



01621 2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀)
DE LA CASIOPEINA III EN RATA Y RATON
POR VIA INTRAVENOSA E INTRAPERITONEAL

TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR:
MARISOL RIVERA HUERTA



ASESORES: MVZ, PhD HECTOR SUMANO LOPEZ
BIOL., M. en C. MA. ISABEL GRACIA MORA
MVZ LUCIA MACIAS ROSALES

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27+628



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A Dios:

Que me permite existir y cumplir mis objetivos.

A José y Gloria (mis padres):

Por todo el apoyo y el amor que me han brindado desde que nací, por impulsarme a seguir adelante y porque saben que este logro no sólo me pertenece a mí.

A Noe y Rocío:

Porque sin saberlo, me han enseñado muchas cosas (después de todo, tiene sus ventajas ser la hermana menor); gracias por apoyarme, los quiero mucho.

A mi sobrina Monse:

Porque si no existiera, no tendría con quien pelear y recordar que un día yo también fui niña.

A la memoria de mi amiga Carmen:

Que siempre se preocupó por mí y que me brindó su amistad, con todo lo que esa palabra implica; por lo mismo sé, que si estuviera aquí, sería tan feliz como yo.

AGRADECIMIENTOS.

A mi hermano Noe:

Te doy las gracias por la ayuda y el apoyo que me has brindado, porque sin ti, llegar hasta aquí hubiera sido más difícil. GRACIAS.

A la familia Chávez Godinez:

Por considerarme un miembro de su familia y la confianza que han depositado en mi, en especial a mi amiga Emelia, por todos esos años en los que he contado con tu apoyo y tus consejos.

A Isabel:

Que creíste en mi desde un principio, brindándome tu apoyo, ayuda y conocimientos para realización de éste trabajo.

A la Dra. Lena Ruiz:

Por su ayuda y por la confianza que deposito en mi.

A todo el equipo de la Unidad de Experimentación Animal por la amistad que me han proporcionado.

A Lucia y Fabiola:

No sólo por su amistad, también por el apoyo y la ayuda que me han brindado, les agradezco el tiempo que invirtieron para que la fase experimental se llevara a cabo.

A Norma Angélica:

Por que se que puedo contar contigo, gracias por tu amistad.

A mis amigos del departamento de Fisiología:

Carlos, Lilia, Ivonne y Raúl no sólo por su amistad, también por compartir conmigo sus conocimientos.

Al Dr. Miguel Angel:

Por todos sus comentarios y sugerencias para la realización de éste trabajo, ya que fueron de gran ayuda.

A mi jurado:

Dr. Miguel Angel Castillo M.

Dr. Carlos Villagrán V.

Dr. Luis Ocampo C.

Dr. Héctor Sumano L.

Dra. Enedina Silva C.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por que ser parte de ella, constituye un gran orgullo para mi.

Agradezco la ayuda económica otorgada para la realización de éste trabajo a través de:

DGAPA proyecto IN201996
CONACYT proyecto Ref. 25510N

A todos los animales:

Puesto que son de gran importancia en la investigación, para adquirir y obtener nuevos conocimientos en beneficio de los seres humanos.

Por último:

Agradezco a todas las personas que han estado conmigo en las buenas y en las malas, que se preocupan por mi, me apoyan y brindan su afecto. Porque forman parte esencial en mi vida a todos ustedes.....mis amigos.

ÍNDICE

Resumen

Capítulo 1. INTRODUCCION

- ¿Qué es el cáncer? 1
- Cernimiento de nuevos fármacos antineoplásicos 9
- Adquisición y Cernimiento 11
- Producción y Formulación 12
- Toxicología 12
- Casiopeína III E 25

Capítulo 1. HIPOTESIS 28

Capítulo 1. OBJETIVOS 29

Capítulo 2. MATERIAL Y METODOS

- Fármaco 30
- Animales 30
- Preparación de la Casiopeína III E para su administración en las ratas de la cepa Wistar por sexo 31
- Preparación de la Casiopeína III E para su administración en ratones de la cepa NIH por sexo 31
- Administración de la Casiopeína III E 32
- Determinación de la DL₅₀ (DL₅₀) 33

Capítulo 3. RESULTADOS

- Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratas hembras de la cepa Wistar por vía intraperitoneal 34
- Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratas hembras de la cepa Wistar por vía intravenosa 37
- Dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones hembras de la cepa NIH por vía intraperitoneal 40
- Dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones hembras de la cepa NIH por vía intravenosa 43
- Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratas machos de la cepa Wistar por vía intraperitoneal 46
- Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratas machos de la cepa Wistar por vía intravenosa 49
- Dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones machos de la cepa NIH por vía intraperitoneal 52
- Dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones machos de la cepa NIH por vía intravenosa 55

Capítulo 4. DISCUSIÓN 58

Capítulo 4. CONCLUSIONES 61

Capítulo 5. REFERENCIAS 63

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Tumores que responden a la quimioterapia	8
Cuadro 2. Factores que influyen en los ensayos de DL ₅₀	19
Cuadro 3. Signología para evaluar toxicidad aguda	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del desarrollo de un nuevo fármaco	10
Figura 2. Programa de cernimiento de actividad para un fármaco antineoplásico	11
Figura 3. Estructura de la casiopeína III E	26

ABREVIATURAS

Cu	cobre
NCI	National Cancer Institute
DL ₅₀	dosis letal 50
mg	miligramos
kg	kilogramos
pH	potencial de iones hidrógeno
DNA	ácido desoxirribonucleico
SNC	sistema nervioso central
DL ₁₀	dosis letal 10
p.e.	por ejemplo
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
N	nitrógeno
O	oxígeno
µm	micrómetros
HEPA	High Efficiency Protection Air
°C	grados centígrados
cm	centímetros
ml	mililitros
mm	milímetros

RESUMEN

MARISOL RIVERA HUERTA. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) DE LA CASIOPEINA III E EN RATA Y RATON POR VIA INTRAVENOSA E INTRAPERITONEAL. (Bajo la dirección del MVZ, PhD, Héctor Sumano López, Biól., M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora y M.V.Z. Lucía Macías Rosales).

El cáncer es una enfermedad mortal y para su tratamiento se cuenta con varias modalidades siendo una de ellas el empleo de fármacos antineoplásicos. Al respecto, la Dra. Lena Ruiz A., en la Facultad de Química de la UNAM, diseñó compuestos de coordinación análogos al cisplatino, con cobre (Cu) como centro metálico; dichos compuestos se conocen con el nombre de Casiopeínas y presentan actividad citostática y antineoplásica.

Antes de que un fármaco pueda ser empleado en la clínica, es necesario seguir el protocolo de cernimiento de nuevos fármacos antineoplásicos que fué diseñado por el National Cancer Institute (NCI) y en el cual se indican estudios de toxicología. En esta tesis se determinará la DL₅₀ de la Casiopeína III E en ratas y ratones por vía intravenosa e intraperitoneal, estableciendo si existen diferencias entre cepas y sexos.

Para la determinación de la DL₅₀ se utilizaron 50 ratas hembras y 55 ratas machos de la cepa Wistar, de 10 semanas de edad y 50 ratones hembras y 50 ratones machos de la cepa NIH, de 8 semanas de edad, divididos en 5 grupos, con 5 animales cada uno. Las dosis empleadas para la vía intraperitoneal en las ratas hembras fueron 2, 3, 4, 5 y 6 mg/Kg; en los machos 4, 6, 8, 10 y 12 mg/Kg. Para la vía intravenosa en las hembras 6, 8, 10, 12 y 14 mg/Kg; en los machos 3, 4, 5, 6 y 7 mg/Kg. Para los ratones NIH, por vía intraperitoneal, en las hembras 8, 10, 12, 13 y 14 mg/Kg; en los machos 4, 6, 8, 10 y 12 mg/Kg. Para la vía intravenosa en las hembras 4, 6, 8, 10 y 12 mg/Kg; en los machos 6, 8, 10, 12 y 14 mg/Kg. Los resultados se procesaron en el programa de Log Probit Analysis.

La DL₅₀ de la Casiopeína III E fue diferente entre las cepas siendo más sensibles las ratas Wistar, tanto en dosis (mg/Kg) como en los signos de toxicidad con respecto a los ratones NIH. Las diferencias de toxicidad aguda para las ratas Wistar fueron principalmente por vía intraperitoneal, en donde la DL₅₀ de las hembras, fue de 4.63 mg/Kg y en los machos 5.26 mg/Kg, la diferencia es de 0.63 mg/Kg, lo que indica que las hembras resultaron ser ligeramente más sensibles que los machos, no así por vía intravenosa. En los ratones NIH se observó que por vía intraperitoneal la DL₅₀ en las hembras fue de 12.47 mg/Kg y en los machos de 6.67 mg/Kg, la diferencia por 5.8 mg/Kg señala la sensibilidad de los machos para la Casiopeína III E no ocurriendo lo mismo por vía intravenosa con una DL₅₀ para las hembras de 7.12 mg/Kg y en los machos de 10.15 mg/Kg, en este caso la diferencia de 3.03 mg/Kg señala la sensibilidad de las hembras; estas diferencias probablemente tengan que ver con la actividad microsomal enzimática que hay para cada sexo de cada especie.

