

103
2e



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**



**"ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE CASIOPEINAS II
Y III EN ORGANOS DE RATON (NIH) POR LA
DETERMINACION DE COBRE"**

TESIS MANCOMUNADA

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N:
ELENA EUGENIA RENDÓN GARRIDO
ERIKA TENORIO MIRANDA**

MEXICO, D.F.

1998

267210

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE LENA RUIZ AZUARA
- VOCAL MARÍA ISABEL GRACIA MORA
- SECRETARIO NADIA MARCELA MUNGUÍA ACEVEDO
- 1ER. SUPLENTE FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
- 2DO. SUPLENTE ARACELI TOVAR TOVAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA,
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA, LAB. 210 Y BIOTERIO PG.

622 38 14 Y 622 53 47

ASESOR DEL TEMA:


DRA. LENA RUIZ AZUARA

SUSTENTANTES:


ELENA EUGENIA RENDÓN GARRIDO


ERIKA TENORIO MIRANDA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lena Ruiz por su confianza, apoyo y la oportunidad que nos dio de poder participar en este proyecto de investigación.

A Isabel, por las asesorías, consejos y facilidades brindadas durante la elaboración de esta tesis.

A Nadia, te agradecemos tu valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

A Lucía, Héctor y Mabel, por todo el tiempo que invirtieron en ayudarnos y por hacer nuestra estancia en la UEA tan agradable.

A Angel y Armando, por enseñarnos y asistirnos en todo lo necesario.

Agradecemos el apoyo financiero brindado por:

- ◆ Fundación UNAM
- ◆ DGAPA IN- 201996
- ◆ DGAPA IN- 207393
- ◆ DGAPA IN- 209995

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Capítulo I. Antecedentes	1
1. El Cáncer	1
1.1. Metástasis.....	2
1.2. Sistemas de señal.....	5
1.3. Factores que originan el cáncer	6
2. Tratamientos antineoplásicos.....	9
2.1. Fármacos antineoplásicos y ciclo celular	9
2.2. Quimioterapia.....	11
2.2.1. Cisplatino	18
3. Casiopeínas	22
4. Distribución de fármacos	28
5. Cobre y zinc.....	32
5.1. Las separaciones que la biología puede lograr.....	33
5.2. La incorporación de los elementos en el equilibrio: la selectividad de la incorporación.....	34
5.3. Zinc: catálisis ácido de Lewis y regulación	39
5.3.1. Zinc en el espacio biológico	39
5.3.2. Zinc como grupo catalítico en enzimas	41
5.4. Cobre: oxidasas extracitoplásmicas y formación de matriz	43
5.4.1. Transporte y oxidasas del cobre.....	45
5.4.2. Funciones del cobre	45
5.5. Cobre y zinc: la matriz conectiva extracelular	46

5.6. Concentración y distribución del cobre y zinc en tejidos.....	48
6. Animales	50
Capítulo II. Objetivos	52
Capítulo III. Metodología.....	53
1. Material	53
1.1. Material biológico	53
1.2. Equipo e instrumentos	54
1.3. Reactivos.....	56
2. Metodología.....	56
2.1. Inoculación del fármaco	56
2.2. Sacrificio de los animales	60
2.3. Tratamiento de las muestras	60
Capítulo IV. Resultados y Discusión	78
Capítulo V. Conclusiones.....	99
Capítulo VI. Anexos.....	101
Anexo I. Espectroscopía de Absorción Atómica	101
Anexo II. Tablas de datos	107
Anexo III. Tablas de datos	115
Capítulo VII. Bibliografía	139

Abreviaturas

- ACV - Advanced Composite Vessel
- ADN - ácido desoxirribonucleico
- As- arsénico
- C- carbono
- Ca-calcio
- C_{max} - concentración máxima
- Co - cobalto
- CO_2 - dióxido de carbono
- Cr-cromo
- Cu - cobre
- DL_{50} - dosis letal cincuenta
- F- flúor
- Fe -hierro
- G_1 - fase presíntesis del ciclo celular (gap1)
- G_2 - fase postsíntesis del ciclo celular (gap2)
- gly - glicina
- G_0 - estadio no proliferativo del ciclo celular
- HNO_3 - ácido nítrico
- I-yodo
- K-potasio
- L-ligante
- M - mitosis
- M- metal
- μg - microgramo
- Mg-magnesio
- mL - mililitro
- Mn - manganeso
- Mo- molibdeno
- MT-metalotioneína
- Na- sodio
- Ni - níquel
- N-nitrógeno
- NO_2 - óxido nítrico
- O- oxígeno
- P- fósforo
- P- proteína
- ppm-partes por millón
- Pt - platino
- S - fase de síntesis del ciclo celular
- S-azufre
- Se-selenio
- Si-silicio
- SNC - Sistema Nervioso Central
- T_{max} - tiempo al cual se encuentra la máxima concentración
- Zn - zinc

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. El Cáncer.

El cáncer es un problema global y no, como a veces se piensa, limitado a las naciones industriales. Hay estimados 5.9 millones de nuevos casos por año mundialmente. Sin embargo, hay una gran variación en los patrones de ocurrencia de cáncer en diferentes regiones del mundo.

El impacto positivo de la quimioterapia en la supervivencia de pacientes con cáncer se puede observar desde las cifras de supervivencia, las cuales en E.U. en la actualidad se aproximan a un 50%, comparado con 40% a principios de los 60's antes del uso extendido de la quimioterapia. La quimioterapia puede ser curativa en un 12% de tipos de cáncer humano incluyendo coriocarcinoma, leucemia linfocítica aguda, enfermedad de Hodgkin y cáncer testicular.

El tratamiento sistémico con fármacos citotóxicos es comúnmente el único tratamiento que puede influir en todos los sitios de una enfermedad metastásica.

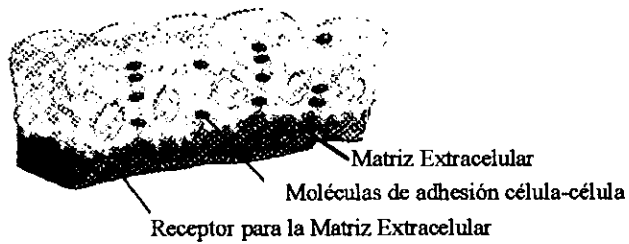
El cáncer o neoplasias malignas constituyen un grupo de enfermedades relacionadas que pueden ocurrir en cualquier tejido corporal y que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales e inmaduras que no son susceptibles a las señales de control de las demás células normales del organismo. Este crecimiento sin restricciones tales como la diferenciación, limitación del tamaño del órgano, regulación hormonal, etc., permite que las células se infiltren a los tejidos adyacentes destruyéndolos, y frecuentemente sean capaces de inducir metástasis (regionales y a distancia).⁽¹⁾

1.1. Metástasis.

La habilidad de células cancerígenas para invadir otros tejidos y diseminarse a otras partes del cuerpo donde pueden generar nuevos tumores (metástasis) es la mayor propiedad que lleva a la muerte del huésped. Las células cancerígenas deben desprenderse de su localización original, invadir un vaso sanguíneo o linfático, viajar en la circulación a un sitio lejano y establecer una nueva colonia celular. En tejidos

normales, existen dos tipos de adhesión celular: la adhesión entre células y la adhesión a la matriz extracelular (*arriba*). Si una célula no puede adherirse a otras células, puede convertirse en invasora y migrar a través de la matriz (*centro*). Si a una célula le falta adherirse a la matriz extracelular, puede desprenderse de su tejido nativo (*abajo*). Generalmente, si una célula no puede readherirse a la matriz extracelular o si se adhiere a un tipo de matriz incorrecto, muere por apoptosis (Figura 1). Las células cancerosas, sin embargo, pueden sobrevivir sin adherirse.⁽¹⁵⁾

Adhesión Celular



Importancia de la adhesión célula-célula



Importancia de la adhesión a la matriz extracelular

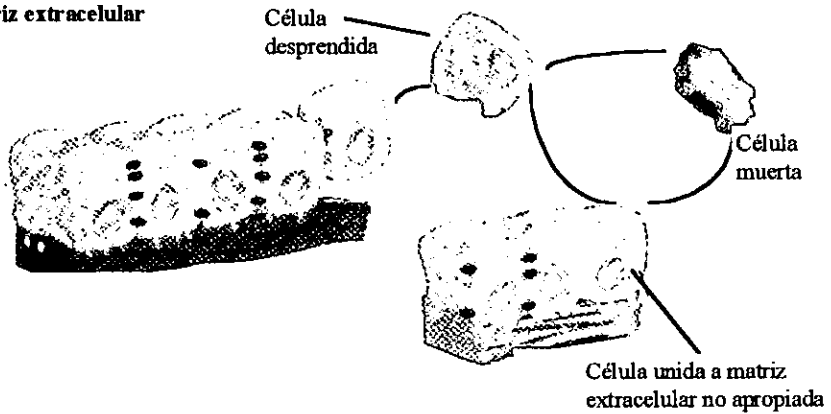


Figura 1. Adhesión Celular

Las proteínas formadas a partir de los oncogenes mandan un mensaje falso al núcleo de que la célula se encuentra adherida de forma apropiada cuando no lo está, deteniendo entonces su muerte por apoptosis. Las células cancerígenas invaden los tejidos liberando enzimas llamadas metaloproteinasas que disuelven las membranas y otras matrices extracelulares. Otras células tienen menor cantidad de estas enzimas y más inhibidores de enzimas.

1.2. Sistemas de señal.

Dos clases de genes, los cuales juntos constituyen solamente una pequeña proporción del genoma, juegan papeles principales en el comienzo del cáncer. En su configuración normal, estos genes coordinan el ciclo de vida de las células. Los proto-oncogenes estimulan el crecimiento, mientras que los genes supresores de tumor lo inhiben. Al ser mutados, los proto-oncogenes pueden convertirse en oncogenes carcinogénicos que llevan a una multiplicación excesiva. Las mutaciones pueden ocasionar la transcripción excesiva de la proteína estimuladora del crecimiento codificada en el proto-oncogén. Los genes supresores de tumor, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando son inactivados por las mutaciones.

Las vías de señal en células normales llevan los mensajes controladores del crecimiento desde la superficie exterior hasta el núcleo. Ahí, un aparato molecular conocido como el “reloj del ciclo celular” recibe los mensajes y decide si la célula debe dividirse o no. Las células cancerosas muchas veces proliferan en exceso debido a que mutaciones genéticas ocasionan que la vía estimuladora mande una señal positiva o que la vía inhibitoria no pueda mandar señales de alto, por lo que la célula entra al ciclo celular.⁽¹⁴⁾

Existe un sistema de seguridad presente en cada célula humana que provoca que la célula se suicide (lleve a cabo “apoptosis”, muerte programada) si algunos de sus componentes esenciales están dañados o si sus sistemas de control son irregulares. Las células cancerosas que se van desarrollando diseñan varios medios para evadir la apoptosis.⁽¹⁴⁾

1.3. Factores que Originan el Cáncer.

Actualmente no se conoce la causa de este desarrollo maligno; sin embargo, se han propuesto diversos factores que, solos o en combinación, pudieran iniciar dicho proceso. Por ejemplo, la exposición a algunas sustancias potencialmente carcinogénicas que estén presentes

en contaminantes ambientales (el humo del tabaco), la dieta (grasa animal saturada y carne roja en particular se asocian con varios tipos de cáncer), los desechos industriales (asbesto, materiales de pintura, etc.), la radiación, traumatismos repetidos, la asociación con ciertos virus oncogénicos, la posible predisposición genética (los genes que se heredan de los padres influyen en el desarrollo del cáncer ya que se puede nacer con mutaciones que promueven el crecimiento excesivo de ciertas células) y el proceso de envejecimiento. Se ha visto que estos factores pueden llegar a causar daño al ADN de las células, produciendo cambios en su estructura, lo cual provoca que no exista respuesta a las señales que controlan su crecimiento y reproducción. Solamente evidencia indirecta relaciona el daño inducido por especies reactivas de oxígeno (radical ion superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, radical de óxido nítrico, etc.) a la iniciación y desarrollo del cáncer humano. Las lesiones genéticas pueden provocarse cuando especies reactivas de oxígeno reaccionan con bases púricas o pirimídicas para formar aductos de ADN. La apoptosis también puede desechar algunas células mutadas precancerígenas del cuerpo. El balance entre la inducción del cáncer y apoptosis determinará si el desarrollo del cáncer procederá o será suprimido.⁽¹⁶⁾

La transformación maligna requiere al menos de tres pasos: la iniciación, la promoción y la progresión.

- * La iniciación se puede entender como un conjunto de eventos que dan lugar a la pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto con células contiguas. La secuencia exacta en que esto ocurre aún está muy lejos de ser esclarecida pero se han generado algunas teorías que pretenden explicar el fenómeno desde dos perspectivas, la genética y la relacionada con las glicoproteínas de la superficie celular .
- * La promoción se refiere a la perpetuación del daño celular, probablemente por la activación de oncogenes o inactivación de los llamados “genes supresores de tumor”. A su vez, se ha postulado que porciones del genoma, proteínas y enzimas son los oncogenes y los genes supresores de tumor (antioncogenes).
- * La progresión requiere el escape de la célula tumoral a los factores inmunes de defensa del organismo, lo que implica una libertad mitótica sin límite .⁽¹⁾

2. Tratamientos Antineoplásicos.

Durante muchos años el tratamiento del cáncer se ha basado en tres tipos de procedimientos, los cuales son: el tratamiento quirúrgico, radioterapia y quimioterapia. En la actualidad se han descubierto y se están utilizando otras formas que son la inmunoterapia, la hipertermia, la hipotermia, la hormonoterapia, así como otros que se encuentran en fase experimental como la terapia génica, la utilización de fotosensibilizadores, terapia de radiosensibilizadores y radioprotectores, la radioterapia con partículas densamente ionizantes y la radioterapia intraoperativa.⁽¹⁸⁾

2.1. Fármacos Antineoplásicos y Ciclo Celular.

Para el empleo apropiado de la nueva generación de agentes antineoplásicos resulta esencial el conocimiento de la cinética del ciclo celular. Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y en consecuencia tienen actividad sólo contra células que están en el proceso de división. De la misma manera, las neoplasias humanas que en la actualidad son más susceptibles al tratamiento quimioterápico son aquellas que tienen una gran fracción en

crecimiento, es decir, un alto porcentaje de células en proceso de división. De la misma manera, los tejidos normales que proliferan rápidamente (médula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal) pueden ser dañados por algunas de estas potentes drogas antineoplásicas y esta toxicidad con frecuencia limita la actividad de ellas.⁽²⁾

Por otra parte, los tumores de crecimiento lento con una fracción de crecimiento pequeña (por ejemplo, carcinomas de colon o pulmón) con frecuencia no responden a las drogas citotóxicas. Aunque existen diferencias en la duración del ciclo celular entre células de distinto tipo, todas las células presentan un patrón similar durante el proceso de división. Este puede ser caracterizado de la siguiente manera:⁽²⁾

1. Fase presíntesis (G_1) en la cual la célula incrementa su tamaño y se prepara para copiar su ADN.
2. Este se copia en la fase de síntesis de ADN (S), y permite a la célula duplicar exactamente su complemento de cromosomas.
3. A la terminación de la síntesis del ADN le sigue un intervalo, la fase postsíntesis (G_2), en la cual la célula se prepara para la fase M.
4. La mitosis (M): La célula G_2 , que contiene un complemento doble de ADN se divide en dos células hijas G_1 . Cada una de ellas

puede inmediatamente volver a entrar en el ciclo celular o pasar a un estadio no proliferativo conocido como G_0 .

La mayoría de los agentes antineoplásicos actúan específicamente en procesos como síntesis del ADN, transcripción o la función de la mitosis de los fibroblastos y, por lo tanto, en lo que se refiere al ciclo celular específico.⁽²⁾

2.2. Quimioterapia.

La quimioterapia consiste en la utilización de compuestos químicos. Este tipo de terapia ha presentado resultados alentadores dado que los compuestos químicos pueden influir en todos los sitios de una enfermedad metastásica después de ser administrados. Esto último es simultáneamente la principal ventaja y desventaja, ya que estos compuestos no discriminan entre células neoplásicas y células normales con alto índice reproductivo.⁽¹⁹⁾ En general, los principales efectos tóxicos que produce un agente quimioterapéutico son, en forma aguda: anorexia, vómito, diarrea, supresión funcional de la médula ósea y del sistema inmune, así como anafilaxia y cambios en el sistema urinario. De forma crónica se presentan daños principalmente en el corazón.⁽²⁰⁾

Los principales órganos afectados por la toxicidad de los fármacos anticancerígenos y su frecuencia son: gastrointestinal (92%), médula ósea (88%), hígado (52%), riñón (40%), cardiovascular (40%), neuromuscular (28%) y respiratorio (20%).⁽²³⁾

La toxicidad de tejidos normales limita la dosis y la frecuencia de administración del fármaco. Tejidos adultos que tienen un alto rango de proliferación celular incluyen médula ósea, mucosa intestinal, folículos pilosos y gónadas. Muchas drogas causan daño a éstos órganos, y esta toxicidad ocurre debido a la actividad preferencial de la mayoría de las drogas a células de rápida proliferación.

Hace 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con fármacos, se sabe que con este propósito se empleaban preparaciones de plata, zinc o mercurio.⁽³⁾ Sin embargo, no se documentó sino hasta 1865 el uso de un tratamiento sistemático en neoplasias malignas cuando Lissauer administraba arseniato de potasio a pacientes con leucemias y observaba efectos positivos; pese a estos antecedentes, la quimioterapia del cáncer como tal se sistematizó 80 años después.

En 1898, Paul Erhlich descubrió el primer agente alquilante (arsefenamina), 50 años después de ser descubierto comenzó a ser aplicado en el tratamiento de neoplasias en humanos.⁽¹⁶⁾

Una de las propiedades más importantes de los agentes alquilantes es su potencial para interferir, aparentemente de manera selectiva, en la proliferación celular, pareciendo dejar a las células no proliferativas sin daño alguno relativamente. La depresión de la médula ósea se considera el efecto tóxico más serio de estos agentes. Las mostazas nitrogenadas interfieren con la mitosis, producen aberraciones cromosómicas, poliploidías, aneuploidías y una variedad de alteraciones citológicas. Estos efectos se observaban en las etapas de desarrollo así como en el adulto, en tejidos normales y neoplásicos, incluyendo al tejido nervioso, y en estudios *in vitro* e *in vivo*.⁽¹⁶⁾

El origen de los fármacos puede ser a partir de productos naturales o bien sintéticos, estos últimos pueden clasificarse a su vez como compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. Actualmente existen numerosos fármacos disponibles al clínico, en su mayoría compuestos orgánicos y sólo unos pocos de origen inorgánico. Los fármacos comúnmente empleados en la quimioterapia de las enfermedades neoplásicas pueden ser divididos en varias clases como aparece en el siguiente cuadro (Figura 2):⁽²⁾

CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES GENÉRICOS (otros nombres)	ENFERMEDAD
AGENTES ALQUILANTES	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina (HN ₂)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin.
		Ciclofosfamida Isofosfamida	Leucemias linfoidea aguda y crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, cuello de útero, ovario, pulmón, tumor de Wilms, testículo, sarcomas de tejido blando.
	Alquilsulfonatos	Busulfán	Leucemia granulocítica crónica
	Nitrosoureas	Carmustina (BCNU)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumores de cerebro primarios, mieloma múltiple, melanoma.
		Semustina (metil- CCNU)	Tumores primarios de cerebro, estómago, colon.
Triacenos	Dacarbazina (DTIC;	Melanoma, enfermedad de	

		dimetiltriacenoimidazo -carboxamida)	Hodgkin, sarcomas de tejidos blandos.
ANTIMETA- BOLITOS	Análogos del ácido fólico	Metotrexato (ametofterina)	Leucemia linfoidea aguda, coriocarcinoma, micosis fungoides, mama, cabeza y cuello, pulmón, sarcoma osteogénico.
	Análogos de la pirimidina	Flourouracilo (5- flourouracilo; 5-FU) Floxuridina (fluorodesoxiuridina; FudR)	mama, colon, estómago, páncreas, ovario, cabeza y cuello, vejiga urinaria, lesiones premalignas de piel (uso tópico).
	Análogos de la purina e inhibidores relacionados	Mercaptopurina (6- mercaptopurina; 6-MP)	Leucemias linfoidea aguda, granulocítica aguda y granulocítica crónica.
	Alcaloides de la vinca	Vinblastina (VLB)	Enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mama, testículo.
		Vincristina	Leucemia linfoidea aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, radomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, tumor de pulmón de

PRODUCTOS NATURALES	Epipodofilotoxinas	Etopósido Tenipósido	células pequeñas. Testículo, tumor de pulmón de células pequeñas y otros tumores de pulmón, mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemia granulocítica aguda, sarcoma de Kaposi.
	Antibióticos	Bleomicina	Testículo, cabeza y cuello, piel, esófago, pulmón y tracto génitourinario; enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin.
		Mitomicina (Mitomicina C)	Estómago, cuello de útero, colon, mama, páncreas, vesícula, cabeza y cuello.
	Enzimas	L-asparaginasa	Leucemia linfocítica aguda
	Modificadores de la respuesta biológica	Interferón alfa	Leucemia de células vellosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, carcinoma de células renales, ovario, vesícula, linfomas no Hodgkin, micosis

			fungoides, mieloma múltiple, leucemia granulocítica crónica.
AGENTES VARIOS	Complejos de coordinación del platino	Cisplatino (<i>cis</i> -DDP) Carboplatino	Testículo, ovario, vesícula, cabeza y cuello, pulmón, tiroides, cuello de útero, endometrio, neuroblastoma, sarcoma osteogénico.
	Antracenediona	Mitoxantrona	Leucemia granulocítica aguda, mama.
	Urea sustituida	Hidroxiurea	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombocitosis esencial, melanoma.
	Derivado de la metilhidrazina	Procarbazina (N-metilhidracina, MIH)	Enfermedad de Hodgkin
	Supresores corticosuprarrenales	Mitotano (<i>o, p'</i> -DDD)	Corteza suprarrenal
		Aminoglutetimida	Mama
HORMONAS Y	Corticosteroides	Prednisona (varios otros preparados equivalentes disponibles)	Leucemias linfocíticas crónica y aguda, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mama.
	Progestágenos	Caproato de	Endometrio, mama.

ANTAGONISTAS		hidroxiprogesterona Acetato de medroxiprogesterona Acetato de megestrol	
	Estrógenos	Dielilestilbestrol Etinilestradiol	Mama, próstata.
	Antiestrógenos	Tamoxifeno	Mama

Figura 2. Fármacos empleados en la quimioterapia.

2.2.1. Cisplatino.

En la quimioterapia del cáncer existen 44 compuestos aprobados para su uso, de estos, un compuesto descubierto de manera azarosa vino a revolucionar la quimioterapia actual, es conocido comercialmente como Cisplatino (*cis*-diamonio-dicloro-platino (II)), y resulta ser un complejo de coordinación que se sintetizó el siglo pasado y fue señalado por vez primera por Rosenberg ⁽⁴⁾ en 1965 por mostrar actividad antibiótica. Estudios posteriores por el mismo autor en 1969 establecen la actividad antitumoral; a la fecha se sabe que actúa como un agente antineoplásico interactuando con el ADN al igual que un análogo de él que presenta la misma efectividad pero que resulta menos tóxico: Carboplatino.^(5,6) Con

este antecedente se puede inferir que complejos de coordinación que poseen una estructura semejante en su diseño al Cisplatino (Figura 3) o Carboplatino podrán presentar actividad antineoplásica.

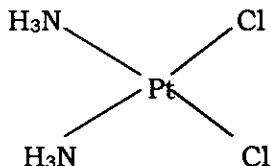


Figura 3. Cisplatino (cis-diamonio-dicloro-platino(II)).

La principal toxicidad del cisplatino que se observó primero en perros y monos ya se ha observado en pacientes. Esta incluye toxicidad renal dosis-limitante, náusea y vómito, mielosupresión, ototoxicidad, y disminución en los electrolitos séricos. El uso intensivo de hidratación intravenosa cuya consecuencia es la diuresis, ha disminuido la gravedad de la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino. El número de efectos secundarios menores continúa incrementando conforme incrementa la experimentación clínica del fármaco. Estos incluyen ahora la tinitus, sordera, neuropatía periférica e hipomagnesemia.

El cisplatino es el primer miembro de una nueva clase de fármacos anticancerígenos potentes (los complejos metálicos de coordinación) en adquirir uso general en la quimioterapia del cáncer. Se ha demostrado ser efectivo solo o en combinación para el tratamiento de una amplia variedad de tipos de cáncer sólidos en el hombre. La evidencia sugiere que puede ser curativo para cáncer testicular y de los ovarios. También es paliativo en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, de la vesícula, próstata, pulmón y algunos cánceres pediátricos. ⁽⁴⁾

Los compuestos de Pt (II) tales como el cisplatino reaccionan con nucleófilos para producir productos de adición; el cisplatino es bifuncional en el sentido de que cada molécula tiene dos sitios de reacción con nucleófilos. En este respecto, el cisplatino y sus derivados se asemejan a los agentes alquilantes bifuncionales como las mostazas nitrogenadas. Como éstas, el cisplatino puede reaccionar con una variedad de sitios moleculares en la célula, pero la reacción más significativa desde un punto de vista biológico es probablemente con el ADN. Los ejemplos de posibles tipos de aductos del cisplatino involucrando al ADN se ilustran en la Figura 4.⁽⁴⁾

Recientemente se aisló un aducto ADN-cisplatino y se obtuvo la estructura cristalina, lo que vino a corroborar la propuesta hecha varios lustros antes.

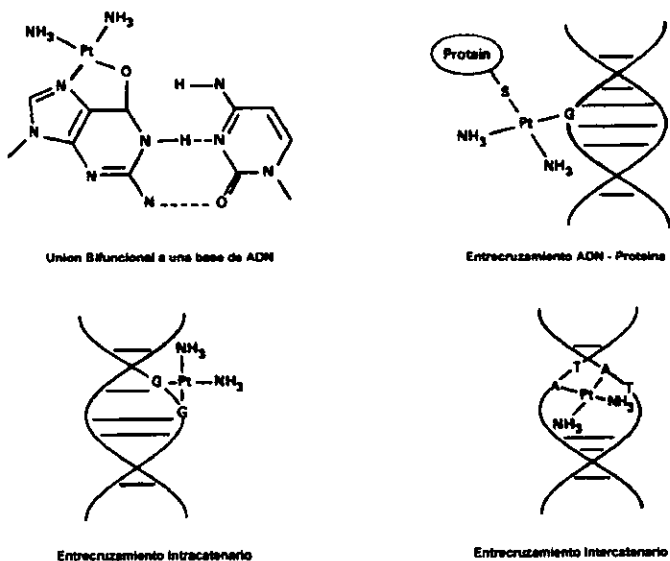


Figura 4. Mecanismos de acción del Cisplatino.

