

.01674  
13



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL  
DE LESIONES EN RATONES INDUCIDAS POR  
LA APLICACION DE CASIOPEINA III**

291528

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A :**

**MVZ. JUAN CARLOS MARIN VALLEJO**

**TUTOR PRINCIPAL: FERNANDO CONSTANTINO CASAS  
COMITE TUTORAL: NURIA DE BUEN DE ARGUERO  
CARLOS VAZQUEZ PELAEZ**



**MEXICO, D. F.**

**2001.**



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:

POR DARME LA EXISTENCIA Y PERMITIRME TERMINAR UNA ETAPA MAS DE MI VIDA.

A MIS PADRES:

GRACIAS POR DARME LA VIDA; ENSEÑARME A VIVIRLA.....POR CREER SIEMPRE EN MI, Y DARME SIEMPRE SU AMOR Y CARIÑO INCONDICIONAL.

A TERE, KARLA Y GUILLERMO MARÍN RODRIGUEZ:

GRACIAS POR SU APOYO, COMPRENSIÓN Y POR SER PARTE ESENCIAL DE MI VIDA.

A MI HERMANO:

GRACIAS POR TODO.

A MAMA CHATA Y MAMI LICHA:

POR TODO LO QUE SIGNIFICAN PARA MÍ.

A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS

SR. AGUSTÍN VALLEJO MARTINEZ Y SR. CESAR MARÍN SEGURA.

## AGRADECIMIENTOS

QUIERO DAR LAS GRACIAS A UNA EXCELENTE PERSONA; LA MC. MARIA ISABEL GRACIA MORA POR SU INVALUABLE APOYO TÉCNICO, PEDAGÓGICO Y MORAL, ASÍ COMO POR TODAS SUS SUGERENCIAS QUE HAN CONTRIBUIDO A LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO. EN PARTICULAR, QUIERO AGRADECER SU ESFUERZO INCANSABLE E INTENSO TRABAJO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.....MUCHÍSIMAS GRACIAS POR DARMÉ LA OPORTUNIDAD DE COMPARTIR SU PROYECTO, CONTAGIARME DE SU OPTIMISMO Y ORIENTARME HACIA EL CAMINO DEL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO.

UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL PARA:

DR. FERNANDO CONSTANTINO CASAS.

GRACIAS POR TRASMITIRME SUS CONOCIMIENTOS, ORIENTARME EN TODO MOMENTO Y ENSEÑARME EL VERDADERO VALOR DE LA AMISTAD.

AL CONACYT POR EL OTORGAMIENTO DE LA BECA No. 125172 PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE MAESTRIA.

A LA DOCTORA LENA RUIZ POR PERMITIRME SER PARTE DE ESTE, SU GRAN PROYECTO, Y DOTAR DE LOS FONDOS PARA SU SEGUIMIENTO.

Proyecto Núm. IN201996 denominado "Caracterización de compuestos anticancerígenos", aprobado y financiado por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

A MI JURADO:

DRA. NURIA DE BUEN DE ARGUERO  
DR. FERNANDO CONSTANTINO CASAS.  
MC. ISABEL GRACIA MORA  
DR. CARLOS VÁZQUE PELAEZ  
DR. JORGE TÓRTORA P.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE HAN PADECIDO CANCER

# CONTENIDO

## PÁGINAS

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 CÁNCER	2
1.2 NEOPLASIAS HUMANAS SENSIBLES A TRATAMIENTOS QUIMIOTERAPÉUTICOS	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 TOXICIDAD DE MEDICAMENTOS ANTICANCERÍGENOS	7
2.2 CASIOPEÍNAS	10
2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN (MET) COMO HERRAMIENTA EN LA DETECCIÓN DE ALTERACIONES SUBCELULARES	14
2.4 ARTEFACTOS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	15
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	
4.1 GENERAL	17
4.2 ESPECÍFICOS	17
5. MATERIAL Y METODOS	18
5.1 ANIMALES Y METODOLOGÍA	18
5.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA HISTOLOGÍA	20
5.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	21
5.4 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	24
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	66
9. LITERATURA CITADA	68
10. ANEXOS	78

## RESUMEN

Juan Carlos Marín Vallejo. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LESIONES EN RATONES INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE CASIOPEÍNA III. (Bajo la dirección de: Dr. Fernando Constantino Casas, Dra. Nuria de Buen de Argüero y Dr. Carlos Vázquez Peláez).

La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer, no solo en el hombre sino para muchas especies más, a propiciado la búsqueda, caracterización y síntesis de nuevos compuestos con capacidad antineoplásica, entre los cuales están un nuevo grupo de ellos patentados con el nombre de Casiopeínas®\*. Estos "compuestos de coordinación" con centros metálicos han demostrado actividad citostática y antineoplásica realmente importante en el aspecto predínico-terapéutico y fueron diseñados por un grupo importante de científicos mexicanos encabezados por la Dra. Lena Ruiz A. y sintetizados en la Facultad de Química de la UNAM. El desarrollo de este tipo de fármacos se efectúa siguiendo cada una de las fases protocolarias de un proyecto general cubriendo satisfactoriamente cada una de las pruebas a estudio y en esta ocasión se realizó el análisis toxicológico, por lo cual se decidió llevar a cabo un estudio ultraestructural de las lesiones tisulares y celulares adversas por aplicación del fármaco Casiopeína® III por vía intraperitoneal. Para tal efecto se utilizaron 40 ratones hembra de la cepa NIH con un peso aproximado de  $25 \pm 3$ g y una edad promedio de 10 semanas con una variación de  $\pm 2$  días, los animales fueron divididos en 9 grupos, asignándole a cada uno una dosis y tiempo de sacrificio posinyección del fármaco experimental. Las dosis empleadas fueron 6, 8, 10, 12 mg/kg de PC, que se encuentran por debajo de su dosis letal media (DL50) determinada con anterioridad que fue de 14mg/kg y los tiempos de sacrificio fueron 45', 90', 3, 6, 12, 24, 48, 72, y 96 horas, se incluyeron 4 animales que sólo recibieron el vehículo del fármaco para considerarse como testigos. Desde el punto de vista histológico las lesiones más importantes fueron: degeneración hepática centrolobulillar, degeneración de fibras musculares cardíacas, degeneración tubular renal, congestión y edema perivascular en varios órganos, así como hemosiderosis esplénica, hiperplasia linfóide y engrosamiento de membranas basales en riñón y pulmón. A la ultraestructura, las lesiones revelan daño y alteración directa de núcleos, organelos y matriz citoplasmática con alteraciones principales tales como pérdida de la agregación de ribosomas polisomas y monosomas, dilatación de cisternas del retículo endoplásmico rugoso (RER), aumento de lípidos intracitoplasmáticos en hepatocitos, distorsión de bandas Z de fibras musculares cardíacas, aumento de la hemosiderina extracelular, disminución de filamentos intermedios, distorsión de membranas plasmáticas, megamitocondrias, pérdida de microvellosidades y podocitos renales; hiperchromatosis, picnosis y apoptosis. Estadísticamente sólo se encontraron dos lesiones significativas ( $p < 0.05$ ) que fueron: histológicamente congestión renal y subcelularmente lesiones inducidas en núcleo. Los órganos más afectados en orden de severidad son: bazo, hígado, corazón, riñón, pulmón y cerebro. Se concluye que la administración de Casiopeína® III no demostró un efecto citotóxico agudo agresivo que comprometa gravemente el parénquima de los órganos afectados, ya que en su mayoría las lesiones que se presentaron cursaron de forma ligera y de distribución focal. La presencia de lesiones en grupos celulares aislados con las dosis empleadas de este fármaco experimental son tolerables si se compara con el efecto terapéutico positivo y la calidad de vida a seguir después de su aplicación con base en estudios anteriores.

**Palabras clave:** Antineoplásico, Casiopeína®III, Toxicidad, Subcelular

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

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL CANCER

Las Neoplasias malignas o "Cáncer" son fenómenos biológicos que se suscitan en todas las especies animales y vegetales, que indican una pérdida del equilibrio interno de los organismos pluricelulares y que se consideran entidades dinicopatológicas de etiología, manifestaciones clínicas, trastornos, resultados y pronósticos diferentes.

El cáncer constituye hoy en día un problema médico de salud pública muy importante. En nuestro país ocupó en 1995 el segundo lugar como causa de mortalidad, siendo responsable del 11.2% del total de muertes ocurridas ese año; y en décadas recientes, se convirtió en una de las causas de mayor mortalidad a nivel mundial<sup>133 134</sup>. La incidencia principal se encuentra en cáncer de mama, pulmón, próstata, útero, colon y recto<sup>133 135</sup> (Figura 1).

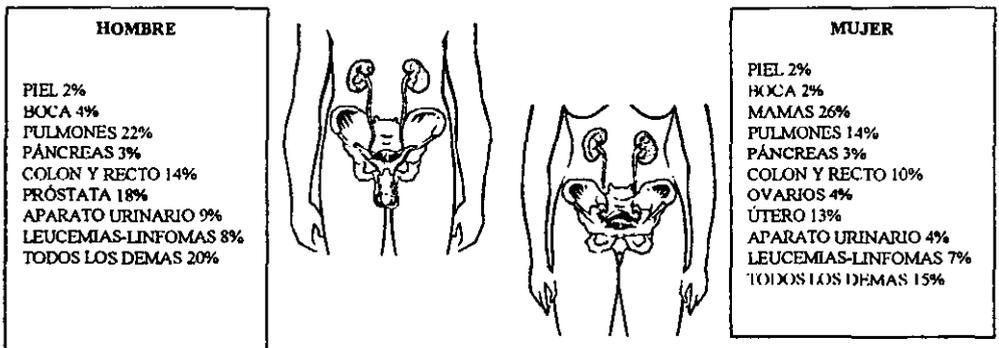


FIG.1 Porcentaje de incidencia en México de cáncer por sexo (Fuente: Secretaría de Salud. Anuario 1990.)

Este problema se agrava más en países desarrollados que en cualquier otro, con motivo de su régimen de alimentación, costumbres y normas socioculturales<sup>112</sup>, así como por la forma de vida urbana o industrial. Es por eso y otras razones, que aquellas enfermedades de tipo crónico- degenerativas como las neoplasias, son un reto muy importante para los investigadores actuales y del mañana, debido a que los mecanismos etiológicos, que por lo general son de curso genético-molecular, requieren de un conocimiento científico cada vez más complejo<sup>149</sup>.

El cáncer ha existido desde tiempos inmemorables en todas las especies de metazoarios, muestras de ello se tienen en estudios Paleontológicos y Antropológicos; en donde se deducen lesiones neoplásicas, básicamente osteosarcomas<sup>149</sup>.

Las Neoplasias malignas hacen referencia a un trastorno de la división celular que conduce a una multiplicación ilimitada de determinados grupos celulares que escapan a los controles normales del organismo. Esta reproducción desenfrenada generalmente se acompaña de una insuficiente diferenciación celular, y resulta en la producción de un tejido nuevo que ocupa espacio en el organismo y rechaza o infiltra los tejidos vecinos. Si la proliferación neoplásica se deja a su libre crecimiento y encuentra una adecuada fuente de nutrientes para las necesidades de sus componentes, invadirá los tejidos del huésped hasta el punto de perjudicar funciones vitales y terminar con la vida del individuo. Una vez establecido el trastorno neoplásico en referencia, no es necesario que persistan las condiciones que los produjeron, pues las células adquieren la propiedad de continuar la multiplicación sin ser frenadas por los mecanismos de control que ejercen su poder sobre las células normales <sup>108</sup>.

Existen muchos y diversos factores que conllevan a un cáncer, por ejemplo: agentes extrínsecos como son: ambiente, normas de conducta como el hábito de fumar tabaco, carcinogénicos químicos naturales o sintéticos como agentes alquilantes o alcaloides. Así mismo, está la radiación, la dieta y los agentes virales. Por otro lado los factores intrínsecos están representados por trastornos genéticos, hormonales o moleculares espontáneos y respuesta inmune <sup>93</sup>. Aunque en términos reales se puede decir que la evidencia de etiología cancerígena más factible está dada por los factores ambientales, sobre todo en animales expuestos a estos factores y con predisposición genética <sup>112 130</sup>.

Entre los tratamientos desarrollados contra el cáncer, existen la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia, la hormonoterapia y la hipertermia. Así mismo, muchos tratamientos innovadores se han desarrollado con técnicas poco usuales como terapia génica y transgénica, fotosensibilizadores, prevención con compuestos químicos, radiosensibilizadores y radioprotectores, así como técnicas de perfusión de linfocitos de localización tumoral y en muchos casos la combinación al mismo tiempo de varias de ellas <sup>113</sup>.