¿QUÉ ES EL CÁNCER?

El cáncer constituye hoy en día un problema de salud pública no sólo en México, sino en todo el mundo. En nuestro país, ocupó en 1995 el segundo lugar como causa de mortalidad, es una enfermedad que no sólo afecta al humano sino también a los animales (1). Dentro de la Medicina Veterinaria se tiene menos ubicada la incidencia de las enfermedades neoplásicas, sin embargo, son comunes los casos de tumores malignos que se reportan en pequeñas especies, se ha manifestado con más relevancia en los últimos 10 a 15 años, y aunque no se conoce cuál es la incidencia exacta, se menciona que 1 de cada 10 perros y gatos pueden presentarlos (5).

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por una proliferación celular anormal, incoordinada y excesiva. Dependiendo de las propiedades específicas del cáncer, éste se puede clasificar de la siguiente manera:

A. Neoplasia benigna, que por definición es aquella que no es invasiva, frecuentemente es encapsulada, no causa metástasis y su crecimiento es moderado.

B. Neoplasia maligna; aquí hay invasión de estructuras aledañas, incluyendo vasos sanguíneos, ganglios linfáticos y nervios; no son encapsuladas y tienen un crecimiento acelerado (3, 24).

Los neoplasias malignas exigen cada vez más estructuras hospitalarias complejas, así como tecnología de diagnóstico más avanzada y tratamientos cuyos costos son bastante elevados; debido a esto los investigadores continúan en la búsqueda de tratamientos más eficaces para poder curar o aminorar los efectos que se presentan de este padecimiento (3,7).

El cáncer ha sido reconocido desde la antigüedad; sus primeros indicios se remontan a 4500 a. C. en Irán y Egipto. En México, los aztecas (siglo XII y XVI) estaban familiarizados con el cáncer y lo llamaban "coalocatl": Recomendaban para su tratamiento la cirugía y después aplicaban cataplasmas. La trepanación fue el procedimiento quirúrgico más utilizado por los aztecas, toltecas y mayas. En 1898 María Sklodowska Curie descubre el radio, y apenas un año después se informa sobre el primer paciente curado con radio. Actualmente existen tres modalidades clásicas para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas: la cirugía, la radiación y la quimioterapia; sin embargo, hay otras alternativas como la crioterapia, la inmunoterapia y la hipertermia que no son tan comunes (2, 32).

La crioterapia se refiere al uso controlado de temperaturas lo suficientemente bajas para producir un daño tisular severo; éstos procedimientos se pueden emplear en aquellas situaciones en las cuales

los procedimientos convencionales son peligrosos y la congelación puede ser el método más efectivo para destruir tejido neoplásico (3).

La inmunoterapia consiste en estimular al sistema inmune o alguno de sus elementos para controlar o destruir a las células cancerígenas; esta estimulación puede lograrse con diferentes agentes inmunoterapéuticos de origen biológico o sintético (22, 34).

La hipertermia se basa en aumentar la temperatura de todo el cuerpo o solamente de ciertas regiones que presentan crecimiento tumoral. Existe evidencia de que la parte interna de un tumor presenta un pH bajo, poca disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, por lo tanto su inactivación es más rápida cuando existe un aumento de temperatura corporal o local. Por otra parte se ha visto que el calor acentúa los efectos de radiación y de muchos agentes quimioterapéuticos por medio de diferentes mecanismos (5, 34).

La cirugía se emplea en la prevención, diagnóstico, tratamiento local, eliminación de la masa tumoral, preservación de la función de los órganos y rehabilitación. El objetivo principal de la cirugía es la curación de pacientes con enfermedad localizada. El segundo objetivo, es lograr el control local de la enfermedad de modo que se puedan usar otras terapias en los sitios de diseminación. En general, las probabilidades de que un procedimiento quirúrgico sea exitoso depende de la extirpación total del

tumor con márgenes adecuados de tejido normal, tocando los tumores lo menos posible para prevenir la diseminación del mismo (4, 37).

La radiación es una forma física del tratamiento del cáncer, destruye tanto células neoplásicas como sanas al ser absorbida, ya que daña directamente el DNA, se aplica en tres formas:

A. teleterapia; consiste en el uso de haces de rayos X, rayos γ o partículas generadas a distancia del paciente y dirigidas a los sitios del organismo donde se considera que está el tumor.

B. braquiterapia; consiste en el uso de fuentes de radiación encapsuladas que se implantan directamente en los tejidos o cavidades corporales; también se denomina terapia intersticial y terapia intracavitaria.

C. sistémica; en la cual los elementos radiactivos se introducen en forma sistémica para que lleguen a las células tumorales mediante los procesos fisiológicos normales, por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales radio marcados administrados por vía intravenosa para localizar y destruir el tumor en cualquier sitio (4, 37).

La quimioterapia constituye un tratamiento sistémico para el tratamiento del cáncer metastásico, en sus inicios los hombres trataban los tumores con la aplicación directa de mezclas que contenían cáusticos, ácidos, alcaloides tales como la belladona, aconita y cicuta, metales y sus

sales y compuestos de cobre, mercurio, antimonio, plomo, zinc y arsénico. En 1943, el Centro de Cáncer de Yale introdujo en la práctica médica los alquilantes como primeros fármacos antineoplásicos, se observó que las mostazas nitrogenadas causaban regresión de linfomas humanos por interferencia con la proliferación celular, pero resultaron sumamente tóxicas por lo que su uso se restringió (4, 13, 32, 37), sin embargo, en la década de 1970-1980 la cura del cáncer por quimioterapia se difundió ampliamente, representando una alternativa terapéutica en algunas neoplasias prolongando así las expectativas de vida de los pacientes (7, 8).

Con la quimioterapia actualmente disponible por lo menos 16 tumores son curables en estadios avanzados, 4 pueden ser curables en el contexto de una terapéutica adyuvante con una carga tumoral subclínica y muchos responden a la quimioterapia, la mayoría de los regímenes curativos están constituidos por combinaciones de fármacos (ver cuadro 1) (37).

Existe una gran variedad de fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer, para poder estudiarlos se les ha clasificado según su mecanismo de acción en: alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, alcaloides, hormonas y otros. La mayoría de los compuestos utilizados en la quimioterapia tienen tres orígenes :

- a) Compuestos aislados de productos naturales.
- b) Compuestos sintéticos con estructuras iguales o semejantes a aquellas de compuestos aislados de productos naturales.
- c) Síntesis *de novo* (compuestos sintéticos cuyas estructuras son productos de un diseño molecular) (3, 8).

La mayoría de los fármacos antineoplásicos tienen actividad sólo contra células que están en el proceso de división, sin embargo hay tejidos que de manera normal proliferan por lo que pueden ser dañados por alguno de estos potentes fármacos antineoplásicos, esta toxicidad con frecuencia limita la utilidad de éstos (2, 13).

Así, los mecanismos antitumorales son tóxicos para diversos tejidos y actúan directamente sobre ellos; por ejemplo: linfocitos, células plasmáticas y células de la médula ósea. Esto provoca que se presente anemia, leucopenia y trombocitopenia, por lo que en los pacientes tratados son comunes las hemorragias y la mayor susceptibilidad a las infecciones, lo que obliga a que exista una estrecha vigilancia de los recuentos leucocitarios, así como de la salud de los pacientes. Algunos fármacos antineoplásicos provocan diarrea, vómito y ulceraciones de la mucosa, debido a que las células basales del epitelio son sumamente susceptibles a éstos. Las células hepáticas y renales responden de forma distinta a los fármacos antineoplásicos y frecuentemente la respuesta no está relacionada con su efecto sobre compartimentos proliferativos. Las células

del Sistema Nervioso Central (SNC) son las menos afectadas por estos fármacos debido a que son protegidas por la barrera hemato-encefálica y por su crecimiento lento. Sin embargo, hay muchos fármacos que provocan daño al SNC y a veces es difícil independizar un efecto directo del fármaco sobre el comportamiento de los efectos combinados del tumor, residuos de las células que mueren, mala nutrición y régimen terapéutico (2, 3, 8)

Por otro lado, los riesgos a largo plazo de ciertos fármacos antineoplásicos son consecuencia de sus propiedades teratogénicas, mutagénicas y por lo tanto oncogénicas (8). Debido a la creciente necesidad de contar con nuevas opciones para cambiar la problemática de las enfermedades neoplásicas se ha dado énfasis al estudio de nuevos fármacos antineoplásicos, y para lograr esto el "National Cancer Institute" (NCI) dictamina que los estudios preclínicos de cualquier tipo de fármaco para tratar enfermedades neoplásicas se deben evaluar primero en animales con tumores que sean similares a los tumores que se presentan en humanos antes de pasar al Ensayo clínico en éstos últimos (3). Dentro del desarrollo de un fármaco es importante conocer los aspectos farmacocinéticos básicos de éste para poder determinar su actividad dentro del organismo (2, 3, 6). Los fármacos existentes para poder controlar o curar enfermedades neoplásicas tienen grandes limitantes ya que resultan sumamente tóxicos para los pacientes y algunos tumores

TUMORES CURABLES EN ESTADIOS AVANZADOS CON QUIMIOTERAPIA.