Desafortunadamente, muchos tumores son totalmente refractarios al cisplatino. Este hecho ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de muchos nuevos agentes en la búsqueda de compuestos con toxicidad reducida y diferentes propiedades biológicas. De manera

ideal, la búsqueda pretende encontrar fármacos con las siguientes características:⁽⁴⁾

- a) Ausencia de resistencia-cruzada al cisplatino.
- b) Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos.
- c) Disminución de efectos eméticos y renales (tóxicos directos en general).
- d) Sinergismo en terapias combinadas .
- e) Bajo potencial oncogénico.

3. Casiopeínas.

Por añadidura en México, la necesidad de importación de estos productos y su costo muy elevado, hace que el desarrollo de productos antineoplásicos adquiera prioridad. El costo de la quimioterapia como tratamiento primario o adyuvante hace, en ocasiones, inaccesible la opción a un gran número de pacientes con las consecuencias éticas que esto significa.⁽⁷⁾

En 1975, la Dra. Ruiz-Ramírez, en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, concibió la idea de

diseñar compuestos de coordinación con posible actividad contra el cáncer. El diseño de los compuestos se realizó considerando además de los puntos anteriores (a - e), varios parámetros particulares de compuestos de coordinación, como son: ⁽⁷⁾

- * El metal y en qué estado de oxidación
- * El número de coordinación del mismo

Con respecto a los ligantes, se considera la capacidad quelatante y el grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad de los mismos. Estas características se reflejan en las propiedades que estos compuestos presentan, en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de los compuestos con el ADN, entre otras posibilidades de mecanismo de actividad. La familia de compuestos llamada Casiopeínas ⁽²⁸⁾ contienen cobre (II) como centro metálico que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N, N) y otro que puede ser aminoacidato (N, O) o donador (O, O).⁽⁷⁾ Estos compuestos han sido clasificados en siete grandes grupos I, II, III, IV, V, VI y VII cuyas fórmulas generales se muestran en la Figura 5.

Los compuestos de coordinación desarrollados por Ruiz-Ramírez fueron diseñados para mostrar una actividad biológica potencial. Dichos compuestos poseen en su esfera de coordinación metales de la primera serie de transición, de preferencia esenciales biológicamente (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn).⁽⁸⁾ A partir de 1980 se inician trabajos de constatación biológica *in vitro* con base en el postulado que pueden tener actividad antineoplásica. Esta hipótesis se apoyó tanto en los postulados antes mencionados como en los postulados de Rosenberg, los últimos a su vez fueron derivados del conocimiento farmacodinámico del cisplatino en líneas tumorales y que se resumen en los siguientes puntos: ⁽⁴⁾

- a) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- b) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
- c) Dos ligantes *cis* monodentados (o uno bidentado) como grupos salientes son necesarios. Los isómeros *trans* son inactivos.
- d) Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- e) Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.

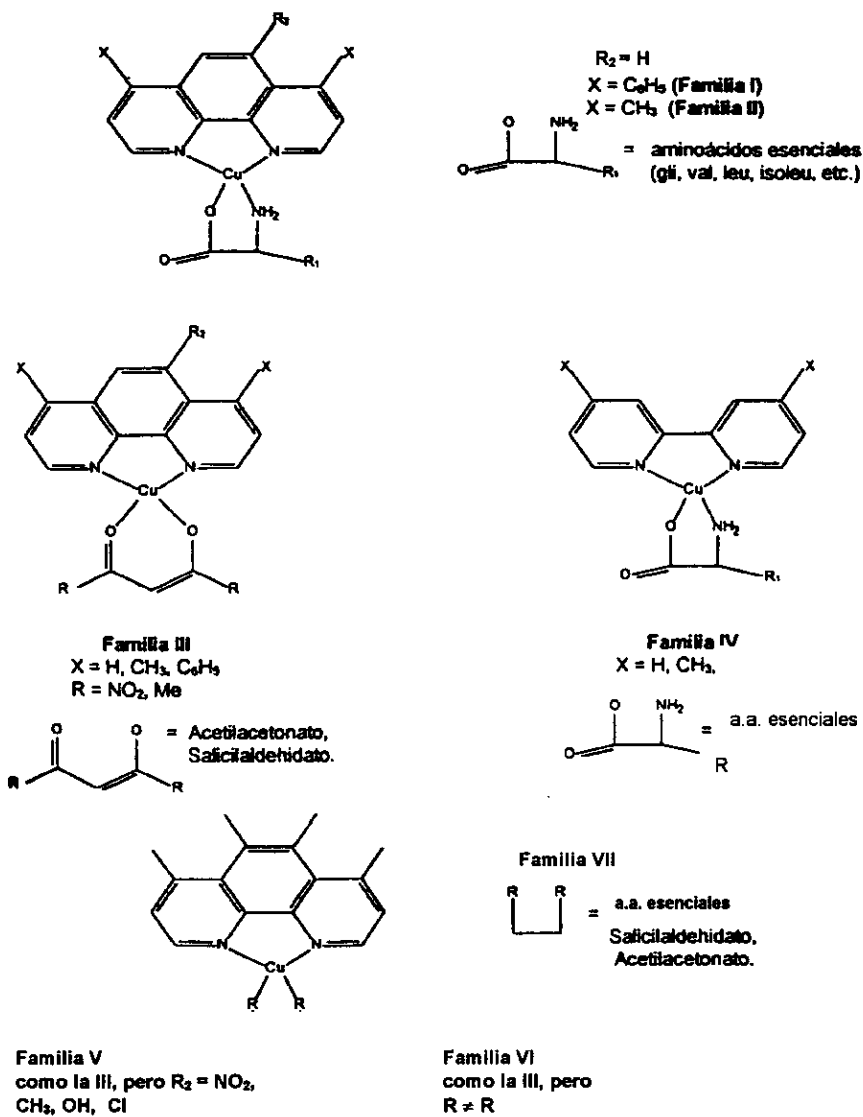


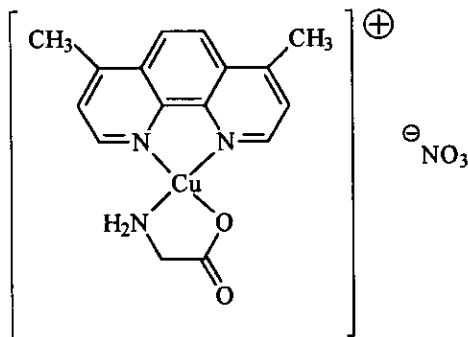
Figura 5. Fórmulas generales de las familias de Casiopeinas.

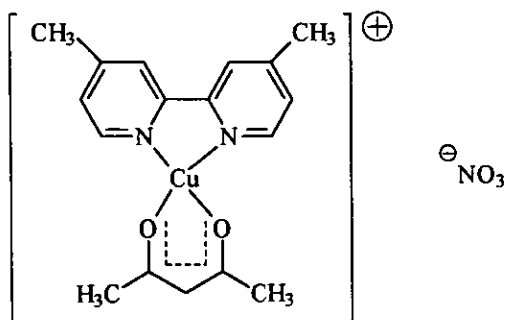
Hasta la fecha se han sintetizado cerca de 100 Casiopeínas, las cuales están caracterizadas químicamente y en proceso de caracterizarse con detalle fisicoquímicamente.⁽²⁴⁾ Se encuentran patentadas.

La actividad biológica de algunas Casiopeínas ha sido estudiada más a fondo y han sido sometidas a múltiples pruebas de acuerdo con las normas internacionales de evaluación de fármacos con potencial anticancerígeno, y los resultados han demostrado que estas moléculas tienen actividad citostática, citotóxica y antineoplásica, lo cual motiva a continuar con estos estudios en otras moléculas de la misma familia.⁽²⁵⁾

Las Casiopeínas utilizadas son la Casiopeína II y Casiopeína III^(9, 10) cuyas estructuras son las siguientes (Figura 6):

Casiopeína II



Casiopeína III**Figura 6. Estructuras de Casiopeína II y III.**

El desarrollo de Casiopeínas es un proyecto multidisciplinario integrado por equipos de trabajo de diferentes instituciones: Facultad de Química (UNAM), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), Facultad de Medicina (UNAM), Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), Instituto de Fisiología Celular (UNAM), Centro para la Innovación Tecnológica (UNAM), Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y otras colaboraciones a nivel internacional.

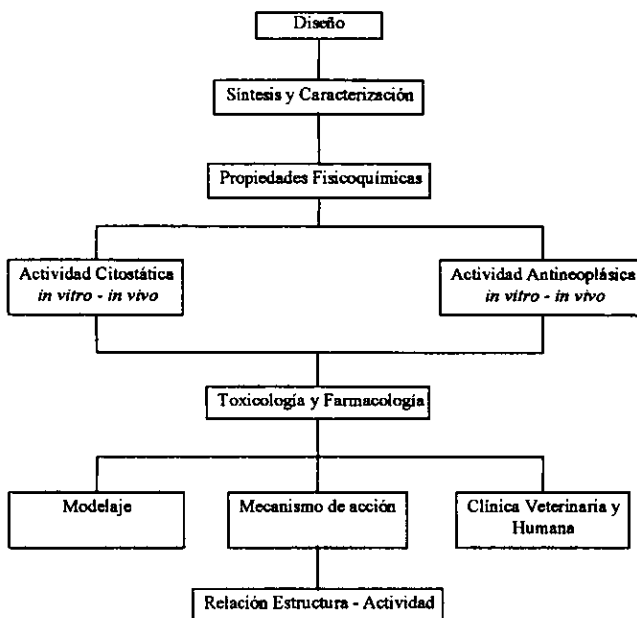


Figura 7. Diagrama de flujo para el desarrollo de fármacos.

4. Distribución de Fármacos.

Para producir sus efectos característicos, un fármaco debe estar presente en concentraciones apropiadas en sus sitios de acción. Si bien las concentraciones alcanzadas son, obviamente, una función de la cantidad de fármaco administrado, también dependen del grado y

velocidad de su absorción, distribución, fijación o localización en tejidos, biotransformación y excreción.

La absorción, distribución, biotransformación y excreción de un fármaco implican su pasaje a través de membranas celulares. En consecuencia, es esencial tener en cuenta los mecanismos mediante los cuales los fármacos cruzan las membranas, y las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y de las membranas que afectan esta transferencia. El tamaño y la forma moleculares, la solubilidad en el sitio de absorción, el grado de ionización y la solubilidad relativa en lípidos de sus formas ionizada y no ionizada son características importantes de un fármaco.

Cuando un compuesto penetra en una célula, obviamente debe atravesar su membrana plasmática. Otras barreras que se oponen al movimiento son una o varias capas celulares, como sucede en el epitelio intestinal y la piel, respectivamente. A pesar de estas diferencias estructurales, la difusión y transporte de los fármacos a través de estas diversas barreras tienen muchas características comunes, ya que los distintos agentes en general pasan a través de las células y no entre ellas. La membrana plasmática constituye, entonces, su barrera común.

Después de que un fármaco es absorbido o administrado en la corriente sanguínea, es distribuido en los líquidos intersticiales y celulares. Los perfiles de distribución de los fármacos reflejan ciertos factores fisiológicos y propiedades fisicoquímicas de los agentes. Así, puede distinguirse una fase inicial de distribución determinada por el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo regional. El corazón, el hígado, el riñón, el cerebro y otros órganos con buena irrigación reciben la mayor parte del fármaco durante los primeros minutos después de la absorción. Después, se produce una segunda fase de la absorción que también está limitada por el flujo sanguíneo e incluye una fracción mucho más grande de la masa corporal que la primera fase. Con estas formas de distribución del flujo sanguíneo existen factores que determinan la velocidad de difusión de los fármacos en los tejidos. La difusión en el compartimiento intersticial se produce rápidamente debido a la naturaleza permeable de las membranas del endotelio capilar (excepto en el cerebro). Los compuestos insolubles en lípidos que atraviesan poco las membranas están limitados en su distribución y, por lo tanto, en sus posibles sitios de acción. La distribución también puede estar restringida por la fijación del fármaco a las proteínas plasmáticas. Un agente que se encuentre fijado firmemente y en proporción elevada tiene un acceso limitado a los sitios de acción celulares y puede ser metabolizado y

eliminado lentamente. Los fármacos pueden acumularse en los tejidos en concentraciones más elevadas que lo esperado en función del equilibrio de difusión como resultado de gradientes de pH, fijación a constituyentes intracelulares o partición en lípidos.⁽²⁾

Los fármacos que se han acumulado en un tejido dado pueden actuar como reservorio prolongando la acción del agente en ese mismo tejido o en un sitio distante al cual llega mediante la circulación.

El flujo sanguíneo cerebral es la única limitación de la permeabilidad del SNC para los fármacos con elevada liposolubilidad. Al aumentar la polaridad, la velocidad de difusión de los fármacos en el SNC es proporcional a la liposolubilidad de las especies no ionizadas. Los agentes altamente ionizados en general no son capaces de penetrar el SNC desde la circulación.

Como ya se ha mencionado, los compartimientos en los cuales se acumulan los fármacos constituyen reservorios potenciales. Si el compuesto acumulado se encuentra en equilibrio con el presente en el plasma y es liberado a medida que declina la concentración en este último, se mantiene una concentración en el plasma y en su sitio de acción y se prolongan los efectos farmacológicos del agente. Sin embargo, si el reservorio tiene una gran capacidad y se ocupa rápidamente, la

distribución del fármaco se altera de modo que se requieren inicialmente cantidades mayores de este para proporcionar una concentración terapéuticamente efectiva en el órgano blanco.

5. Cobre y Zinc.

Uno de los motivos por los que las Casiopeínas contienen cobre es porque es un metal esencial y las células tienen mecanismos para regularlo, de aquí que los compuestos que lo contengan serán menos tóxicos.

Así mismo, el presente trabajo pretende no solo la determinación de cobre, sino además la de zinc dado que se conoce que los niveles de cobre y zinc en la célula son inversamente proporcionales. Tener información a este respecto, proporcionará indicios de si el cobre de la Casiopeína se encuentra libre o si se mantiene su naturaleza de complejo.

Unos 30 elementos son reconocidos como esenciales para la vida. Algunos son requeridos en abundancia, o aunque sea en cantidades macroscópicas, en esencialmente todas las formas de vida: H, Na, K, Mg, Ca, C, N, O, P, S y Cl. Los demás se encuentran en cantidades "traza" (o

ultratraza), aunque el Fe, Cu y Zn están en la cima de esta escala de “trazas” y son, aparentemente, también esenciales para todas, o por lo menos casi todas, las formas de vida. Los elementos restantes que son requeridos al menos por algunas formas de vida son Li, B, F, Si, V, Cr, Mn, Co, Ni, As, Se, Mo, I y W.⁽²⁶⁾

Uno de los principales papeles de los elementos metálicos en bioquímica es en las metaloenzimas. Este término se aplica a las enzimas que requieren la participación de un ion metálico en el sitio activo de su función y además enlazan otro ion metálico (o iones) aún en estado latente.⁽²⁶⁾

5.1. Las separaciones que la biología puede lograr.

Una célula puede utilizar cinco tipos de trampas acuosas para los elementos: ⁽²²⁾

1. La membrana celular puede ser utilizada como una barrera física para difusión de un ión libre o acomplexado.
2. Un elemento puede ser almacenado, libre o acomplexado, dentro de una vesícula interna u organelo después de pasar una segunda membrana.
3. Polímeros internos pueden unirse a un elemento en el equilibrio.

4. Polímeros internos pueden incorporar un elemento formando enlaces termodinámicamente inestables pero estables cinéticamente.
5. Dos elementos atrapados pueden combinarse para formar un precipitado en el equilibrio.

5.2. La incorporación de los elementos en el equilibrio: la selectividad de la incorporación.

La trampa para la incorporación del cobre y zinc es la unión termodinámica y cinéticamente estable a polímeros, proteínas y polisacáridos (intercambio lento).

Los ligantes selectivos para los metales de transición son los donadores N/S. Algunas características generales de los complejos con iones metálicos presentes en sistemas biológicos se muestran en la tabla 1: (22)

Características	Na⁺, K⁺	Mg²⁺, Ca²⁺	Zn²⁺, Ni²⁺	Fe, Cu, Co, Mo, Mn
Estado de oxidación predominante	+1	+2	+2	Más de un estado
Estabilidad de los complejos	Muy baja	Baja o Mediana	Alta	Alta, pero mediana en el caso de Mn ²⁺ y Fe ²⁺
Átomos donadores preferidos	Oxígeno	Oxígeno	Azufre o nitrógeno	Nitrógeno o azufre (y especialmente oxígeno en los casos de algunos complejos de Fe y Mn)
Movilidad en el medio biológico	Muy móvil	Semi-móvil	Estático, Ni, generalmente estático, Zn.	Estático (semi móvil en los casos de Mn ²⁺ y Fe ²⁺)

Tabla 1. Características generales de los compuestos con iones metálicos en sistemas biológicos.

Las diferentes formas de lograr una unión termodinámica selectiva, basándose en el tamaño, tipo de donador y forma del ligante son:⁽²²⁾

1. selección por carga;
2. selección por tamaño del ión;
3. selección por el átomo ligante donador. Los iones de cobre son los que se unen con más fuerza y si el cobre estuviera en exceso sobre las concentraciones totales de los ligantes libres N/S, todos los demás metales de transición divalentes serían excluidos de los centros N, S. Sin embargo, a través de mecanismos biológicos de control, ciertos ligantes fuera o dentro de las células se encuentran presentes en un ligero exceso relativo a ciertos metales, los cuales están limitados en su disponibilidad. Ambos ligantes y los iones metálicos también pueden estar restringidos por un bombeo selectivo a través de las membranas. La competencia entonces es tal que cada metal ocupa su sitio apropiado y no interfiere con la distribución de aquellos que forman complejos menos estables. Las constantes de estabilidad *efectivas* de los complejos determinan la distribución adecuada. Por esta razón el cobre se acompleja con los mejores sitios donadores (como la superóxido dismutasa dentro de las células), sobreponiéndose a la competencia con el zinc, el cual se encuentra más disponible.

Cuando casi todo el cobre está unido y no hay exceso de sus ligantes, los sitios N/S enlazan al zinc;⁽²²⁾

4. selección por geometría de coordinación preferencial. En algunos casos, se puede hacer el uso de la preferencia de ciertos iones metálicos por sitios de coordinación de una cierta geometría. Los casos de zinc (II) y cobre (II) son un ejemplo. Ambos cationes solamente se encuentran disponibles en cantidades traza, aunque el zinc puede estar unas 100 veces más disponible en tierra y agua que el cobre. Para balancear esto, el cobre se une a la mayoría de los centros ligantes por lo menos 100 veces más fuerte que el zinc. La selectividad aquí se basa en el poder de polarización diferente de los dos, el uso de donadores diferentes y sus demandas estereoquímicas diferentes.

En primer lugar, el cobre (II) muestra una habilidad no compartida por el zinc de formar un enlace a pH=7 con el nitrógeno peptídico en su estado ionizado. En este caso, el factor de selectividad cobre/zinc es quizá tan grande como 10^4 . La selección positiva por el cobre se incrementa aún más utilizando la preferencia de este metal por una estructura tetragonal (como ejemplo de este efecto se encuentra la proteína plasmática acarreadora de cobre, albúmina). La selectividad positiva por el zinc puede basarse en su demanda diferente por una geometría tetraédrica, con ligantes de azufre o nitrógeno (por ejemplo,

la anhidrasa carbónica y la alcohol deshidrogenasa). Un buen ejemplo de selectividad simultánea por cobre y zinc aparece en la superóxido dismutasa; ⁽²²⁾

5. selección por estabilización por pares de espín;

6. selección por unión en grupos;

Los factores biológicos son:

7. selección por control de la concentración de M y L. Un ejemplo de esto se encuentra en el plasma, en donde los iones metálicos se extraen uno a uno por ligantes poderosos para evitar las interferencias mutuas. Entonces, el cobre se extrae primero por la albúmina. El zinc también se extrae por la albúmina que puede tener tres o cuatro N-donadores neutrales en una geometría tetraédrica;

8. selección por coeficientes de transferencia del agua a proteínas (o membranas).⁽²²⁾

A través de las membranas, como a través de las células, hay tráfico de iones, ligantes (incluyendo proteínas) y complejos. Puede ser aplicada energía a estos procesos o a una fase completa ajustando, por ejemplo, el pH o el potencial redox en un compartimiento.

Dentro del citoplasma de la célula, el cobre y zinc circulan utilizando metalotioneína. El cobre que se encuentra formando un

complejo es principalmente extracelular y algunas de sus metaloenzimas se encuentran entre dobles membranas o en los organelos.⁽²²⁾

5.3. Zinc: catálisis ácido de Lewis y regulación.

El zinc es un ácido de Lewis fuerte, pero permanece similar al cobre en este respecto. Estos iones pueden unirse fuertemente a donadores como tiolatos y aminas. Sin embargo, el zinc difiere del cobre en que no presenta una valencia variable (cambio en el estado de oxidación) por lo que puede ser preferido en algunos compartimientos biológicos por esta simple razón ya que la actividad redox introduce el riesgo de reacciones de radicales libres.⁽²²⁾

5.3.1. Zinc en el espacio biológico.

Dentro de algunas características particulares del zinc se encuentran:

1. El zinc es el ión metálico catalizador más común en el citoplasma de las células pero es menos común que algunos iones metálicos del grupo IA y IIA. El cobre es más común fuera del citoplasma y fuera de las células.

2. Las enzimas de zinc en las células están involucradas en una gran variedad de reacciones enzimáticas en el citoplasma; las enzimas digestivas son activas fuera de las células o en las vesículas.
3. El zinc se encuentra rara vez íntimamente asociado con una membrana.
4. El papel estructural del zinc se extiende desde estructuras filamentosas (parecidas a la queratina) hasta la organización de cromosomas, principalmente dentro de las células.
5. El uso del zinc en las funciones reguladoras del DNA está confinado a los eucariotes. ⁽²²⁾

La variedad de papeles que tiene el zinc dentro y fuera de las células se muestra en la Figura 8.

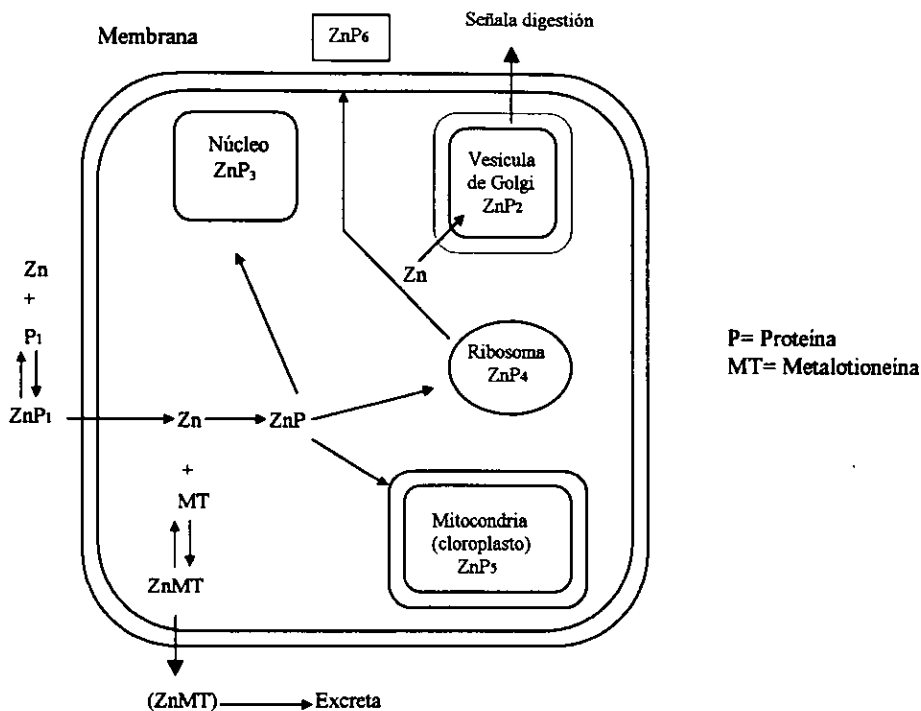


Figura 8. Papeles del zinc dentro y fuera de las células.

5.3.2. Zinc como grupo catalítico en enzimas.

Algunos ejemplos de enzimas de zinc que utilizan varios iones metálicos se muestran en la tabla 2: ⁽²²⁾

Enzima	Iones metálicos
Fosfolipasa C	Tres iones zinc
Fosfatasa alcalina	Dos iones zinc y un ion magnesio .
5' Nucleotidasa	Dos iones zinc

Tabla 2. Enzimas de zinc.

Las proteínas de zinc relacionadas con una acción hormonal peptídica se muestran en la tabla 3, asimismo se muestra el papel del zinc en procesos de degradación en la tabla 4.⁽²²⁾

Hormona	Asociación con hormonas
Insulina	Zinc asociado con el almacenamiento de la hormona
Angiotensina	Zinc en la enzima convertidora de angiotensina
Encefalina	Zinc en la enzima encefalinasa
Neurotensina	Degradación por una enzima dependiente de zinc

Tabla 3. Proteínas de zinc.

Proceso de degradación	Enzima de zinc
Acción de jugo pancreático	Carboxipeptidasa
Digestión extracelular (levadura)	Aminopeptidasa de Zn
Digestión extracelular (bacteria)	Termolisina
Degradación del ADN y ARN	3' Nucleotidasa
Hormonas peptídicas	Peptidasas 24.11
Degradación del tejido conectivo	Colagenasas del Zn

Tabla 4. Papel de zinc en procesos de degradación.