La cirugía y la radioterapia están recomendadas básicamente para ciertos tipos de cáncer de presentación localizada; mientras que la quimioterapia es apropiada para trastornos sistémicos. La radioterapia y la quimioterapia pueden ser tratamientos drásticos pero necesarios ya que por lo general tienen afectación tanto al núcleo de células tumorales como al de las normales <sup>36 65</sup>. En el presente trabajo se abarcarán solo aspectos relacionados a la quimioterapia por que la aplicación de casiopéinas entra dentro de este grupo.

En la actualidad la quimioterapia es la forma de aplicación terapéutica de más amplia diversificación y sobre todo sobresale en cuanto a estudios y descubrimientos de una gran gama de compuestos<sup>25</sup> (Cuadro 1). Se han determinado para dichos fines normas de reglamentación y de evaluación internacionales de fármacos con potencial anticancerígeno, encaminados a establecer lineamientos para poder designar a alguno de estos como efectivo para su aplicación en la práctica médica <sup>13 53</sup>.

**Cuadro 1 Principales medicamentos anticancerígenos utilizados en el humano**

<b>TIPO DE AGENTE QUIMIOTERAPÉUTICO</b>	<b>COMPUESTO</b>
<b>ANTIMETABOLITOS</b>	Metotrexato 6-mercaptopurina 6-tioguanina 5-fluorouracilo Citosina arabinósido Citarabina Pentostatina
<b>ALCALOIDES DE PLANTAS</b>	Vincristina Vinblastina Etoposido Teniposido
<b>AGENTES ALQUILANTES</b>	Ciclofosfamida Cloranbucio Mostaza nitrogenada Trietilentiofosforamida Busulfán Melfalán Dacarbasina Cisplatino Thiotepa Hexametilamina Carmustina Semustina Iomustina
<b>HORMONAS</b>	Prednisona Dietilestilbestrol
<b>ANTIBIÓTICOS</b>	Doxorubicina Bleomicina Actinomicina Daunorubicina Idarubicina Mitramicina
<b>MISCELÁNEOS</b>	L-asparaginasa, hidxiurea O,p'-DDD

Modificado de Bertram GK. Farmacología básica y clínica 1996.

El interés actual para establecer líneas de investigación enfocadas al descubrimiento, síntesis y caracterización de nuevos fármacos antineoplásicos, es poder obtener en mayor o menor grado, pero siempre significativo, una mejor actividad para dicho fin; como son: selectividad del compuesto a neoplasias específicas, a grupos tumorales de estirpes

celulares similares o en definitiva contra diferentes tipos de cáncer. Así mismo se intenta reducir efectos secundarios tóxicos, como alteraciones tisulares, celulares, daño subcelular o metabólico y reacciones cruzadas <sup>43</sup>.

Miles de drogas han sido estudiadas con fines anticancerosos y hoy se conoce mas de un centenar que tienen esta capacidad. Todas ellas, sin embargo, también afectan a las células normales aunque por lo general, con menor agresividad y ésta es su principal limitación. Pero se ha demostrado que aunque la mayoría de estos fármacos no tengan la capacidad de erradicar por completo un cáncer, si la tienen para prolongar la vida del paciente por muchos años, lo cual en términos clínicos se considera una gran ventaja.

## 1.2 NEOPLASIAS HUMANAS SENSIBLES A TRATAMIENTOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

El número de Neoplasias malignas en humanos y en animales es grande y la quimioterapia como esquema de tratamiento puede tener inconvenientes como :

- a). El margen de seguridad del nivel de toxicidad de un fármaco entre las células cancerígenas y las normales es muy corto o no existe.
  - b). Las células metastásicas que se alojan por detrás de las barreras endoteliales, son un blanco de difícil acceso para el fármaco.
  - c). Las células neoplásicas emigrantes pueden llegar a ser insensibles a los fármacos <sup>33 43 53</sup>.
  - d). El fármaco anticancerígeno puede causar mas daño sistémico a corto plazo, que el tipo de neoplasia en tratamiento.
- Así mismo la efectividad de un fármaco en contra del cáncer dependerá mucho de la estirpe celular (origen histogénico) que se esté tratando, grado de distribución y metástasis; localización, desarrollo, malignidad y complicaciones entre otros factores <sup>31 60</sup>.

Entre las principales neoplasias malignas que responden o pueden responder favorablemente a un tratamiento quimioterapéutico en humanos<sup>7 53</sup> están:

EN ADULTOS: Mieloma múltiple, micosis fungoide, fibrosarcoma, carcinomas de mama diseminados (localmente avanzados o metastásicos), coriocarcinoma uterino, carcinoma de testículo, seminoma, carcinoma microcítico de

pulmón, carcinoma *in situ* de estómago, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad de Hodgkin, sarcoma osteogénico, melanoma, macroglobulinemia de Waldstrom, tricoleucemia y linfomas.

EN NIÑOS: Tumor de Wilms, linfomas como el de Burkitt, germinomas, retinoblastoma, neuroepiteliomas, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Ewing y melanomas.

Por otro lado existen neoplasias que por localización, estirpe y agresividad no tienden a responder tan positivamente:

EN ADULTOS: Glioblastomas, neuromas, astrocitomas, adenocarcinomas hipofisarios, meningioma, hepatoma, carcinoma epidermoide de útero (endometrial), carcinomas suprarrenales, pulmonares, de mama faringe y esófago, mastocitoma, osteosarcoma, condromas, meduloblastoma entre otros.

EN NIÑOS: Linfomas, carcinomas de estómago, endometrio, cervix y císticos; adenocarcinoma pancreático, insulinoma, leucemia crónicas y otros sarcomas.

Una de las formas de cáncer mas favorecidas por el tratamiento con fármacos no importando el aspecto citotóxico es la leucemia. Existen por lo menos 7 fármacos que pueden producir remisiones en pacientes con leucemia y otros tipos de cáncer parenquimatosos por ejemplo: vincristina, metotrexate, 6-mercaptipurina, prednisona y cidofosfamida, que son efectivas contra la leucemia linfocida aguda de niños; la 6-mercaptipurina y el metil-GAG son efectivos contra la leucemia mielocítica aguda del adulto. Así mismo existen otros fármacos que se pueden combinar con tratamientos alternos para otros tipos de cáncer como la actinomicina D, el 5-fluorouracilo, tio Tepa y varias hormonas entre otros muchos, lo que demuestra que la línea farmacológica de investigación es una de las más importantes y complejas para el desarrollo de medicamentos realmente efectivos contra este padecimiento.

## 2. ANTECEDENTES DE LA QUIMIOTERAPIA ANTICANCERÍGENA.

Hace 500 años ya existía el concepto de tratamiento anticancerígeno con fármacos <sup>14</sup>. Se sabe que con este propósito se emplearon preparaciones de plata, zinc y mercurio. Sin embargo, el uso de fármacos en un tratamiento sistémico para neoplasias malignas no se documentó sino hasta 1865, cuando Lissauer administraba arseniato de potasio a pacientes leucémicos y observaba efectos positivos <sup>26</sup>. En 1898, Paul Erlich descubrió la arsefenamida, primer agente

alquilante ocupado como quimioterapia a partir de 1940 <sup>33</sup>. Pese a estos antecedentes, la quimioterapia como terapéutica oncológica se sistematizó hasta 80 años después, como una verdadera terapia antineoplásica de los años 40's con la aparición de los antagonistas del ácido fólico. Actualmente existen numerosos fármacos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, cabe hacer notar que en 1969, Rosenberg <sup>121</sup> reportó la actividad citostática de un compuesto sintético de origen inorgánico que marcó la pauta de una nueva generación de compuestos, este compuesto fue el *cis*-diamino-dicloro-platino, conocido ahora como cisplatino <sup>114</sup>.

No obstante el cisplatino y otros fármacos anticancerígenos, no resultan efectivos para el tratamiento de muchas neoplasias malignas, lo cual ha propiciado el diseño, la síntesis y la evaluación de muchos agentes que presenten un mejor mecanismo de acción, menor costo y desde luego con un menor grado de toxicidad, siendo esto último el mejor criterio de la manera en que estos compuestos son utilizados.

## 2.1 TOXICIDAD DE MEDICAMENTOS ANTICANCERÍGENOS

El conocimiento de los efectos adversos por la aplicación terapéutica de los fármacos quimioterapéuticos, conduce a tomar decisiones muy importantes para la conservación de la integridad física y de salud de un paciente. Aspectos tales como cinética celular, farmacodinámica, toxicología genética, entre otros contribuyen a entender mejor el mecanismo de acción de estos fármacos incorporando consideraciones y contraindicaciones especiales para su uso <sup>36</sup>.

A finales de la década de los setenta se conduyó que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, actúan sobre las células siguiendo una cinética de primer orden, es decir que cada fármaco destruye un porcentaje fijo de células, independientemente de la masa tumoral residual <sup>62</sup>. Podemos dividir la acción de los fármacos quimioterapéuticos según su actividad sobre la cinética celular en:

### A. AGENTES FASE ESPECÍFICOS.

Actúan sobre una sola fase del ciclo celular. El incremento en las dosis no producen una mayor respuesta, pero puede mejorar su efectividad por expansión prolongada: L-asparginasa, Antimetabolitos, Alcaloides <sup>916</sup>.

## B. AGENTES FASE NO ESPECÍFICOS.

B1 Ciclos específicos. Actúan sobre cualquier célula que se encuentre en ciclo celular activo sin importar la fase en que se encuentre <sup>7</sup>: agentes alquilantes: cisplatino, carboplatino, etc.

B2 Ciclos inespecíficos. Actúan sobre cualquier célula ya sea en estado activo o en reposo: esteroides y la bleomicina<sup>7</sup>

Los principales signos, síntomas y lesiones que produce un agente quimioterapéutico son: anorexia, vómito, diarrea, alopecia, inmunosupresión, así como degeneración hepática, renal y daño cardiovascular. Al microscopico por lo general se observan, hemorragias, congestión, edema, degeneración hidrópica, necrosis e inflamación supurativa que involucra a distintos órganos; siendo los trastornos vasculares los más frecuentes <sup>132</sup>. A nivel subcelular con análogos del cisplatino, se muestra hepatotoxicidad aguda, significativa degeneración de podocitos renales y degeneración de mitocondrias con presencia de cuerpos lamelares. Desde un punto de vista clínico y anatomopatológico, estos mecanismos de acción son evidentes por los daños directos que trastornan a la célula o grupos celulares, lo que conduce posteriormente a complicaciones mayores que comprometen a órganos o tejidos e incluso la propia vida del paciente <sup>8,30</sup>.

Entre los principales signos de toxicidad por grupos o familias de fármacos tenemos:

**AGENTES ALQUILANTES.** Ocasionan defectos en la transcripción y replicación del ADN siendo lo más susceptible las fases *G1* y *S* lo que origina efectos clínicos adversos como citotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. Como ejemplos de estos compuestos y su toxicidad están:

**MOSTAZAS NITROGENADAS** (metocloretamina, cidofofamida, ifosfamida, melfalan, clorambucil), con toxicidad principal de: Mielosupresión, náuseas, vómito, alopecia, hiperpigmentación, cistitis hemorrágica, fibrosis pulmonar, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, estomatitis, dermatitis, amenorrea, rash y hemólisis inmune<sup>48,51</sup>.

**ETILAMINAS** (thiotepa, hexametilmalamina), que pueden presentar casi la misma toxicidad que los anteriores pero además vértigo, cefalea, hipo-arreflexia, parestesias y ataxia.

ALQUILSULFONATOS, NITROSUREAS Y TRIAZINAS como: busulfán, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU, dacarbacina (DTIC) que pueden presentar aplasias medulares, ginecomastia, cataratas, hepatotoxicidad, fallo renal progresivo, neuritis óptica entre otras <sup>730</sup>.

ALCALOIDES. Son de fase específicos: vincristina, vinblastina, etoposido (VP-16), teniposido (VM-26), con toxicidad principal de neurotoxicidad leucopenia y colitis <sup>162</sup>.

ANTIBIOTICOS. (daunorrubina, idarrubina, doxorrubina, epirrubina, mitramicina, bleomicina, mitoxantrone) pueden provocar además: pericarditis, miocarditis, insuficiencia cardiaca, arritmias, estomatitis, neumonitis intersticial, eritema pruriginoso entre otros <sup>164</sup>.

ANTIMETABOLICOS. De fase específicos, actúan en su mayoría en la fase S. (metotrexato, citarabina, fludarabina, fluoracilo, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina) provocan fibrosis hepática crónica, rash mucopapilar, nefrotoxicidad, aracnoiditis aguda, encefalopatía desmielinizante y leucemia linfoblástica aguda <sup>76</sup>.

OTROS. (cisplatino, carboplatino, procarbacina, asparraginas, amsacrina, docetaxel) con toxicidad aguda y crónica con tinnitus, sordera, neuropatía periférica, insuficiencia renal, hiperestesia, azoospermia y coagulopatias <sup>164</sup>.