Coriocarcinoma	Tumor de Wilms
Leucemia linfocítica aguda (en niños y adultos)	Linfoma de Burkitt
Enfermedad de Hodgkin	Rabdomiosarcoma embrionario
Linfoma difuso de células grandes	Sarcoma de Ewing
Linfoma linfoblástico (en niños y adultos)	Neuroepitelioma periférico
Linfoma folicular mixto	Neuroblastoma
Cáncer testicular	Cáncer pulmonar de células pequeñas
Leucemia mielogénica aguda	Cáncer de ovario

TUMORES CURABLES POR QUIMIOTERAPIA EN EL CONTEXTO COADYUVANTE.

Cáncer de mama
 Sarcoma osteogénico
 Sarcoma de tejidos blandos
 Cáncer colorrectal

TUMORES QUE RESPONDEN EN UN ESTADIO AVANZADO, PERO QUE AUN NO SON CURABLES CON QUIMIOTERAPIA.

Cáncer de vejiga	Cánceres de cabeza y cuello
Leucemia mielogénica crónica	Cáncer endometrial
Leucemia linfocítica crónica	Carcinoma corticosuprarrenal
Leucemia de células pilosas	Meduloblastoma
Mieloma múltiple	Policitemia rubra vera
Linfoma folicular de células pequeñas clivadas	Cáncer de próstata
Carcinoma gástrico	Insulinoma
Carcinoma de cuello uterino	Cáncer de mama
Sarcoma de tejidos blandos	Tumores carcinoides

TUMORES CON Poca RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN UN ESTADIO AVANZADO

Sarcoma osteogénico	Cáncer colorrectal
Cáncer pancreático	Cáncer de pulmón no de células pequeñas
Cáncer renal	Melanoma
Cáncer tiroideo	Carcinoma hepatocelular
Carcinomas de la vulva o del pene	

Cuadro 1. Tumores que responden a la quimioterapia.

llegan a generar resistencia (8). Por lo anteriormente citado es importante la búsqueda de nuevos fármacos con una menor toxicidad y con diferentes propiedades biológicas como:

- a) Que no presente resistencia cruzada
- b) Que presente un espectro más amplio de actividad
- c) Que presente mayor efectividad clínica antitumoral
- d) Disminución de efectos eméticos y renales
- e) Sinergismo en terapias combinadas (2,6,9,11)

CERNIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

El número de nuevos fármacos evaluados cada año en los Estados Unidos por el National Cancer Institute (NCI) es enorme (37). La mayoría de medicamentos nuevos son desarrollados y producidos por corporaciones internacionales, el proceso desde que un fármaco se sintetiza hasta que se vende comercialmente dura aproximadamente 10 años y cuesta alrededor de 100 millones de dólares (21). El desarrollo de sistemas de cernimiento para encontrar fármacos con actividad frente a tumores sólidos se lleva a cabo en la "Division of Cancer Treatment" que depende del NCI, organismo responsable de evaluar la eficacia de nuevos

compuestos sintéticos y productos naturales contra un grupo de tumores en animales y que poseen un alto grado de concordancia con los que se presentan en el humano (37).

De forma general podemos decir que para desarrollar un fármaco antineoplásico se deben de seguir los siguientes pasos:

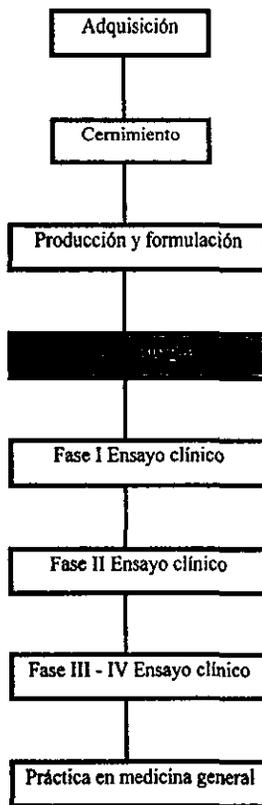


Figura 1. Diagrama de Flujo del Desarrollo de un Nuevo Fármaco

ADQUISICIÓN Y CERNIMIENTO

La adquisición de un fármaco, en ocasiones resulta casualidad, es por ello que la fase de cernimiento es la más importante en el proceso de selección de éste, es el mecanismo por el cual se restringe el número de compuestos químicos y se establece el número de fármacos que pueden ser manejados. Esto se consigue al evaluarlos en ratones con tumores transplantables de los cuales se conoce su desarrollo, los modelos tumorales más empleados son el L1210 y P388 que son Leucemias, B16 melanoma o carcinoma de pulmón de Lewis. De este modo se realiza un “pre-cernimiento” de la actividad antitumoral para la posterior selección de fármacos durante la fase que continua (37).

El programa de cernimiento es el siguiente:

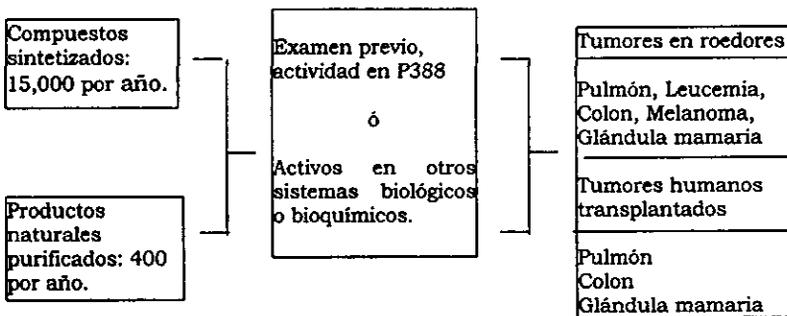


Figura 2. Programa de Cernimiento de Actividad para un Fármaco Antineoplásico.

Se toma la decisión de continuar sólo si se demuestra que el fármaco tiene efecto anticancerígeno contra uno de los tumores que se encuentran

en el panel. Se recomienda la evaluación tanto *in vivo* como *in vitro* para conocer mejor la actividad antineoplásica de un fármaco (8).

PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN

Para la producción y formulación de fármacos anticancerígenos es importante evaluar la pureza del fármaco con la determinación del punto de fusión, análisis de componentes, cromatografía y espectrofotometría; la determinación del pH y la solubilidad en disolventes fisiológicos aceptables así como la estabilidad de sus componentes (7).

TOXICOLOGÍA

Los ensayos de toxicidad se realizan en roedores, perros y monos en ese orden, pero un sistema menos costoso es la evaluación de la toxicidad sólo en roedores donde se determina la dosis letal en 10%, 50% y 90% de los animales empleados y la dosis reproducible que es letal en 10% de estos animales tratados; por lo tanto, la DL10% es usada para establecer una dosis inicial para ensayos clínicos en humanos y que nos proporcionará una seguridad máxima (7).

La toxicología se puede definir como la ciencia que estudia los efectos de las interacciones de las sustancias químicas con el organismo animal vivo, en las circunstancias que la rodean y con tendencia a una finalidad preventiva, y la valoración del riesgo del empleo de dichas sustancias químicas (15).

La toxicología se orienta hacia el estudio de los efectos de las sustancias sobre los sistemas biológicos, dedicando especial interés a los mecanismos de los efectos perjudiciales y a las condiciones bajo las cuales se dan dichos efectos (17).

La toxicología se puede clasificar de la siguiente manera:

- a) Experimental. Es la fase primaria de la aplicación de la toxicología, misma que se realiza en el laboratorio con animales de experimentación, órganos o tejidos individualizados, y la que tiene una gran conexión con la farmacología.
- b) Clínica. Es la aplicación práctica que estudia los problemas patológicos con que se va a encontrar el toxicólogo en la vida profesional (15).

Por lo tanto, apoyándonos en la toxicología experimental podemos evaluar la toxicidad de un fármaco para que éste pueda ser usado, conocer su dosis efectiva así como el periodo de administración (3).

El estudio de los métodos toxicológicos se centra en la detección y evaluación de la naturaleza de los cambios funcionales y estructurales inducidos químicamente y el significado de estos efectos en las células vivas. Debido a que todos los efectos de las sustancias químicas en los sistemas vivos no son necesariamente perjudiciales, la función principal de la ciencia de la toxicología es identificar de forma clara aquellas sustancias químicas capaces de producir un perjuicio serio a los sistemas vivos.

