+	
19mg		+	+	+	++			+	+	
22mg				++	+				+	

CEREBRO	CONGESTIÓN EN PARÉNQUIMA									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg	+	+		+	+	+	+	+	+	
13mg	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+
16mg				+	++		+	+	+	
19mg	+	++		++		+	+	+		
22mg				+	+	+	+	+		

RIÑÓN	CONGESTIÓN EN PARÉNQUIMA									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13mg	+	+	++	+	++	++	++	++	++	
16mg		+	+	++	+	++	++			+
19mg	+	+		++	++	++	+			+
22mg	++			++	+	++	++	++	++	

RIÑÓN	CONGESTIÓN GLOMERULAR									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg			+		+				+	+
13mg							+	++	++	
16mg	++								++	
19mg			+	++					+	
22mg			+					++	++	

PULMÓN	CONGESTIÓN									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg	+			+	+	+	++	+	+	
13mg	+	+	+	+	+	+	++	+	++	
16mg	+	+	+	++	+	++	++	++	++	
19mg	++	+	++	+	+	++	++	++	++	
22mg	++	++	+	+	++		+	+	+	

PULMÓN	ENGROSAMIENTO DE PARED VASCULAR									
	tiempo	45'	90'	3o	6o	12o	24o	48o	72o	control
10mg	+			+				+		
13mg	+				+		+	+	++	
16mg	+	+			+		+	+	+	
19mg	+	+			+			++	+	
22mg	+	+			+			+	+	

+ grado ligero ++ grado moderado