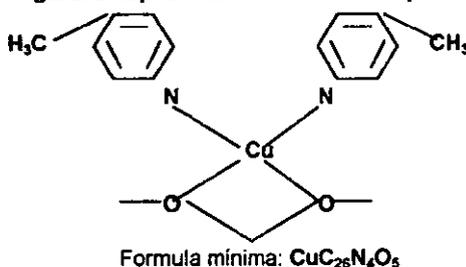
La mayoría de estos medicamentos anticancerígenos carecen de estudios correspondientes a toxicidad subcelular.

En el caso de las Casiopeínas®, se ha demostrado que pueden actuar en cualquier fase del ciclo de división celular sobre todo en la fase S. En general las células que tienen la propiedad de llevar a cabo divisiones celulares frecuentes (epitelios, células vasculares, médula ósea), se ven afectadas de manera más drástica por la toxicidad del agente quimioterapéutico, otras células parenquimales como las del riñón y el hígado principalmente, responden de manera distinta a los fármacos anticancerígenos y frecuentemente la respuesta no está relacionada con su mecanismo de acción. Las neuronas son en estos términos, las células menos afectadas porque son las que poseen mayor jerarquía biológica, cuentan con una barrera vascular selectiva (barrera hemato-encefálica) y por su crecimiento lento además de poca o nula capacidad de división celular, a pesar de lo anterior, muchos fármacos pueden desarrollar toxicosis del Sistema Nervioso Central (SNC) y en ocasiones es difícil separar efectos directos del tratamiento, con los efectos combinados del cáncer, residuos de células que mueren, mala nutrición del paciente y régimen de vida <sup>101496</sup>.

## 2.2 CASIOPEÍNAS

En México, la necesidad de importación de productos antineoplásicos y su elevado costo, marcó una de las pautas para el desarrollo de productos con actividad antineoplásica. Concientes de esta situación, un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), encabezados por la Dra. Lena Ruiz, se plantearon como objetivo la obtención de complejos de coordinación que pudieran tener actividad antineoplásica, a la fecha este grupo ha sintetizado y caracterizado alrededor de 100 compuestos <sup>58 124</sup>, entre los cuales se encuentra al fármaco que se evalúa en esta investigación y que pertenece a una familia integrada en su estructura por Cobre (II) como metal central, especie aceptora de pares electrones y quelatos diiminas (N-N), con quelatos aminoacidos donadores (O-O), recibiendo el nombre genérico de Casiopeínas® <sup>122</sup>. Estos compuestos registrados y patentados por la UNAM (Figura 2), han sido caracterizados por análisis elemental, cromatográfico, espectrofotometría de infrarrojo, UV-Vis, además de conductividad, momento magnético y estructura por rayos X <sup>33 127 128 142 143</sup>.

**Figura. 2 Aspecto molecular de Casiopeína® III**



El desarrollo de este tipo de fármacos se efectúa siguiendo el Protocolo de un Proyecto General, que incluye determinación de potencial citostático y antineoplásico *in vitro* e *in vivo*, así como evaluación farmacológica y toxicológica completa. La Casiopeína® III, que se sometió a evaluación en el presente trabajo, ha cubierto satisfactoriamente las siguientes pruebas:

1. Evaluación citostática *in vitro* sobre cultivo de linfocitos humanos sanos, con resultados comparables e incluso superiores a la mayoría de los quimioterapéuticos de uso comercial <sup>126</sup>.

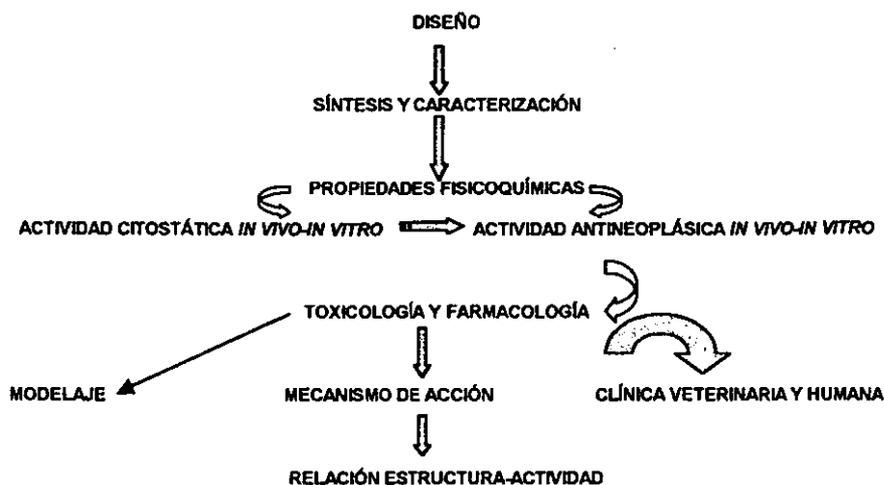
2. Evaluación antineoplásica *in vitro* empleando dones tumorales humanos de cáncer cérvico-uterino adquiridos de biopsias de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan-México), obteniendo resultados comparables a la actividad de la Mitomicina C y el Cisplatino <sup>60</sup>.
3. Evaluación citostática *in vivo* empleando el método de intercambio de cromátidas hermanas en el ratón. Este tipo de experimentos se encuentran en una fase inicial, pero los resultados que se obtengan darán indicios de su efectividad citostática, además de sus posibles mecanismos de acción <sup>125</sup>.
4. Pruebas de potencial mutagénico *in vivo* <sup>60</sup>.
5. Pruebas para evaluar mutaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*, los resultados de los ensayos mutagénicos *in vivo* e *in vitro* muestran ligera actividad mutagénica de este compuesto <sup>34</sup>.
6. Pruebas de actividad antineoplásica *in vivo* empleando los modelos tumorales murinos recomendados por el "National Cancer Institute", EUA. <sup>78</sup>, los resultados en este contexto son muy alentadores, ya que algunas Casiopeínas superan por mucho los requerimientos exigidos por los protocolos internacionales, incluso dependiendo la Casiopeína® de elección, así como el esquema de tratamiento y dosis empleada, se han logrado remisiones totales y sobrevidas que van hasta de un 200% <sup>61 72 96</sup>.
7. Interacción de estos compuestos con DNA lineal y superenrollado evaluado por medio de electroforesis en gel <sup>130</sup>.
8. Farmacocinética básica de Casiopeínas® I, II y III en ratones y ratas. Este trabajo permitió conocer la concentración del compuesto en los sitios de acción, así como la intensidad de sus efectos en función al tiempo para cada uno de los compuestos, para así poder determinar su comportamiento en el organismo. Los resultados obtenidos a partir de las muestras en ratones indican que los órganos con mayor retención de los tres compuestos son riñón y bazo <sup>66</sup>.
9. Cardiotoxicidad y Ototoxicidad. Estas pruebas se encuentran en desarrollo y han sido diseñadas para poder determinar el efecto de las Casiopeínas® en órganos vitales como el corazón y por otro lado, con base en los efectos de toxicidad que se han observado en el oído en el tratamiento con Cisplatino <sup>114</sup> se ha decidido estudiar este efecto con Casiopeínas®.

10. Ensayos toxicológicos en ratón. Se evaluó la toxicidad de Casiopeína® I y II en ratones por medio de estudios anatomohistológicos, demostrándose pocos cambios celulares con lesiones importantes en hígado y riñón como degeneración centrolobulillares pericorticales y glomerulares<sup>16 152</sup>.
11. Eficacia en el tratamiento de leucemia viral Felina y evaluación de la Toxicidad de la Casiopeína® I en perros con resultados que revelan una situación clínica favorable <sup>36</sup>.
12. Estudio de subproductos del metabolismo de las casiopeinas, en donde se ha demostrado que interactúan estrechamente con sistemas de detoxificación, sobre todo oxigenasas como citocromos P-450IA1, las flavoproteínas y otras enzimas; en donde, por lo general los agentes residuales como las fenantrolinas libres son capeces de coordinarse al hierro intracelular y los átomos de cobre por reacciones de óxido reducción, promueven la producción de radicales hidroxilo o superóxido, que dañan no solo al genoma, sino a varias estructuras celulares de las células neoplásicas y células normales <sup>12 124</sup>.

Los resultados de estos experimentos en conjunto, han propiciado el comienzo de evaluaciones toxicológicas. Así se obtuvieron Dosis letales agudas 50 (DL50) incluyendo a la Casiopeína® III en ratón, y recientemente se llevaron a cabo estudios de toxicidad en perros <sup>36</sup>. Así pues, los resultados obtenidos son alentadores para la fase clínica, por lo que se ha decidido llevar a cabo análisis histopatológicos y ultraestructurales de la acción de Casiopeína® III administrada intraperitonealmente (IP) a diferentes dosis y tiempos de sacrificio, ya que esta vía de administración debe ser utilizada antes que cualquier otra para evaluaciones preclínicas y toxicológicas de cualquier fármaco de acuerdo a la reglamentación del "Cancer Chemotherapy National Service Center" (CCNSC)<sup>57 101</sup>.

Todas estas pruebas así como las subsecuentes, están contempladas dentro de un marco de fases progresivas del Proyecto General encaminado al desarrollo de compuestos anticancerígenos de origen Mexicano, que incluye Protocolos para nuevas etapas experimentales dirigidas a toxicología, farmacología y sobre todo a histología y citología como en el caso del presente Proyecto (Figura 3).

**Figura 3. FLUJOGRAMA PARA EL SEGUIMIENTO DEL PROYECTO: "DESARROLLO DE COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS"**



### 2.3 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN (MET) COMO HERRAMIENTA EN EL DIAGNÓSTICO DE ALTERACIONES SUBCELULARES.

La ciencia médica ha desarrollado un sin número de metodologías de diagnóstico, siendo cada día más precisas y efectivas. En 1878, Ernest Abbe declara que las limitantes de un microscopio óptico en cuanto al alcance de resolución estaba determinado por la longitud de onda de la luz <sup>18</sup>, por lo que aquellas estructuras que estaban separadas por 0.2  $\mu\text{m}$  al visualizarse, se observarían como una sola. En 1929, De Broglie señaló que la longitud de onda de los electrones en movimiento es menor que el de la luz y en el mismo año, Bush, propuso que un campo electromagnético se comporta igual que una lente convexa de microscopio óptico <sup>18</sup>.

El primer microscopio electrónico de transmisión (MET) fue construido y demostrado en Berfín en 1931 por Max Knol y Ernest Riska, pero hasta 1947 los microscopios solamente tenían un poder de resolución de 0.1  $\mu\text{m}$  y no se podían visualizar estructuras biológicas porque en aquellos tiempos los cortes de especímenes eran muy gruesos. A

partir de 1950 se han podido desarrollar técnicas de fijación, inclusión y cortes de tejidos para análisis biológicos <sup>73</sup>. Así mismo, otras aportaciones importantes fueron por ejemplo que en 1962, Sabatini y col. formularon nuevos fijadores a base de aldehídos tales como glutaraldehído y acetaldehído que conservaban estructuras celulares y permitían la aplicación de técnicas histoquímicas <sup>94</sup>. En 1948, Paese y Boker al modificar un microtomo convencional, obtuvieron cortes muy finos, haciendo que fuera posible la utilización de cortes más delgados de material biológico para su aplicación en microscopía electrónica de transmisión (MET).

Por otro lado, alrededor de los años 40, surgió un cambio metodológico que propiciaba la adquisición de técnicas microscópicas para la aplicación en el campo de la medicina con fines de investigación <sup>31</sup> y de métodos adecuados para fraccionar y separar organelos por medio de ultracentrifugación <sup>32</sup>. Todo esto propició que los investigadores obtuvieran confianza en sus adelantos y se interesaran por lo que podrían encontrar a nivel ultraestructural, es por eso que en los últimos 50 años se han podido describir cada una de las "piezas anatómicas" que conforman la estructura celular, sus características y funcionalidad hasta llegar a niveles moleculares <sup>50 103</sup>.

En el caso de la Patología, en la actualidad se cuenta con revisiones y textos muy importantes, en donde se expresa la importancia de esta o de otras ramas afines muy especializadas y modernas como la Patología molecular o especial, que utilizan técnicas independientes de microscopía convencional (óptica), como microscopio electrónico de barrido (MEB), rayos X, espectroscopía atómica entre otros, dando como resultado que se formen compendios y libros completos de colecciones que en el caso del MET surgen como revisiones de microfotografías de estructuras con morfología alterada que contribuyen al enriquecimiento del conocimiento en esta área <sup>103 110 123</sup>.