Existen principios generales que se aplican a muchos, o quizás a todos los procedimientos de ensayo toxicológico. Son los siguientes:

1) Para que un agente químico produzca un efecto biológico, debe entrar en contacto inmediato con las células en consideración.

2) Para cada sustancia química existe una cantidad por debajo de la cual no produce efecto detectable en ningún sistema biológico y una cantidad con la cual produce un efecto significativo en todos los sistemas biológicos. Entre estos extremos se encuentra el intervalo de cantidades en el que toda sustancia química ocasionará un efecto significativo en algunos tipos de sistemas biológicos.

3) Las células que tienen funciones parecidas y vías metabólicas similares en varias especies por lo general se verán afectadas de forma parecida por una entidad química dada.

4) Pequeños cambios en la estructura de un agente químico pueden influir en gran manera en su acción biológica.

Es importante considerar que se requiere de un lugar adecuado en donde realizar este tipo de experimentos toxicológicos los cuales deben de contar con el material suficiente, personal que tenga conocimientos de éste tipo de pruebas, sistemas informativos de bibliografía y de datos, conocimiento previo de la toxicodinamia y toxicocinética de la sustancia problema, debe realizarse una selección de especie, sexo y edad de los animales de experimentación, así como su alojamiento, alimentación y

condiciones de manejo, que permitirán una vigilancia total durante la experimentación (15, 17).

Las categorías de los ensayos toxicológicos son según Loomis (17):

A. Ensayos agudos que implican la administración de la sustancia a ensayar en una sola ocasión.

a) Determinación de la DL_{50} (ensayo de 48 hrs. - puede ser de 24 hrs. y control de sobrevivientes durante 7 - 15 días)

- Dos especies (normalmente ratas y ratones)
- Dos vías de administración (una es la vía de uso prevista)

b) Efectos tópicos sobre la piel del conejo (si la vía de uso prevista es la tópica, evaluación a las 24 hrs. y a los 7 días).

B. Ensayos prolongados que implican la administración de la sustancia a ensayar en múltiples ocasiones.

a) Duración de tres meses

b) Dos especies (de ordinario ratas y perros)

c) Tres niveles de dosis

d) Evaluación del estado de salud

- Todos los animales se pesan semanalmente
- Examen físico completo cada semana
- Química sanguínea, análisis de orina, hematología y ensayos funcionales

e) Necropsia e Histología.

C. Ensayos crónicos (dosis diarias)

a) Duración : 2 a 7 años según resultados de ensayos prolongados previos, estudios farmacodinámicos con varias especies animales y/o posibles estudios tentativos en humanos con dosis únicas.

b) Mínimo de dos niveles de dosis

c) Vía de administración según la vía de uso prevista

d) Evaluación del estado de salud

- Todos los animales se pesan semanalmente
- Examen físico completo cada semana
- Química sanguínea, análisis de orina, examen hematológico y ensayos funcionales en todos los animales a intervalos.

e) Todos los animales se someten a necropsia que incluye el examen histológico de todos los sistemas.

D. Ensayos especiales

- a) De potenciación con otras sustancias
- b) De efectos sobre la reproducción
- c) De teratogenicidad
- d) De carcinogenicidad
- e) De efectos sobre piel y ojos
- f) De efectos sobre el comportamiento

Como ya se mencionó, los estudios de toxicidad aguda, también conocida como dosis-única o Dosis Letal 50 (DL₅₀) consisten en administrar el compuesto a los animales en una ocasión. Se evalúa para determinar el grado de toxicidad de una sustancia química (que es la relación entre la dosis y los efectos adversos), para establecer la toxicidad de otras sustancias químicas similares y para determinar los efectos tóxicos específicos y proveer información sobre el modo de acción tóxica. Se pueden evaluar los daños que ocasiona empleando diferentes rutas de administración y animales de ambos sexos. Se llevan a cabo en animales de laboratorio y finalmente los resultados se extrapolan a otras especies, tomando en cuenta la premisa de que hay similitudes entre diferentes especies de vertebrados y que esas similitudes se pueden ver reflejadas en la respuesta obtenida en este tipo de estudios, sin embargo, hay que considerar también que las similitudes tienen limitaciones para la interpretación de resultados (35).

Los estudios de toxicidad aguda de este modo identifican agentes químicos altamente tóxicos y proporciona información sobre los posibles daños que pueden ocurrir cuando los humanos son expuestos, por lo general, se utilizan animales de una especie en particular, cepa, edad y peso, son mantenidos bajo condiciones controladas de dieta, jaulas, temperaturas, humedad relativa y tiempo de dosificación (Ver Cuadro 2). Por razones prácticas y económicas la especie convencional para este estudio son los roedores y por razones éticas se recomienda trabajar con un pequeño número de animales para cada dosis. Los estudios con dosis únicas generan datos sobre la dosis no efectiva, la dosis máxima a la cual un efecto tóxico no es visto, la dosis mínima letal, la dosis más pequeña requerida para matar a un animal y la dosis letal media (DL50), concepto introducido por Trevan en 1917 y que representa la muerte de la mitad (50%) de la población estudiada (3, 31).

Factor a considerar	Descripción
Especies	Diferencias metabólicas
Cepas	Deficiencias enzimáticas
Sexo	Nivel hormonal/preñación
Edad/Peso	Hígado/función renal: actividad microsomal enzimática
Medio ambiente	Alojamiento, manejo de humedad relativa, temperatura, actividad.
Dieta	Proteína: grasa, proporción
Modo de administración	Ruta/velocidad de administración
Formulación	Vehículo, volumen, pH, osmolaridad

Cuadro 2. Factores que influyen en los ensayos de DL₅₀

La mayoría de los estudios de toxicidad aguda y sub-aguda son realizados en roedores (principalmente ratas y ratones), aunque esto depende en gran medida de los objetivos particulares de la investigación y la extrapolación de una especie a otra requiere cuidado.

La causa de que los roedores se usen más para el desarrollo de las pruebas de toxicidad es la concepción de eventos que pueden ocurrir si los hombres fueran expuestos al mismo fármaco. No hay una razón específica

para asumir que los roedores no den una respuesta idéntica por lo que en los humano las razones de su uso son las siguientes:

- a) Algunos roedores (p.e. ratas y ratones) son fácil de reproducir en cantidades necesarias.
- b) La crianza de los roedores en el laboratorio es fácil de mantener.
- c) Los roedores son baratos en relación a otras especies.
- d) Se pueden reproducir y criar cepas definidas de roedores dependiendo del estudio de toxicidad.
- e) Se pueden emplear ratones libres de patógenos específicos con lo cual presentan problemas de salud mínimos.
- f) La cantidad del producto empleado para las pruebas de toxicidad son mínimas por el tamaño de los roedores.
- g) Generalmente es fácil la exposición al fármaco.
- h) Es fácil observar los signos de intoxicación.

La diferencia en la toxicidad aguda entre sexos de diferentes especies o entre cepas de la misma especie se puede derivar por diferencias fisiológicas, puede ser por la distribución de los fluidos y grasa corporales o la diferencia en la actividad de enzimas que hay presentes en ambos sexos, por otra parte, hay que considerar que si una población es expuesta

a un mismo tóxico encontraremos individuos que presenten tolerancia a éste y que se conoce como idiosincrasia de cada individuo (6, 35).

La edad y el peso de los animales empleados para los estudios de toxicidad aguda son importantes, sin embargo una vez que es definida la población, la relación edad-peso no es lineal y puede haber diferencias reales en el empleo de hembras y machos de acuerdo a estas características (35).

En cuanto a la elección de la vía de administración de los fármacos en los estudios de toxicidad, la vía intraperitoneal es la que más se emplea, ya en la práctica su uso es raro porque puede ocasionar peritonitis. El área de la membrana que reviste la cavidad peritoneal es muy extensa y permite una rápida absorción de muchos tipos de fármacos. Para propósitos prácticos el peritoneo se divide en dos partes; una que envuelve la mayor parte del órgano abdominal (peritoneo visceral) y la otra parte es la pared del abdomen (peritoneo parietal). Los fármacos que son absorbidos por el peritoneo visceral drenan hacia la vena porta y de ahí pasan al hígado en donde puede ocurrir la toxicidad y desintoxicación. Una pequeña cantidad de la sustancia puede ser absorbida por el peritoneo parietal y drenar directamente hacia la circulación sistémica, de este modo pasa nuevamente al hígado (35, 36).

Son tres razones por las cuales se utiliza la vía intraperitoneal en los estudios de toxicología:

- a) Técnicamente es más fácil su uso que la vía intravenosa.
- b) Es posible usar soluciones de fármacos en aceite por vía intraperitoneal pero no intravenoso.
- c) Usando la vía intraperitoneal para propósitos de investigación los cambios metabólicos que son asociados con el tracto alimentario se evitan (35).