5.4. Cobre: oxidasas extracitoplásmicas y formación de matriz.

El Cu (II) es el ion divalente más efectivo que sea disponible para unir a moléculas orgánicas. Esto se debe en parte a su afinidad electrónica, es también el ácido disponible que mejor ataca a un pH alrededor de 7, aunque rara vez se utiliza como tal en biología. Solamente una o dos proteínas de cobre se encuentran en el citoplasma de las células (eucariotas). Todas las células eucariotas tienen una proteína de cobre en el citoplasma, la superóxido dismutasa. Quizá el uso más común del cobre es en la transferencia de electrones, especialmente asociada con las enzimas oxidativas y captura de energía.⁽²²⁾

Proteína o Enzima	Localización	Función
Citocromo oxidasa	Cara externa de la membrana mitocondrial	Reducción de O_2 a H_2O
Lacasa, Tirosinasa Fenol oxidasa	Extracelular	Oxidación de fenoles (reducción de O_2 a H_2O)
Ceruloplasmina	Extracelular (plasma)	Oxidación de Fe (II) a Fe(III) (reducción de O_2 a H_2O)
Hemocianina	Extracelular (plasma)	Transporte de O_2
Lisina oxidasa	Extracelular	Entrecruzamiento del colágeno (reducción de O_2)
Ascorbato oxidasa	Extracelular	Oxidación de ascorbato (reducción de O_2 a H_2O)
Galactosa oxidasa	Extracelular	Oxidación de alcoholes primarios a aldehidos en azúcares (reducción de O_2 a H_2O)
Amino oxidasa	Extracelular	Extracción de hormonas
Proteínas azules	Membranas (alto potencial); vesículas de tilacoides	Transferencia de electrones
Superóxido dismutasa	Citosol	Dismuta superóxido (eucariotes)

Tabla 5. Función y localización de algunas proteínas y enzimas del cobre.

5.4.1. Transporte y oxidasas del cobre.

Altos niveles de cobre en organismos vivientes no aparecen frecuentemente ya que los minerales del cobre son algo insolubles. Una vez que el cobre ha sido digerido, su siguiente incorporación es controlada por la albúmina circulando en sangre, la cual supuestamente lleva el cobre al hígado. El hígado es la fuente de muchas de las oxidasas que están circulando en la sangre.

El cobre se mantiene en muy bajos niveles en el citoplasma de las células; el exceso de cobre se maneja por ligantes especiales, las metalotioneínas (MT).⁽²²⁾

5.4.2. Funciones del cobre.

El cobre es utilizado en la transferencia de electrones; también se utiliza en los pasos finales de entrecruzamiento de la síntesis de filamentos extracelulares y tejidos. Muchas oxidasas del cobre ayudan a producir las matrices extracelulares de organismos eucariotes vivientes. En el citoplasma de las células (superóxido dismutasa) y en el exterior de estas (ascorbato oxidasa), hay dos enzimas de cobre que ya sea cazan radicales libres o quizá producen radicales libres *débiles* para extraer a

los fuertes. La complejidad de los usos del cobre se muestra en la Figura 9 que es un esquema general del manejo del cobre en las células y sus compartimientos.⁽²²⁾

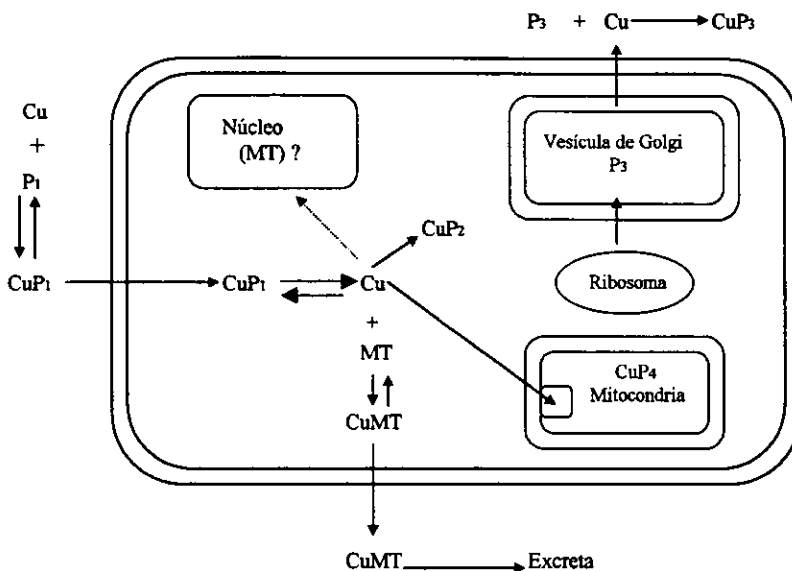


Figura 9. Manejo del cobre en la célula y sus compartimientos.

5.5. Cobre y zinc: la matriz conectiva extracelular.

A diferencia del zinc, el cobre se extrae de todas las células por la metalotioneína. En consecuencia, las enzimas del cobre se encuentran principalmente en el espacio extracelular en ambos (aerobios) procariotes

y eucariotes. Las enzimas extracelulares de cobre e intracelulares de zinc se encuentran en comunicación vía reacciones de buffer de la metalotioneína.⁽²²⁾

El requerimiento esencial inmediato para la evolución de una estructura multicelular era que hubiera una actividad sintética externa formando el tejido conectivo. En la estabilización de *polímeros externos* se involucran las enzimas de cobre. Esta construcción tiene que ser controlada ya que la matriz externa a una célula debe estar en un balance homeostásico entre la síntesis y la degradación para permitir el reemplazo de daño y crear un espacio para un crecimiento sistemático, lo cual requeriría que la matriz fuera degradada y reconstruida. Se requiere una serie de señales entre las enzimas “digestivas” (enzimas de zinc) y las enzimas oxidativas externas (enzimas de cobre). Los dos sistemas de polimerización/despolimerización se comunican entre ellos dentro de la célula a través de iones elementales, cobre y zinc, y probablemente vía las metalotioneínas y después los genes. La Figura 10 permite observar el papel del hierro y cobre en relación al del zinc en el control de señales extracelulares y tejidos y muestra también la conexión de los compuestos de calcio y fosfato con estos controles.⁽²²⁾

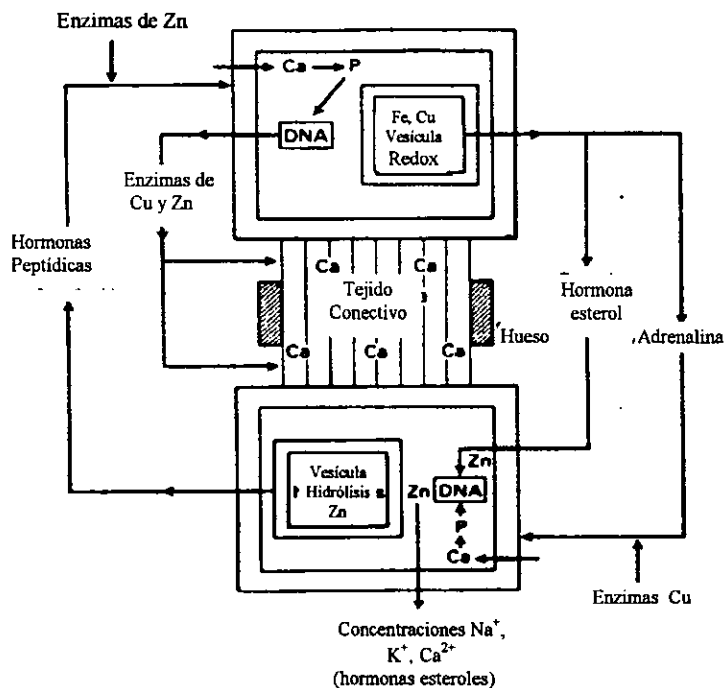


Figura 10. Papel del hierro y cobre en relación al zinc.

5.6. Concentración y distribución del cobre y zinc en tejidos.

En los animales adultos, la concentración de cobre es 0.0002-0.00025 por ciento menor a la de Fe. Los animales recién nacidos contienen más cobre debido probablemente a su más alta concentración en hígado.

Los órganos del cuerpo pueden ser subdivididos en tres grupos en base a su contenido de cobre: alto-cobre (hígado, cerebro, bazo, huesos y pelo), medio-cobre (músculos, riñones, páncreas, corazón) y bajo-cobre (glándulas de secreción internas, órganos sexuales).⁽²³⁾

El contenido de cobre de los músculos esqueléticos, corazón, glándulas endócrinas y riñones es relativamente independiente al nivel de cobre en la dieta. En otros órganos, especialmente el hígado, y también bazo, cerebro y huesos, el contenido de cobre depende fuertemente de su concentración en la dieta.

El cobre endógeno se elimina del cuerpo principalmente a través del tracto digestivo (con la bilis y, en menor grado, con otros jugos digestivos). La excreción del cobre con la bilis es considerada como una de las principales vías para mantener la homeostasis de este elemento en el cuerpo (tracto gastrointestinal- sangre- hígado- bilis).⁽²³⁾

Los animales adultos contienen ligeramente más zinc, pero la variación en la concentración con la edad es diferente para diferentes especies, y no es tan pronunciada como en el caso de otros microelementos. El zinc total en el cuerpo se distribuye a "*grosso modo*" como sigue: esqueleto 28, hígado 7-8, sangre 2-3, otros órganos 16-18 por ciento.

No hay tejidos en los que el zinc se localizaría preferencialmente; su distribución es más o menos uniforme. Sin embargo, las concentraciones más altas de este elemento se encuentran en el tejido óseo, hígado y pelo. Debe hacerse notar que la concentración de zinc en órganos internos no es constante, sino que varía con la edad, el sexo y la cantidad de alimento mineral recibido por los animales. Las variaciones de edad son particularmente pronunciadas en huesos y pelo y menos pronunciadas en hígado, músculos y otros órganos.⁽²³⁾

6. Animales.

El trabajar con sistemas vivos posee una complejidad intrínseca, de aquí que la elección de un adecuado sistema sea de extrema importancia, por lo que se decidió que los animales a emplear en este estudio fueran ratones exogámicos, ya que una población amplia de animales de laboratorio asemeja la población humana como un grupo heterogéneo con muchas variaciones genéticas. Las cepas exogámicas conservan la variabilidad genética, por lo que se asemejan más al ser humano.

Los compuestos a probar se inocularon por vía intraperitoneal, ya que la cavidad peritoneal ofrece una gran superficie de absorción desde la cual los compuestos pasan con rapidez a la circulación, principalmente a través de la vena porta; en consecuencia, son posibles las pérdidas debidas al primer paso hepático.⁽²⁾ La administración intraperitoneal es un procedimiento común de laboratorio, pero rara vez se emplea en la clínica. Los peligros de causar infecciones y adherencias son demasiado grandes para justificar el empleo de rutina de esta vía en el hombre. Así pues, el presente trabajo pretende un primer acercamiento a la biodistribución de las Casiopeínas a través del monitoreo de cobre y zinc por Absorción Atómica.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS GENERALES

- ♦ Evaluar la distribución de las Casiopeínas II y III *in vivo*, por medio de la determinación de la cantidad de cobre por el método de Absorción Atómica.
- ♦ Observar la relación entre cobre y zinc en los órganos a estudiar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ♦ Determinar la concentración máxima (C_{max}) de las Casiopeínas II y III en los siguientes órganos de ratón: hígado, riñón, encéfalo, bazo, pulmón y corazón.
- ♦ Determinar el tiempo para encontrar la máxima concentración de las Casiopeínas II y III en los órganos antes mencionados (t_{max}).
- ♦ Observar el tiempo al cual se han eliminado las Casiopeínas de cada órgano estudiado.
- ♦ Aportar información sobre la distribución de las Casiopeínas con el fin de cooperar con la investigación de fármacos antineoplásicos que se realiza dentro de la Facultad de Química.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

1. MATERIAL

1.1. Material Biológico.

Para la realización del experimento se emplearon 60 ratones de la cepa exogámica **NIH**, los cuales permanecieron en la Unidad de Experimentación Animal del "Conjunto E" de la Facultad de Química, UNAM, manteniéndolos en instalaciones convencionales, ventiladas mediante la extracción e inyección forzadas de aire con 18 recambios/hora, el aire de recambio se filtra mediante filtros HEPA para partículas hasta de 3 μm . La temperatura se mantiene a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa en 50-60% ⁽²¹⁾. Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 horas. Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* que consistió en Ralston Rations Nutricubos (Purina), cuyo contenido nutricional es: proteína min. 23.0%, grasa min. 3.0%, fibra max. 1.0%, calcio max. 1.0%,

fósforo min. 0.6%, zinc 70 ppm, cobre 13 ppm. El agua fue purificada por ósmosis inversa y acidificada con HCl hasta alcanzar un pH=2.5 para el control de parásitos gastrointestinales.⁽¹⁷⁾.

1.2. Equipo e Instrumentos.

Para la administración de las Casiopeínas a los ratones se utilizó:

- Jeringas de insulina
- Vasos de precipitado de 50 mL
- Espátula Cromo-Níquel
- Algodón
- Cronómetro
- Filtro µstar LB™ 0.22 µm, no pirogénico, Costar
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Cajas de acrílico
- Guantes de látex

Para el sacrificio y la extracción de los órganos:

- Tabla de disección
- Tijeras y pinzas de disección
- Bolsas de plástico de 10x5 cm

- Pipeta graduada de 5mL
- Vasos de precipitado de 10 mL
- Vaso de precipitado de 50 mL
- Vaso de precipitado de 100 mL
- Matraces volumétricos de 5 mL
- Matraces volumétricos de 10 mL
- Propipeta
- Pipeta pasteur con bulbo
- Piseta
- Agitador de vidrio
- Viales de plástico de 10 mL
- Membranas de ruptura para vasos ACV
- Congelador TOR REY -20°C
- Estufa
ELISA 98-102°C
- Estufa
BLUE M. Electric Company 73°C
- Horno de Microondas CEM
MDS-2000
CEM Innovators in Microwave Technology
- Vórtex
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica - Perkin Elmer 2380

1.3. Reactivos.

- Casiopeína II -gly. Fórmula mínima $\text{CuC}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{H}_{10}$
- Casiopeína III. Fórmula mínima $\text{CuC}_{15}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{17}$
- Alcohol etílico
- Agua desionizada
- Hidróxido de potasio
- Suero glucosado al 5%
- Acido nítrico suprapuro 65%

MERCK

- Acido nítrico

Baker Analyzed Reactivo 65.4%

2. METODOLOGÍA

Para determinar la distribución se llevaron a cabo los siguientes pasos:

2.1. Inoculación del fármaco.

Una vez proporcionados los ratones se pesaron en una balanza granataria, obteniéndose pesos entre los 20 y 30 gramos. Cada ratón fue

marcado con el propósito de identificar su tiempo de inyección, y por consiguiente su tiempo de sacrificio. Los horarios de inyección y de sacrificio así como las dosis administradas de cada Casiopeína se muestran en las tablas 6 y 7.

Las soluciones de Casiopeínas se prepararon en suero glucosado al 5%.

Se inocularon por vía intraperitoneal 30 ratones hembras de la cepa **NIH**, de 9 semanas de edad, con una dosis de Casiopeína II-gly de 2.22 mg/Kg de peso, lo que corresponde a $\frac{1}{4}$ de la DL_{50} . Otros 30 ratones machos de la misma cepa y de 14 semanas de edad, se inocularon con una dosis de Casiopeína III de 3.65 mg/Kg de peso ($\frac{1}{4}$ de DL_{50}) por la misma vía.

Casiopeína II								
Especie: ratón			Cepa: NIH					
Sexo: hembras			Edad: 9 semanas					
Peso Prom. 21.7 gramos			Dosis: 2,22 mg/kg					
No. Ratón	Peso de ratón (g)	Dosis mg	Dosis ml	Sacrificio (horas)	Tiempo de inyección	Fecha de inyección	Tiempo de sacrificio	Fecha de sacrificio
1	23.5	0.052	1.3	16	17:51	16/02/1998	9:51	17/02/1998
2	20.4	0.045	1.1	16	17:54	16/02/1998	9:54	17/02/1998
3	19.6	0.044	1.1	16	17:57	16/02/1998	9:57	17/02/1998
4	20	0.044	1.1	64	16:14	20/02/1998	10:14	23/02/1998
5	22.8	0.051	1.3	64	16:16	20/02/1998	10:16	23/02/1998
6	20	0.044	1.1	64	16:18	20/02/1998	10:18	23/02/1998
7	21.2	0.047	1.2	4	10:30	17/02/1998	14:30	17/02/1998
8	23.2	0.052	1.3	4	10:32	17/02/1998	14:32	17/02/1998
9	22	0.049	1.2	4	10:41	17/02/1998	14:41	17/02/1998
10	24.1	0.054	1.3	8	10:41	20/02/1998	18:41	20/02/1998
11	22.1	0.049	1.2	8	10:44	20/02/1998	18:44	20/02/1998
12	17.3	0.038	1.0	8	10:46	20/02/1998	18:46	20/02/1998
13	20.1	0.045		0		19/02/1998	10:56	19/02/1998
14	22.4	0.050		0		19/02/1998	10:57	19/02/1998
15	23.2	0.052		0		19/02/1998	10:57	19/02/1998
16	23.2	0.052	1.3	0.5	9:47	19/02/1998	10:17	19/02/1998
17	21.2	0.047	1.2	0.5	9:49	19/02/1998	10:19	19/02/1998
18	22.4	0.050	1.2	0.5	9:51	19/02/1998	10:21	19/02/1998
19	21.2	0.047	1.2	128	9:41	19/02/1998	17:41	24/02/1998
20	25.7	0.057	1.4	128	9:43	19/02/1998	17:43	24/02/1998
21	21.7	0.048	1.2	128	9:45	19/02/1998	17:45	24/02/1998
22	19.3	0.043	1.1	32	9:54	23/02/1998	17:54	24/02/1998
23	19.5	0.043	1.1	32	10:10	23/02/1998	18:10	24/02/1998
24	21.3	0.047	1.2	32	10:12	23/02/1998	18:12	24/02/1998
25	21.8	0.048	1.2	1	10:14	23/02/1998	11:14	23/02/1998
26	20.6	0.048	1.1	1	10:16	23/02/1998	11:16	23/02/1998
27	18	0.040	1.0	1	10:17	23/02/1998	11:17	23/02/1998
28	22.9	0.051	1.3	2	10:27	24/02/1998	12:27	24/02/1998
29	27.3	0.061	1.5	2	10:30	24/02/1998	12:30	24/02/1998
30	23.1	0.051	1.3	2	10:32	24/02/1998	12:32	24/02/1998

Tabla 6. Horario de inoculación y sacrificio para Casiopeína II.

Casiopeína III								
Especie:	ratón			Cepa:	NIH			
Sexo:	machos			Edad:	14 semanas			
Peso Promedio	28.86 gramos			Dosis:	3.65 mg/kg			
No. Ratón	Peso de ratón (g)	Dosis mg	Dosis ml	Sacrificio (horas)	Tiempo de inyección	Fecha de inyección	Tiempo de sacrificio	Fecha de sacrificio
1	28.1	0.103	0.8	0.5	17:03	07/07/1997	17:33	07/07/1997
2	27.1	0.099	0.7	0.5	17:06	07/07/1997	17:36	07/07/1997
3	26	0.095	0.7	0.5	17:09	07/07/1997	17:39	07/07/1997
4	25.4	0.093	0.9	1	15:45	07/07/1997	16:45	07/07/1997
5	24.8	0.091	0.9	1	15:46	07/07/1997	16:46	07/07/1997
6	24.8	0.091	0.9	1	15:48	07/07/1997	16:48	07/07/1997
7	22.8	0.083	0.9	2	15:43	07/07/1997	17:43	07/07/1997
8	26.2	0.096	1.0	2	15:41	07/07/1997	17:41	07/07/1997
9	25	0.091	0.9	2	15:39	07/07/1997	17:39	07/07/1997
10	31.5	0.115	0.9	16	18:36	07/07/1997	10:36	08/07/1997
11	30	0.110	0.8	16	18:39	07/07/1997	10:39	08/07/1997
12	35.9	0.131	1.0	16	18:42	07/07/1997	10:42	08/07/1997
13	37.3	0.136	1.0	64	18:46	07/07/1997	10:46	10/07/1997
14	24.4	0.089	0.7	64	18:48	07/07/1997	10:48	10/07/1997
15	36.9	0.135	1.0	64	18:52	07/07/1997	10:52	10/07/1997
16	31.9	0.116	1.0	32	10:42	08/07/1997	18:42	09/07/1997
17	32.3	0.118	1.0	32	10:44	08/07/1997	18:44	09/07/1997
18	32.6	0.119	1.0	32	10:49	08/07/1997	18:49	09/07/1997
19	29.1	0.106	0.8	8	10:40	09/07/1997	18:40	09/07/1997
20	31	0.113	0.9	8	10:44	09/07/1997	18:44	09/07/1997
21	32.7	0.119	0.9	8	10:50	09/07/1997	18:50	09/07/1997
22	33	0.120	0.9	4	11:07	09/07/1997	15:07	09/07/1997
23	27.6	0.101	0.8	4	11:11	09/07/1997	15:11	09/07/1997
24	27	0.099	0.8	4	11:13	09/07/1997	15:13	09/07/1997
25	25.1	0.092	0.7	128	10:57	09/07/1997	18:57	14/07/1997
26	24.1	0.088	0.7	128	11:00	09/07/1997	19:00	14/07/1997
27	24	0.088	0.7	128	11:03	09/07/1997	19:03	14/07/1997
28	28.2			0			11:10	08/07/1997
29	31.5			0			11:11	08/07/1997
30	29.4			0			11:15	08/07/1997

Tabla 7. Horario de inoculación y sacrificio para Casiopeína III.

2.2. Sacrificio de los Animales.

Después de la administración de los fármacos, los ratones se sacrificaron a los siguientes tiempos: 0 horas (control, a estos ratones no se les administró Casiopeína, por lo que las concentraciones de cobre obtenidas a partir de estos fueron tomadas como basales), 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 horas, tres ratones en cada tiempo, extrayéndoles los siguientes órganos: hígado, corazón, riñón, bazo, pulmón y encéfalo.

Una vez extraídos los órganos, se colocó cada uno dentro de bolsas de plástico de 10 x 5 cm, previamente etiquetadas, para después mantenerse en congelación hasta el momento de su tratamiento.

2.3. Tratamiento de las muestras.

Para el tratamiento de las muestras, se requieren vasos de precipitado de 10 mL libres de cualquier metal o partícula que pudiera contaminarlas. Los vasos fueron lavados primero con agua y jabón para después colocarse en un recipiente que contenía ácido nítrico al 10%, dejándose ahí durante un día. Pasado este tiempo se sacaban del recipiente, se lavaban con agua desionizada y se les agregaba hidróxido de potasio (potasa), dejándose reposar aproximadamente 30 minutos. Por último, se enjuagaban una vez más con agua desionizada y se colocaban

en la estufa con el propósito de secarlos. Los vasos, previamente numerados, se pesaban todos los días hasta obtener un peso constante (una diferencia no mayor a 0.0007 gramos del peso anterior). Una vez que los vasos estaban a peso constante se colocaban los órganos, un órgano en cada vaso, y se metían otra vez a la estufa para evaporar toda el agua presente en el tejido. De la misma forma que antes, los vasos se pesaron varios días consecutivos hasta observar que el peso no variaba más de 0.0007 gramos, lo cual nos indicaba que los órganos se encontraban a peso constante.

Posteriormente, se realiza la digestión de cada una de las muestras por la técnica de "Digestión de Muestras por Tecnología de Microondas".⁽¹¹⁾

El calentar ácidos en un plancha caliente es el método convencional de preparar muestras para análisis. Este método requiere supervisión para prevenir la evaporación de la muestra hasta sequedad, por lo que puede tomar de horas a días para completarse. La temperatura de reacción está limitada al punto de ebullición atmosférico de la mezcla de ácido, la exposición a vapores de ácido y la contaminación externa de las muestras son preocupaciones adicionales al utilizarse este método tradicional.⁽¹¹⁾

Las microondas son una forma de radiación electromagnética que consiste en campos eléctricos y magnéticos oscilantes. La oscilación del campo eléctrico ocasiona el calentamiento de los líquidos al ser expuestos a la energía de microondas. Los líquidos se calientan por dos mecanismos: la rotación de dipolo y la conducción iónica.⁽¹³⁾

Las moléculas polares, tales como el agua y los alcoholes tienden a alinear sus momentos dipolares con el campo eléctrico cambiante. Esto ocasiona que las moléculas roten de un lado a otro y choquen con las moléculas que las rodean, generando calor.

Los iones en solución tienden a migrar en presencia del campo eléctrico de microondas. Este movimiento iónico resulta en la colisión entre moléculas y iones, lo que también genera calor. Los dos mecanismos (rotación de dipolo y conducción iónica) ocurren simultáneamente y contribuyen en cantidades variables a la velocidad total de calentamiento del líquido.⁽¹³⁾

El Sistema de Microondas para Preparación de Muestras (modelo MDS-2000) utiliza la energía de microondas para calentar las muestras. Los compuestos, tales como el agua y otros líquidos polares absorben esta energía rápidamente. Una muestra colocada dentro de un vaso transparente a las microondas, con un líquido polar o solución iónica (generalmente un ácido) en el MDS-2000, está sujeta a un calentamiento

rápido y presiones elevadas, ocasionando la digestión o disolución de la muestra en corto tiempo.⁽¹³⁾

El MDS-2000 (Figura 11), está diseñado para ser utilizado en el laboratorio en digestiones, disoluciones, hidrólisis o secado de un amplio rango de materiales. Su principal propósito es la preparación rápida de muestras para análisis por absorción atómica y cromatografía de gases o líquidos.

Por lo anterior esta técnica fue elegida, además presenta varias características como son: proporciona energía directamente a la muestra, es utilizable con los reactivos tradicionales, es rápida por lo que reduce los costos, los elementos volátiles pueden retenerse, reduce la cantidad de reactivos necesarios, algunas descomposiciones se realizan con más precisión, la contaminación de muestras se reduce y los vasos cerrados con alta presión/ temperatura pueden ayudar a las reacciones que no son posibles en condiciones atmosféricas.⁽¹³⁾

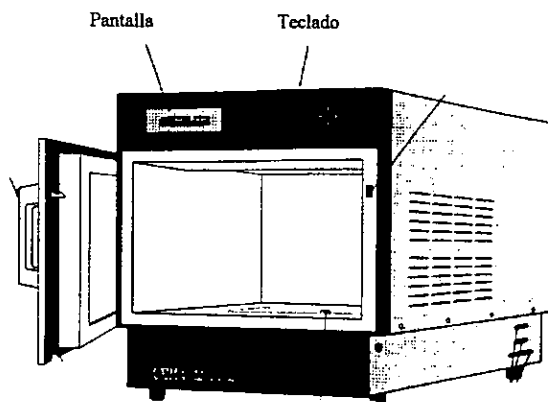


Figura 11. Horno de microondas, modelo MDS-2000.