## 2.4 ARTEFACTOS (ARTIFICIOS) EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Para una buena observación e interpretación de imágenes en microscopía electrónica, se tiene que ser cuidadoso y seguir un protocolo adecuado de procesamiento de las muestras; los artefactos en MET son todas aquellas anomalías físicas, químicas, mecánicas o de cualquier otra índole, que durante el procesamiento de las muestras se involucran como detalles morfológicos anexos (artificiales), que por lo general dan como resultado una visualización errónea de los cortes obtenidos para fines diagnósticos <sup>121</sup>. Este tipo de agregados su pueden presentar como sombras,

sombras, raspaduras, precipitados, variaciones de continuidad, sobreagrupaciones celulares y demás. En la mayoría de los casos los artificios se presentan sobre todo en las primeras etapas del procesamiento de muestras, y más aun durante la fijación de los tejidos; fijadores caducos o en concentraciones y volúmenes irregulares así como muestras de gran tamaño o con un estado de *rigor mortis* avanzado, dan como consecuencia la visualización de estados degenerativos celulares en grandes cantidades e incluso necrosis de secciones completas, en especial en las áreas correspondientes al centro de la muestra en donde es menor el efecto de los conservadores <sup>167</sup>. Otras maneras importantes de producir artificios es durante el procedimiento de la deshidratación, sobre todo si no se toman en cuenta los tiempos requeridos para el tipo o los tipos de tejidos a trabajar; lo cual propicia una visualización con variaciones de tamaño y morfología de células, comparado con el natural a la hora de fijarlas <sup>73</sup>. De la misma manera se pueden encontrar variaciones morfológicas debidas a los cortes ultrafinos que se realizan, en donde cuchillas desgastadas o ultramicrotomos mal ajustados dan como resultado cortes exageradamente gruesos que distorsionan la imagen o que presentan raspaduras que se traducen al ME como áreas continuas de distorsión celular con desaparición del patrón de agregación normal parénquima-estroma <sup>28</sup>. En el caso de las tinciones que se aplican, el reconocimiento de reactivos especiales para ciertos tejidos, ayuda a que no se exagere una precipitación de sales fuera de lo común, lo que puede tener como consecuencia en imagen la interpretación de estructuras anexas como inclusiones y nucleolos prominentes. Así mismo cuestiones tan sutiles como la apreciación fotográfica, una mala revelación de negativos, el desacople de la fuente de electrones del microscopio, rejillas desgastadas y muchas más pueden intervenir como factor de modificación visual; y es por ello que todos estos factores tienen que tomarse en cuenta para seguir un protocolo acorde a los tipos de tejidos que se procesarán utilizando solo reactivos con grado ME y las técnicas adecuadas para la totalidad del procesamiento de las muestras en fines diagnósticos.

El presente trabajo, como se señaló, se enfoca en la identificación de alteraciones celulares y la participación de la Casiopeína® III en las mismas, determinando los daños que pudieran ser responsables de alteraciones mayores tanto histológicas, funcionales o sistémicas generales, sin cometer errores de interpretación por artificios principalmente como cambios degenerativos independientes de la acción del compuesto experimental.

Se pretende con esto, dar un seguimiento acorde a los protocolos establecidos por anatonopatólogos experimentales de todo el mundo, para llevar un orden sistémico-estructural a un nivel celular o subcelular, clasificando los trastornos por áreas de afección por ejemplo trastornos de retículo endoplásmico rugoso (R.E.R.), alteraciones de membranas celulares, alteraciones del aparato de Golgi e inclusiones., basándose en términos convencionales de la Patología para la descripción de daños en estructuras finas celulares o ultraestructurales, eligiendo al ratón como modelo en este tipo de estudios preclínicos principalmente en medicina humana <sup>13</sup>. Para tales efectos se administraron varias dosis del fármaco (Casiopéina® III) con base en su DL50 en ratones por vía Intraperitoneal, por ser esta la ruta terapéutica más común para efectos antioncogénicos en sus fases preclínicas iniciales <sup>13,59</sup>, recomendada además por el Instituto Nacional de Cancerología para estudios toxicológicos como parte de aplicaciones previas a su uso experimental en humanos, con el fin de abordar la fase clínica I en dicha Institución (Proyecto de colaboración directa de esta dependencia y la Facultad de Química de la UNAM).

### 3. HIPÓTESIS

La administración experimental de Casiopeína®III, determina cambios morfológicos celulares y subcelulares de origen tóxico en distintos órganos, relacionados con trastornos degenerativos, necróticos o apoptóticos; al aplicarse en ratones dicho complejo de coordinación, por vía Intraperitoneal en diferentes intervalos de dosis (2mg por debajo de la Dosis letal media "DL50").

### 4. OBJETIVOS

#### *4.1 Objetivo General*

Detectar los principales sitios blanco de interacción de la Casiopeína® III a nivel celular y subcelular, determinando cuál o cuáles tejidos u organelos celulares resultan afectados por la aplicación experimental del fármaco en ratones NIH.

#### *4.2 Objetivos específicos*

- 4.2.1. Detectar y catalogar las alteraciones celulares y ultraestructurales relacionadas con efecto citotóxico de la Casiopeína® III.
- 4.2.2. Diferenciar lesiones comunes como degeneración y/o necrosis o bien estimulación de mecanismos apoptóticos por degradación, activación e interacción con el fármaco.
- 4.2.3. Categorizar el nivel e importancia de la lesión o las lesiones de los diferentes tejidos y organelos citoplasmáticos y dividir por estructuras de interés (mitocondria, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, nucleolo, nucleolo, lisosomas, vacuolas.) para consideraciones posteriores del fármaco.
- 4.2.4. Contribuir al historial toxicológico y farmacológico del producto para intuir o descartar posible efectos secundarios o contraindicaciones en su aplicación, evaluando el daño que los compuestos experimentales puedan causar en el organismo.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 ANIMALES Y METODOLOGÍA

Se seleccionaron 40 ratones hembra clínicamente sanos de la cepa exogámica NIH, con un peso de  $25 \pm 3$  g y una edad promedio de 10 semanas con una variación de  $\pm 2$  días. Los ratones, fueron numerados por medio de muescas en las orejas. Los animales utilizados se alojaron en jaulas de policarbonato tipo caja de zapato en grupos de 4, que ofrecen un área de piso de  $364 \text{ cm}^2$  y protegidos con filtros de poliéster tipo Kraft. Se proporcionó *ad libitum*, una dieta especial para roedores (alimento peleteado comercial de importación), y agua filtrada por ósmosis inversa y acidificada hasta alcanzar un pH de 2.5<sup>32 49 64 98</sup>.

Los animales permanecieron en áreas de la Unidad de Experimentación Animal (UEA) de la Facultad de Química de la UNAM, que cuenta con instalaciones especiales para este propósito, ventiladas mediante extracción forzada de aire y filtrado por sistemas HEPA con  $3 \mu\text{m}$  de diámetro de filtro y 18 recambios del volumen total de aire por hora. Los animales se mantuvieron a una temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ <sup>97</sup>, con una humedad relativa 50-60% y ciclos de luz y oscuridad de 12/12 horas. Los ratones se repartieron aleatoriamente en 9 grupos de acuerdo a los tiempos de sacrificio que fueron de: 45 min, 90 min, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h posinyección, eligiéndose 4 dosis seriadas con intervalos de 2 mg entre cada una que están por debajo de la DL50 (14 mg/kg) calculada con anterioridad de acuerdo al método de Lithfield y Wilcoxon<sup>59 89 98</sup>, siendo las dosis aplicadas de 6, 8, 10 y 12 mg/kg por vía intraperitoneal. Se formó un grupo control de 4 animales quedando conformados los grupos como se aprecian en el cuadro 2.

Cuadro 2. GRUPOS DE RATONES CONFORMADOS POR DOSIS Y TIEMPOS DE SACRIFICIO POSINOCULACION DE CASIOPEINA III.

GRUPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TIEMPO	45 MIN.	90 MIN.	3 h.	6 h.	12 h.	24 h	48 h.	72 h.	96 h.	CONTROL
6 mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8 mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 mg/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12 m/kg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Hecha la asignación de dosis/tiempos de sacrificio se procedió a la preparación de Casiopeina® III haciendo los cálculos correspondientes, obteniendo una concentración de 0.72 mg en 1 ml. Una vez obtenida la cantidad en miligramos del compuesto, se pesaron los animales para asignarles su dosis correspondiente en mg/kg de peso corporal. Posteriormente se solubilizó la Casiopeina® utilizando cloruro de sodio al 0.9 % como solución fisiológica más compatible debido a que en este medio conserva su concentración con mayor estabilidad y un mejor coeficiente de extinción <sup>100</sup>, una vez disuelta se aforó con la misma solución hasta obtener un volumen total de 50ml a un ph final de 7.2 y concentración molar de 2.4457E-3m/l; de tal forma que se preparo *in situ* antes de su administración para evitar degeneración por el vehículo al paso del tiempo <sup>42-44</sup>.

Se eligieron animales sin implantes tumorales o con el padecimiento cancerígeno, para descartar posibles alteraciones provocadas por el proceso tumoral en su reacción con el compuesto experimental; como restos celulares de procesos degenerativos en la neoplasia, citocinas liberadas por el mismo proceso, régimen terapéutico y posible síndrome paraneoplásico. Al grupo testigo o sin tratamiento, se les administró solamente el diluyente.

Los animales fueron sacrificados humanitariamente al término de los tiempos asignados por medio de dislocación cervical. Posteriormente se realizó la necropsia y se disecaron órganos blanco de mayor importancia en relación a estudios previos, tales como bazo, pulmón, riñón, hígado, cerebro y miocardio <sup>56 116 152</sup>. Para este fin los ratones se colocaron en posición decúbito dorsal sobre una charola de disección y se sostuvieron fijando sus extremidades con alfileres, se humedeció la región ventral con etanol al 96% iniciando necropsia con la apertura de las cavidades

abdominal, torácica y craneal para la toma de órganos <sup>152</sup>, de cada ratón se obtuvieron muestras por órgano para su procesamiento y examen histopatológico y para MET.

## 5.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA HISTOLOGÍA

Se tomaron muestras de los ratones de todos los grupos para el procesamiento y su examen con técnicas de histopatología, con el fin de apreciar las áreas o regiones importantes de lesión y dirigir con mayor interés el estudio de ellas mediante un examen de Microscopía electrónica de transmisión, caracterizando las lesiones más significativas a este nivel.

Las muestras obtenidas en esta parte del experimento, fueron: cerebro, cerebelo, bazo, riñón, hígado, corazón y pulmón debido a que en estudios histopatológicos anteriores con otras casiopéptinas casi idénticas molecularmente mostraron mayor sensibilidad citotóxica <sup>116 152</sup>; tales órganos se fijaron en formalina 1:10 amortiguada con fosfatos a un pH de 7.2-7.4, por un tiempo no mayor a 72h. Una vez fijados los órganos de interés se procesaron de forma automática en histoquinet, posteriormente se procedió a la inclusión en parafina de las muestras para llegar a tener cortes de 5µm <sup>53 107</sup>; se realizó en cada muestra la tinción habitual de trabajo (H-E) y una vez terminadas las laminillas se examinaron por medio de Microscopía fotónica <sup>26 62 94 151</sup>.

Para llevar a cabo un seguimiento de caracterización en las posibles lesiones a presentarse y para efectos de evaluación cualitativa se asignarán grados de lesión; en este caso leve para el 5 al 25% del total de cinco objetivos visualizados aleatoriamente, moderado para el 25 al 50% y severo para más del 50%. Además se asignó la distribución de la lesión como Focal o multifocal con solo alguna(s) áreas bien delimitadas del órgano afectado; o Difuso, con más del 70% del órgano afectado.

### 5.3 PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La mitad de las muestras obtenidas de los órganos para histología de todos los ratones, se procesaron para MET, teniendo mayor interés la búsqueda de lesiones en aquellas muestras que en el examen Histopatológico presentaban lesiones importantes.

#### FIJACIÓN

Para la fijación de muestras en MET se obtuvieron muestras representativas de los diferentes órganos antes señalados durante la necropsia, después de haberse perfundido *in situ* con glutaraldehído al 3% y amortiguador de fosfatos pH 7.4 como fijador mediante inducción directa con jeringa desechable de 50ml a presión continua. Las piezas tomadas se cortaron a un espesor no mayor a 5 mm, se manipularon sobre una gota de fijador y posteriormente se cortaron con hojas de bisturí (dentro de la gota), fragmentos de aproximadamente 0.5 mm de espesor o menos.

Se seleccionaron unos 10 a 20 fragmentos de tejido por muestra y se colocaron en tubos de ensaye (para cada órgano o tejido) con 2 ó 3 ml de glutaraldehído al 3%, utilizando un tiempo de fijación de 24 horas.

#### LAVADO

Para el lavado de muestras se utilizó solución amortiguadora de fosfatos de 2 a 3 veces para eliminar el fijador primario, y con agua destilada 2 a 3 veces para eliminar el exceso de la solución amortiguadora.