La vía intravenosa y ocasionalmente la vía intraarterial se consideran las vías más rápidas para entrar a la circulación sanguínea. La distribución del fármaco hacia el órgano blanco es rápida y el hígado es principalmente rodeado pero puede haber variaciones cuantitativas en la respuesta dependiendo de cual arteria o vena es usada para la inyección. Idealmente un producto inyectado hacia el flujo sanguíneo debe ser isotónico, inyecciones de solución hipertónica e hipotónica afecta a los eritrocitos y otras células, particularmente las que se localizan en el sitio de inyección (35).

La velocidad con la cual el fármaco es inyectado hacia el flujo sanguíneo puede influir en la respuesta toxicológica. Una inyección rápida puede resultar mucho más tóxica cuando la misma cantidad del fármaco es administrada lentamente; por esta razón es esencial en toxicología que la velocidad de inyección sea definida y controlada (6, 35).

La Dosis Letal 50 (DL₅₀) se determina considerando un periodo de 48 hrs. tomando en cuenta a los animales que mueren durante ese tiempo, sin embargo los individuos sobrevivientes deben ser observados en intervalos usualmente de 14 días (no menos de 7 días). Después se puede seguir con la observación si se desea, con la finalidad de encontrar signos tóxico tardíos. Todos los animales muertos durante el periodo de observación y todos los animales sobrevivientes al final del estudio pueden ser sometidos a una necropsia y examinación histopatológica para obtener mayor información del fármaco en prueba (2, 3).

Durante los estudios de toxicidad se pueden realizar las siguientes observaciones (17):

- | | |
|---|---|
| <p>1.-Actividad
 Disminución de la actividad locomotora
 Aumento de la actividad locomotora
 Saltos</p> <p>2.-Reacción extraña
 Movimientos acrobáticos
 Vagabundeo sin propósito fijo
 Movimientos hacia atrás
 Hociqueo
 Lamer las paredes del compartimiento
 Movimientos de empujar con la nariz
 Fijar la mirada con ojos vidriosos
 Dar vueltas</p> <p>3.-Fonación
 Incremento de la fonación
 Disminución de la fonación
 Fonación normal
 Sensibilidad al dolor
 Incremento de sensibilidad
 Disminución de sensibilidad
 Analgesia</p> <p>4.-Sensibilidad al sonido
 Incremento de sensibilidad
 Disminución de sensibilidad
 Reactividad</p> <p>5.-Sensibilidad al tacto
 Incremento de sensibilidad
 disminución de sensibilidad</p> <p>6.-Cola anormal
 Cola rígida
 Cola flácida</p> <p>7.-Interacción social
 Incremento del comportamiento exploratorio
 Disminución del comportamiento exploratorio
 Incremento de la frecuencia de erguimiento
 Incremento de la velocidad de erguimiento
 Disminución de la frecuencia de erguimiento
 Disminución de la altura de erguimiento</p> <p>8.-Comportamiento agresivo
 Incremento especie contra la misma especie
 Disminución en la especie
 Incremento individuo hacia experimentadores
 Disminución en el individuo</p> <p>9.-Ataxia</p> <p>10.-Convulsiones
 Convulsiones tónicas
 Convulsiones clónicas
 Convulsiones mixtas
 Subconvulsiones
 Agarrotamiento audiogénico</p> <p>11.-Tono muscular
 Incremento tono muscular - Tronco</p> | <p>Disminución tono muscular - Tronco</p> <p>Incremento tono muscular - Extremidades</p> <p>Disminución tono muscular - Extremidades</p> <p>12.-Parálisis</p> <p>13.-Respuesta somática
 Incremento del aseo
 Disminución del aseo
 Frotarse la nariz
 Incremento de rascarse
 Disminución de rascarse
 Retorcimiento</p> <p>14.-Reflejos posturales
 Depresión reflejo colocación
 Ausencia reflejo colocación
 Depresión reflejo asimiento
 Ausencia reflejo asimiento
 Depresión reflejo enderezamiento
 Ausencia reflejo enderezamiento</p> <p>15.-Postración
 Postración
 Pérdida de conciencia</p> <p>16.-Temblores
 Temblores - En reposo y en movimiento
 Temblores _ Sólo en movimiento</p> <p>17.-Exoftalmia</p> <p>18.-Irritación ocular
 Opacidad ocular
 Parpadeo excesivo
 Iritis</p> <p>19.-Reflejo corneal
 Ausencia reflejo corneal
 Depresión reflejo corneal</p> <p>20.-Lacrimación</p> <p>21.-Nistagmo</p> <p>22.-Reflejo pupilar a la luz (fotomoor)
 Ausencia reflejo pupilar
 depresión reflejo pupilar</p> <p>23.-Fotofobia</p> <p>24.-Tamaño de la pupila
 Midriasis
 Miosis</p> <p>25.-Defecación
 Incremento de la defecación
 Disminución de la defecación
 Diarrea
 Deposiciones sanguinolentas</p> <p>26.-Salivación
 Salivación
 Sequedad de la boca</p> <p>27.-Micción
 Incremento de la micción
 Disminución de la micción
 Hematuria</p> <p>28.-Apnea</p> <p>29.-Disnea</p> <p>30.-Respiración
 Incrementa ritmo respiración
 Disminuye ritmo de la respiración</p> |
|---|---|

Incrementa profundidad de la respiración	rectal
Disminuye profundidad de la respiración	34.-Cianosis
Respiración irregular	35.-Déficit motor
31.-Corazón	Déficit motor en pista inclinada
Ritmo cardiaco	Déficit motor en barra rotatoria
pulso	Déficit motor en alambre horizontal
32.-Descarga nasal	36.-Piloerección
33.-Temperatura corporal	37.-Ausencia de efectos
incremento de la temperatura rectal	38.-Muerte
Disminución de la temperatura	Incremento de la micción
	Disminución de la micción
	Hematuria

Cuadro 3. Signología para Evaluar Toxicidad Aguda.

En 1975, la Dra. Ruiz-Ramírez, de 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 antineoplásica, como el cisplatino y el carboplatino, este último menos tóxico que el cisplatino. Los compuestos de coordinación sintetizados por Ruiz-Ramírez fueron diseñados para mostrar una actividad biológica potencial. La estructura química de las casiopéinas esta formada por cobre (Cu), como centro metálico y quelatos diiminas (NN) con quelatos aminoacidatos o donadores (OO) (Ver Figura 3), son compuestos de coordinación análogos al cisplatino, que se diseñaron considerando diferentes parámetros y propiedades químicas como son: el metal y su estado de oxidación, el número de coordinación del metal, propiedades de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad del mismo, todo esto para favorecer la interacción de estos compuestos con el ADN entre otros posibles mecanismos de acción (10).

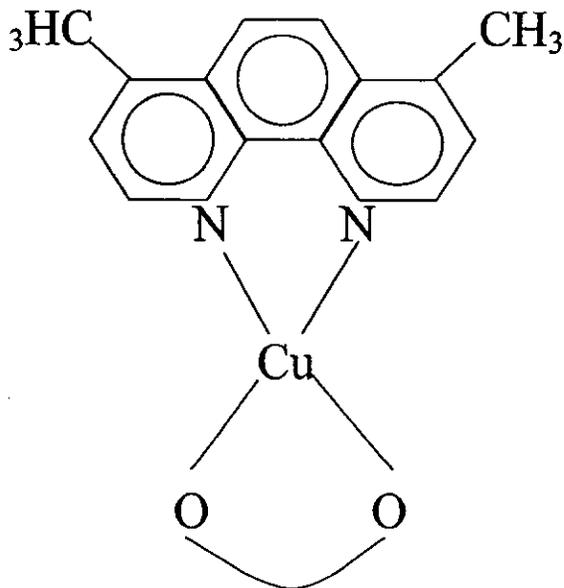


Figura 3. Estructura de la Casiopeína III-E

A partir de 1980 se inician trabajos de constatación biológica *in vitro*, con base en el supuesto de que puedan tener actividad antineoplásica. Esta hipótesis se apoyó en los postulados de Rosenberg que a su vez fueron derivados del conocimiento farmacodinámico del cisplatino en líneas tumorales y que se resumen en los siguientes puntos:

- 1) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.

- 2) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante dentro del organismo.
- 3) Son necesarios dos ligantes cis monodentados (o uno bidentado) como grupos salientes.
- 4) Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- 5) Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados (9, 12).

El presente trabajo aborda específicamente el estudio de toxicidad aguda de la Casiopeina IIIIE en ratas Wistar y en ratones NIH por vía intraperitoneal e intravenosa y con el empleo de ambos sexos.

HIPÓTESIS.