El MDS-2000 ofrece la posibilidad de programar nuevos métodos en donde el usuario describe el nombre, poder, presión, tiempo, tiempo en la presión y velocidad del ventilador que se desea para cada programa específico. El programa puede ser almacenado para utilizarse después.⁽¹³⁾

Se utilizó un programa que se dividía en 5 etapas, en el cual encontrábamos 4 variables en cada etapa. En la pantalla las ubicábamos como se muestra en la Figura 12:

	f1 - help	f2 - next	f3 - end		
FILE NAME	_____				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	000	000	000	000	000
PRESS	000	000	000	000	000
TIME	0000	0000	0000	0000	0000
TAP	0000	0000	0000	0000	0000
FAN	100	100	100	100	100

Figura 12. Pantalla del horno.

- **POWER (poder).**- Esta variable se refiere al porcentaje de energía de microondas que van a ser emitidas durante la digestión, el valor numérico que puede tomar es de 0 a 100 %. La elección del valor adecuado se hace en base al número de vasos ACV que se tengan contemplados en la digestión. Por cada vaso menos, tomando como 100 % para 12 vasos, se disminuirá un 5 % de poder.
- **PRESS (presión).**- Se refiere a la presión que se mantendrá en la muestra durante cada etapa de la digestión y se mantendrá constante mediante emisiones intermitentes de microondas. El rango de presión es de 0-600 psig.

- TIME (tiempo).- Es el tiempo máximo en el cual debe alcanzarse la presión constante para cada etapa. El rango de tiempo es de un segundo a 59 minutos.
- TAP (tiempo en la presión).- Es el tiempo en el cual se mantendrá constante dicha presión en cada etapa. Cuando el sistema alcance la presión, esta se mantiene constante durante el tiempo programado.⁽¹³⁾

Para la preparación de muestras se requiere un manejo adecuado de los vasos donde se realiza la digestión. Los vasos ACV consisten de un material resistente y transparente a la energía de microondas, por lo que el líquido y muestra que se encuentran dentro de ellos pueden absorber la máxima cantidad de energía de microondas incidente. Las especificaciones de los vasos ACV (Figura 13) son las siguientes: ⁽¹³⁾

Presión máxima de trabajo permitida----- 200 PSIG / 13.8 bar

Temperatura máxima de operación----- 200°C

Peso máximo de una muestra orgánica----- 0.5 gramos

Volumen del vaso-----100 mL

Elemento de seguridad-----membrana de ruptura

Materiales de construcción:

Anillo-----Teflón PFAR

Interior-----Teflón PFAR

Cuerpo-----Teflon PFA^R
Tapa-----Ultem^R polieterimida
Membrana de ruptura----- Teflon PFA^R

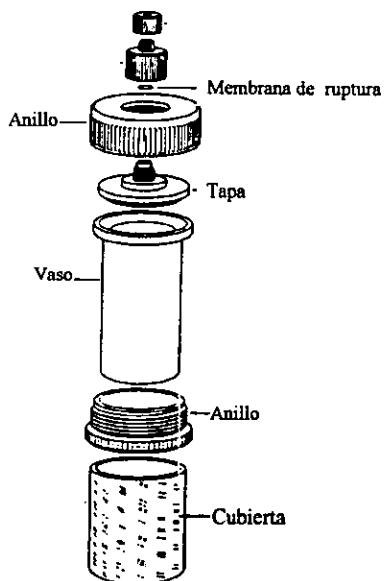


Figura 13. Vaso ACV.

Es importante indicar que la presión máxima de trabajo que soportan este tipo de vasos es de 200 psi, y si se llega a rebasar esta presión habrá una ruptura de membrana (una posible causa es la cantidad excesiva de muestra orgánica reactiva). De esta forma nos aseguramos de no llegar más allá del límite de resistencia de los vasos y

evitar así un accidente. En cada digestión se pueden colocar hasta 12 vasos ACV en un carrusel como se indica en la Figura 14.⁽¹³⁾

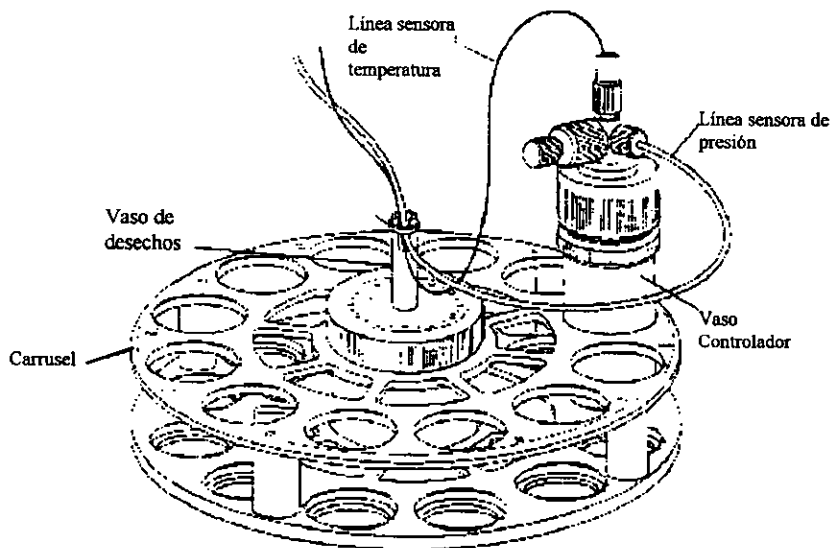


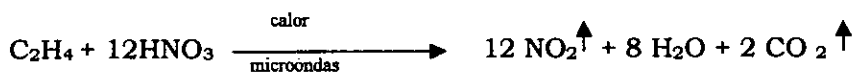
Figura 14. Carrusel de vasos ACV.

Al centro del carrusel se encuentra el vaso de desechos que se conecta directamente a cada vaso para coleccionar ahí los desechos líquidos (mezcla de muestra y ácido) en caso de una ruptura de membrana. De las 12 muestras que se colocan en el carrusel sólo de una de ellas se monitorea la presión y, por tanto, es la que determina el progreso de la digestión en cada etapa del programa. Esta muestra debe ser la de mayor masa o bien la de mayor volumen, dado que el registro de presión

que se tenga de ella debe ser representativo de todas las demás y la cantidad de gases que genere deberá ser mayor que cualquiera de las otras muestras. La medición y control de la presión dentro de un vaso cerrado se hace utilizando un tubo controlador de Teflon^R PFA de 3 mm de diámetro.⁽¹³⁾

El MDS-2000 esta equipado con un sistema sensor para detectar problemas en los vasos que ocurran dentro de la cavidad del microondas. Cuando un problema (tal como la ruptura de una membrana de seguridad) es detectado, el programa de calentamiento con microondas se aborta, el sistema de extracción se activa al 100% de su capacidad y se muestra una señal de alarma en la pantalla del horno. El sistema de extracción remueve los vapores corrosivos y dañinos, así como los flamables, de la cavidad del horno. Al 100 % de su capacidad, el extractor moviliza el aire a una velocidad de 3.6 m³ / minuto.⁽¹³⁾

Dentro de lo que es la descomposición de matrices biológicas por ácidos minerales tenemos como última instancia la siguiente ecuación:



De la ecuación anterior vemos entonces que los metales a determinarse (cobre y zinc) quedan en solución.

Antes de iniciar una corrida, de digestión o de lavado, era necesario purgar el sistema controlador de la presión (inyectando agua dentro del mismo) para evitar la corrosión y las burbujas de aire en el tubo controlador.⁽¹³⁾

Para realizar la digestión de los órganos, se colocaban nuevas membranas de ruptura (Figura 15), además se verificaba que todos los componentes del vaso estuvieran secos y libres de cualquier partícula. Las gotas de líquido o las partículas absorben energía de microondas, ocasionando un calentamiento localizado que puede dañar o quemar los componentes del vaso.⁽¹³⁾

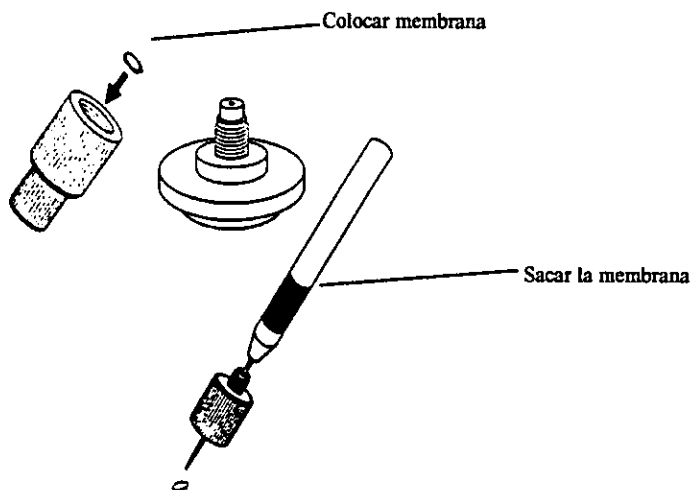


Figura 15. Colocación de membranas de seguridad.

Se colocaba un órgano en cada vaso, con excepción del doceavo, el cual se utilizaba como blanco de la corrida (solamente se le agregaba ácido nítrico). El órgano debía colocarse al fondo del vaso para que se cubriera completamente con el reactivo. Posteriormente se agregaban 3 mL de ácido nítrico suprapuro a cada uno de los vasos. Después de cerrarse cada vaso (Figura 16), se insertaba en cada uno la línea que conducía al vaso de desechos y en el vaso controlador de presión se insertaba también la línea sensora de la presión.⁽¹³⁾

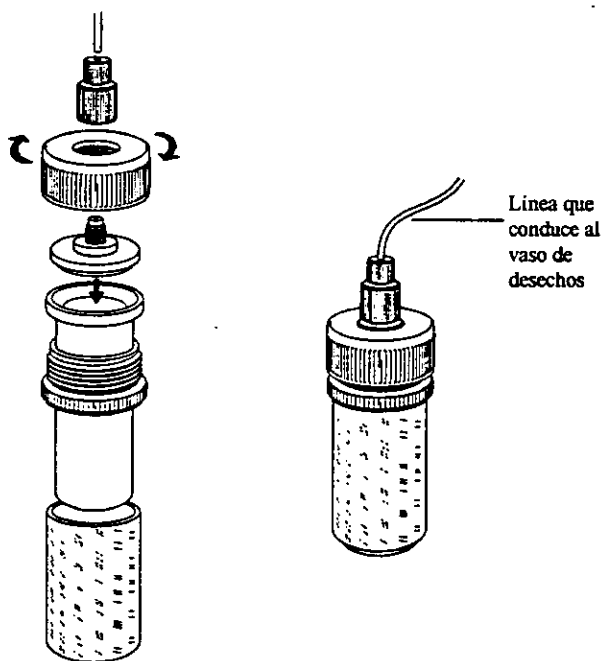


Figura 16. Cerrado de los vasos ACV.

Los vasos se metían después al horno en el carrusel para realizar la corrida de digestión. Para cada órgano se elaboró un programa específico tomando en cuenta las características del tejido (peso, contenido de lípidos, etc.). Las muestras de hígado después de la primera digestión mostraban todavía grasa por lo que fue necesario realizar una segunda digestión utilizando un programa más corto. Los programas utilizados fueron los siguientes (Figuras 17-23):

	f1 - help	f2 - next	f3- end		
FILE NAME	ENCEFALO				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	20	40	60	80	100
TIME	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
TAP	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00
FAN	100	100	100	100	100

Figura 17. Programa para digestión de encéfalo.

	f1 - help	f2 - next	f3 - end		
FILE NAME	RIÑON				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	20	40	60	80	100
TIME	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
TAP	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00
FAN	100	100	100	100	100

Figura 18. Programa para digestión de riñón.

	f1 - help	f2 - next	f3 - end		
FILE NAME	CORAZON				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	20	40	60	80	100
TIME	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
TAP	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00
FAN	100	100	100	100	100

Figura 19. Programa para digestión de corazón.

	f1 - help	f2 - next	f3 - end		
FILE NAME	PULMON				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	20	40	60	80	100
TIME	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
TAP	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00
FAN	100	100	100	100	100

Figura 20. Programa para digestión de pulmón.

	f1 - help	f2 - next	f3 - end		
FILE NAME	BAZO				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	20	40	60	80	100
TIME	10:00	10:00	10:00	10:00	10:00
TAP	5:00	5:00	5:00	5:00	5:00
FAN	100	100	100	100	100

Figura 21. Programa para digestión de bazo.

	f1 - help	f2 - next	f3 - end		
FILE NAME	HIGADO	(PRIMERA)			
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	40	60	80	100	120
TIME	10:00	10:00	10:00	15:00	15:00
TAP	5:00	5:00	5:00	10:00	10:00
FAN	100	100	100	100	100

Figura 22. Programa para digestión de hígado.

	f1 - help	f2 - next	f3- end		
FILE NAME	HIGADO	(SEGUNDA)			
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	80	100	120	0	0
TIME	10:00	10:00	10:00	0	0
TAP	5:00	5:00	5:00	0	0
FAN	100	100	100	100	100

Figura 23. Programa para digestión de hígado.

Una vez terminada la digestión, se esperaba a que bajara la presión por debajo de 30 psi para así poder sacar el carrusel del horno. Los vasos se enfriaban a temperatura ambiente y en la campana de extracción se liberaba la presión restante de cada vaso, se abrían y se permitía la salida de los vapores. Las muestras se pasaban a matraces aforados, y se llevaban a 10 mL con agua desionizada. La única excepción fueron las muestras de bazo que por la baja concentración de cobre que presentaban fue necesario aforarlas a 5 mL. Hecho lo anterior, en cada muestra se determinaba la cantidad de cobre y zinc por el método de Espectrometría de Absorción Atómica.⁽¹²⁾ Ver Anexo I.

Entre una digestión y otra era necesario un ciclo de lavado que consistía en agregar tres mL de ácido nítrico a cada vaso, cerrarlos y meterlos al horno utilizando un programa específico formado por cuatro etapas de 10 minutos cada una, como se muestra en la Figura 24:

	f1 - help	f2-next	f3 - end		
FILE NAME	LAVADO				
stage	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
POWER	100	100	100	100	100
PRESS	30	50	70	90	000
TIME	10:00	10:00	10:00	10:00	0000
TAP	10:00	10:00	10:00	10:00	0000
FAN	100	100	100	100	100

Figura 24. Programa para lavado de vasos.

Terminado el ciclo de lavado, los vasos se sacaban del horno liberando la presión, el ácido nítrico restante se desechaba y los vasos se enjuagaban con agua desionizada, dejándose secar después a temperatura ambiente para poder ser utilizados de nuevo en una corrida de digestión.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos de las muestras analizadas por absorción atómica (ver Anexo II y III para las tablas de datos, de la 10 a la 57), nos indican la distribución de los metales a lo largo del tiempo. Tomando en cuenta los valores normales de cobre y zinc en cada órgano, podemos relacionar el incremento o decremento en la concentración de cada metal a la dosis administrada de cada Casiopeína.

Las gráficas de concentración de cobre y zinc, obtenidas a partir de las tablas se muestran a continuación (Figuras 25-50):

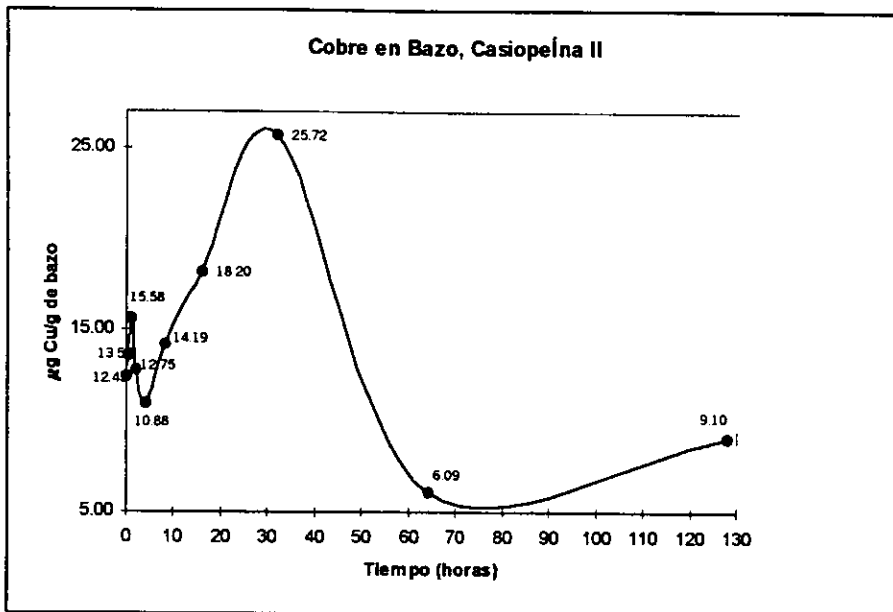


Figura 25. Distribución de cobre en bazo, Casiopeína II.

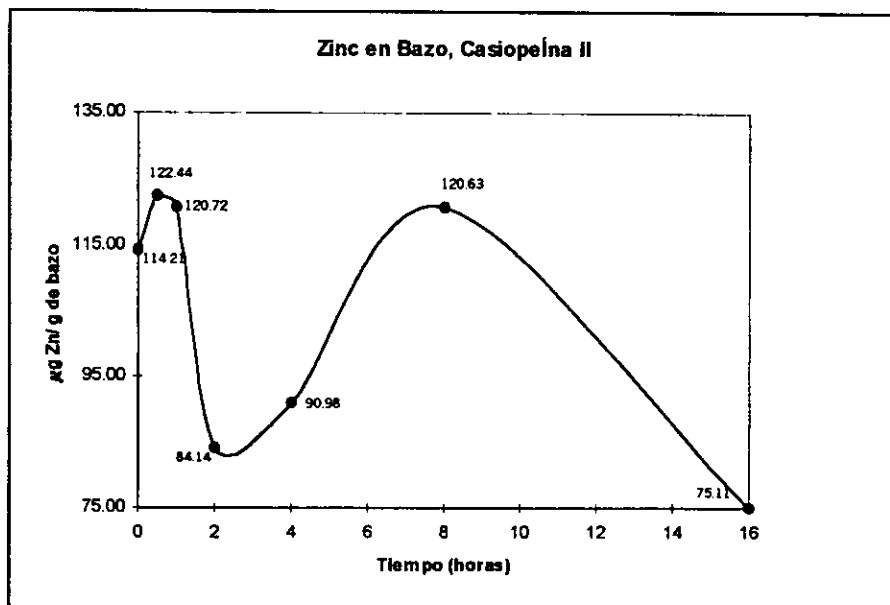


Figura 26. Distribución de zinc en bazo, Casiopeína II.

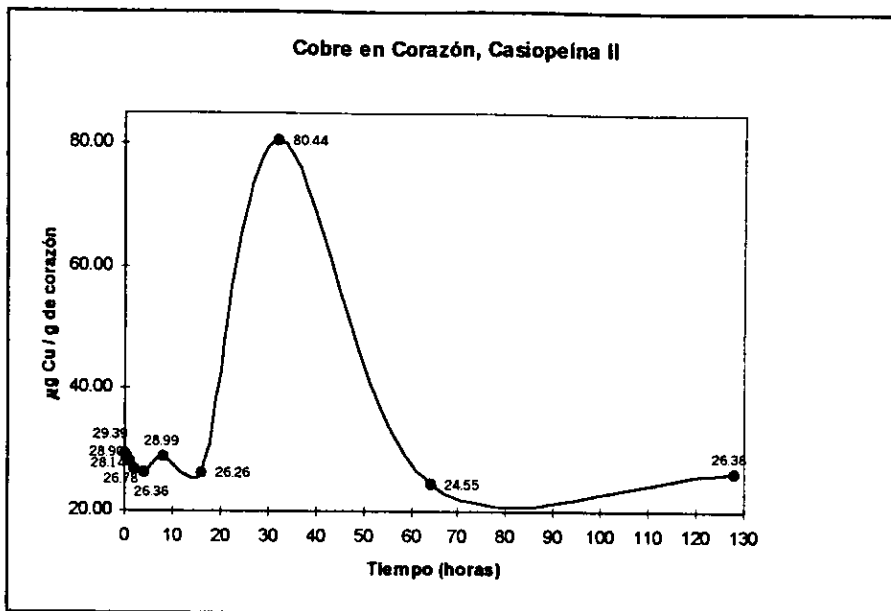


Figura 27. Distribución de cobre en corazón, Casiopeína II.

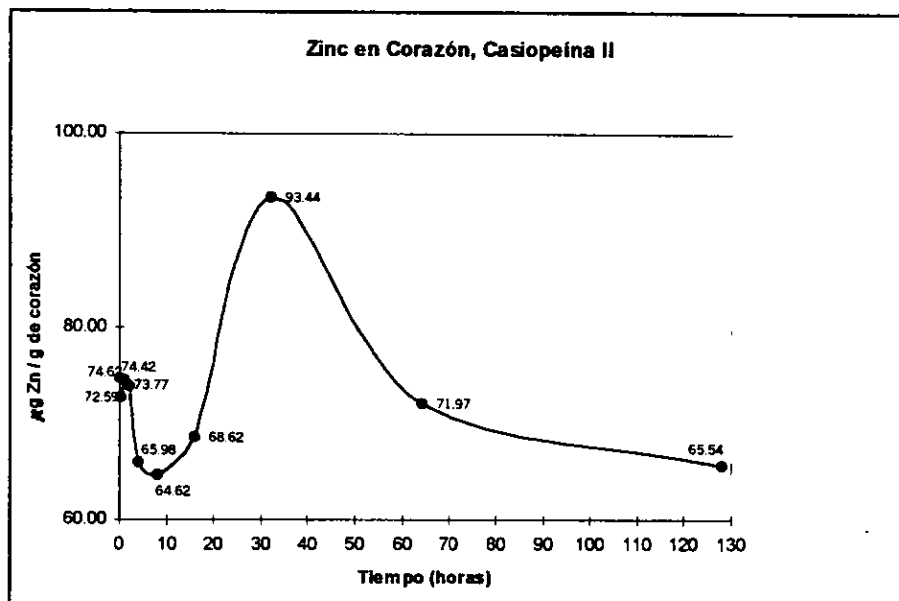


Figura 28. Distribución de zinc en corazón, Casiopeína II.

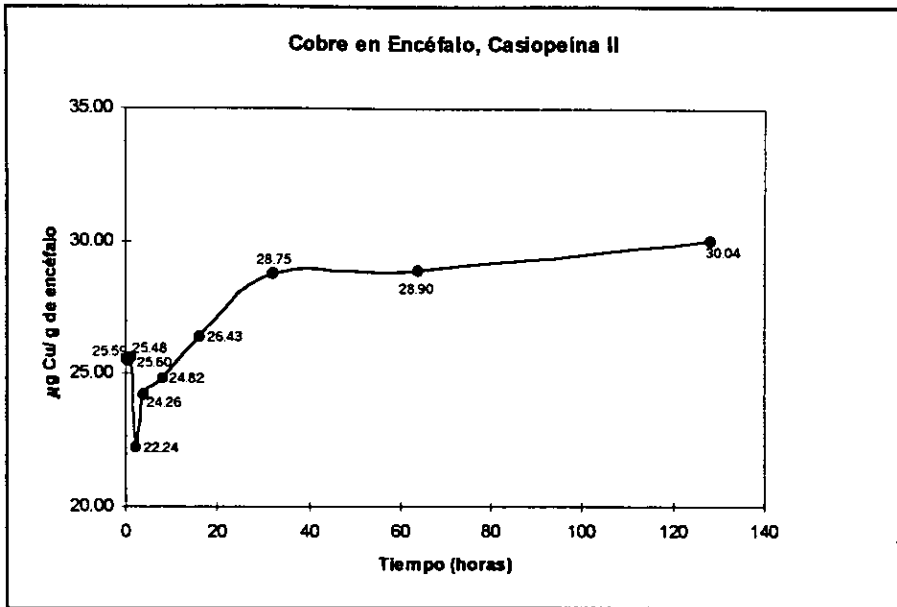


Figura 29. Distribución de cobre en encéfalo, Casiopeína II.

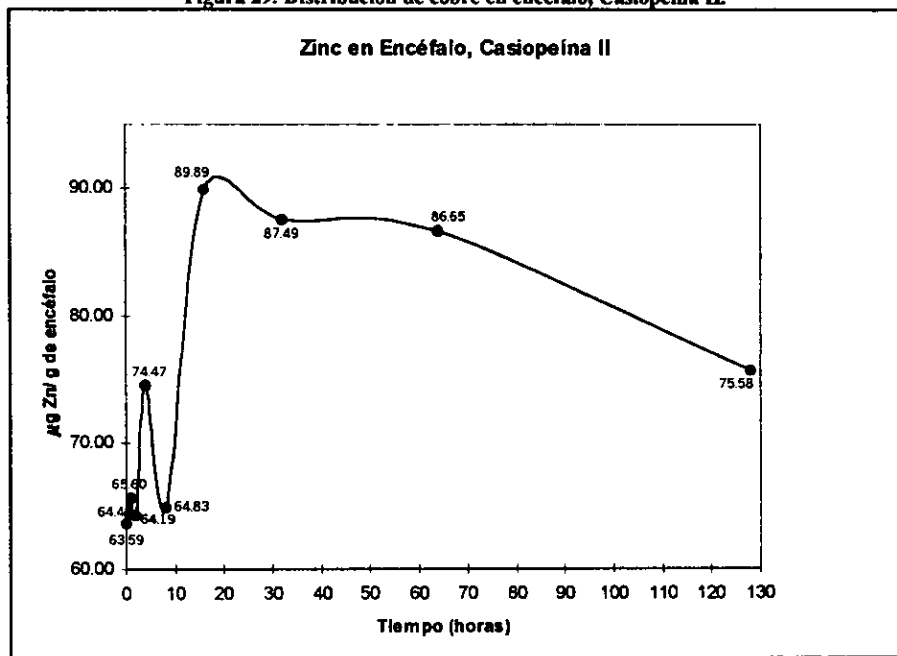


Figura 30. Distribución de zinc en encéfalo, Casiopeína II.