#### POSFIJACIÓN

La posfijación se realizó con tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ) con solución amortiguadora de fosfatos en proporción al 1% durante 1 a 2 horas a 4°C dejando las muestras en refrigeración. A continuación se lavaron las muestras con solución amortiguadora (un total de 3 lavados en 10 minutos).

#### DESHIDRATACIÓN

Para la deshidratación de los tejidos se utilizaron alcoholes etílicos graduales desde el 50% al absoluto con un tiempo de 5 a 10 minutos cada uno:

1. Alcohol al 50% ..... 5 minutos
2. Alcohol al 60% ..... 5 minutos
3. Alcohol al 70% ..... 5 minutos

4.	Alcohol al 80%	.....	5 minutos
5.	Alcohol al 90%	.....	5 minutos
6.	Alcohol al 96%	.....	5 minutos
7.	Alcohol al 100%	.....	3 cambios de 10-15 minutos cada uno.

Dependiendo del órgano, se necesitaron diferentes tiempos de deshidratación en cada cambio de alcohol, utilizando en algunos casos acetonas como en cerebro y pulmón, después se realizaron 2 cambios de óxido de propileno de 10 minutos cada uno.

#### PREINCLUSIÓN

En esta fase, se mezcló la primera vez uno a uno óxido de propileno y resina epón, dejando el tejido en esta solución durante 1 hora en el tubo tapado y a temperatura ambiente en campana de desecación. Después se hizo una mezcla de óxido de propileno y resina epón 1:3 respectivamente durante una hora también con el tubo tapado, de esta manera la mezcla pudo permanecer más de 24 horas.

#### INCLUSIÓN

En la inclusión, se sacaron los fragmentos para secarse en papel filtro, mas tarde se colocaron en las cápsulas con una gota de solución final de resina epón, identificando las mismas, orientando los fragmentos dentro en su extremo apical. Se rellenaron las cápsulas con resina epón 812 con dos cambios con resina epón 812 de 60 minutos y posteriormente se dejaron polimerizando en la estufa por 24 horas.

#### CORTE Y VISUALIZACIÓN

Las cápsulas se cortaron en forma de pirámide para muestras semifinas que se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes definitivos se procesaron en el ultramicrotomo y se tiñieron con acetato de uranilo al 4% con citrato de plomo. Estas se llevaron a visualización y revisión al microscopio electrónico de transmisión de manera aleatoria, tomando 10 campos visuales para búsqueda de lesiones por cada fragmento de muestra procesada.

Las imágenes de interés fueron procesadas para negativos de 32 mm (microfotografía), seleccionando y revelando las más representativas.

Para evaluar trastornos subcelulares se interpretaron éstos tomando en cuenta anomalías en membrana celular, trastornos compartimentales, patología de ribosomas, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso (R.E.R), retículo endoplásmico liso (R.E.L), aparato de Golgi, vacuolas y lisosomas.

Para llevar a cabo un seguimiento de caracterización de las lesiones ultraestructurales y para efectos de evaluación cualitativa se asignaron cambios numéricos en estructuras como Ausencia, disminución, aumento, agregación; cambios morfológicos en estructuras como Hiperplasia-gigantismo, dilatación, separación de crestas mitocondriales, fragmentación, pérdida de la agregación de ribosomas del RER, núcleos fusiformes, dentados, refráctiles, contracción, condensación heterocromática, nucleolos prominentes, dispersión de cromatina y grado de estos cambios como Leve (5-25% de células afectadas en los 10 campos visuales), moderado(25-50%) y severo (de más del 50%); en donde un campo visual correspondería en estos términos a la apreciación total de una área dentro de la célula.

#### 5.4 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Con los datos obtenidos de las frecuencias de lesiones presentadas de todas las muestras se despejaron tablas de contingencia a partir de la base de datos del Programa Excel Microsoft® versión 2000., para PC. Los resultados obtenidos de las lesiones microscópicas al microscopio fotónico y subcelulares, fueron analizados por medio del método estadístico de Ji cuadrada y comparados mediante la prueba exacta de Fisher <sup>113</sup>.

Se realizó una prueba estadística (Ji cuadrada) y el programa CAT-MOD del paquete SAS/STAT® 1991, para determinar si había algún efecto de la casiopeína sobre las lesiones microscópicas y ultramicroscópicas, en órganos y organelos respectivamente con respecto a la dosis utilizada y el tiempo de sacrificio del animal.

\*Microsoft Excel 2000; (9.8.2812). Copyright © 1983-1999; Microsoft Corporation.

\*\*STATISTICA SAS/SAT For Windows, Release 5.1 '97 edition, Copyright © 1984-1997; by AtalSoft, Inc.

## 6. RESULTADOS

La administración de Casiopeína® III por vía iP en los ratones, tuvo como consecuencia la presentación de cuadros clínicos con manifestaciones tóxicas cardiovasculares y nerviosas; así como cambios relacionados con alteraciones anormales de estructuras a diferentes niveles. Durante el transcurso de la observación clínica, los principales signos que se presentaron dentro de las primeras 24h a diferentes tiempos posinoculación del compuesto experimental fueron: polipnea, taquicardia, agitación, midriasis, postración, somnolencia con pasividad extrema y en varios animales se manifestó falta de locomoción (Cuadro 3).

*Cuadro 3. Principales signos clínicos observados en los ratones durante las primeras 24 horas posinoculación de Casiopeína® III via iP.*

<i>Tiempo posinoculación</i>	<i>Signos clínicos</i>	<i>No. de Observaciones</i>	<i>Observaciones en controles</i>
10-60seg	ataxia debilidad polipnea dísnea convulsiones	18/36 6/36 12/36 12/36 8/36	2/4
1-5min	midriasis epistaxis somnolencia/depresión postración	6/36 4/36 10/36 9/36	1/4 1/4
5-15min	hipotermia hiperestesia depresión taquicardia	6/36 3/36 5/36 21/36	
15-1h	midriasis somnolencia fatiga	2/36 7/36 9/36	
1-12h	polipnea postración hipotermia pasividad	10/36 5/36 3/36 10/36	
12-24h	somnolencia pasividad anorexia hematuria disenteria	3/36 3/36 9/36 4/36 2/36	

La inducción y distribución rápida del complejo de coordinación condujo a la aparición de estas manifestaciones tempranas sobre todo en los primeros 15 minutos y en animales tratados con dosis mayores de 8 mg/kg (Cuadro 4).

Algunos animales manifestaron ataxia, depresión, convulsiones con tendencia a hacinarse en las esquinas de las jaulas; sin embargo al administrar solo el vehículo en los animales control (0.5ml de agua destilada) por la misma vía, estos no mostraron semiología anormal, salvo ligera agitación con aumento de frecuencias respiratoria y cardiaca, estando activos todo el tiempo y con un consumo de alimento normal. La mayor parte de los signos clínicos presentados se observaron durante las primeras 12h, posteriormente fueron disminuyendo su intensidad y frecuencia de presentación propiciando una recuperación gradual en la actividad psicomotora de todos los animales tratados.

La mayor parte de los signos clínicos observados, tuvieron origen neurológico con notoria descompensación cardiorrespiratoria debido a las manifestaciones clínicas principales de ataxia, convulsiones, taquicardia y polipnea respiratoria consecutiva.

Cuadro 4. Principales signos clínicos observados a diferentes dosis y tiempos de sacrificio después de la administración de Casiopeina® III vía IP

TIEMPO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
45 min.	Ataxia, convulsiones, polipnea, debilidad	Convulsiones, midriasis, somnolencia	Diseña, taquicardia, Depresión, somnolencia	Disnea, taquicardia, ataxia, depresión
90 min	Ataxia, disnea, debilidad, Postración	Ataxia, polipnea, depresión	Ataxia, convulsiones, somnolencia	Somnolencia, Disnea, postración Hipotermia
3 hrs	Ataxia, taquicardia, polipnea, debilidad	Somnolencia, Debilidad, cansancio	Ataxia, epistaxis, disnea, depresión	Ataxia, taquicardia, Midriasis, somnolencia
6 hrs	Taquicardia, ataxia, polipnea, depresión	Hiperestesia, epistaxis, taquicardia, hipotermia	Taquicardia, convulsiones, polipnea	Hiperestesia, postración, hipotermia, anorexia
12 hrs	Debilidad, disnea, ataxia	Taquicardia, ataxia, depresión, hiperestesia	Taquicardia, polipnea, ataxia, convulsiones	Taquicardia, depresión, anorexia, postración
24 hrs	Disnea, debilidad, postración	Midriasis, depresión, Ataxia	Ataxia, hiperestesia, Ataxia, depresión	Postración, epistaxis, somnolencia, disnea
48 hrs	Ataxia, depresión, diseña	Hiperestesia, polipnea, hipotermia	Taquicardia, postración, anorexia, somnolencia, debilidad	Taquicardia, postración, depresión, anorexia
72 hrs	Anorexia, depresión, taquicardia, disnea, midriasis	Taquicardia, anorexia, depresión, ataxia, disnea,	Debilidad, depresión, hipotermia, anorexia	Somnolencia, postración, hipotermia, anorexia
96 hrs	Ataxia, disnea, taquicardia	Hiperestesia, polipnea, anorexia, postración	Taquicardia, convulsiones, midriasis, ataxia	Ataxia, convulsiones, depresión, anorexia
Control	Inquietud, taquicardia	Somnolencia	—	Taquicardia

## LESIONES MACROSCÓPICAS

A la necropsia, el conjunto de lesiones macroscópicas observadas, se limitaron prácticamente a órganos parenquimatosos y serosas de cavidades torácica y abdominal (Cuadro 5).

En la inspección externa, piel y faneras no presentaron lesión aparente, el tejido celular subcutáneo de algunos animales presentó edemas aislados con masas musculares adjuntas íntegras.

En el aparato gastrointestinal no se observaron alteraciones macroscópicas, salvo equimosis aisladas, en solo dos casos, en la mucosa de la primera porción de intestino delgado, el hígado de algunos animales presentó áreas rojo oscuro bien delimitadas sobre todo en las áreas de afluente portal además de moderada hepatomegalia. En el aparato respiratorio se observó en seis casos congestión difusa de lóbulos pulmonares con integridad de vías aéreas superiores. En órganos genitourinarios, solo se evidenció ligera congestión de la superficie cortical renal.

Cuadro 5. Lesiones macroscópicas de mayor relevancia\* originadas por la aplicación de Casiopeína® III.

<i>Lesión</i>	<i>Observaciones</i>	<i>Controles</i>
Ascitis	13/36	2/4
Hidrotórax	14/36	0/4
Hidropericardio	8/36	0/4
Congestión general	5/36	0/4
Edema subcutáneo	6/36	0/4
Isquemia periférica	5/36	0/4
Esplenomegalia	7/36	0/4
Hepatomegalia	8/36	0/4
Congestión pulmonar	5/36	0/4

\*Al hacer la recopilación del total de frecuencias con que se presentan cada una de estas lesiones, solo se toman a consideración o como importantes las lesiones con un mínimo de 5 observaciones.

En la inspección de sistema cardiovascular se encontraron lesiones tales como: pericarditis serosa, congestión general y esplenomegalia; así como algunos animales con moderada isquemia periférica. Los daños en serosas fueron más notorios, cerca de un 40% de los animales presentaron ascitis y peritonitis serosa; hidrotórax, pleuritis

serosa e hidropericardio sin compromiso de membranas sinoviales en las articulaciones (Cuadro 6). No hubo evidencia de lesión a nivel macroscópico tanto en sistema nervioso central como en periférico.

Cuadro 6. Lesiones macroscópicas observadas en los ratones después de la administración de Casiopeína® III vía IP.

TIEMPO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
45 min	Ligera congestión pulmonar renal	Hidrotórax, hidropericardio	Ascitis, hepatomegalia	Ascitis
90 min	Edema subcutáneo	Hidropericardio	Hidrotórax	Congestión generalizada, hepatomegalia
3 hr	Congestión esplénica	Esplenomegalia, edema subcutáneo	Ascitis	Hepatomegalia
6 hr	Ascitis	Edema generalizado	Hidrotórax, hidropericardio	Isquemia generalizada
12 hr	Esplenomegalia, hidropericardio	Hidrotórax	Ascitis, congestión general	Hepatomegalia, esplenomegalia
24 hr	Ascitis, esplenomegalia	Ascitis	Esplenomegalia, edema subcutáneo	Edema subcutáneo, Ascitis
48 hr	Pericarditis	Hidropericardio	Hidropericardio, esplenomegalia	Hepatomegalia congestión pulmonar
72 hr	Ascitis, hidrotórax	Hidrotórax, edema subcutáneo	Ascitis, isquemia generalizada, hepatomegalia	Esplenomegalia, hepatomegalia, ascitis
96 hr	Congestión pulmonar, hidropericardio	Congestión general, hidropericardio	Ascitis, hidrotórax	Hepatomegalia ligera, ascitis
Control	---	---	---	Ligero edema subcutáneo

En el caso de los 4 animales controles, las lesiones macroscópicas encontradas, corresponden solo a la acción traumática e irritativa del vehículo en su aplicación como: Ascitis, peritonitis, congestión abdominal y hemorragias localizadas en los puntos de aplicación del vehículo.