La DL₅₀ de la casiopeína IIIE administrada por vía intravenosa e intraperitoneal es más tóxica en ratas hembras de la cepa Wistar y ratones hembras de la cepa NIH que en los machos respectivos.

OBJETIVOS.

- Determinar si existe alguna diferencia en la DL_{50} de la Casiopeína IIIIE administrada por vía intravenosa e intraperitoneal entre sexos empleando roedores de las cepas Wistar y NIH.

- Determinar la DL_{50} de la Casiopeína IIIIE administrada por vía intravenosa e intraperitoneal en ratas hembras de la cepa Wistar y ratones hembras de la cepa NIH.

- Determinar la DL_{50} de la Casiopeína IIIIE administrada por vía intravenosa e intraperitoneal en ratas machos de la cepa Wistar y ratones machos de la cepa NIH.

- **Fármaco.**

La casiopeína IIIIE fue obtenida por su ruta usual de síntesis (35). Se evaluó su pureza por medio de punto de fusión, conductividad, así mismo análisis elemental y espectrofotométrico. Conjuntamente se determinó su estabilidad en disolventes fisiológicamente aceptables, en éste trabajo de utilizó solución glucosada al 5% (6).

- **Animales.**

Se emplearon 50 ratones hembras y 50 ratones machos de la cepa NIH de 8 semanas de edad y 50 ratas hembras y 55 ratas machos de la cepa Wistar de 10 semanas de edad que fueron alojados bajo condiciones ambientales controladas que incluyeron extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora; éste se realiza mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de 3 μm en el aire de inyección. La temperatura se mantuvo a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa en 55%, los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 hrs. Se les proporcionó alimento esterilizable para ratón / rata Harlan Teklad y agua *ad libitum*, la cual se acidificó hasta alcanzar un pH de 2.5, las jaulas para su alojamiento eran de acrílico cristal transparente con las dimensiones siguientes para ratón: 19 x 10.5 x 8 cm (10 ratones/caja) y para ratas: 32 x 47 x 20 cm (5 ratas/caja), la cama era de viruta esterilizada y el cambio de jaulas se realizó cada tercer día, los bebederos se lavaron un día a la semana y se esterilizaron (11, 14, 18).

• **Preparación de la casiopeína IIIIE para su administración en las ratas de la cepa Wistar por sexo.**

Se formaron 5 grupos con 5 ratas cada uno, cada grupo se marcó con un color diferente para su identificación durante el experimento, se pesaron todas las ratas para obtener un peso promedio, posteriormente se realizaron los cálculos para saber la cantidad del fármaco que correspondía a ese peso y la cantidad total que sería diluida en 100 ml de suero glucosado al 5%.

Una vez preparada la solución se realizó el cálculo para obtener la dosis en ml para cada rata de acuerdo a la dosis correspondiente para cada grupo y el peso individual, las dosis establecidas* para la vía intraperitoneal en las hembras fueron 2, 3, 4, 5 y 6 mg/Kg; en los machos fueron 4, 6, 8, 10 y 12 mg/Kg. Para la vía intravenosa (vena caudal) en las hembras fueron 6, 8, 10, 12 y 14 mg/Kg; en los machos fueron 3, 4, 5, 6 y 7 mg/Kg. Los volúmenes empleados no sobrepasaron en ningún caso 1 ml.

• **Preparación de la casiopeína IIIIE para su administración en ratones de la cepa NIH por sexo.**

Se formaron 5 grupos con 5 ratones cada uno, cada grupo se marcó con un color diferente para su identificación durante el experimento, se pesaron todos los ratones para obtener un peso promedio, posteriormente se realizaron los cálculos para saber la cantidad del fármaco que

correspondía a ese peso y la cantidad total que sería diluida en 50 ml de suero glucosado al 5%.

Una vez preparada la solución se realizó el cálculo para obtener la dosis en ml para cada ratón de acuerdo a la dosis correspondiente para cada grupo y el peso individual, las dosis establecidas^{*} para la vía intraperitoneal en las hembras fueron 8, 10, 12, 13 y 14 mg/Kg; en los machos fueron 4, 6, 8, 10 y 12 mg/Kg. Para la vía intravenosa (vena caudal) en las hembras fueron 4, 6, 8, 10 y 12 mg/Kg; en los machos fueron 6, 8, 10, 12 y 14 mg/Kg. Los volúmenes empleados no sobrepasaron en ningún caso 1 ml.

• **Administración de la Casiopeína IIIE.**

Una vez establecidas las dosis individuales, se realizó la sujeción de cada animal para la administración de la Casiopeína IIIE, en el caso de la vía intraperitoneal se realizó en la región caudal izquierda del abdomen en esta región no hay órganos vitales excepto el intestino delgado. Para realizar la técnica fue necesario colocar al animal decúbito dorsal y administrar con una torunda de algodón un poco de alcohol al 70% en el sitio de inyección.

Para la vía intravenosa fue necesario presionar la región en donde se localiza la vena caudal para que esta resalte o bien colocar fomentos de agua caliente para que haya vasodilatación aplicar con una

^{*} Las dosis se determinaron de acuerdo a la Dosis Letal 50 de la Casiopeína I, II, III y VII-gli (12, 29, 30)

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio de los factores que influyen en el comportamiento de los sistemas de control de procesos industriales.

Una vez que se ha establecido el objetivo principal, se detallan los objetivos secundarios que guiarán el desarrollo del estudio.

El presente trabajo se divide en tres partes principales: la primera trata sobre los fundamentos de los sistemas de control, la segunda sobre los métodos de diseño y la tercera sobre los resultados obtenidos.

En la primera parte se describen los conceptos básicos de los sistemas de control, como la retroalimentación y el control en lazo cerrado.

En la segunda parte se detallan los métodos de diseño de controladores, como el método de Ziegler-Nichols y el método de los polos y ceros.

En la tercera parte se presentan los resultados obtenidos en la simulación de los sistemas de control diseñados, así como un análisis de su comportamiento.

Finalmente, se concluye el trabajo con una serie de conclusiones y recomendaciones que sirven de guía para futuros estudios en esta área.

Este trabajo fue desarrollado en el marco del curso de Sistemas de Control de Procesos Industriales, impartido por el profesor Dr. [Nombre del profesor].

torunda de algodón alcohol al 70% en el sitio de inyección, es importante dirigir la aguja con el bisel hacia arriba y una vez adentro del área hacer los movimientos necesarios y con precaución para encontrar el vaso sanguíneo, se recomienda usar agujas calibre 23 - 25 mm (35).

- **Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀).**

Los animales se mantuvieron durante 15 días en observación para evaluar su sinología, la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) se llevó a cabo considerando sólo a aquellos animales que murieron durante las 48 hrs. post-administración de la Casiopeína IIIIE los resultados fueron evaluados mediante el programa Log Probit Analysis.

RESULTADOS

Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratas hembras de la cepa Wistar por vía Intraperitoneal.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
2	5	0	0
3	5	0	0
4	5	1	20
5	5	3	60
6	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 4.63 mg/Kg**Límite superior = 5.37 mg/Kg****Límite inferior = 3.86 mg/Kg**

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE por vía intraperitoneal.

Dosis mg/Kg	Signos
2	normales
3	ardor y dolor abdominal ligeros solo unos 60 minutos aproximadamente, heces blandas
4	ardor y dolor abdominal franco, heces blandas, postración, disnea
5	ardor y dolor abdominal severo, vagabundeo sin propósito fijo, temblor sólo en movimiento, diarrea, disnea.
6	ardor y dolor abdominal severo, postración, incoordinación al caminar, diarrea, disnea.

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
2	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
3	heces blandas durante 5 días y después los signos eran iguales que el grupo anterior.
4	disnea, postración, ascitis moderada, pelo hirsuto.
5	disnea, postración, nariz congestionada, ascitis severa, pelo hirsuto.

Dosis Letal 50 (DL₅₀) de la Casiopeína IIIE en ratas hembras de la cepa

Dosis Letal 50 (DL₅₀) de la Casiopeína IIIE en ratas hembras de la cepa Wistar por vía Intravenosa.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
6	5	0	0
8	5	2	40
10	5	3	60
12	5	5	100
14	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 8.84 mg/Kg

Límite superior = 10.24 mg/Kg

Límite inferior = 7.30 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE por vía intravenosa.

Dosis mg/Kg	Signos
6	normal
8	heces blandas, temblores sólo en movimiento, disnea.
10	heces blandas, temblores sólo en movimiento, postración, disnea, taquicardia.
12	heces blandas, temblores sólo en movimiento, disnea, taquicardia
14	heces blandas, temblor al caminar, postración, disnea, taquicardia, muerte de una rata 6 minutos después de la administración.

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
6	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
8	heces blandas durante 3 días y después los signos eran iguales que el grupo anterior.
10	disnea, postración, heces blandas.

Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratones hembras de la cepa NIH por vía Intraperitoneal.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
8	5	0	0
10	5	0	0
12	5	1	20
13	5	4	79.99
14	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 12.47 mg/Kg

Límite superior = 13.18 mg/Kg

Límite inferior = 11.56 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE por vía intraperitoneal

Dosis mg/Kg	Signos
8	normales
10	ardor abdominal, heces blandas, postración
12	ardor y dolor abdominal, heces blandas, disnea, postración, arqueamiento, temblores ligeros.
13	ardor y dolor abdominal, arqueamiento, diarrea, disnea, postración, temblores sólo en movimiento.
14	ardor y dolor abdominal, arqueamiento, diarrea, disnea, postración, temblores sólo en movimiento.

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
8	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
10	heces blandas durante 5 días y después los signos eran iguales que el grupo anterior
12	Disnea, postración, ascitis, pelo hirsuto, ojos vidriosos.
13	Disnea, postración, nariz congestionada, ascitis severa, pelo hirsuto, ojos vidriosos.

Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratones hembras de la cepa NIH por vía Intravenosa.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
4	5	0	0
6	5	2	40
8	5	2	40
10	5	5	100
12	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 7.12 mg/Kg

Límite superior = 8.61 mg/Kg

Límite inferior = 5.50 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE por vía intravenosa.

Dosis mg/Kg	Signos
4	normales
6	tranquilos, disnea, heces blandas.
8	postración, ligeros temblores, heces blandas, disnea, taquicardia.
10	postración, temblores, diarrea, taquicardia, disnea.
12	postración, temblores, diarrea, disnea, taquicardia, muerte de un ratón 10 minutos después de la administración.

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
4	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
6	heces blandas durante 5 días y después los signos eran iguales que el grupo anterior
8	Disnea, postración, pelo hirsuto

Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratas machos de la cepa Wistar por vía Intrapéritoneal.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
3	5	0	0
4	5	0	0
5	5	2	40
6	5	4	79.99
7	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 5.26 mg/Kg

Límite superior = 5.95 mg/Kg

Límite inferior = 4.51 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE por
vía intraperitoneal

Dosis mg/Kg	Signos
3	normales
4	disnea y postración ligera, una rata presentó diarrea
5	dolor abdominal, postración, letargia, disnea ligera
6	ardor y dolor abdominal, postración, letargia, heces blandas, pelo hirsuto
7	ardor y dolor abdominal severo, postración, vagabundeo sin propósito fijo, diarrea, disnea

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
3	normales
4	normales
5	moderada disnea, ascitis, tranquilas
6	disnea, ascitis, postración, murió 3 días después de la administración

Dosis Letal 50 (DL₅₀) de la Casiopeína IIIE en ratas machos de la cepa Wistar por vía Intravenosa.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
4	5	0	0
6	5	2	40
8	5	2	40
10	5	3	60
12	5	3	60
14	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 8.48 mg/Kg

Límite superior = 11.22mg/Kg

Límite inferior = 6.16 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeina IIIE por vía intravenosa.

Dosis mg/Kg	Signos
4	tranquilas, respiración normal, activas
6	postración, disnea ligera
8	alertas, agresivos entre ellos, aumento de la actividad locomotora
10	inquietas, incremento de la frecuencia de erguimiento, agresivos entre ellos, alertas, aumento de la actividad locomotora
12	agresivos entre ellos, disnea, postración
14	postración, disnea, letargia

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
4	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
6	tranquilos, comían y bebían agua de manera normal, ninguna alteración apreciable
8	pelo ligeramente hirsuto, ojos vidriosos, tranquilos
10	disnea, pelo ligeramente hirsuto, actitud tranquila
12	letargia, pelo hirsuto, encorvamiento

**Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratones machos de la cepa NIH por vía
Intraperitoneal.**

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
4	5	0	0
6	5	3	60
8	5	3	60
10	5	4	79.99
12	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 6.67 mg/Kg

Límite superior = 8.39 mg/Kg

Límite inferior = 4.85 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE vía intraperitoneal

Dosis mg/Kg	Signos
4	normales
6	ardor abdominal, heces blandas, postración
8	ardor y dolor abdominal, heces blandas, disnea, postración, arqueamiento
10	ardor y dolor abdominal, arqueamiento, diarrea, disnea, postración
12	ardor y dolor abdominal, arqueamiento, disnea, postración

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
4	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
6	tranquilos, pelo ligeramente hirsuto, ninguna otra alteración apreciable
8	Disnea, postración, pelo hirsuto, ojos brillosos .
10	Disnea, postración, ascitis ligera, pelo hirsuto, ojos brillosos.

Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratones machos de la cepa NIH por vía Intravenosa.

Dosis mg/Kg	No. animales	Muertos	% de muertos
6	5	0	0
8	5	0	0
10	5	3	60
12	5	4	79.99
14	5	5	100

Dosis letal 50 (DL₅₀) = 10.15 mg/Kg

Límite superior = 11.54 mg/Kg

Límite inferior = 8.67 mg/Kg

Evaluación de signos después de administrar la Casiopeína IIIE por vía intravenosa.

Dosis mg/Kg	Signos
6	normales
8	normales
10	postración, temblores ligeros sólo en movimiento , disnea.
12	postración, temblores sólo en movimiento, disnea, letargia
14	postración, temblores, disnea, letargia

Los animales que sobrevivieron después de las 48hrs fueron observados durante 13 días más encontrando los siguientes resultados:

Dosis mg/Kg	Signos
6	tranquilos, comían y tomaban agua de manera normal, ninguna alteración apreciable.
8	tranquilos y apacibles
10	un poco de disnea, postración, pelo ligeramente hirsuto
12	disnea, letargia, ojos brillosos, pelo hirsuto

DISCUSIÓN.

Existen muchos fármacos que son tóxicos para ambos sexos y algunos lo son más en un sexo con respecto a otro; no se cuenta con literatura que señale la sensibilidad para cada uno de ellos, sin embargo se ha encontrado que la proporción de ésta es diferente en distintas cepas de la misma especie (35).

En cuanto a la Casiopeína III E podemos observar que las diferencias que se presentan entre la cepa Wistar y NIH para la DL_{50} por vía intravenosa e intraperitoneal son las siguientes:

Por vía intraperitoneal la Casiopeína III E fue más tóxica en las ratas Wistar con respecto a los ratones NIH. En cuanto a la vía intravenosa se observa un cambio, es decir, las hembras NIH fueron más sensibles con relación a los machos y a las ratas Wistar. Es importante señalar que en estudios anteriores con otras Casiopeínas se ha encontrado que por vía intraperitoneal resultan ser más tóxicas en comparación con la vía intravenosa (28, 29); en esta ocasión sucedió lo mismo.

Existen estudios histopatológicos que muestran el daño que ocasionan estos compuestos en diversos órganos, afectando principalmente al hígado y en segundo lugar al corazón (28, 29); siendo el primero, el órgano principal de biotransformación para los fármacos, podríamos suponer que por vía intraperitoneal resulta más afectado, lo que implica que la Casiopeína permanece más tiempo en el organismo

causando mayores efectos tóxicos que por vía intravenosa, en la cual el fármaco se distribuye a todo el organismo alcanzando una concentración inicial alta en sangre, pero usualmente es eliminado más rápidamente. Los daños ocasionados en hígado por la vía intravenosa son menores, así como los efectos tóxicos externos visibles. Por vía intraperitoneal la Casiopeína IIIE produjo ascitis, que en ocasiones se presentó hasta 18 hrs. post-administración, diarrea, nariz congestionada y pelo hirsuto, a diferencia de la vía intravenosa, en la cual los signos predominantes fueron disnea, postración y pelo ligeramente hirsuto.

El tamaño y la superficie corporal de un individuo, influyen en su metabolismo, su relación es inversamente proporcional, esto significa que el metabolismo de un ratón es más activo con respecto al de una rata, de esta manera podemos establecer la diferencia que existe entre la dosis necesaria para causar la muerte del 50% de los animales, que en el caso de los ratones NIH fueron mayores con respecto a las Ratas Wistar.

En el caso de las diferencias entre sexos, Katzung menciona que cuando se evalúa la toxicidad de un fármaco en ambos sexos es más común encontrar que las hembras sean más susceptibles que los machos (16); en el caso de las ratas hembras Wistar, la DL_{50} por vía intraperitoneal, fué de 4.63 mg/Kg y en los machos 5.26 mg/Kg, la diferencia es de 0.63 mg/Kg lo que indica que las hembras resultaron ser ligeramente más sensibles a la Casiopeína IIIE, no así por vía intravenosa.