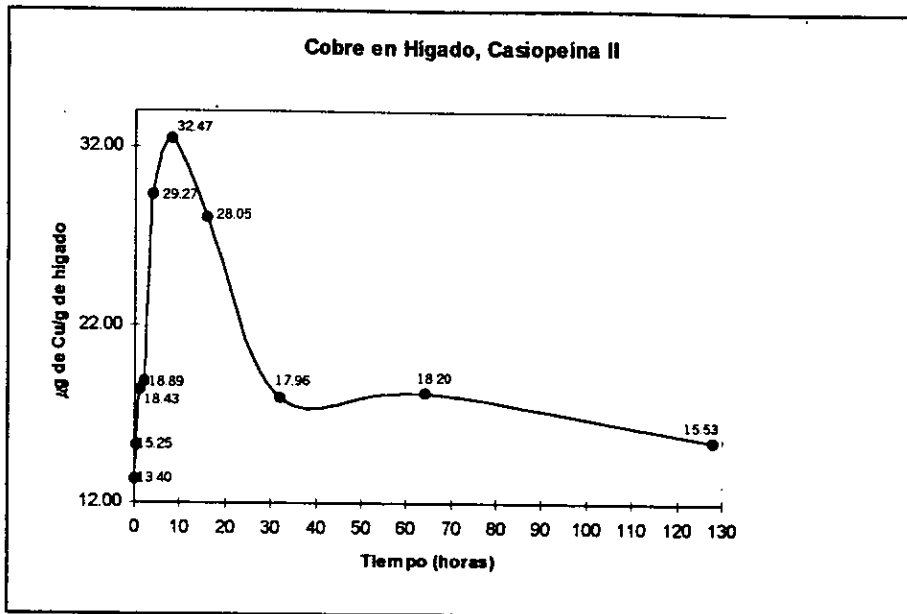


Figura 31. Distribución de cobre en hígado, Casiopeína II.

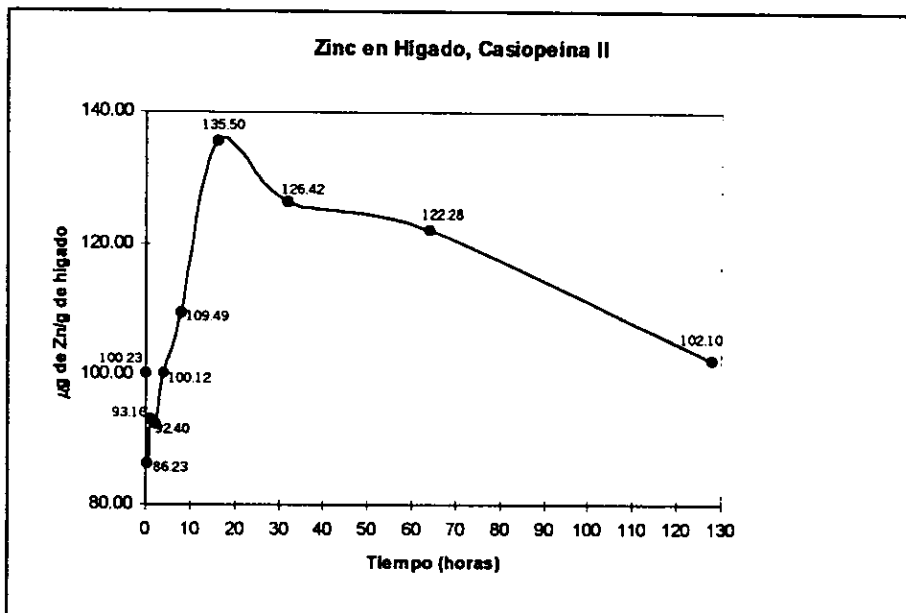


Figura 32. Distribución de zinc en hígado, Casiopeína II.

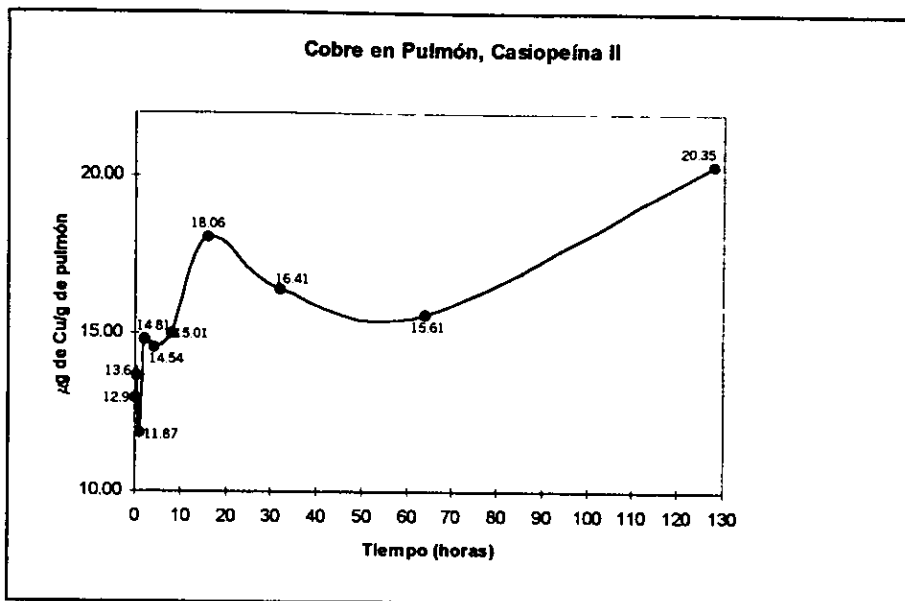


Figura 33. Distribución de cobre en pulmón, Casiopeína II.

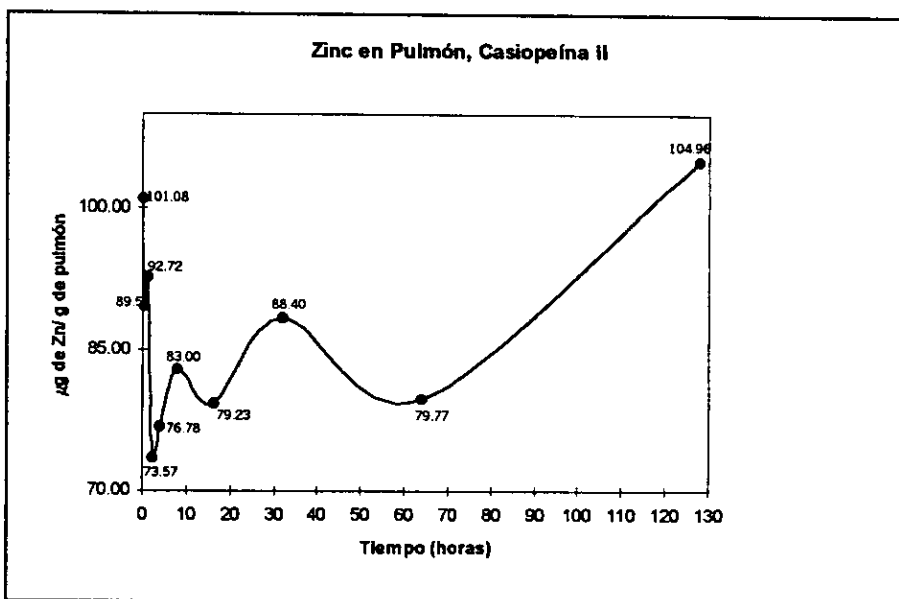


Figura 34. Distribución de zinc en pulmón, Casiopeína II.

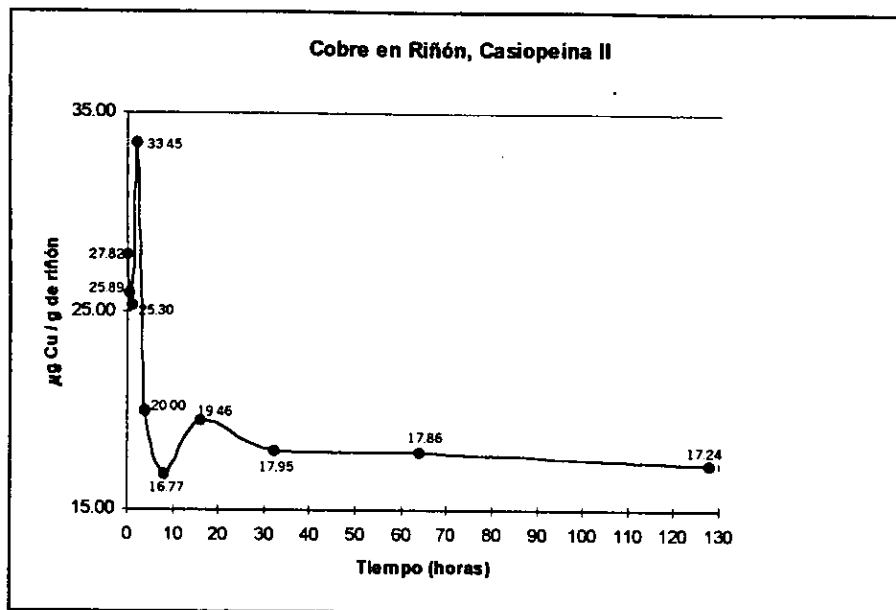


Figura 35. Distribución de cobre en riñón, Casiopeína II.

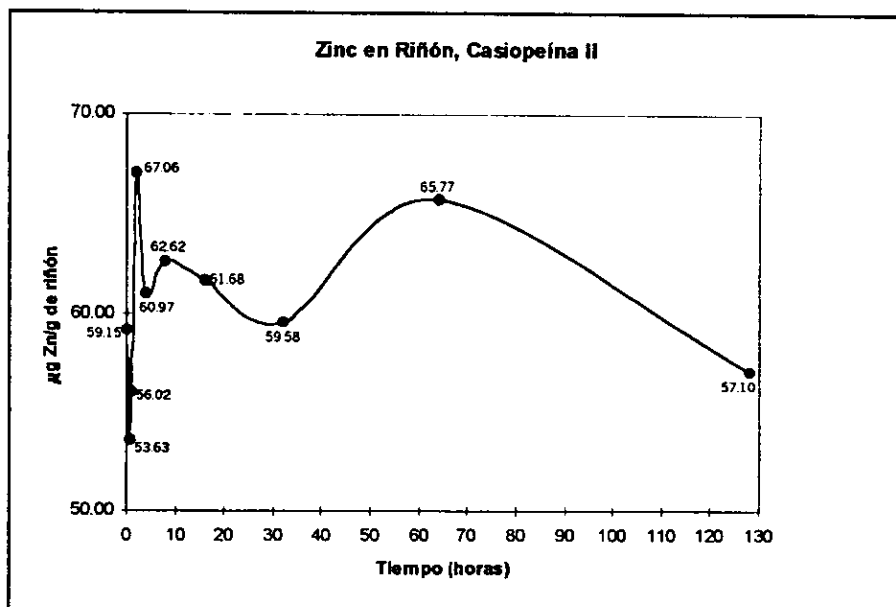


Figura 36. Distribución de zinc en riñón, Casiopeína II.

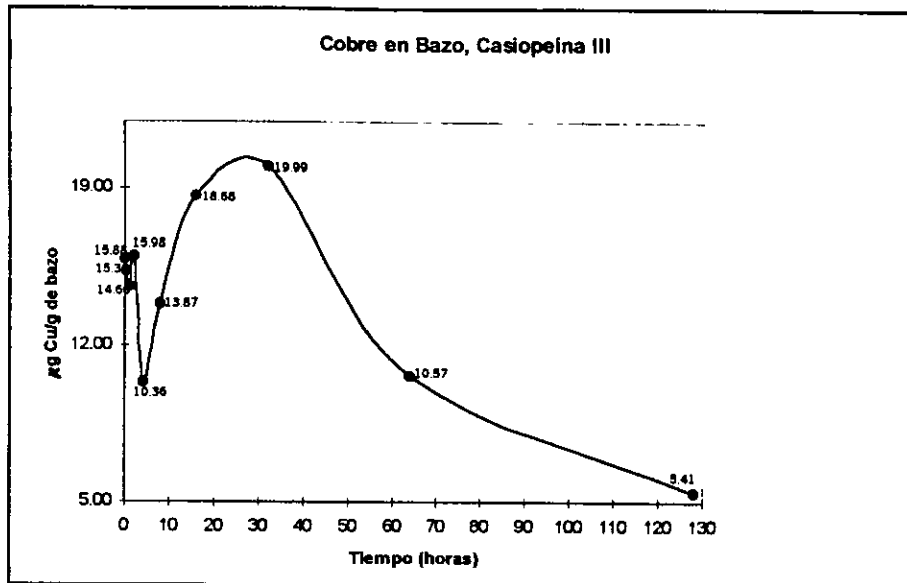


Figura 37. Distribución de cobre en bazo, Casiopeína III.

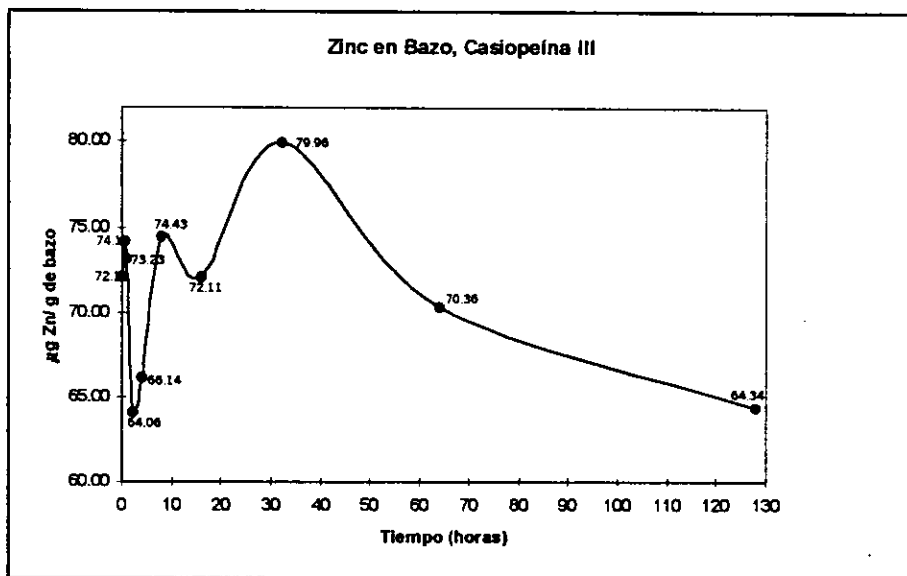


Figura 38. Distribución de zinc en bazo, Casiopeína III.

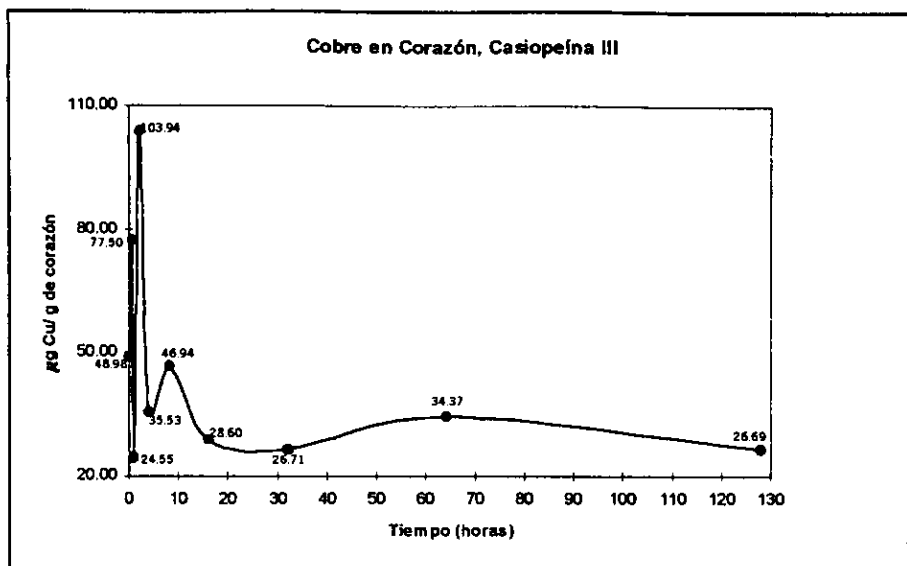


Figura 39. Distribución de cobre en corazón, Casiopeína III.

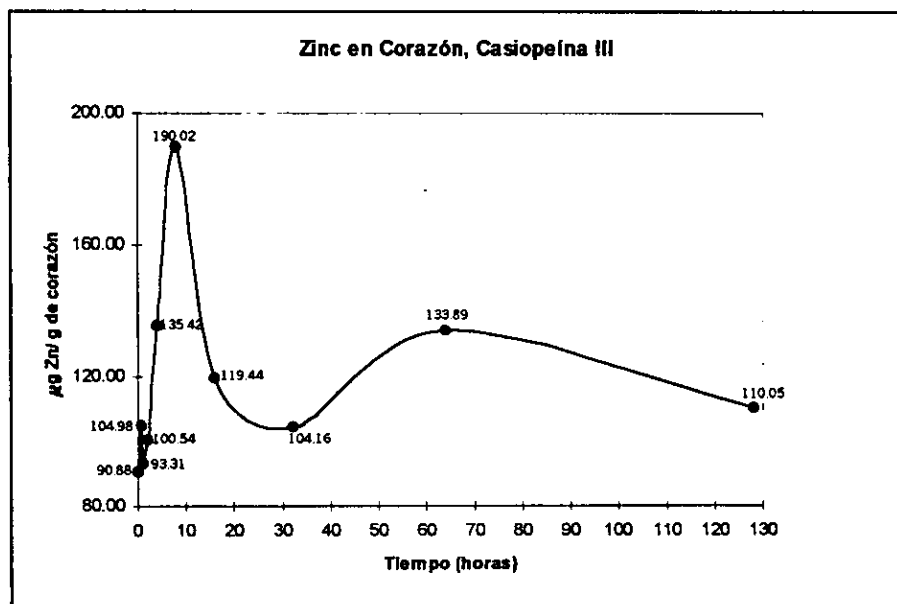


Figura 40. Distribución de zinc en corazón, Casiopeína III.

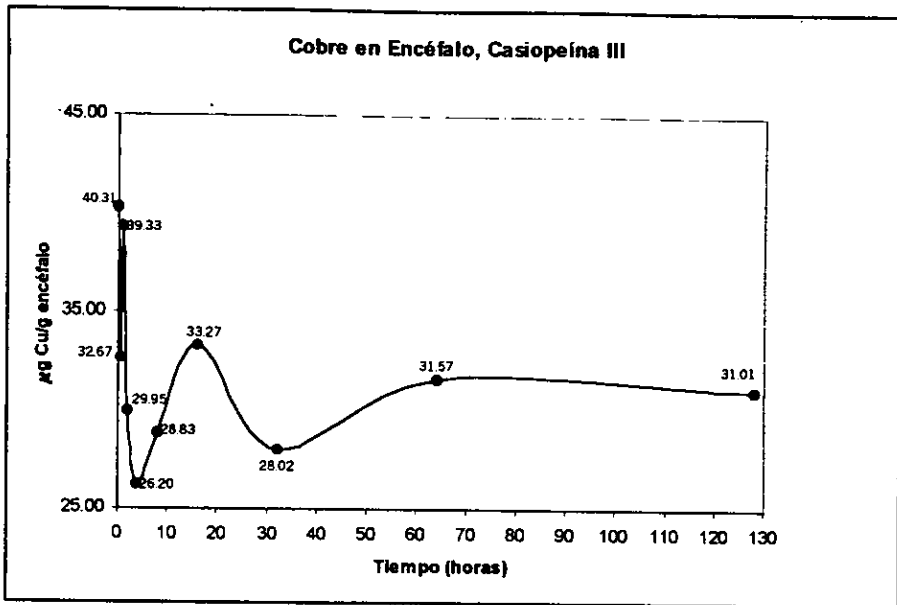


Figura 41. Distribución de cobre en encéfalo, Casiopeína III.

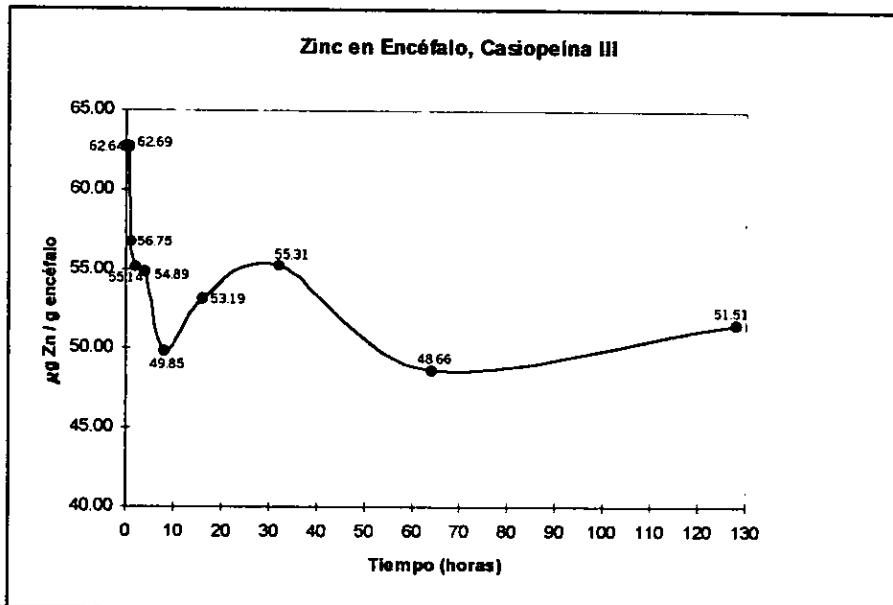


Figura 42. Distribución de zinc en encéfalo, Casiopeína III.

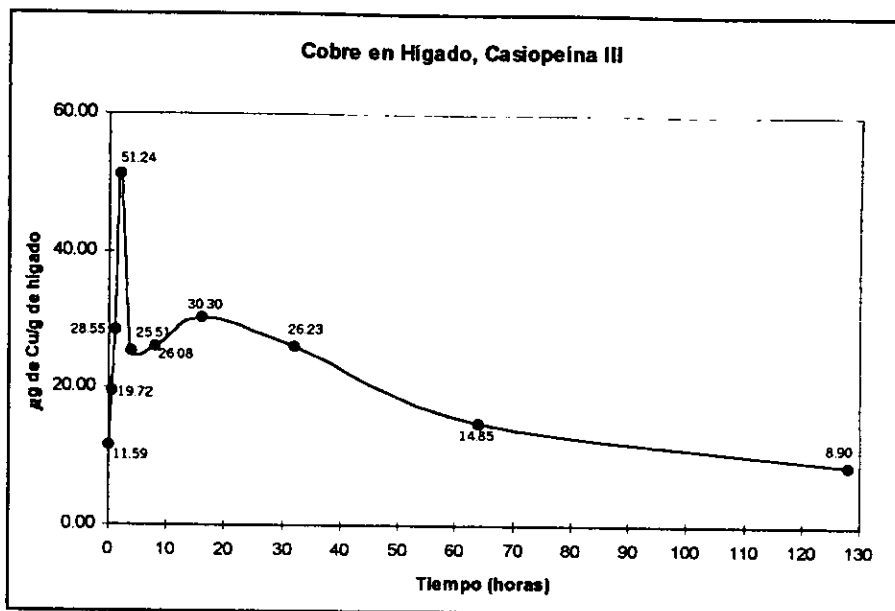


Figura 43. Distribución de cobre en hígado, Casiopeína III.

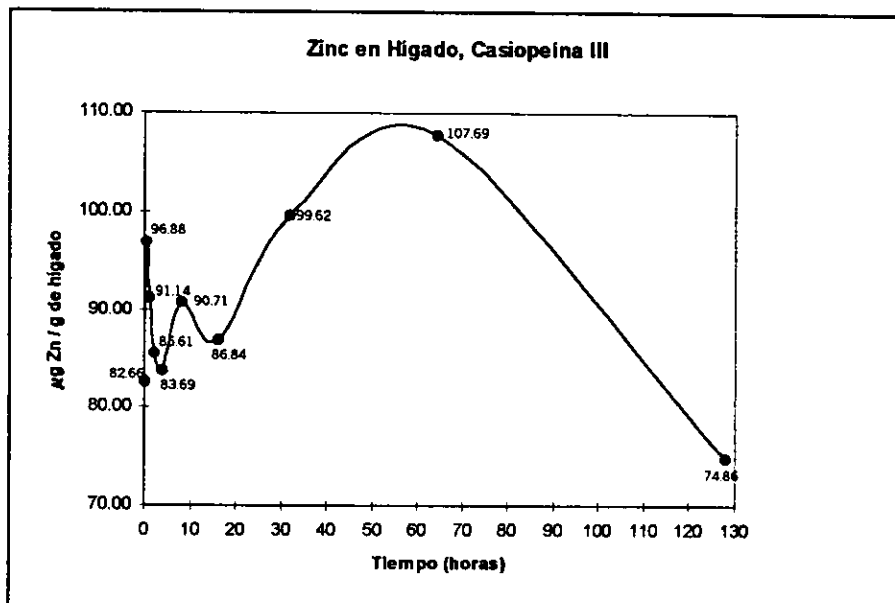


Figura 44. Distribución de zinc en hígado, Casiopeína III.

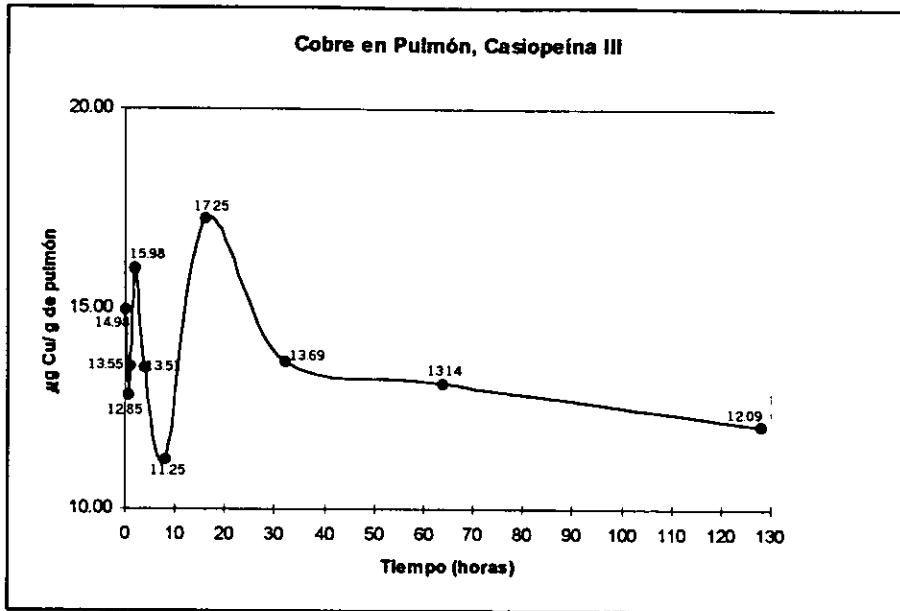


Figura 45. Distribución de cobre en pulmón, Casiopeína III.