#### LESIONES MICROSCÓPICAS

En el examen histopatológico se revizó el hígado, corazón, cerebro, bazo, riñón y pulmón. La mayoría de las lesiones se presentaron siguiendo una distribución de localizada a multifocal y en grado leve (Cuadro 7).

Cuadro 7. Hallazgos microscópicos de mayor frecuencia en los 36 animales tratados con Casiopeína® III y grupo control.

<i>Lesión microscópica</i>	<i>No. de observaciones</i>	<i>Animales control</i>
Degeneración hidrópica hepática centrolobulillar	22/36	0/4
Degeneración de fibras musculares cardíacas (degeneración sarcolémica)	10/36	•
Congestión paracortical renal	10/36	•
Congestión esplénica	17/36	•
Infiltrado linfático perivascular hepático	5/36	•
Hemosiderosis esplénica	7/36	•
Megacariocitosis esplénica	12/36	•
Hiperplasia linfoide y de ganglios hemaes	11/36	•
Edema intersticial (interalveolar septal)	9/36	•
Congestión epicárdica	16/36	•
Degeneración tubular renal (paracortical)	7/36	•
Congestión cerebral	5/36	•
Edema perivascular cerebral	10/36	•
Tumefacción cerebral	9/36	•

El hígado de la mayoría de los ratones tratados con la Casiopeína® III presentó una lesión característica correspondiente a degeneración hidrópica centrolobulillar (Figura 4), algunas veces con áreas de afección cortical con ligero edema y congestión. En el corazón se observó degeneración de fibras musculares cardíacas (Figura 5) y en algunos casos miocarditis con congestión moderada y edema intersticial además de ligera pericarditis, sin afección en ninguno de los casos del endocardio. En el caso del pulmón se detectó la presencia de pequeñas acumulaciones de material proteico y heritrocitos en espacios alveolares y en algunos casos áreas de neumonía intersticial; las paredes alveolares de una gran parte de los animales se encontraron atelectásicos total o parcialmente colapsados y engrosados, sobre todo en lóbulos caudales e intermedios. En algunas áreas pulmonares, los vasos sanguíneos de mediano calibre presentaron acúmulos de linfocitos y células plasmáticas (hiperplasia linfoide) y focos aislados de congestión (Figura 6), sobre todo en aquellos animales que se sacrificaron a las 48, 72, y 96 h posinoculación con dosis de 10 y 12mg/kg.

En riñón, se identificaron áreas de degeneración tubular proximal, distal y paracortical con zonas de necrosis (Figura 7), con áreas de infiltración linfoide, congestión difusa y edema intersticial; sin compromiso total del parénquima, pero con afectación principal en las zonas de afuecia vascular glomérular.

En cerebro, la única lesión que se encontró fue edema perivascular focal de apariencia mínima con muy pocas áreas de congestión (Figura 8).

El bazo fue uno de los órganos con más cambios histológicos, observándose áreas con un aumento considerable de pigmento hemático (hemosiderosis) y moderada congestión con atrofia de nódulos linfoides (Figura 9); además de aumento del número de megacariocitos de localización paracortical en relación al parénquima-estroma normal de animales sanos determinado por el número promedio de este tipo de células que se presentan en 10 campos visuales (Figura 10).

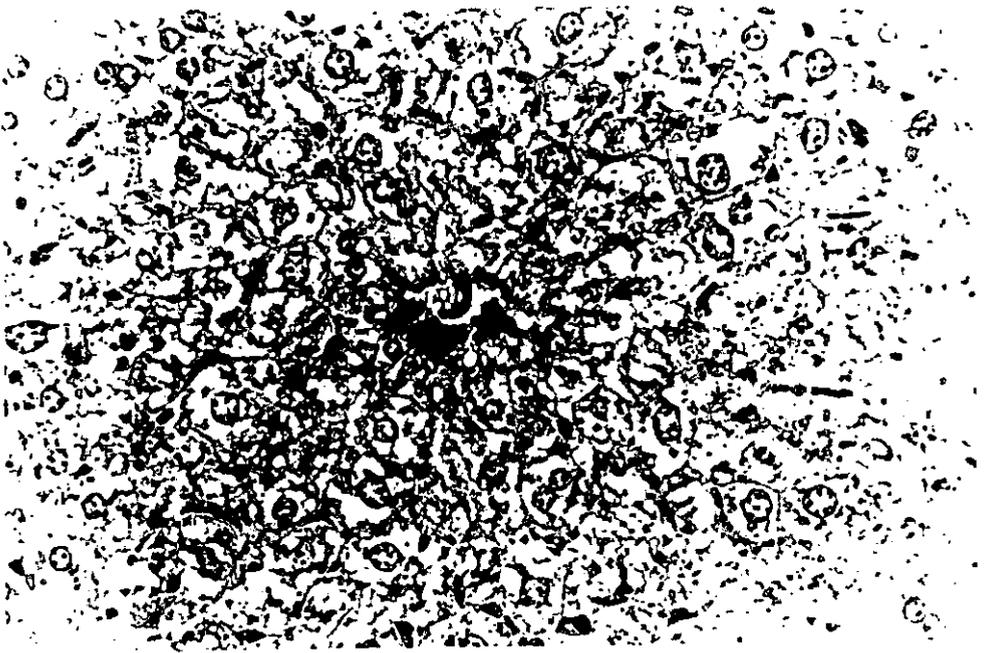


Figura 4.- Sección de hígado en el cual se aprecia degeneración hidrópica centrolobulillar, así como ligero edema intersticial. (H.E.40X)



Figura 5.- Sección de miocardio en el cual se observa degeneración de fibras musculares cardiacas, así como ligera congestión (H.E.100X)

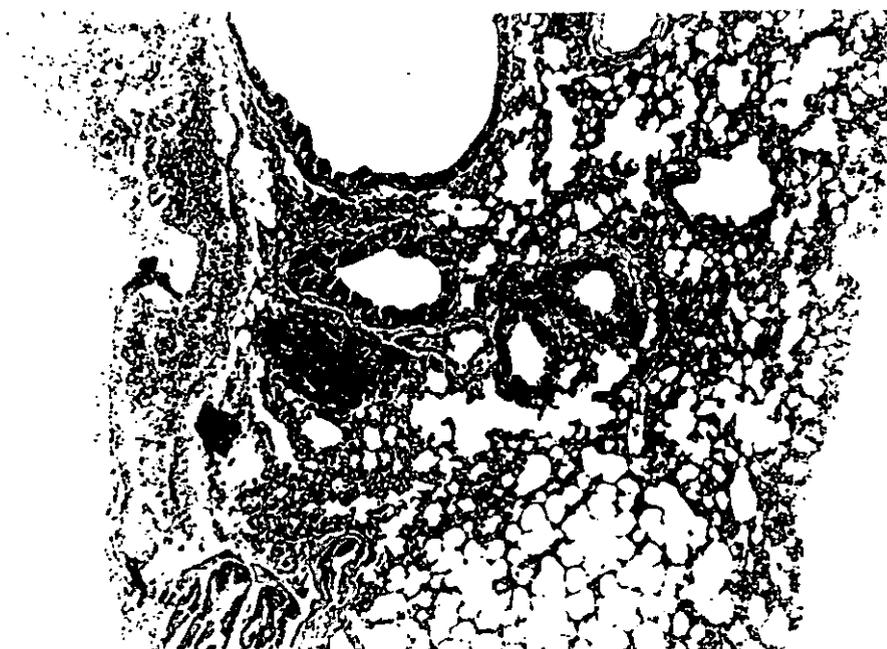


Figura 6.- Sección de pulmón en el cual se observa edema intersticial con engrosamiento de paredes alveolares e hiperplasia linfoide, así como ligera congestión. (H.E.40X)

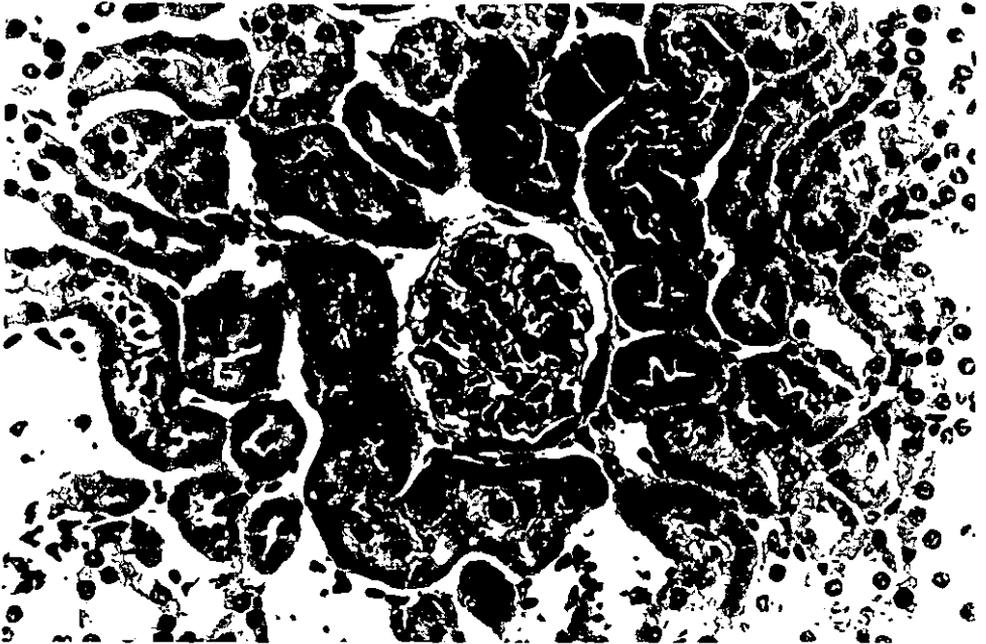


Figura 7.-Sección de riñón en el cual se observa degeneración de túbulos proximales y ligero edema intersticial. (H.E.40X)

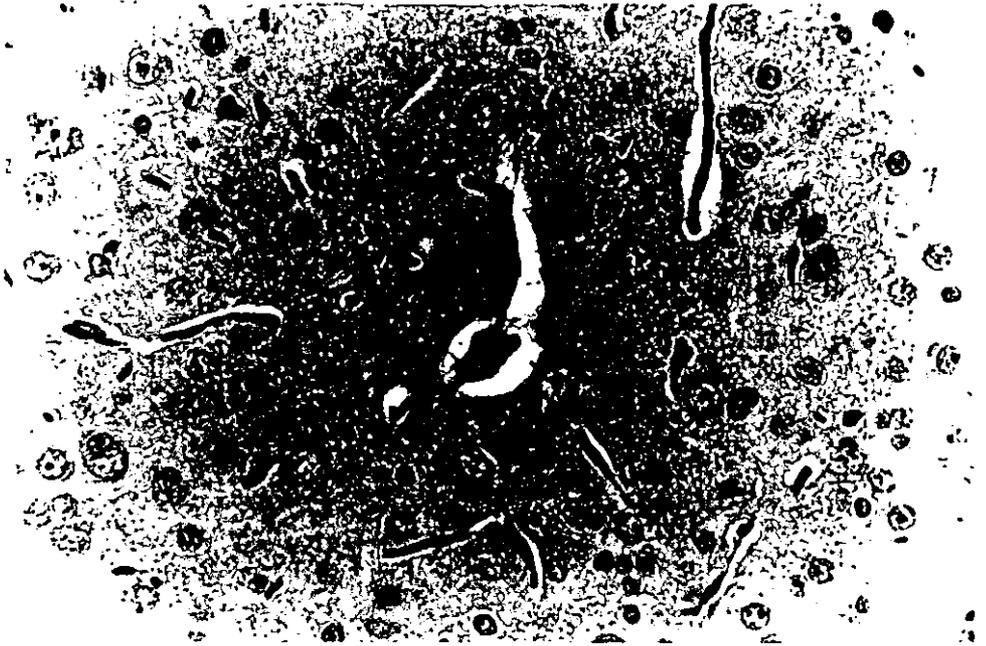


Figura 8.- Sección de encéfalo en el cual se observa edema perivascular. (H.E.100X)