ESTO ES UN DOCUMENTO
DE LA BIBLIOTECA
NACIONAL DE MÉDICA
Y CIRURJIA
DE LA UNAM

En las ratas se han comprobado variaciones en el metabolismo de los fármacos, dependientes del sexo, por ejemplo la actividad hepática en las hembras para los organofosforados es menor que en los machos, lo que las hace más susceptibles a una intoxicación. El macho adulto joven metaboliza los fármacos con mayor rapidez que la hembra madura de la misma especie. Esas diferencias en el metabolismo se han asociado con claridad a las hormonas androgénicas, sin embargo, eso no se ha demostrado aún con otros roedores (16). Por el momento no se cuenta con la farmacocinética de la Casiopeína IIIIE lo que nos impide saber con certeza por qué se dieron esas diferencias, específicamente en los ratones NIH, en los cuales se observó que por vía intraperitoneal la DL_{50} en las hembras, fue de 12.47 mg/Kg y en los machos de 6.67 mg/Kg, la diferencia de 5.8 mg/Kg señala la sensibilidad de los machos para la Casiopeína IIIIE; siendo lo contrario por vía intravenosa, con una DL_{50} para las hembras de 7.12 mg/Kg y en los machos de 10.15 mg/Kg, en este caso la diferencia de 3.03 mg/Kg señala la sensibilidad de las hembras; en este trabajo sólo se determinó la toxicidad aguda empleando dos cepas y dos vías de administración, una de ellas, la vía intravenosa es la que se recomienda para la administración de fármacos antineoplásicos.

CONCLUSIONES.

La toxicidad aguda de la Casiopeína IIIE es diferente entre las cepas Wistar y NIH, esto se observa tanto en dosis (mg/Kg) como en signos de toxicidad siendo las más afectadas las ratas Wistar principalmente al emplear la vía intraperitoneal. Loomis señala que la letalidad por vía intraperitoneal puede ser menor que por vía intravenosa, a consecuencia de la destoxificación hepática del compuesto o por circulación enterohepática del mismo a menos que su efecto tóxico se localice en el hígado (17)

Las diferencias que se encontraron entre sexos son notorias, básicamente para los ratones NIH en ambas rutas de administración. En lo que se refiere a la vía intraperitoneal, las diferencias entre sexos se pueden deber principalmente a la relativa actividad de las enzimas microsomales enzimáticas existentes para cada uno, así como a la distribución de fluidos y grasa corporal. Los cambios observados por vía intravenosa, pueden tener su origen en la velocidad de administración como tal; en ensayos no publicados para la Casiopeína III se encontró que la velocidad de administración influye en la toxicidad, esto se realizó empleando una bomba de infusión; en el caso de la presente tesis, la administración fue manual y fue ejecutada por la misma persona, sin embargo no se podía tener un control permanente sobre la administración

del fármaco, puesto que era afectada por la actitud del animal al ser sujetado.

Por último, para saber las causas reales de las variaciones entre cepas y sexos debidas a la administración de la Casiopeína IIIIE es necesario realizar estudios de farmacocinética y farmacodinamia. Para pruebas posteriores de toxicidad aguda de otras Casiopeínas, se recomienda, además de los estudios ya mencionados, tener un mejor control en las técnicas de administración del fármaco, para que no influya en nuestros resultados.

REFERENCIAS.

1. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México: Epidemiología. *Secretaría de Salud*, México, 1997.
2. Balls, M., Riddell, R. J. And Worden, A. N.: *Animals and Alternatives in Toxicity Testing*, *Academic Press*, London, 1983.
3. Barragry, T. B.: *Veterinary Drug Therapy*, *Lea & Febiger*, U. S. A., 1994.
4. Booth, N. H. y Mc Donald, L. E.: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Vol. I y II, *Edit. Acribia*, España, 1988.
5. Bravo, G. M. E.: *Evaluación Antineoplásica de Compuestos de Coordinación de Cobre (Casiopeína) en Modelo Tumoral Murino*. Tesis de Licenciatura. *Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México*. México, D. F., 1998.
6. Busch, H.: *Methods in Cancer Research*. Vol I, *Academic Press*, San Diego, Cal. 1967.
7. Busch, H.: *Preclinical Methodology for the Selection of Anticancer Agent*. Vol. I, *Academic Press*, London, 1967.
8. De Vita, V. T. and Rosenberg, S. A.: *Cancer Principles & Practice of Oncology*, *Lippincott Company*, Philadelphia, U. S. A., 1993.
9. Dobson, M. J. and Gorman, T. N.: *Cancer Chemotherapy in Small Animal Practice*, *Blackwell Scientific Publications*, London, Edinburgh, 1993.

10. Du Souich, P.: Métodos en Farmacología Clínica, *Organización Mundial de la Salud*, México, 1992.
11. Gracia, M. M. I., Gómez, M- A. y Tinoco, M. M.: Nuevo Bioterio en el Conjunto "E" de la Facultad de Química. UNAM. *Animales de Experimentación. Revista Internacional*, 24 - 25 (1996).
12. Gracia, M. M. I.: Evaluación Preclínica de la Actividad Antineoplásica de Dos Nuevos Compuestos de Coordinación. Tesis de Maestría. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México*, México, D. F., 1999.
13. Goodman, G. A. y Rall, T. W.: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8a. ed., *Panamericana*, México, 1991.
14. Hall, E. H., White, W. J. and Lang, C. M.: Acidification of Drinking Water. *Lab. Anim. Sci.*, 30: 643 - 651 (1980).
15. Jurado, C. R.: Toxicología Veterinaria. 2a. ed. *Salvat Editores*, Barcelona, España, 1989.
16. Katzung, G. B.: Farmacología Básica y Clínica. 4a. ed. *Manual Moderno*, México, 1991.
17. Loomis, T. A.: Fundamentos de Toxicología, *Acribia*, Zaragoza, España, 1982.
18. Matthew, S. and Pezzuto, M. J.: Methods in Plant Biochemistry. Vol. 6, *Academic Press*, London, 1991.

19. Mcpherson, C. W.: Reduction of *Pseudomona aeuroginosa* and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. *Lab. Anim. Care.*, 13: 737 - 744 (1963).

20. Meneses, G. A., López, S. y Sánchez, P. S.: La Célula Neoplásica, Histología y su Nomenclatura, *Facultad de Química, UNAM e Instituto Nacional de Cancerología*, México, 1992.

21. Naranjo, C. A. y Souich, P.: Métodos en Farmacología Clínica, *Organización Panamericana de la Salud*, 1992.

22. Page, R. L. and Thorall, D. E.: Clinical Indications and Applications of Radiotherapy and Hyperthermia. *Vet. Clin. of North Am. Small An. Prac.*, 20: 1025 - 1091 (1990).

23. Powis, G. H. and Hacker, M. P.: The Toxicity of Anticancer Drug, *Pergamon Press*, 1991.

24. Pratt, W. B. and Ruddon, R. W.: The Anticancer Drugs, *Oxford University Press*, New York Oxford, 1979.

25. Registros No. 188101-120579 y 18802-120580. Dirección General de Intervenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológicos (SECOFI).

26. Rosenberg, B., Van Camp, L. and Mansour, B. H.: Platinum compounds a nex class of potent antitumor agent. *Nature*, 22 - 26: 383-386 (1969).

27. Rosenthal, R. C. and Crow, S. E.: Cancer Chemotherapy in Veterinary Practice, *American Animal Hospital Association*, Denver, 1991.
28. Ruiz, A. L. y Moreno, E. R.: Diseño, Síntesis y Caracterización de las Casiopeínas. 1a. Jornada de trabajo en casiopeínas, *Facultad de Química*, México, 1994.
29. Ruiz, A. L.: 3a. Jornada de Trabajo en Casiopeínas, *Facultad de Química*, UNAM, México, 1998.
30. Ruiz, A. L.: Naturaleza Química y Clasificación de los Agentes Quimioterapéuticos. Memorias del Curso de Cáncer y Quimioterapia, *Facultad de Química, UNAM e Instituto Nacional de Cancerología*, México, 1992.
31. Sullivan, J. B. and Krieger, G. R.: Hazardous Materials Toxicology, *Williams & Wilkins*, Baltimore, 1992.
32. Terán, P. M. A.: Objetivo de los Centros Oncológicos en México. *Cancerología*, 45 (1): 8 - 10 (1999).
33. Theilen, G. H. and McDowell, B. R.: Veterinary Cancer Medicine. 2th ed. *Lea & Febiger*, Philadelphia, 1987.
34. Thompson, J. M. and Gorman, N. T.: Hypertermia and Radiation in the Management of Canine Tumors. *J. Small Anim. Pract.*, 28: 457 - 477 (1987).

35. Vernon, K. B.: Acute and Sub- acute Toxicology, *Edward Arnold*, Great Britain, 1988.

36. Waynforth, H. B. and Flecknell, P. A.: Experimental and Surgical Technique in the Rat, 2th ed. *Acaddemic Press*, San Diego, Cal., 1992.

37. William, N. K.: Medicina Interna I. 2a. ed. *Médica Panamericana*, Philadelphia, 1992.