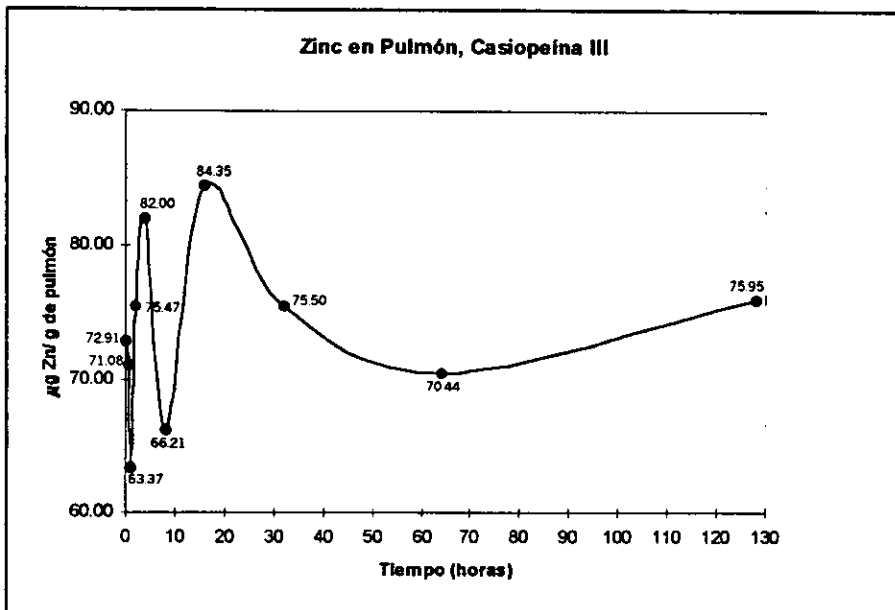


Figura 46. Distribución de zinc en pulmón, Casiopeína III.

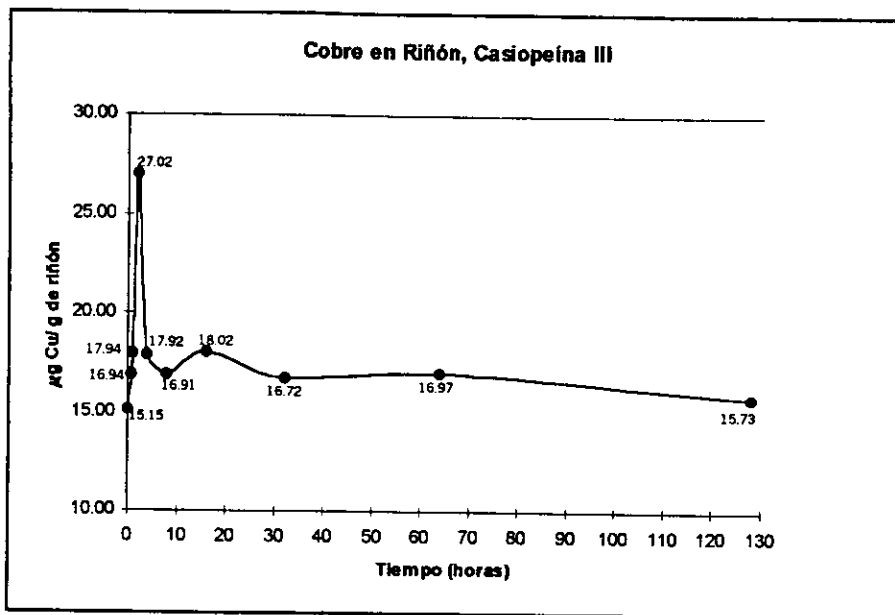


Figura 47. Distribución de cobre en riñón, Casiopeina III.

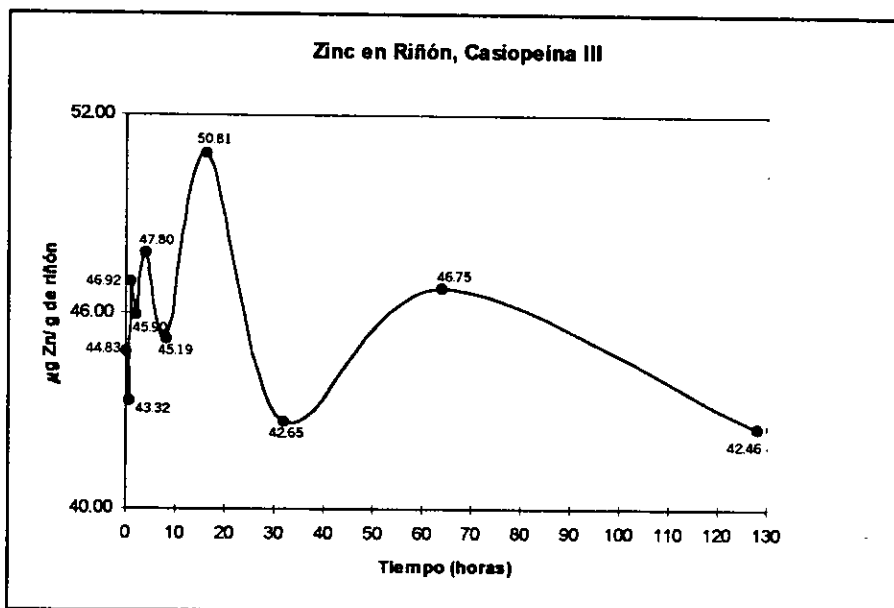


Figura 48. Distribución de zinc en riñón, Casiopeina III.

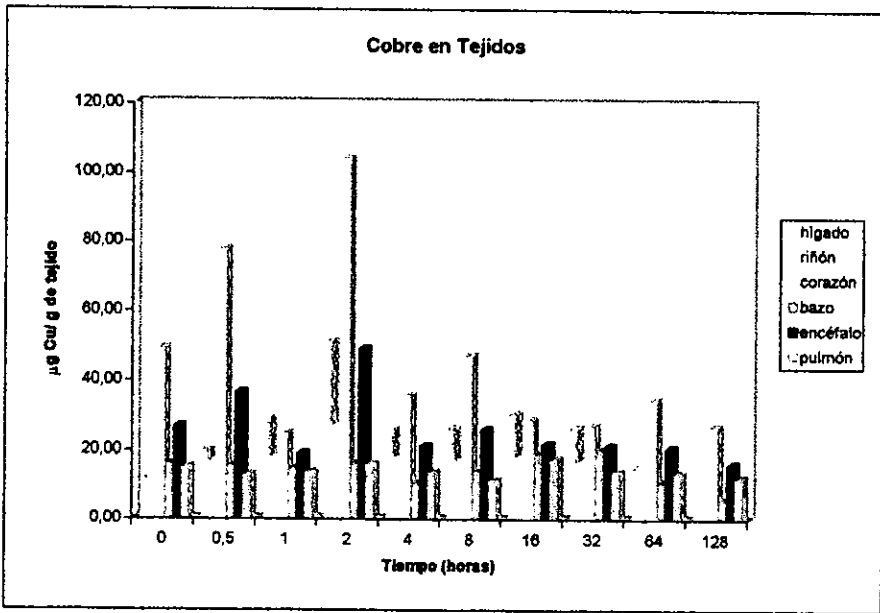


Figura 49. Distribución de cobre en tejidos, Casiopeina III.

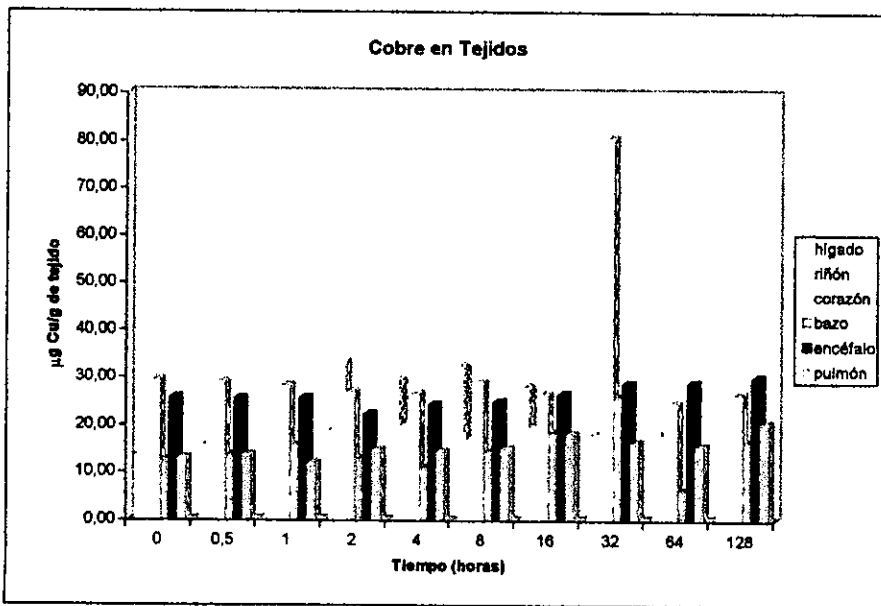


Figura 50. Distribución de cobre en tejidos, Casiopeina II.

En encéfalo, con la Casiopeína II, podemos observar que la concentración total de cobre aumenta a partir de las 16 horas alcanzando el primer máximo relativo a las 32 horas y desde este tiempo se mantiene la concentración constante, sin que se alcance a ver la eliminación del fármaco, por lo que se necesitarían analizar más tiempos (Figura 29).

Con la Casiopeína III se observa que la concentración de cobre disminuye sin encontrarse una concentración máxima, ya que la concentración basal de cobre es más alta que las demás (Figura 41).

Con la Casiopeína II, los niveles de zinc aumentan hasta llegar a la máxima concentración encontrada a las 16 horas, después estos niveles disminuyen paulatinamente hasta las 128 horas sin alcanzar el nivel basal (Figura 30).

Con la Casiopeína III, los niveles de zinc disminuyen en un principio rápidamente, posteriormente aumentan ligeramente sin alcanzar la concentración basal para después volver a disminuir (Figura 42).

En corazón, con la Casiopeína II, la concentración de cobre incrementa bruscamente para alcanzar la concentración máxima a las 32 horas, y después disminuye rápidamente hasta alcanzar niveles basales, permaneciendo constante (Figura 27).

Con la Casiopeína III, la concentración máxima se alcanza a las 2 horas, disminuyendo después a concentraciones menores a la basal (Figura 39).

En cuanto a los niveles de zinc, con la Casiopeína II, encontramos que de los 30 minutos a las 16 horas, estos son menores al nivel basal, siguiendo un incremento hasta alcanzar la concentración máxima a las 32 horas. Posteriormente disminuyen hasta llegar al nivel basal en donde permanecen constantes (Figura 28).

Con la Casiopeína III, la concentración de zinc aumenta, obteniendo la máxima concentración a las 8 horas, para después disminuir y volver a aumentar ligeramente a las 64 horas, siguiendo una disminución paulatina (Figura 40).

Para bazo, en lo que respecta a la Casiopeína II, los niveles de cobre aumentan hasta alcanzar la concentración máxima a las 32 horas y después disminuyen hasta llegar a la concentración basal (Figura 25).

La concentración de cobre con la Casiopeína III en un principio disminuye del nivel basal, y a partir de las 8 horas se incrementa hasta llegar al máximo a las 32 horas, seguido de una disminución gradual (Figura 37).

Los niveles de zinc con la Casiopeína II disminuyen drásticamente a partir de la concentración máxima a los 30 minutos; a partir de las dos

horas se observa un incremento llegando a una concentración cercana a la máxima a las 8 horas, para después disminuir otra vez (Figura 26).

En cuanto a la concentración de zinc con la Casiopeína III, también hay una disminución drástica, y se observa un aumento a partir de las dos horas. Se llega a la concentración máxima a las 32 horas y a partir de esta, la concentración de zinc disminuye gradualmente (Figura 38).

En riñón, con la Casiopeína II, vemos que la máxima concentración se alcanza a las dos horas rápidamente, a partir de las cuales, la concentración baja bruscamente a niveles de cobre por debajo del nivel basal, manteniéndose constante (Figura 35).

Por lo que respecta a la Casiopeína III, se observa un comportamiento parecido al anterior. En general se observa que las concentraciones de Cu a tiempos muy grandes (superiores a 8 hrs.) van disminuyendo paulatinamente, sin embargo las determinaciones de muestras próximas a la inoculación nos indican un incremento acelerado en las concentraciones de Cu, la concentración máxima también se alcanza a las dos horas (Figura 47).

La concentración de zinc con la Casiopeína II primero disminuye y después se incrementa drásticamente para llegar a un máximo a las dos horas. Posteriormente vemos que la concentración disminuye y vuelve a aumentar ligeramente hasta llegar a una concentración cercana a la

máxima a las 64 horas, disminuyendo otra vez hasta alcanzar el nivel basal (Figura 36).

En cuanto a la Casiopeína III, la concentración de zinc presenta un comportamiento irregular ya que aumenta y disminuye varias veces; conforme transcurre el tiempo, la amplitud de las curvas observadas en la gráfica va incrementándose. La concentración máxima se alcanza a las 16 horas (Figura 48).

En pulmón, con la Casiopeína II, podemos observar que el primer máximo relativo se encuentra a las 16 horas, sin embargo, convendría analizar tiempos posteriores ya que la concentración de cobre continúa aumentando (Figura 33).

En lo que respecta a la Casiopeína III, la concentración de cobre aumenta y disminuye durante los primeros tiempos de forma aleatoria hasta llegar a la máxima concentración a las 16 horas. Se observa después una disminución de la concentración, permaneciendo constante en el nivel basal (Figura 45).

Los niveles de zinc con la Casiopeína II disminuyen de manera acelerada hasta las dos horas, a partir de las cuales empiezan a aumentar hasta llegar al máximo a las 128 horas, concentración que es cercana a la basal (Figura 34).

Con la Casiopeína III, las concentraciones de zinc presentan una tendencia irregular, observándose la máxima concentración a las 16 horas, tiempo a partir del cual disminuye la concentración (Figura 46).

En hígado, con la Casiopeína II, la concentración de cobre se incrementa paulatinamente, llegando a un máximo a las 8 horas, para después disminuir de forma gradual alcanzando el nivel basal (Figura 31).

Con la Casiopeína III se observa una tendencia similar a la observada con la Casiopeína II, ya que los niveles de cobre aumentan hasta llegar al máximo a las dos horas. Vemos después que la concentración de cobre disminuye gradualmente (Figura 43).

A partir de los 30 minutos, con la Casiopeína II, los niveles de zinc se incrementan hasta llegar al máximo a las 16 horas, disminuyendo después poco a poco hasta llegar a un valor cercano al basal (Figura 32).

Con la Casiopeína III, la concentración de zinc aumenta para después disminuir y llegar al nivel basal; a partir de las 4 horas vuelve a incrementarse la concentración llegando a la máxima a las 64 horas (Figura 44).

En resumen, los valores de la concentración máxima de cobre y zinc y el tiempo al cual se encuentra esta concentración para las Casiopeínas II y III se muestran en las tablas 8 y 9.

COBRE

	Casiopeína II		Casiopeína III	
	Concentración máxima ($\mu\text{g Cu/g de tejido}$)	Tiempo máximo (horas)	Concentración máxima ($\mu\text{g Cu / g de tejido}$)	Tiempo máximo (horas)
Bazo	25.72	32	19.99	32
Corazón	80.43	32	103.94	2
Encéfalo	28.75*	32	40.31	0
Hígado	32.47	8	51.24	2
Pulmón	16.06 *	16	17.25	16
Riñón	33.45	2	27.02	2

* Primer máximo relativo

Tabla 8. Tiempo máximo y concentración máxima del cobre para las Casiopeínas II y III.

ZINC

	Casiopéina II		Casiopéina III	
	Concentración máxima ($\mu\text{g Zn / g}$ de tejido)	Tiempo máximo (horas)	Concentración máxima ($\mu\text{g Zn / g}$ de tejido)	Tiempo máximo (horas)
Bazo	122.44	0.5	79.96	32
Corazón	93.44	32	190.02	8
Encéfalo	89.89	16	62.69	0.5
Hígado	135.50	16	107.69	64
Pulmón	92.72*	1	84.35	16
Riñón	67.06	2	50.81	16

* Primer máximo relativo

Tabla 9. Tiempo máximo y concentración máxima del zinc para las Casiopéinas II y III.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Considerando que la determinación de cobre representa la presencia de la Casiopeína, se concluyen los siguientes puntos.

La Casiopeína II se distribuye con mayor rapidez en riñón e hígado, ya que se encontró la concentración máxima a tiempos cortos (2 y 8 horas respectivamente). La Casiopeína III presenta el mismo comportamiento aunque también se distribuye rápidamente en corazón (2 horas).

La rápida distribución de los fármacos en el hígado, puede deberse a que después de una administración intraperitoneal, estos sufren el efecto del primer paso (hepático).

Para la Casiopeína II vemos que en encéfalo y pulmón después de que se obtiene un primer máximo relativo (32 y 16 horas respectivamente), la concentración de cobre se mantiene constante hasta las 128 horas (último tiempo analizado), sin haberse podido observar la

eliminación, por lo que se deberían analizar más tiempos. Esto nos indica que en caso de que se utilizara este fármaco para el tratamiento de un tumor en estos órganos, exista la posibilidad de que la Casiopeína II tenga tiempo suficiente para producir sus efectos terapéuticos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la Casiopeína III no atraviesa la barrera hematoencefálica, ya que las concentraciones de cobre se encuentran por debajo de la concentración basal.

Experimentalmente se encontró que existe una relación inversa entre el cobre y el zinc en algunos órganos, principalmente con la Casiopeína III (hígado, riñón, corazón y bazo), mientras que con la Casiopeína II solo se observó esta relación en pulmón.

Como no se encuentra una relación inversa clara, permite suponer que la naturaleza del complejo (Casiopeína) se mantiene en los órganos.

CAPÍTULO VI

ANEXO I

Espectroscopía de Absorción Atómica.

La configuración más estable y de más bajo contenido energético, es conocida como "estado fundamental" y es la configuración orbital normal para el átomo.

Si a un átomo se aplica energía de una magnitud apropiada, ésta será absorbida por él e inducirá que el electrón exterior sea promovido a un orbital menos estable o "estado excitado". Como este estado es inestable, el átomo inmediatamente y espontáneamente retornará a su configuración fundamental. El electrón por lo tanto retornará a su orbital inicial estable y emitirá energía radiante equivalente a la cantidad de energía inicialmente absorbida en el proceso de excitación.

Si luz de una determinada longitud de onda incide sobre un átomo libre en estado fundamental, el átomo puede absorber energía y pasa al estado excitado, en un proceso conocido como **absorción atómica**. La propiedad de un átomo de absorber luz de longitud de onda específica, es utilizada en la espectrofotometría de absorción atómica.

La característica de interés en las medidas por absorción atómica, es el monto de luz a la longitud de onda resonante, que es absorbida, cuando la luz pasa a través de una nube atómica. Conforme el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad que de ésta será absorbida se incrementará en una forma predecible.

El uso de fuentes especiales de luz y la selección cuidadosa de la longitud de onda, permite la determinación cuantitativa específica de elementos individuales en la presencia de otros.

La nube de átomos requerida para las mediciones en absorción atómica, es producida por la adición de suficiente energía térmica a la muestra para disociar los compuestos químicos en átomos libres. La aspiración de una solución de la muestra, dentro de una llama alineada con el rayo de luz, sirve para este propósito.

Luz, a la longitud de onda de resonancia, de intensidad inicial I_0 , es enfocada sobre la llama, que contiene átomos al estado fundamental. La intensidad inicial de la luz es disminuida en una cantidad determinada por la concentración de los átomos en la llama. Luego la luz es dirigida sobre el detector donde se mide la intensidad disminuida, I . La cantidad de la luz absorbida se determina por comparar I a I_0 .

Absorbancia es el término más conveniente para caracterizar la absorción de luz en la espectrofotometría de absorción, pues esta

cantidad guarda una relación lineal con la concentración. La ley de Beer define esta relación:

$$A = abc$$

en donde "A" es la absorbancia; "a" es el coeficiente de absorptividad constante que es característica de las especies que absorben; "b" es la longitud del paso de luz ocupado por la celda de absorción; y "c" es la concentración de las especies absorbentes en la celda de absorción. Esta ecuación simplemente establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes para unas condiciones instrumentales dadas.

En un espectrofotómetro se requiere una fuente de luz la cual emita las líneas atómicas características del elemento a ser analizado. Se hace necesario generar un vapor atómico en el paso del rayo de luz de la fuente. Esto se obtiene generalmente al introducir la muestra en un quemador o alternativamente, en un horno eléctricamente calentado que se encuentre alineado en el paso óptico del espectrofotómetro. Se necesita de algunos componentes para la medición de la luz específica. Un monocromador que dispersa las distintas longitudes de onda de la luz que es emitida de la fuente y separa la línea particular que se emplea para este fin. La longitud de onda aislada por el monocromador incide directamente sobre el detector, que sirve como el "ojo" del instrumento.

Un átomo absorbe luz de longitudes de onda muy discretas. Para medir esta absorción de bandas tan angostas con la máxima sensibilidad, es necesario usar una fuente que emita longitudes de onda muy específicas que puedan ser absorbidas por el átomo. La lámpara de cátodo hueco (LCH) es una excelente y brillante fuente de energía discreta para la mayoría de los elementos determinables por absorción atómica.

El cátodo de la lámpara es un cilindro hueco del metal o de una aleación de este, cuyo espectro debe producirse. El ánodo y el cátodo se encuentran en un cilindro de vidrio sellado y lleno ya sea de neón o argón.

Se pueden obtener significantes y convenientes beneficios con la incorporación de óptica adicional para obtener el sistema de "doble haz". En el diseño de doble haz, la luz de la lámpara es dividida en un haz-muestra que es enfocado a través de la celda de muestreo y un haz de referencia que pasa alrededor de la celda de la muestra y sirve como un monitor de la intensidad de la lámpara. En un sistema de doble haz, las lecturas no representan simplemente la intensidad de la luz de un sólo haz, sino el cociente entre el haz de muestra y el de referencia y que se originan de la misma fuente. Como resultado de esto, las fluctuaciones en la intensidad de la fuente, las cuales afectan igualmente la intensidad

del haz de referencia y al haz de la muestra, no son trasladadas como fluctuaciones en las lecturas del instrumento.

En un monocromoador típico, la luz de la fuente entra al monocromador por la apertura espectral de entrada y es dirigida hacia la red de difracción en donde tiene lugar la dispersión. Las longitudes de onda divergentes son dirigidas hacia la apertura espectral de salida. Ajustando el ángulo de la red, se permite que una línea de emisión preseleccionada de la fuente pasa a través de la apertura de salida e incida sobre el detector.

El atomizador de un espectrofotómetro de absorción atómica debe generar átomos en estado fundamental en el paso óptico del fotómetro. La técnica más ampliamente usada es la aspiración directa en la llama de la solución de la muestra. En el sistema de pre-mezcla, la solución de la muestra es aspirada a través de un nebulizador que genera un aerosol fino, dentro de una cámara de mezcla. Aquí el aerosol de la muestra se mezcla con los gases, el combustible y el oxidante, y luego es llevado al cabezal del quemador en donde ocurre la combustión y la atomización de la muestra.

El detector es un tubo fotomultiplicador, que produce una corriente eléctrica que depende de la intensidad de la luz incidente. La corriente eléctrica del fotomultiplicador es luego amplificada y procesada por la electrónica del instrumento, que produce una señal la cual es medida de la atenuación de la luz que ocurre en la celda de muestreo.