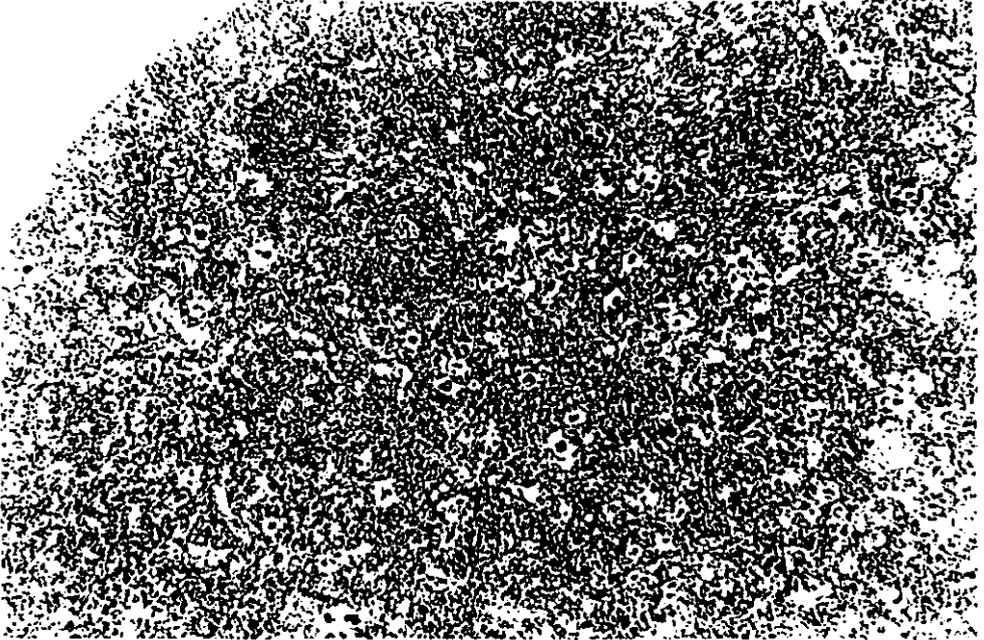


Figura 9.- Sección de bazo en el cual se aprecia ligera atrofia de nódulos linfoides y abundante hemosiderina. (H.E.25X)

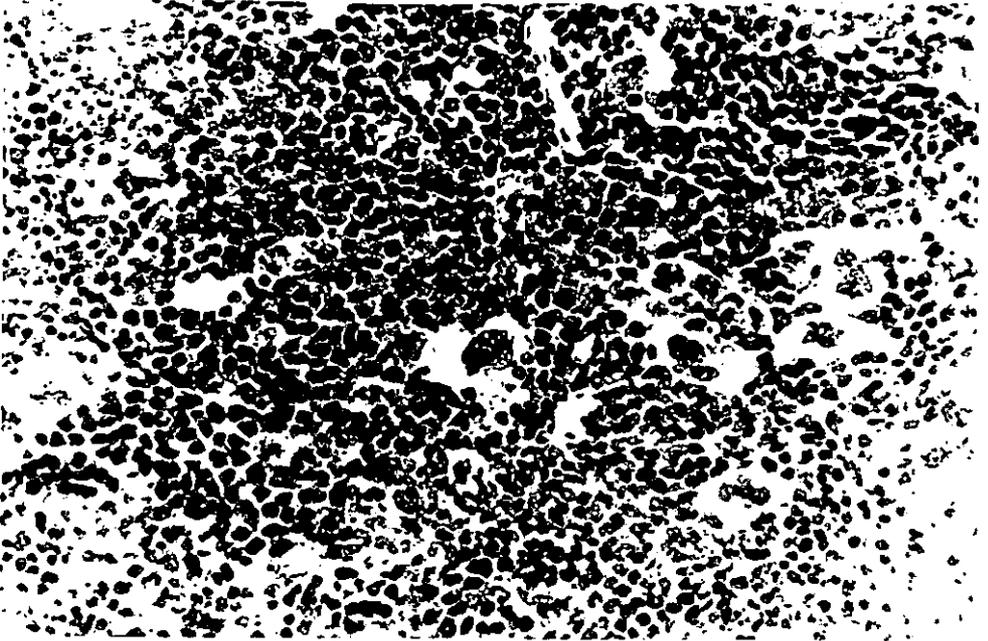


Figura 10.- Corte de bazo en el cual se observa numerosos megacariocitos y abundante hemosiderina (H.E.40X)

La mayor parte de las lesiones microscópicas que se observaron en microscopia fotónica se presentaron casi en todos los casos a diferentes dosis y tiempos de sacrificio, incrementándose su frecuencia de aparición sobre todo en aquellos animales que recibieron mayor dosis y que se sacrificaron a mayor tiempo posinoculación, los animales control no tuvieron lesiones aparentes significativas (Anexo No. 18). Los órganos que resultaron mayormente afectados a nivel histológico fueron el bazo y el hígado. Para la descripción de dichas lesiones se elaboraron cuadros para cada uno de los grupos en relación a sus tiempos de sacrificio y dosis asignadas, frecuencia de cada lesión, la presencia o no de estas lesiones en grupo control, grado e intensidad de la lesión, distribución y curso (Anexos 1-10 y anexos 11-43). En términos descriptivos solo se presentó una sola lesión como estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) que fue congestión paracortical renal (Ver anexo No. 32).

#### HALLAZGOS SUBCELULARES

De la misma manera que en el examen histológico, para el análisis con MET, se procesaron muestras de hígado, corazón, cerebro, bazo, riñón y pulmón. La inoculación de Casiopeína® III en este caso, indujo en las células de dichos órganos cambios numéricos y estructurales de membranas, organelos y matriz citoplásmica. Muchas de las alteraciones estructurales eran comunes en varias estirpes celulares (Cuadro 8A Y 8B), y algunas de ellas comprometían la integridad funcional de las células, originando cambios drásticos por procesos degenerativos internos. Generalmente las alteraciones subcelulares observadas fueron más evidentes en células epiteliales y en grupos celulares próximos a afluentes vasculares.

En las membranas celulares (internas, externas, nucleares y de organelos), las discontinuidades o perforaciones adquiridas fueron poco sobresalientes; las formas anormales o "bizarras" como: distorsiones, indentaciones, invaginaciones, evaginaciones y asimetrías (esferocitosis, eliptocitosis) se presentaron en catorce de los 36 animales tratados sobre todo en eritrocitos, macrófagos y linfocitos que se encontraban endaustrados en los vasos y capilares propios de los órganos afectados o bien liberados en su intersticio; además de dichas alteraciones algunas de sus

membranas se presentaban en formas muy inestables con salida de contenido plasmático (piropoiquilicosis). Otros de los defectos adquiridos de las membranas celulares observadas, son la pérdida de microvellosidades en los túbulos contorneados renales tanto proximales como distales observado en solo 3 animales tratados, así como aparente distorsión y desprendimiento de membrana en podocitos glomerulares en 12 de los 36 animales excepto grupo control(Figura 11).

Cuadro 8A. Hallazgos ultramicroscópicos de mayor frecuencia en los 36 animales tratados con Casiopeína® III y grupo control.

<i>Lesión ultramicroscópica</i>	<i>No. de observaciones</i>	<i>Animales control</i>
Gigantismo mitocondrial (megamitocondrias)	25/36	1/4
Pérdida de la agregación ribosómica	20/36	1/4
Aumento de lípidos intracitoplásmicos	19/36	1/4
Distorsión de bandas Z y discos		
Intercalares	16/36	1/4
Dilatación de crestas mitocondriales	15/36	0/4
Engrosamiento de membranas basales	14/36	0/4
Hiperchromatosis	13/36	0/4
Pérdida de podocitos glomerulares	12/36	0/4
Edema intersticial	12/36	0/4

En el caso de las membranas neuronales, se observó la fijación de un material electrodenso que por sus características visuales era compatible con precipitación de metales; formándose áreas concéntricas o depósitos aislados principalmente alrededor de fibras nerviosas mielínicas (Figura 12). En el caso de las membranas basales tanto de epitelios respiratorios como renales, se observó marcado engrosamiento (Figura 13), lo que originaba desplazamiento de grupos celulares cercanos y distorsión del patrón morfológico local en solo cuatro animales.

En los complejos de unión, nexos y desmosomas, las lesiones se evidenciaron en los procesos intercalares de fibras musculares cardíacas de 16 animales, mostrando malformaciones en *zonula occludens* que se presentó mal delimitada, con parcial, hasta total inhibición de contacto (Figura 14).

Cuadro 8B. FRECUENCIAS DE LESIONES\* ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA®III.

ORGANO O ESTRUCTURA SUBCELULAR AFECTADA	TIPO DE ALTERACIÓN	Nº DE CASOS	CONTROLES	PRINCIPALES CÉLULAS AFECTADAS	ORGANO DE ORIGEN**
MEMBRANAS	DISTORSIÓN DE MEMBRANAS CELULARES	14/36	-	MEGACARIOCITOS	B
	ENGROSAMIENTO DE LA MEMB. BASAL	14/36	-	PARÉNTES M VTRH ARPS GLOMERULO	P,R
	PÉRDIDA DE MICROVELLOSIDADES	3/36	-	TUBULOS CONTORNEADOS	R
	DESMELINIZACIÓN	10/36	-	NEURONAS	Ce
	PÉRDIDA DE PODOCITOS	12/36	-	GLOMERULO	R
	LINFOCITOS INFLAMADOS	7/36	-	NÓDULOS LINFOIDES	I B
	COMPLEJOS DE UNIÓN ALTERADOS	3/36	-	FIBRAS MUSCULARES, CÉLULAS TUBULARES CILÍNDRICAS CILIAS	Co,R
NÚCLEO Y NUCLEOLO	HIPERCROMATOSIS	13/36	1/4	VARIAS ESTIRPES CELULARES	Co,P,R,B,H
	FRAGMENTACIÓN DE HETEROCROMATINA	5/36	-	.	.
		8/36	-	.	.
	PIKOSIS	8/36	-	NEURÓCITOS, HEPATOCITOS,	Co,P,R,H
	APOPTOSIS	7/36	-	FIBRAS MUSC.	P,R,H
	IDENTACIÓN Y MULTIFORMAS	11/36	-	VARIAS ESTIRPES CELULARES	Co,P,R,B,H
	NUCLEOS PROMINENTES Y ABERTANTES	11/36	-	.	.
MITOCONDRIA	DILATACIÓN DE CRESTAS	15/36	1/4	FIBRAS MUSC. HEPATOCITOS, CEL. PLASMÁTICAS, MACROFAGOS, CEL. EPITELIALES Y ENDOTELIALES	Co,R,H
		25/36	1/4	FIBRAS MUSCUL. HEPATOCITOS	R,H
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS	PÉRDIDA DE LA AGREGACIÓN RIBOSÓMICA	20/36	-	HEPATOCITOS, CEL. PLASMÁTICAS HEPATOCITOS	H,B
	HIPERPLASIA DE APARATO DE GOLGI	6/36	1/4	.	H
VACUOLAS LISOSOMAS	HIPERPLASIA	10/36	-	EPITELIO RENAL, HEPATOCITOS, MACROFAGO S. LINFOCITOS	B,R
INCLUSIONES	↑ DE LÍPIDOS INTRACTOPLÁSMICOS Y DE HEMOSIDERINA Y ↑ LIPOFUSINA ↑ FIBRINA ↓ SULFATANTE ↑ COLÁGENO	19/36	1/4	HEPATOCITOS	H
		17/36	-	ESPACIOS INTERTENCIALES	B,R
		6/36	-	.	R,P
		7/36	-	.	P
		6/36	-	.	P,R
OTROS	DISTORSIÓN DE BANDAS Z Y DISCOS INTERCALARES	16/36	-	FIBRAS MUSC.	Co
	↑ FILAMENTOS INTERMEDIOS	6/36	-	VARIAS ESTIRPES CEL. ESPACIO INTERSTICIAL	P,H,Co,R,B
	EDEMA INTERSTICIAL	12/36	-	GLOMERULO	P,H,Co,R,B,Ce
	↑ DE CÉLULAS MESANGIALES	7/36	-	ESPACIO INTERSTICIAL	R
	DILATACIÓN DE SINUSOIDES HEPÁTICOS	2/36	-	.	H
	ENGROSAMIENTO DE ENDOTELIO	4/36	-	VASOS SANGÜÍNEOS	H,R,P

↑ AUMENTO ↓ DISMINUCIÓN

\*TODAS LAS LESIONES SE OBSERVARON DE GRADO LIGERO A MODERADO

\*\*ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

En aquellas células que resultaron más afectadas, las mitocondrias mostraron baja densidad electrónica sobretodo en su compartimento externo; mientras que en el interno solo se observó material amorfo normal de alta densidad compatible principalmente por sales de calcio inorgánico, ribosomas y DNA<sup>106</sup>. Muchas de las mitocondrias afectadas presentaron dilatación excesiva de sus crestas sin necesariamente estar involucradas en un entorno degenerativo celular. Las principales alteraciones observadas en mitocondrias fueron el aumento en el número de ellas (hiperplasia), y las variaciones de tamaño que es relativo al tipo celular al que pertenecen; en este contexto, sobre todo en músculo cardíaco y en el hígado se evidenció gigantismo (hipertrofia o megamitocondrias) en 25 de los 36 animales.