ANEXO II

Casiopéina II µg de Cu/g de bazo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	15.15	9.57	12.63	12.45
0.5	11.63	12.74	16.34	13.57
1	14.71	15.15	18.89	15.58
2	16.03	8.13	14.08	12.75
4	14.49	9.80	8.33	10.88
8	16.67	18.75	7.14	14.19
16	16.23	12.05	26.32	18.20
32	15.43	18.26	45.45	25.72
64	8.24	7.46	2.58	6.09
128	12.02	6.17		9.10

Tabla 10

Casiopéina II µg Cu/ g de corazón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	34.09	25.50	28.57	29.39
0.5	36.44	29.85	20.41	28.90
1	26.32	29.70	28.41	28.14
2	32.79	23.17	24.39	26.78
4	24.88	28.46	25.75	26.36
8	29.20	27.78	30.00	28.99
16	30.97	28.44	19.38	26.26
32	22.47	24.39	194.44	80.43
64	25.13	22.22	26.32	24.55
128	26.79	30.53	21.83	26.38

Tabla 11

Casiopéina II µg Cu/g de encéfalo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	25.81	29.25	21.71	25.59
0.5	22.32	27.68	26.44	25.48
1	26.12	24.56	28.11	25.60
2	24.36	23.53	18.82	22.24
4	18.04	30.83	23.90	24.26
8	27.30	25.10	22.07	24.82
16	24.76	23.39	31.13	26.43
32	24.75	27.35	34.14	28.75
64	21.95	28.99	35.77	28.90
128	31.21	33.16	25.74	30.04

Tabla 12

Casiopaina II $\mu\text{g Cu/g}$ de hígado				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	14.41	11.40	14.38	13.40
0.5	14.16	17.31	14.29	15.25
1	19.16	19.28	16.83	18.43
2	19.48	18.30	0	18.89
4	27.56	28.84	31.42	29.27
8	34.12	30.82	0	32.47
16	29.47	31.63	23.05	28.05
32	17.39	18.82	17.67	17.96
64	17.30	19.09	18.20	18.20
128	16.89	14.54	15.14	15.53

Tabla 13

Casiopaina II $\mu\text{g Cu/g}$ de pulmón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	22.06	3.19	13.54	12.93
0.5	13.59	12.85	14.49	13.64
1	11.42	11.88	12.32	11.87
2	9.68	15.75	19.00	14.81
4	12.68	15.50	15.43	14.54
8	16.44	14.05	14.55	15.01
16	12.74	20.69	20.76	18.06
32	17.86	17.99	13.38	16.41
64	14.44	16.53	15.87	15.61
128	18.38	24.27	18.38	20.35

Tabla 14

Casiopaina II $\mu\text{g de Cu / g}$ de riñón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	29.23	29.26	24.97	27.82
0.5	30.03	21.71	25.94	25.89
1	25.33	24.46	26.10	25.30
2	27.34	22.81	50.19	33.45
4	18.68	21.25	20.07	20.00
8	16.51	18.50	15.29	16.77
16	18.84	21.02	18.52	19.46
32	15.32	20.80	17.72	17.95
64	19.00	17.18	17.40	17.86
128	17.01	14.77	19.92	17.24

Tabla 15

Casiopéina III µg de Cu/g de bazo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	15.71	13.76	18.18	15.88
0.5	14.29	14.29	17.33	15.30
1	13.66	16.85	13.27	14.60
2	20.83	13.66	13.44	15.98
4	11.32	9.05	10.70	10.36
8	14.46	14.63	12.50	13.87
16	36.95	9.05	10.05	18.68
32	40.82	8.80	10.34	19.99
64	13.82	10.92	6.98	10.57
128	3.36	7.46		5.41

Tabla 16

Casiopéina III µg Cu/g de corazón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	68.26	31.33	47.34	48.98
0.5	27.95	181.60	22.96	77.50
1	22.88	26.23	0.00	24.55
2	24.10	32.26	255.45	103.94
4	25.94	50.91	29.74	35.53
8	31.25	79.58	29.97	46.94
16	28.90	25.64	31.25	28.60
32	26.23	27.03	26.87	26.71
64	27.40	38.46	37.25	34.37
128	29.85	25.21	25.00	26.69

Tabla 17

Casiopéina III µg Cu/g de encéfalo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	35.98	41.29	43.66	40.31
0.5	36.19	35.00	26.82	32.67
1	36.36	31.06	50.57	39.33
2	34.03	29.14	26.67	29.95
4	31.15	24.71	22.73	26.20
8	34.08	24.36	28.06	28.83
16	30.17	32.71	36.92	33.27
32	24.79	29.62	29.65	28.02
64	34.36	33.75	26.60	31.57
128	20.44	48.98	23.61	31.01

Tabla 18

Casiopaina II $\mu\text{g Cu/g}$ de hígado				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	10.49	12.00	12.27	11.59
0.5	20.32	18.20	20.63	19.72
1	18.73	36.79	30.13	28.55
2	70.73	42.40	40.60	51.24
4	30.06	29.13	17.34	25.51
8	26.60	26.41	25.22	26.08
16	21.16	40.26	29.48	30.30
32	28.96	24.59	25.13	26.23
64	18.04	12.78	13.73	14.85
128	8.76	8.20	9.74	8.90

Tabla 19

Casiopaina III $\mu\text{g Cu/g}$ de pulmón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	18.65	12.25	14.03	14.98
0.5	11.47	13.26	13.81	12.85
1	12.32	15.00	13.33	13.55
2	11.66	18.48	17.80	15.98
4	15.58	13.48	11.47	13.51
8	10.79	11.98	10.97	11.25
16	15.02	16.78	19.96	17.25
32	15.04	10.79	15.23	13.69
64	12.45	17.48	9.48	13.14
128	11.40	11.88	12.99	12.09

Tabla 20

Casiopaina III $\mu\text{g Cu/g}$ de riñón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	14.43	15.45	15.56	15.15
0.5	17.15	16.76	16.90	16.94
1	15.08	21.10	17.64	17.94
2	44.17	17.75	19.15	27.02
4	18.84	16.91	18.01	17.92
8	16.88	16.38	17.46	16.91
16	17.49	18.32	18.24	18.02
32	19.53	15.28	15.34	16.72
64	21.56	12.58	16.78	16.97
128	15.37	15.42	16.41	15.73

Tabla 21

Casiopaina II µg de Zn/g de bazo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	126.26	105.26	111.11	114.21
0.5	119.19	133.76	114.38	122.44
1	154.41	103.03	104.73	120.72
2	89.74	71.14	91.55	84.14
4	90.58	104.58	77.78	90.98
8	133.33	150.00	78.57	120.63
16	77.92	72.29	0	75.11
32	0	0	0	0
64	0	0	0	0
128	0	0	0	0

Tabla 22

Casiopaina II µg Zn/g de corazón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	85.23	65.16	73.47	74.62
0.5	72.87	79.60	65.31	72.59
1	70.18	79.21	73.86	74.42
2	98.36	57.92	65.04	73.77
4	64.68	73.17	60.09	65.98
8	69.34	59.52	65.00	64.62
16	79.65	75.83	50.39	68.62
32	56.18	52.85	171.29	93.44
64	75.38	70.37	70.18	71.97
128	58.04	68.70	69.87	65.54

Tabla 23

Casiopaina II µg Zn/g de encéfalo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	60.65	69.34	60.78	63.59
0.5	57.39	71.51	64.37	64.42
1	62.19	64.12	70.50	65.60
2	58.47	62.35	71.76	64.19
4	66.52	83.85	73.04	74.47
8	59.66	70.01	64.83	64.83
16	72.12	67.84	129.70	89.89
32	84.16	87.99	90.31	87.49
64	69.51	124.64	65.81	86.65
128	71.88	79.14	75.93	75.58

Tabla 24

Casiopéina II µg Zn/g de hígado				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	103.84	99.45	97.41	100.23
0.5	86.36	91.94	80.39	86.23
1	95.82	91.94	91.71	93.16
2	92.53	92.26	0	92.40
4	86.07	102.53	111.77	100.12
8	105.36	113.62	0	109.49
16	131.12	147.20	128.18	135.50
32	127.54	120.19	131.52	126.42
64	125.96	120.82	120.06	122.28
128	101.73	90.03	114.53	102.10

Tabla 25

Casiopéina II µg Zn/g de pulmón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	99.26	118.21	85.78	101.08
0.5	92.39	92.08	84.06	89.51
1	84.47	80.76	112.94	92.72
2	77.42	76.77	66.51	73.57
4	80.34	69.77	80.25	76.78
8	90.41	74.94	83.64	83.00
16	61.57	100.00	76.12	79.23
32	82.14	82.73	100.33	88.40
64	83.03	71.63	84.66	79.77
128	77.21	131.07	106.62	104.96

Tabla 26

Casiopéina II µg de Zn/g de riñón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	67.69	57.18	52.56	59.15
0.5	58.56	49.14	53.18	53.63
1	52.00	55.71	60.36	56.02
2	61.20	70.98	69.01	67.06
4	56.03	65.00	61.87	60.97
8	67.08	64.20	56.57	62.62
16	62.81	60.06	62.17	61.68
32	52.92	63.80	62.02	59.58
64	72.54	61.88	62.92	65.77
128	63.18	35.09	73.04	57.10

Tabla 27

Casiopéina II				
µg de Zn /g de bazo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	68.06	71.10	77.27	72.15
0.5	77.55	65.71	79.21	74.16
1	84.70	73.03	61.95	73.23
2	72.92	60.11	59.14	64.06
4	73.58	63.35	61.50	66.14
8	66.12	63.41	93.75	74.43
16	76.35	74.66	65.33	72.11
32	91.84	72.18	75.86	79.96
64	69.12	69.87	72.09	70.36
128	57.05	71.64		64.34

Tabla 28

Casiopéina III				
µg Zn/g de corazón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	92.15	88.77	91.72	90.88
0.5	130.43	79.90	104.59	104.98
1	78.43	108.20	0	93.31
2	99.40	93.19	109.03	100.54
4	123.92	174.55	107.81	135.42
8	113.28	328.72	128.07	190.02
16	141.62	125.36	91.35	119.44
32	121.31	92.66	98.51	104.16
64	87.67	107.69	206.30	133.89
128	85.82	105.04	139.29	110.05

Tabla 29

Casiopéina III				
µg Zn/g de encéfalo				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	59.97	59.35	68.61	62.64
0.5	60.32	76.67	51.09	62.69
1	52.27	54.35	63.62	56.75
2	59.28	52.82	53.33	55.14
4	59.19	55.23	50.24	54.89
8	52.88	47.28	49.38	49.85
16	49.77	46.73	63.08	53.19
32	53.13	58.06	54.73	55.31
64	50.95	51.51	43.53	48.66
128	48.74	55.78	50.00	51.51

Tabla 30

Casiopéina III $\mu\text{g Zn/g}$ de hígado				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	81.07	77.62	89.30	82.68
0.5	98.36	98.95	93.33	96.88
1	97.49	84.17	91.76	91.14
2	91.15	83.97	81.71	85.61
4	88.64	76.47	85.95	83.69
8	85.34	95.01	91.78	90.71
16	77.34	89.40	93.78	86.84
32	87.14	105.05	106.67	99.62
64	128.73	108.59	85.75	107.69
128	72.95	74.31	77.33	74.86

Tabla 31

Casiopéina III $\mu\text{g Zn/g}$ de pulmón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	69.93	68.63	80.16	72.91
0.5	77.98	68.97	66.30	71.08
1	61.60	72.50	56.00	63.37
2	64.14	76.21	86.05	75.47
4	83.12	92.13	70.75	82.00
8	62.95	69.86	65.81	66.21
16	83.69	93.96	75.39	84.35
32	80.20	70.14	76.14	75.50
64	74.69	73.43	63.19	70.44
128	76.92	66.51	84.42	75.95

Tabla 32

Casiopéina III $\mu\text{g Zn/g}$ de riñón				
Tiempo (horas)	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Promedio
0	44.33	42.68	47.47	44.83
0.5	45.21	38.68	46.08	43.32
1	44.39	51.48	44.91	46.92
2	44.17	44.80	48.74	45.90
4	52.59	45.35	45.45	47.80
8	43.04	43.93	48.60	45.19
16	51.67	50.61	50.15	50.81
32	45.57	40.76	41.64	42.65
64	59.30	33.54	47.41	46.75
128	41.59	41.13	44.67	42.46

Tabla 33

ANEXO III

Cobre en
BazoCasiopéina
II

Muestra Nº.	Conc. Cu (ppm)	μg de Cu	peso bazo (g)	μg de Cu/g de bazo
1	0.03	0.3	0.0099	30.30
2	0.04	0.4	0.0209	19.14
3	0.05	0.5	0.0198	25.25
4	0.04	0.4	0.0172	23.26
5	0.04	0.4	0.0157	25.48
6	0.05	0.5	0.0153	32.68
7	0.04	0.4	0.0136	29.41
8	0.05	0.5	0.0165	30.30
9	0.05	0.5	0.0148	33.78
10	0.05	0.5	0.0156	32.05
11	0.04	0.4	0.0246	16.26
12	0.04	0.4	0.0142	28.17
13	0.04	0.4	0.0138	28.99
14	0.03	0.3	0.0153	19.61
15	0.03	0.3	0.018	16.67
16	0.05	0.5	0.015	33.33
17	0.03	0.3	0.008	37.50
18	0.01	0.1	0.007	14.29
19	0.05	0.5	0.0154	32.47
20	0.04	0.4	0.0166	24.10
21	0.08	0.8	0.0152	52.63
22	0.05	0.5	0.0162	30.86
23	0.04	0.4	0.0123	32.52
24	0.11	1.1	0.0121	90.91
25	0.03	0.3	0.0182	16.48
26	0.03	0.3	0.0201	14.93
27	0.01	0.1	0.0194	5.15
28	0.05	0.5	0.0208	24.04
29	0.03	0.3	0.0243	12.35
30	0	0	0	0

Tabla 34. Cobre en bazo, Casiopéina II.

Zinc en Bazo				
Casiopeína II				
Muestra N°.	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso bazo (g)	µg de Zn/g de bazo
1	0.25	2.5	0.0099	252.53
2	0.44	4.4	0.0209	210.53
3	0.44	4.4	0.0198	222.22
4	0.41	4.1	0.0172	238.37
5	0.42	4.2	0.0157	267.52
6	0.35	3.5	0.0153	228.76
7	0.42	4.2	0.0136	308.82
8	0.34	3.4	0.0165	206.06
9	0.31	3.1	0.0148	209.46
10	0.28	2.8	0.0156	179.49
11	0.35	3.5	0.0246	142.28
12	0.26	2.6	0.0142	183.10
13	0.25	2.5	0.0138	181.16
14	0.32	3.2	0.0153	209.15
15	0.28	2.8	0.018	155.56
16	0.4	4	0.015	266.67
17	0.24	2.4	0.008	300.00
18	0.11	1.1	0.007	157.14
19	0.24	2.4	0.0154	155.84
20	0.24	2.4	0.0166	144.58
21	0	0	0.0152	0
22	0	0	0.0162	0
23	0	0	0.0123	0
24	0	0	0.0121	0
25	0	0	0.0182	0
26	0	0	0.0201	0
27	0	0	0.0194	0
28	0	0	0.0208	0
29	0	0	0.0243	0
30	0	0	0	0

Tabla 35. Zinc en bazo, Casiopeína II.

Cobre en Corazón				
Casiopeína II				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso corazón (g)	µg de Cu/g de corazón
1	0.06	0.6	0.0176	34.0909
2	0.09	0.9	0.0353	25.4958
3	0.07	0.7	0.0245	28.5714
4	0.09	0.9	0.0247	36.4372
5	0.06	0.6	0.0201	29.8507
6	0.05	0.5	0.0245	20.4082
7	0.06	0.6	0.0228	26.3158
8	0.06	0.6	0.0202	29.7030
9	0.05	0.5	0.0176	28.4091
10	0.08	0.8	0.0244	32.7869
11	0.06	0.6	0.0259	23.1660
12	0.06	0.6	0.0246	24.3902
13	0.05	0.5	0.0201	24.8756
14	0.07	0.7	0.0246	28.4553
15	0.06	0.6	0.0233	25.7511
16	0.08	0.8	0.0274	29.1971
17	0.07	0.7	0.0252	27.7778
18	0.06	0.6	0.02	30.0000
19	0.07	0.7	0.0226	30.9735
20	0.06	0.6	0.0211	28.4360
21	0.05	0.5	0.0258	19.3798
22	0.04	0.4	0.0178	22.4719
23	0.06	0.6	0.0246	24.3902
24	0.42	4.2	0.0216	194.4444
25	0.05	0.5	0.0199	25.1256
26	0.06	0.6	0.027	22.2222
27	0.06	0.6	0.0228	26.3158
28	0.06	0.6	0.0224	26.7857
29	0.08	0.8	0.0262	30.5344
30	0.05	0.5	0.0229	21.8340

Tabla 36. Cobre en corazón, Casiopeína II.

Zinc en Corazón				
Casiopeína II				
Muestra N°	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso corazón (g)	µg de Zn/g de corazón
1	0.15	1.5	0.0176	85.2273
2	0.23	2.3	0.0353	65.1558
3	0.18	1.8	0.0245	73.4694
4	0.18	1.8	0.0247	72.8745
5	0.16	1.6	0.0201	79.6020
6	0.16	1.6	0.0245	65.3061
7	0.16	1.6	0.0228	70.1754
8	0.16	1.6	0.0202	79.2079
9	0.13	1.3	0.0176	73.8636
10	0.24	2.4	0.0244	98.3607
11	0.15	1.5	0.0259	57.9151
12	0.16	1.6	0.0246	65.0407
13	0.13	1.3	0.0201	64.6766
14	0.18	1.8	0.0246	73.1707
15	0.14	1.4	0.0233	60.0858
16	0.19	1.9	0.0274	69.3431
17	0.15	1.5	0.0252	59.5238
18	0.13	1.3	0.02	65.0000
19	0.18	1.8	0.0226	79.6460
20	0.16	1.6	0.0211	75.8294
21	0.13	1.3	0.0258	50.3876
22	0.1	1	0.0178	56.1798
23	0.13	1.3	0.0246	52.8455
24	0.37	3.7	0.0216	171.2963
25	0.15	1.5	0.0199	75.3769
26	0.19	1.9	0.027	70.3704
27	0.16	1.6	0.0228	70.1754
28	0.13	1.3	0.0224	58.0357
29	0.18	1.8	0.0262	68.7023
30	0.16	1.6	0.0229	69.8690

Tabla 37. Zinc en corazón, Casiopeína II.

Cobre en Encéfalo				
Casiopéina II				
Muestra Nº.	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso encéfalo (g)	µg de Cu/g de encéfalo
1	0.2	2	0.0775	25.81
2	0.27	2.7	0.0923	29.25
3	0.15	1.5	0.0691	21.71
4	0.21	2.1	0.0941	22.32
5	0.24	2.4	0.0867	27.68
6	0.23	2.3	0.087	26.44
7	0.21	2.1	0.0804	26.12
8	0.18	1.8	0.0733	24.56
9	0.2	2	0.0766	26.11
10	0.2	2	0.0821	24.36
11	0.2	2	0.085	23.53
12	0.16	1.6	0.085	18.82
13	0.16	1.6	0.0887	18.04
14	0.25	2.5	0.0811	30.83
15	0.18	1.8	0.0753	23.90
16	0.27	2.7	0.0989	27.30
17	0.19	1.9	0.0757	25.10
18	0.16	1.6	0.0725	22.07
19	0.23	2.3	0.0929	24.76
20	0.2	2	0.0855	23.39
21	0.24	2.4	0.0771	31.13
22	0.2	2	0.0808	24.75
23	0.23	2.3	0.0841	27.35
24	0.31	3.1	0.0908	34.14
25	0.18	1.8	0.082	21.95
26	0.2	2	0.069	28.99
27	0.25	2.5	0.0699	35.77
28	0.27	2.7	0.0865	31.21
29	0.31	3.1	0.0935	33.16
30	0.2	2	0.0777	25.74

Tabla 38. Cobre en encéfalo, Casiopéina II.

Zinc en Encéfalo				
Casiopeína II				
Muestra Nº.	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso encéfalo (g)	µg de Zn/g de encéfalo
1	0.47	4.7	0.0775	60.65
2	0.64	6.4	0.0923	69.34
3	0.42	4.2	0.0691	60.78
4	0.54	5.4	0.0941	57.39
5	0.62	6.2	0.0867	71.51
6	0.56	5.6	0.087	64.37
7	0.5	5	0.0804	62.19
8	0.47	4.7	0.0733	64.12
9	0.54	5.4	0.0766	70.50
10	0.48	4.8	0.0821	58.47
11	0.53	5.3	0.085	62.35
12	0.61	6.1	0.085	71.76
13	0.59	5.9	0.0887	66.52
14	0.68	6.8	0.0811	83.85
15	0.55	5.5	0.0753	73.04
16	0.59	5.9	0.0989	59.66
17	0.53	5.3	0.0757	70.01
18	0.47	4.7	0.0725	64.83
19	0.67	6.7	0.0929	72.12
20	0.58	5.8	0.0855	67.84
21	1	10	0.0771	129.70
22	0.68	6.8	0.0808	84.16
23	0.74	7.4	0.0841	87.99
24	0.82	8.2	0.0908	90.31
25	0.57	5.7	0.082	69.51
26	0.86	8.6	0.069	124.64
27	0.46	4.6	0.0699	65.81
28	0.62	6.2	0.0865	71.68
29	0.74	7.4	0.0935	79.14
30	0.59	5.9	0.0777	75.93

Tabla 39. Zinc en encéfalo, Casiopeína II.

Cobre en Hígado				
Casiopeína II				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso hígado (g)	µg de Cu/g de hígado
1	0.39	3.9	0.2706	14.41
2	0.29	2.9	0.2544	11.40
3	0.4	4	0.2782	14.38
4	0.41	4.1	0.2895	14.16
5	0.48	4.8	0.2773	17.31
6	0.4	4	0.2799	14.29
7	0.5	5	0.2609	19.16
8	0.56	5.6	0.2904	19.28
9	0.4	4	0.2377	16.83
10	0.6	6	0.308	19.48
11	0.74	7.4	0.4043	18.30
12	0	0	0.2813	0
13	0.73	7.3	0.2649	27.56
14	0.81	8.1	0.2809	28.84
15	0.79	7.9	0.2514	31.42
16	0.91	9.1	0.2667	34.12
17	0.86	8.6	0.279	30.82
18	0	0	0	0
19	0.8	8	0.2715	29.47
20	0.75	7.5	0.2371	31.63
21	0.57	5.7	0.2473	23.05
22	0.36	3.6	0.207	17.39
23	0.44	4.4	0.2338	18.82
24	0.43	4.3	0.2433	17.67
25	0.43	4.3	0.2485	17.30
26	0.64	6.4	0.3352	19.09
27	0.47	4.7	0.2582	18.20
28	0.42	4.2	0.2487	16.89
29	0.42	4.2	0.2888	14.54
30	0.32	3.2	0.2113	15.14

Tabla 40. Cobre en hígado, Casiopeína II.

Zinc en Hígado				
Casiopéina II				
Muestra Nº	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso hígado (g)	µg de Zn/g de hígado
1	2.81	28.1	0.2706	103.84
2	2.53	25.3	0.2544	99.45
3	2.71	27.1	0.2782	97.41
4	2.5	25	0.2895	86.36
5	2.5	25	0.2773	90.16
6	2.25	22.5	0.2799	80.39
7	2.5	25	0.2609	95.82
8	2.67	26.7	0.2904	91.94
9	2.18	21.8	0.2377	91.71
10	2.85	28.5	0.308	92.53
11	3.73	37.3	0.4043	92.26
12	0	0	0	0
13	2.28	22.8	0.2649	86.07
14	2.88	28.8	0.2809	102.53
15	2.81	28.1	0.2514	111.77
16	2.81	28.1	0.2667	105.36
17	3.17	31.7	0.279	113.62
18	0	0	0	0
19	3.56	35.6	0.2715	131.12
20	3.49	34.9	0.2371	147.20
21	3.17	31.7	0.2473	128.18
22	2.64	26.4	0.207	127.54
23	2.81	28.1	0.2338	120.19
24	3.2	32	0.2433	131.52
25	3.13	31.3	0.2485	125.96
26	4.05	40.5	0.3352	120.82
27	3.1	31	0.2582	120.06
28	2.53	25.3	0.2487	101.73
29	2.6	26	0.2888	90.03
30	2.42	24.2	0.2113	114.53

Tabla 41. Zinc en hígado, Casiopéina II.

Cobre en Pulmón				
Casiopéina II				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso pulmón (g)	µg de Cu/ g de pulmón
1	0.06	0.6	0.0272	22.06
2	0.01	0.1	0.0313	3.19
3	0.06	0.6	0.0443	13.54
4	0.05	0.5	0.0368	13.59
5	0.06	0.6	0.0467	12.85
6	0.05	0.5	0.0345	14.49
7	0.05	0.5	0.0438	11.42
8	0.05	0.5	0.0421	11.88
9	0.06	0.6	0.0487	12.32
10	0.06	0.6	0.062	9.68
11	0.08	0.8	0.0508	15.75
12	0.08	0.8	0.0421	19.00
13	0.06	0.6	0.0473	12.68
14	0.04	0.4	0.0258	15.50
15	0.05	0.5	0.0324	15.43
16	0.06	0.6	0.0365	16.44
17	0.06	0.6	0.0427	14.05
18	0.04	0.4	0.0275	14.55
19	0.06	0.6	0.0471	12.74
20	0.06	0.6	0.029	20.69
21	0.06	0.6	0.0289	20.76
22	0.05	0.5	0.028	17.86
23	0.05	0.5	0.0278	17.99
24	0.04	0.4	0.0299	13.38
25	0.04	0.4	0.0277	14.44
26	0.06	0.6	0.0363	16.53
27	0.06	0.6	0.0378	15.87
28	0.05	0.5	0.0272	18.38
29	0.05	0.5	0.0206	24.27
30	0.05	0.5	0.0272	18.38

Tabla 42. Cobre en pulmón, Casiopéina II.

Zinc en Pulmón				
Casiopeína II				
Muestra N°	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso pulmón (g)	µg de Zn/g de pulmón
1	0.27	2.7	0.0272	99.26
2	0.37	3.7	0.0313	118.21
3	0.38	3.8	0.0443	85.78
4	0.34	3.4	0.0368	92.39
5	0.43	4.3	0.0467	92.08
6	0.29	2.9	0.0345	84.06
7	0.37	3.7	0.0438	84.47
8	0.34	3.4	0.0421	80.76
9	0.55	5.5	0.0487	112.94
10	0.48	4.8	0.062	77.42
11	0.39	3.9	0.0508	76.77
12	0.28	2.8	0.0421	66.51
13	0.38	3.8	0.0473	80.34
14	0.18	1.8	0.0258	69.77
15	0.26	2.6	0.0324	80.25
16	0.33	3.3	0.0365	90.41
17	0.32	3.2	0.0427	74.94
18	0.23	2.3	0.0275	83.64
19	0.29	2.9	0.0471	61.57
20	0.29	2.9	0.029	100.00
21	0.22	2.2	0.0289	76.12
22	0.23	2.3	0.028	82.14
23	0.23	2.3	0.0278	82.73
24	0.3	3	0.0299	100.33
25	0.23	2.3	0.0277	83.03
26	0.26	2.6	0.0363	71.63
27	0.32	3.2	0.0378	84.66
28	0.21	2.1	0.0272	77.21
29	0.27	2.7	0.0206	131.07
30	0.29	2.9	0.0272	106.62

Tabla 43. Zinc en pulmón, Casiopeína II.

Cobre en Riñón				
Casiopeína II				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso de riñón (g)	µg de Cu / g de riñón
1	0.19	1.9	0.065	29.2308
2	0.22	2.2	0.0752	29.2553
3	0.19	1.9	0.0761	24.9671
4	0.2	2	0.0666	30.0300
5	0.19	1.9	0.0875	21.7143
6	0.2	2	0.0771	25.9403
7	0.19	1.9	0.075	25.3333
8	0.18	1.8	0.0736	24.4565
9	0.16	1.6	0.0613	26.1011
10	0.21	2.1	0.0768	27.3438
11	0.18	1.8	0.0789	22.8137
12	0.4	4	0.0797	50.1882
13	0.13	1.3	0.0696	18.6782
14	0.17	1.7	0.08	21.2500
15	0.12	1.2	0.0598	20.0669
16	0.16	1.6	0.0969	16.5119
17	0.17	1.7	0.0919	18.4984
18	0.1	1	0.0654	15.2905
19	0.15	1.5	0.0796	18.8442
20	0.14	1.4	0.0666	21.0210
21	0.14	1.4	0.0756	18.5185
22	0.11	1.1	0.0718	15.3203
23	0.15	1.5	0.0721	20.8044
24	0.16	1.6	0.0903	17.7187
25	0.11	1.1	0.0579	18.9983
26	0.15	1.5	0.0873	17.1821
27	0.13	1.3	0.0747	17.4029
28	0.14	1.4	0.0823	17.0109
29	0.16	1.6	0.1083	14.7738
30	0.15	1.5	0.0753	19.9203

Tabla 44. Cobre en riñón, Casiopeína II.

Zinc en Riñón				
Casiopeína II				
Muestra Nº	Conc. Zn (ppm)	µg Zn	peso de riñón (g)	µg Zn/g de riñón
1	0.44	4.4	0.065	67.6923
2	0.43	4.3	0.0752	57.1809
3	0.4	4	0.0761	52.5624
4	0.39	3.9	0.0666	58.5586
5	0.43	4.3	0.0875	49.1429
6	0.41	4.1	0.0771	53.1777
7	0.39	3.9	0.075	52.0000
8	0.41	4.1	0.0736	55.7065
9	0.37	3.7	0.0613	60.3589
10	0.47	4.7	0.0768	61.1979
11	0.56	5.6	0.0789	70.9759
12	0.55	5.5	0.0797	69.0088
13	0.39	3.9	0.0696	56.0345
14	0.52	5.2	0.08	65.0000
15	0.37	3.7	0.0598	61.8729
16	0.65	6.5	0.0969	67.0795
17	0.59	5.9	0.0919	64.2002
18	0.37	3.7	0.0654	56.5749
19	0.5	5	0.0796	62.8141
20	0.4	4	0.0666	60.0601
21	0.47	4.7	0.0756	62.1693
22	0.38	3.8	0.0718	52.9248
23	0.46	4.6	0.0721	63.8003
24	0.56	5.6	0.0903	62.0155
25	0.42	4.2	0.0579	72.5389
26	0.54	5.4	0.0873	61.8557
27	0.47	4.7	0.0747	62.9183
28	0.52	5.2	0.0823	63.1835
29	0.38	3.8	0.1083	35.0877
30	0.55	5.5	0.0753	73.0412

Tabla 45. Zinc en riñón, Casiopeína II.

Cobre en Bazo				
Casiopéina III				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso bazo (g)	µg de Cu/g de bazo
1	0.06	0.3	0.0191	15.7068
2	0.06	0.3	0.0218	13.7615
3	0.08	0.4	0.022	18.1818
4	0.07	0.35	0.0245	14.2857
5	0.05	0.25	0.0175	14.2857
6	0.07	0.35	0.0202	17.3267
7	0.05	0.25	0.0183	13.6612
8	0.06	0.3	0.0178	16.8539
9	0.06	0.3	0.0226	13.2743
10	0.08	0.4	0.0192	20.8333
11	0.05	0.25	0.0183	13.6612
12	0.05	0.25	0.0186	13.4409
13	0.06	0.3	0.0265	11.3208
14	0.04	0.2	0.0221	9.0498
15	0.04	0.2	0.0187	10.6952
16	0.07	0.35	0.0242	14.4628
17	0.06	0.3	0.0205	14.6341
18	0.06	0.3	0.024	12.5000
19	0.15	0.75	0.0203	36.9458
20	0.04	0.2	0.0221	9.0498
21	0.04	0.2	0.0199	10.0503
22	0.2	1	0.0245	40.8163
23	0.05	0.25	0.0284	8.8028
24	0.06	0.3	0.029	10.3448
25	0.06	0.3	0.0217	13.8249
26	0.05	0.25	0.0229	10.9170
27	0.03	0.15	0.0215	6.9767
28	0.01	0.05	0.0149	3.3557
29	0.05	0.25	0.0335	7.4627
30	0	0	0	0

Tabla 46. Cobre en bazo, Casiopéina III.

Zinc en Bazo				
Casiopeína III				
Muestra Nº	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso bazo (g)	µg de Zn/g de bazo
1	0.26	1.3	0.0191	68.0628
2	0.31	1.55	0.0218	71.1009
3	0.34	1.7	0.022	77.2727
4	0.38	1.9	0.0245	77.5510
5	0.23	1.15	0.0175	65.7143
6	0.32	1.6	0.0202	79.2079
7	0.31	1.55	0.0183	84.6995
8	0.26	1.3	0.0178	73.0337
9	0.28	1.4	0.0226	61.9469
10	0.28	1.4	0.0192	72.9167
11	0.22	1.1	0.0183	60.1093
12	0.22	1.1	0.0186	59.1398
13	0.39	1.95	0.0265	73.5849
14	0.28	1.4	0.0221	63.3484
15	0.23	1.15	0.0187	61.4973
16	0.32	1.6	0.0242	66.1157
17	0.26	1.3	0.0205	63.4146
18	0.45	2.25	0.024	93.7500
19	0.31	1.55	0.0203	76.3547
20	0.33	1.65	0.0221	74.6606
21	0.26	1.3	0.0199	65.3266
22	0.45	2.25	0.0245	91.8367
23	0.41	2.05	0.0284	72.1831
24	0.44	2.2	0.029	75.8621
25	0.3	1.5	0.0217	69.1244
26	0.32	1.6	0.0229	69.8690
27	0.31	1.55	0.0215	72.0930
28	0.17	0.85	0.0149	57.0470
29	0.48	2.4	0.0335	71.6418
30	0	0	0	0

Tabla 47. Zinc en bazo, Casiopeína III.

Cobre en Corazón				
Casiopéina III				
Muestra	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso corazón (g)	µg de Cu/g de corazón
1	0.2	2	0.0293	68.2594
2	0.12	1.2	0.0383	31.3316
3	0.16	1.6	0.0338	47.3373
4	0.09	0.9	0.0322	27.9503
5	0.75	7.5	0.0413	181.5981
6	0.09	0.9	0.0392	22.9592
7	0.07	0.7	0.0306	22.8758
8	0.08	0.8	0.0305	26.2295
9	0	0	0	0.0000
10	0.08	0.8	0.0332	24.0964
11	0.09	0.9	0.0279	32.2581
12	0.82	8.2	0.0321	255.4517
13	0.09	0.9	0.0347	25.9366
14	0.14	1.4	0.0275	50.9091
15	0.08	0.8	0.0269	29.7398
16	0.08	0.8	0.0256	31.2500
17	0.23	2.3	0.0289	79.5848
18	0.11	1.1	0.0367	29.9728
19	0.1	1	0.0346	28.9017
20	0.09	0.9	0.0351	25.6410
21	0.13	1.3	0.0416	31.2500
22	0.08	0.8	0.0305	26.2295
23	0.07	0.7	0.0259	27.0270
24	0.09	0.9	0.0335	26.8657
25	0.1	1	0.0365	27.3973
26	0.1	1	0.026	38.4615
27	0.13	1.3	0.0349	37.2493
28	0.08	0.8	0.0268	29.8507
29	0.06	0.6	0.0238	25.2101
30	0.07	0.7	0.028	25.0000

Tabla 48. Cobre en corazón, Casiopéina III.

Zinc en Corazón Casiopeína III				
Muestra Nº	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso corazón (g)	µg de Zn/g de corazón
1	0.27	2.7	0.0293	92.1502
2	0.34	3.4	0.0383	88.7728
3	0.31	3.1	0.0338	91.7160
4	0.42	4.2	0.0322	130.4348
5	0.33	3.3	0.0413	79.9031
6	0.41	4.1	0.0392	104.5918
7	0.24	2.4	0.0306	78.4314
8	0.33	3.3	0.0305	108.1967
9	0	0	0	0.0000
10	0.33	3.3	0.0332	99.3976
11	0.26	2.6	0.0279	93.1900
12	0.35	3.5	0.0321	109.0343
13	0.43	4.3	0.0347	123.9193
14	0.48	4.8	0.0275	174.5455
15	0.29	2.9	0.0269	107.8067
16	0.29	2.9	0.0256	113.2813
17	0.95	9.5	0.0289	328.7197
18	0.47	4.7	0.0367	128.0654
19	0.49	4.9	0.0346	141.6185
20	0.44	4.4	0.0351	125.3561
21	0.38	3.8	0.0416	91.3462
22	0.37	3.7	0.0305	121.3115
23	0.24	2.4	0.0259	92.6641
24	0.33	3.3	0.0335	98.5075
25	0.32	3.2	0.0365	87.6712
26	0.28	2.8	0.026	107.6923
27	0.72	7.2	0.0349	206.3037
28	0.23	2.3	0.0268	85.8209
29	0.25	2.5	0.0238	105.0420
30	0.39	3.9	0.028	139.2857

Tabla 49. Zinc en corazón, Casiopeína III.

Cobre en Encéfalo				
Casiopeína III				
Muestra Nº	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso encéfalo (g)	µg de Cu/g de encéfalo
1	0.24	2.4	0.0667	35.9820
2	0.32	3.2	0.0775	41.2903
3	0.21	2.1	0.0481	43.6590
4	0.27	2.7	0.0746	36.1930
5	0.21	2.1	0.06	35.0000
6	0.21	2.1	0.0783	26.8199
7	0.32	3.2	0.088	36.3636
8	0.2	2	0.0644	31.0559
9	0.31	3.1	0.0613	50.5710
10	0.31	3.1	0.0911	34.0285
11	0.16	1.6	0.0549	29.1439
12	0.18	1.8	0.0675	26.6667
13	0.2	2	0.0642	31.1526
14	0.17	1.7	0.0688	24.7093
15	0.19	1.9	0.0836	22.7273
16	0.29	2.9	0.0851	34.0776
17	0.17	1.7	0.0698	24.3553
18	0.25	2.5	0.0891	28.0584
19	0.2	2	0.0663	30.1659
20	0.28	2.8	0.0856	32.7103
21	0.24	2.4	0.065	36.9231
22	0.21	2.1	0.0847	24.7934
23	0.25	2.5	0.0844	29.6209
24	0.26	2.6	0.0877	29.6465
25	0.29	2.9	0.0844	34.3602
26	0.19	1.9	0.0563	33.7478
27	0.22	2.2	0.0827	26.6022
28	0.13	1.3	0.0636	20.4403
29	0.36	3.6	0.0735	48.9796
30	0.17	1.7	0.072	23.6111

Tabla 50. Cobre en encéfalo, Casiopeína III.

Zinc en Encéfalo				
Casiopéina III				
Muestra N°	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso encéfalo (g)	µg de Zn/g de encéfalo
1	0.4	4	0.0667	59.9700
2	0.46	4.6	0.0775	59.3548
3	0.33	3.3	0.0481	68.6071
4	0.45	4.5	0.0746	60.3217
5	0.46	4.6	0.06	76.6667
6	0.4	4	0.0783	51.0856
7	0.46	4.6	0.088	52.2727
8	0.35	3.5	0.0644	54.3478
9	0.39	3.9	0.0613	63.6215
10	0.54	5.4	0.0911	59.2755
11	0.29	2.9	0.0549	52.8233
12	0.36	3.6	0.0675	53.3333
13	0.38	3.8	0.0642	59.1900
14	0.38	3.8	0.0688	55.2326
15	0.42	4.2	0.0836	50.2392
16	0.45	4.5	0.0851	52.8790
17	0.33	3.3	0.0698	47.2779
18	0.44	4.4	0.0891	49.3827
19	0.33	3.3	0.0663	49.7738
20	0.4	4	0.0856	46.7290
21	0.41	4.1	0.065	63.0769
22	0.45	4.5	0.0847	53.1287
23	0.49	4.9	0.0844	58.0569
24	0.48	4.8	0.0877	54.7320
25	0.43	4.3	0.0844	50.9479
26	0.29	2.9	0.0563	51.5098
27	0.36	3.6	0.0827	43.5308
28	0.31	3.1	0.0636	48.7421
29	0.41	4.1	0.0735	55.7823
30	0.36	3.6	0.072	50.0000

Tabla 51. Zinc en encéfalo, Casiopéina III.

Cobre en Hígado				
Casiopéina III				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso hígado (g)	µg de Cu/g de hígado
1	0.44	4.4	0.4194	10.4912
2	0.62	6.2	0.5166	12.0015
3	0.54	5.4	0.4401	12.2699
4	0.88	8.8	0.4331	20.3186
5	0.78	7.8	0.4285	18.2030
6	0.82	8.2	0.3975	20.6289
7	0.73	7.3	0.3898	18.7276
8	1.46	14.6	0.3968	36.7944
9	1.09	10.9	0.3618	30.1271
10	2.39	23.9	0.3379	70.7310
11	1.51	15.1	0.3561	42.4038
12	1.58	15.8	0.3892	40.5961
13	1.36	13.6	0.4524	30.0619
14	1.04	10.4	0.357	29.1317
15	0.7	7	0.4037	17.3396
16	0.96	9.6	0.3609	26.6002
17	1.07	10.7	0.4052	26.4067
18	1.08	10.8	0.4282	25.2219
19	0.93	9.3	0.4396	21.1556
20	1.36	13.6	0.3378	40.2605
21	1.44	14.4	0.4884	29.4840
22	1.11	11.1	0.3833	28.9590
23	0.92	9.2	0.3741	24.5924
24	1.1	11	0.4378	25.1256
25	0.81	8.1	0.449	18.0401
26	0.4	4	0.3131	12.7755
27	0.73	7.3	0.5318	13.7270
28	0.37	3.7	0.4222	8.7636
29	0.34	3.4	0.4145	8.2027
30	0.35	3.5	0.3595	9.7357

Tabla 52. Cobre en hígado, Casiopéina III.

Zinc en Hígado				
Casiopéina III				
Muestra N°	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso hígado (g)	µg de Zn/g de hígado
1	3.4	34	0.4194	81.0682
2	4.01	40.1	0.5166	77.6229
3	3.93	39.3	0.4401	89.2979
4	4.26	42.6	0.4331	98.3607
5	4.24	42.4	0.4285	98.9498
6	3.71	37.1	0.3975	93.3333
7	3.8	38	0.3898	97.4859
8	3.34	33.4	0.3968	84.1734
9	3.32	33.2	0.3618	91.7634
10	3.08	30.8	0.3379	91.1512
11	2.99	29.9	0.3561	83.9652
12	3.18	31.8	0.3892	81.7061
13	4.01	40.1	0.4524	88.6384
14	2.73	27.3	0.357	76.4706
15	3.47	34.7	0.4037	85.9549
16	3.08	30.8	0.3609	85.3422
17	3.85	38.5	0.4052	95.0148
18	3.93	39.3	0.4282	91.7795
19	3.4	34	0.4396	77.3430
20	3.02	30.2	0.3378	89.4020
21	4.58	45.8	0.4884	93.7756
22	3.34	33.4	0.3833	87.1380
23	3.93	39.3	0.3741	105.0521
24	4.67	46.7	0.4378	106.6697
25	5.78	57.8	0.449	128.7305
26	3.4	34	0.3131	108.5915
27	4.56	45.6	0.5318	85.7465
28	3.08	30.8	0.4222	72.9512
29	3.08	30.8	0.4145	74.3064
30	2.78	27.8	0.3595	77.3296

Tabla 53. Zinc en hígado, Casiopéina III.

Cobre en Pulmón				
Casiopéina III				
Muestra N°	Conc. Cu (ppm)	µg de Cu	peso pulmón (g)	µg de Cu/ g de pulmón
1	0.08	0.8	0.0429	18.6480
2	0.05	0.5	0.0408	12.2549
3	0.07	0.7	0.0499	14.0281
4	0.05	0.5	0.0436	11.4679
5	0.05	0.5	0.0377	13.2626
6	0.05	0.5	0.0362	13.8122
7	0.06	0.6	0.0487	12.3203
8	0.06	0.6	0.04	15.0000
9	0.05	0.5	0.0375	13.3333
10	0.04	0.4	0.0343	11.6618
11	0.08	0.8	0.0433	18.4758
12	0.06	0.6	0.0337	17.8042
13	0.06	0.6	0.0385	15.5844
14	0.06	0.6	0.0445	13.4831
15	0.06	0.6	0.0523	11.4723
16	0.06	0.6	0.0556	10.7914
17	0.06	0.6	0.0501	11.9760
18	0.06	0.6	0.0547	10.9689
19	0.07	0.7	0.0466	15.0215
20	0.05	0.5	0.0298	16.7785
21	0.09	0.9	0.0451	19.9557
22	0.06	0.6	0.0399	15.0376
23	0.06	0.6	0.0556	10.7914
24	0.06	0.6	0.0394	15.2284
25	0.06	0.6	0.0482	12.4481
26	0.05	0.5	0.0286	17.4825
27	0.06	0.6	0.0633	9.4787
28	0.04	0.4	0.0351	11.3960
29	0.05	0.5	0.0421	11.8765
30	0.04	0.4	0.0308	12.9870

Tabla 54. Cobre en pulmón, Casiopéina III.

Zinc en Pulmón				
Casiopeína III				
Muestra Nº	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	peso pulmón (g)	µg de Zn/g de pulmón
1	0.3	3	0.0429	69.9301
2	0.28	2.8	0.0408	68.6275
3	0.4	4	0.0499	80.1603
4	0.34	3.4	0.0436	77.9817
5	0.26	2.6	0.0377	68.9655
6	0.24	2.4	0.0362	66.2983
7	0.3	3	0.0487	61.6016
8	0.29	2.9	0.04	72.5000
9	0.21	2.1	0.0375	56.0000
10	0.22	2.2	0.0343	64.1399
11	0.33	3.3	0.0433	76.2125
12	0.29	2.9	0.0337	86.0534
13	0.32	3.2	0.0385	83.1169
14	0.41	4.1	0.0445	92.1348
15	0.37	3.7	0.0523	70.7457
16	0.35	3.5	0.0556	62.9496
17	0.35	3.5	0.0501	69.8603
18	0.36	3.6	0.0547	65.8135
19	0.39	3.9	0.0466	83.6910
20	0.28	2.8	0.0298	93.9597
21	0.34	3.4	0.0451	75.3880
22	0.32	3.2	0.0399	80.2005
23	0.39	3.9	0.0556	70.1439
24	0.3	3	0.0394	76.1421
25	0.36	3.6	0.0482	74.6888
26	0.21	2.1	0.0286	73.4266
27	0.4	4	0.0633	63.1912
28	0.27	2.7	0.0351	76.9231
29	0.28	2.8	0.0421	66.5083
30	0.26	2.6	0.0308	84.4156

Tabla 55. Zinc en pulmón, Casiopeína III.

Cobre en Riñón				
Casiopeína III				
Muestra N°	Conc.Cu (ppm)	µg de Cu	Peso riñón (g)	µg de Cu/ g de riñón
1	0.14	1.4	0.097	14.4330
2	0.21	2.1	0.1359	15.4525
3	0.2	2	0.1285	15.5642
4	0.22	2.2	0.1283	17.1473
5	0.26	2.6	0.1551	16.7634
6	0.22	2.2	0.1302	16.8971
7	0.18	1.8	0.1194	15.0754
8	0.25	2.5	0.1185	21.0970
9	0.22	2.2	0.1247	17.6423
10	0.5	5	0.1132	44.1696
11	0.21	2.1	0.1183	17.7515
12	0.22	2.2	0.1149	19.1471
13	0.24	2.4	0.1274	18.8383
14	0.22	2.2	0.1301	16.9101
15	0.21	2.1	0.1166	18.0103
16	0.2	2	0.1185	16.8776
17	0.22	2.2	0.1343	16.3812
18	0.23	2.3	0.1317	17.4639
19	0.22	2.2	0.1258	17.4881
20	0.21	2.1	0.1146	18.3246
21	0.24	2.4	0.1316	18.2371
22	0.24	2.4	0.1229	19.5281
23	0.21	2.1	0.1374	15.2838
24	0.21	2.1	0.1369	15.3397
25	0.24	2.4	0.1113	21.5633
26	0.18	1.8	0.1431	12.5786
27	0.23	2.3	0.1371	16.7761
28	0.17	1.7	0.1106	15.3707
29	0.18	1.8	0.1167	15.4242
30	0.18	1.8	0.1097	16.4084

Tabla 56. Cobre en riñón, Casiopeína III.

Zinc en Riñón				
Casiopeína III				
Muestra N°	Conc. Zn (ppm)	µg de Zn	Peso riñón (g)	µg de Zn/ g de riñón
1	0.43	4.3	0.097	44.3299
2	0.58	5.8	0.1359	42.6784
3	0.61	6.1	0.1285	47.4708
4	0.58	5.8	0.1283	45.2065
5	0.6	6	0.1551	38.6847
6	0.6	6	0.1302	46.0829
7	0.53	5.3	0.1194	44.3886
8	0.61	6.1	0.1185	51.4768
9	0.56	5.6	0.1247	44.9078
10	0.5	5	0.1132	44.1696
11	0.53	5.3	0.1183	44.8014
12	0.56	5.6	0.1149	48.7380
13	0.67	6.7	0.1274	52.5903
14	0.59	5.9	0.1301	45.3497
15	0.53	5.3	0.1166	45.4545
16	0.51	5.1	0.1185	43.0380
17	0.59	5.9	0.1343	43.9315
18	0.64	6.4	0.1317	48.5953
19	0.65	6.5	0.1258	51.6693
20	0.58	5.8	0.1146	50.6108
21	0.66	6.6	0.1316	50.1520
22	0.56	5.6	0.1229	45.5655
23	0.56	5.6	0.1374	40.7569
24	0.57	5.7	0.1369	41.6362
25	0.66	6.6	0.1113	59.2992
26	0.48	4.8	0.1431	33.5430
27	0.65	6.5	0.1371	47.4106
28	0.46	4.6	0.1106	41.5913
29	0.48	4.8	0.1167	41.1311
30	0.49	4.9	0.1097	44.6673

Tabla 57. Zinc en riñón, Casiopeína III.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Lessner Howard E., Oncología Médica, Editorial El Manual Moderno, S.A., México, D.F., 1980.
2. Goodman Gilman A., Rall T. W., Nies A.S., Taylor P., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Editorial Médica Panamericana, octava edición, México, D.F., 1991, p.p. 21-22, 27-29, 1165-1168.
3. Rosenberg B., Van Camp L., Truska J.G. & Mansour V.H., Platinum Compounds: a new class of potent antitumor agents, *Nature* (1969) 22, 26, 385-386 .
4. Prestayko A., Crooke S., Carter S., CISPLATIN. Current Status and New Developments, Academic Press, Inc., New York, 1980, p. 1-2,5,10, 13, 21-23.
5. Zahid H. Siddik, Mervin Jines, Frances E. Boxal & Kenneth R. Harrap, "Comparative Distribution and Excretion of Carboplatin & Cisplatin in Mice", *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, (1988), 21:19-24.
6. Freid F., Some Milestones in the Development in Cancer Chemotherapy: En: Pratt W. *et al.*, *The Anticancer Drug*, Oxford University Press, New York, 1979, p.p. 12-19.

7. Ruiz Azuara L., Moreno Esparza R., Gasque L., Martínez A., Ferrer G., Redón R., Solans X., "Estudio Estructural de las Casiopeínas", Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas (memorias), México, D.F., 1996, p.p. 2-3.
8. Ruiz-Ramírez L., Gracia I., de la Rosa M.E., Sumano H., Gómez C., Arenas F, Gómez E., Pimentel E., Cruces M., "Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and Preliminar toxicity of copper (II) New Drugs: Casiopeinas I, II and III.", *J. Inorganic Biochem.*, (1993), 51:1-2, 406 .
9. Ruiz Azuara, L. Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico.
SECOFI. Registros Num. 18801-120579 y 18802-120580.
US Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997).
10. Ruiz-Ramírez L., Gasque L., Martínez A., Moreno-Esparza R., and Solans X., "Copper (II) Hydrate mixed chelate complexes", Part II, *Acta Cryst.* (1993), C49, 890-893.
11. Jassie, Digestión de muestras por tecnología de microondas, CEM. Corporation, II, UNAM 1995.
12. Skoog Douglas A., West Donald M., Química Analítica, cuarta edición, McGraw-Hill/Interamericana de México S.A. de C.V., Edo. de México, 1989, p.p. 494-500.

13. Operation Manual. Microwave Sample Preparation System MDS-2000, CEM Corporation, USA, 1994, p.p. 2-3, 8, 12, 66, 141, 144, 147-148.
14. Weinberg Robert A., "How Cancer Arises", *Scientific American*, (1996), 275:3, 32-34, 38.
15. Ruoslahti Erkki, "How Cancer Spreads", *Scientific American*, (1996), 275:3, 42-45.
16. Borek Carmia, "Antioxidants and Cancer", *Science & Medicine*, (1997), 4:6, 52-53. Schnitzer R.J., Hawking F., Experimental Chemotherapy: Chemotherapy of Neoplastic Diseases Part II, Academic Press Inc., NY, 1967, p.p. 46,53.
17. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, Edited for UFAW by Trevor B. Poole, 6ª edición, *Longman Scientific and Technical*, Great Britain, 1987.
18. Page R.L., Thorall D.E., Clinical Indications and Applications of Radiotherapy and Hyperthermia, *Vet. Clin. of North Am. Small An. Prac.*; (1990), 20:1025-1091.
19. Helfand S.C., Principles and Applications of Chemotherapy, *Vet. Clin. of North Am. Small An. Prac.*; (1990), 20:987-1013.
20. Powis G., Hacker M.P., The Toxicity of Anticancer Drugs, Pergamon Press, USA, 1991.

21. Beaty, Richard D., Conceptos, Instrumentación y Técnicas de Espectrofotometría por Absorción Atómica, Perkin-Elmer, USA, 1979, p.p. 1-47.
22. Fraústo da Silva J. J. R., Williams R. J. P., The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life, Clarendon Press, Oxford, 1991, p.p. 3-4, 26-29, 33-36, 40-42, 73-75, 86-88, 143-145, 300-314, 388-398, 515-516, 524.
23. Georgievskii V. I., Annenkov B. N., Samokhin V.T., Mineral Nutrition of Animals, Butterworths, p.p. 178-179, 182, 192-193.
24. Ruiz-Ramírez L., de la Rosa M.E., Gracia-Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Breña M., Gutiérrez P., E. Pimentel E. and Cruces M. and Natarajan A.T., Casiopeínas, Metal Based-Drugs a New Class of Antineoplastic and Genotoxic Compounds, J. of Inorganic Biochemistry, 59 (2-3) (1995) 206.
25. Ruiz-Ramírez L., Gracia-Mora I., de la Rosa M.E., Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gómez E. Pimentel E. and Cruces M., "Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II and III", J. of Inorganic Biochemistry, 51 (1-2) (1993) 406.
26. Cotton F. Albert, Wilkinson Geoffrey, Advanced Inorganic Chemistry, 5a edición, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1930, p.p. 1335.
27. Rafael-Moreno Esparza, Elies Molins, José Luis Briansó, Lena Ruiz-Ramírez and Rocío Redón. "Aqua (1, 10-phenanthroline)(L-

serinato)copper (II) Nitrate". *Acta Crystallographica* (1995) C51, 1505-1508.

28. Marca Registrada. Título de Marca: Casiopeína. Reg 407543 SECOFI (1992).

Laus Deo