Así mismo, la mayor parte de las mitocondrias afectadas en una fibra muscular, presentaban más crestas de las normales en dirección longitudinal y a menudo dichas crestas mostraban aberración, con arquitectura anormal y espacios intermembranosos muy estrechos que contenían una matriz altamente electrodensa (Figura 15). Por lo general en los animales que recibieron dosis de 10 y 12 mg/kg, los defectos de gigantismo mitocondrial estaban acompañados por otros tipos de alteraciones subcelulares como inclusiones aisladas.

Algunas mitocondrias anormales de células renales, hepatocitos y fibras musculares cardíacas de animales que recibieron dosis de 12mg/kg se encontraban en tumefacción con pérdida total o parcial de sus membranas, crestas y de la matriz interna; y por lo general tenían una distribución metacéntrica.

Los lisosomas de macrófagos en el hígado (células de Kupffer) y del bazo principalmente, tenían un aumento considerable de su tamaño y en contraste, otras células fagocíticas carecían parcial o totalmente de ellos. Los macrófagos del bazo presentaron marcada digestión lisosómica de eritrocitos fagocitados, evidenciándose con cuerpos residuales intracitoplasmáticos, vacuolas gigantes, fagolisosomas y abundante hemosiderina extracelular depositada. Generalmente las células que se encontraban en procesos degenerativos o apoptóticos contenían estructuras lisosómicas activas con perforaciones y rupturas de membrana incluso cerca de sus núcleos y sistemas de origen en aparato de Golgi.

Con respecto a estructuras adquiridas intracelulares, como las inclusiones que son principalmente precipitados moleculares, en algunas células del bazo se observó acumulación de glucógeno en lisosomas y vacuolas descartándose la posibilidad de confundir la visualización con artificios. En el hígado se encontraron células con inclusiones poco características, aunque compatibles morfológicamente con acúmulos de lípidos en vacuolas o libres en el citoplasma en 19 animales tratados y uno del grupo control (Figura 16), las vacuolas observadas presentaron tamaños irregulares sin alteración aparente de su membrana simple, dispersas por todo el citoplasma con colocación principal metacéntrica. En varios grupos celulares de solo 6 animales con dosis de 8 y 10mg/kg, se observó la presencia de acúmulos intercelulares con características ozmofílicas correspondientes a colágeno que formaban "mallas" con patrón molecular irregular en ocasiones con distribución semejante a fibrina.

Los cambios morfológicos en cuanto al aparato o complejo de Golgi, básicamente fueron de tipo proliferativo y degenerativo. Se encontró disminución del patrón de adherencia entre sus cisternas en los hepatocitos con degeneración centrolobulillar aunado a la presencia de vacuolas lipídicas ampliamente distribuidas sin afección de células periportales. En algunos casos como en animales con dosis de 12mg/kg el aparato de Golgi apareció tumefacto y tanto las cisternas como sus vesículas de desprendimiento no mostraban contenido y en fragmentos se presentaban sus membranas colapsadas. En el caso de RER, las alteraciones más evidentes fueron, hiperplasia de cisternas, pérdida de ribosomas y polisomas de su sitio de adherencia de la membrana de RER en un total de 20 animales tratados, con un aumento drástico de monosomas libres en el citoplasma sin evidencia en el grupo control. Además se observó la presencia de cisternas dilatadas en grado variable, que por lo general contenían un material electrodensito finamente granular o fibrilar, y solo en algunas células presentaban uno o varios cuerpos electrodensitos correspondientes a liposomas. En las células hepáticas y renales las cisternas del RER aumentaron en número principalmente en dosis de 10 y 12 mg/kg, estas formaron masas más o menos compactas lo que se puede caracterizar como "agregados tubulares", los hepatocitos, sobre todo, presentaron al mismo tiempo acumulaciones moderadas de glucógeno (Figura 17).

Con respecto al núcleo, se evidenció en algunos tipos celulares fragmentación de heterocromatina con picnosis y cariorrexis en curso. Muchos de los núcleos anormales presentaban formas caprichosas, divisiones y concentraciones

de material heterocromático apreciándose como resultado polinucleos y nucleolos prominentes en 11 de los animales tratados y uno solo del grupo control (Figura 18). Algunos de los núcleos de mayor afectación presentaron fusión continua de su doble membrana sin aparente visualización de sus poros y en segmentos hubo fracturas con liberación de material nuclear. Otras lesiones subcelulares con menor frecuencia de presentación fueron: edemas perivasculares discretos en cerebro y en varias otras localizaciones como bazo e hígado, desmielinización de fibras nerviosas, dilatación de sinusoides hepáticos, aumento de filamentos intermedios en varias estirpes celulares principalmente en endotelios, en las fibras musculares se evidenció distorsión de bandas Z y sarcómeros en 16 animales (Figura 19), en células de paredes alveolares, se evidenció desprendimiento y degeneración de neumocitos tipo I y macrófagos alveolares, con engrosamiento moderado de las paredes alveolares, en neumocito tipo II pérdida parcial del surfactante y tumefacción interna en solo 7 animales tratados (Figura 20).

Los órganos que se vieron más afectados a nivel subcelular por la incorporación de compuesto experimental vía intraperitoneal fueron el riñón y el hígado con 16 y 13 diferentes tipos de alteraciones subcelulares por órgano, siendo las estructuras subcelulares más afectas las membranas y los núcleos. Estadísticamente solo se considera como significativa ( $p < 0.05$ ), la alteración morfológica inducida en núcleo (Ver anexo No.45). No se encontró evidencia estadística significativa que indique una relación directa de las lesiones con el tiempo de sacrificio o con la cantidad de fármaco utilizado. Los animales controles no demostraron cambios ultraestructurales importantes para ser considerados. La mayoría de las lesiones importantes como gigantismo mitocondrial, pérdida de agregación ribosómica, hiperchromatosis, engrosamiento de membranas basales y complejos de unión alterados, se presentaron principalmente en los órganos de los animales que recibieron dosis de 8,10, y 12, sobre todo en tiempos de sacrificio que van de las 48 a las 72 h, reconociéndose un efecto menor a partir de las 96h. de sacrificio (Anexos 44-53 y anexos 54-61).



Figura 11.- Microfotografía electrónica de células renales en la cual se observa Pérdida y fusión de podocitos glomerulares (flechas), membrana basal (Mb), Núcleo (N), célula mesangial (Cm), célula parenquimal (Cp), mitocondrias (M), espacio urinario (Eu). 30000X.

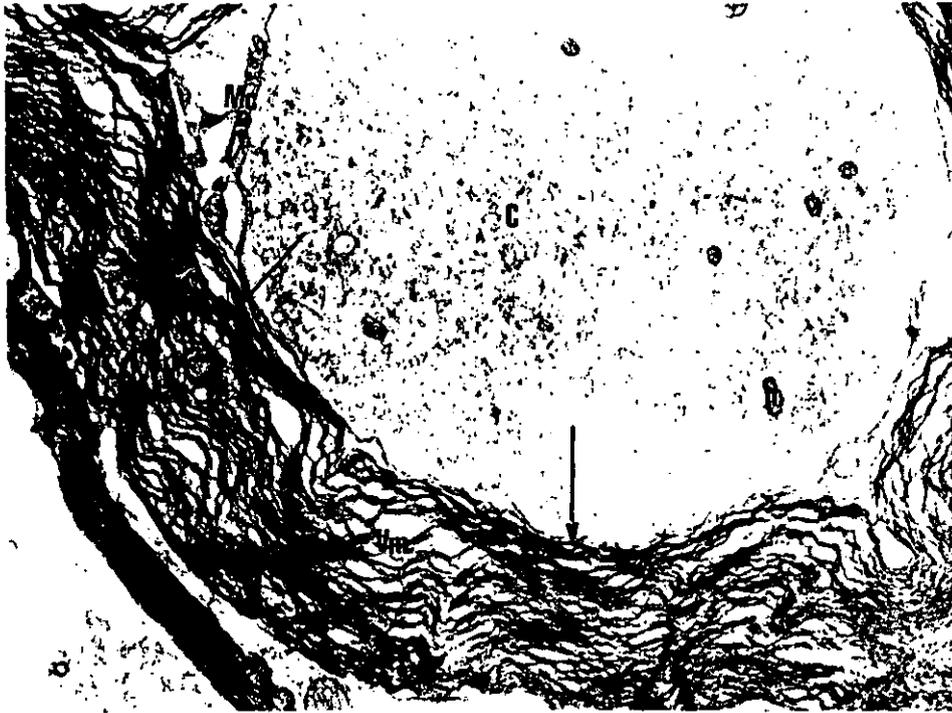


Figura 12.- Microfotografía electrónica de célula cerebral en la cual se observa precipitación perizonal en vainas mielínicas y debridación de las mismas (flechas), vainas de mielina (Vm) citoplasma (C), membrana celular (Mc).40000X.



Figura 13.- Microfotografía electrónica del Pulmón en la cual se aprecia engrosamiento de la membrana basal con pérdida de continuidad (flechas), moderado edema (Ed), inclusiones grasas (I), núcleo (N), espacio alveolar (Ea), eritrocito (E).4000X.



Figura 14.- Microfotografía electrónica de fibras musculares cardiacas que presentan depleción de discos intercalares (flechas), precipitado de cobre (Pc), mitocondrias (M), miofibrilas (Mf).58000X



Figura 15.- Microfotografía electrónica de corazón en el cual se aprecia gigantismo (Megamitocondrias) en fibras musculares (flechas); crestas mitocondriales (Cm), miofibrillas (Mf), sarcómero (Z), bandas Z (bz), Núcleo (N), membrana nuclear (Mn), Eucromatina (Eu), heterocromatina (Hc), aparato de golgi (Ag). 58000X.



Figura 16.- Microfotografía electrónica de Hepatocito en donde se puede apreciar lípidos intracelulares (flecha), edema (Ed), preopitado de cobre principalmente intramitocondrial (Pc) núcleo, mitocondria (M), núcleo (N), eucromatina (Eu), heterocromatina (Hc), membrana nuclear (Mn), retículo endoplásmico rugoso (RER), monosomas (m), membrana celular (Mc).30000X.

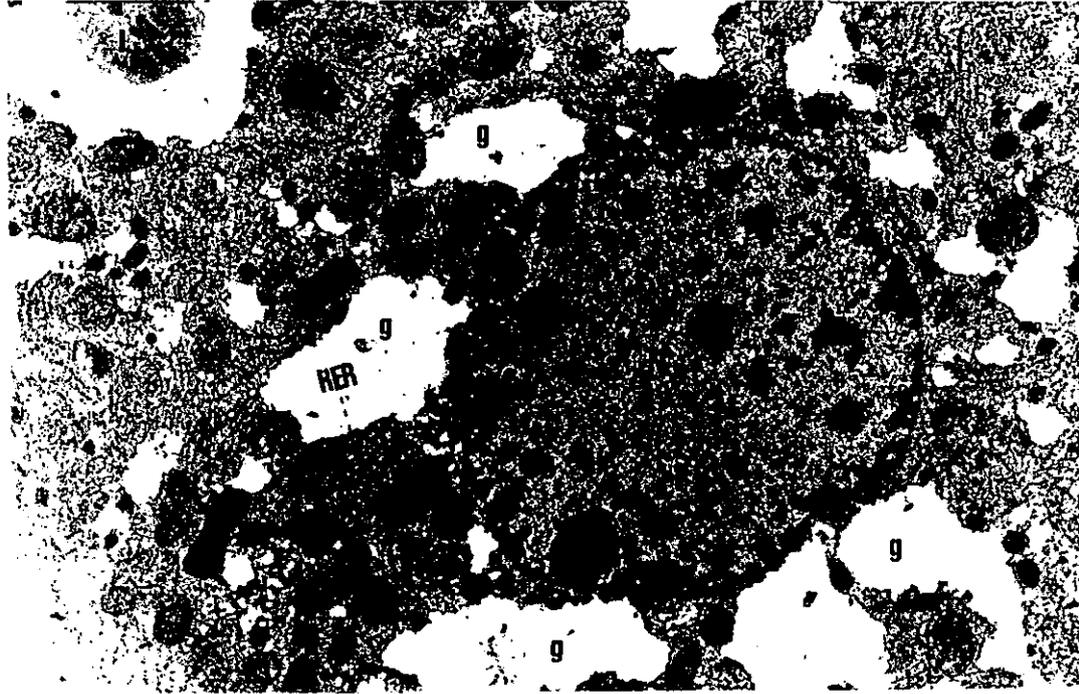


Figura 17.- Microfotografía electrónica de hepatocito en el cual se demuestra marcado aumento del glucógeno (g), Núcleo (N), dispersión de heterocromatina (He), lípidos intracitoplasmáticos (L), mitocondrias (M), retículo endoplasmico rugoso (RER). 20000X .

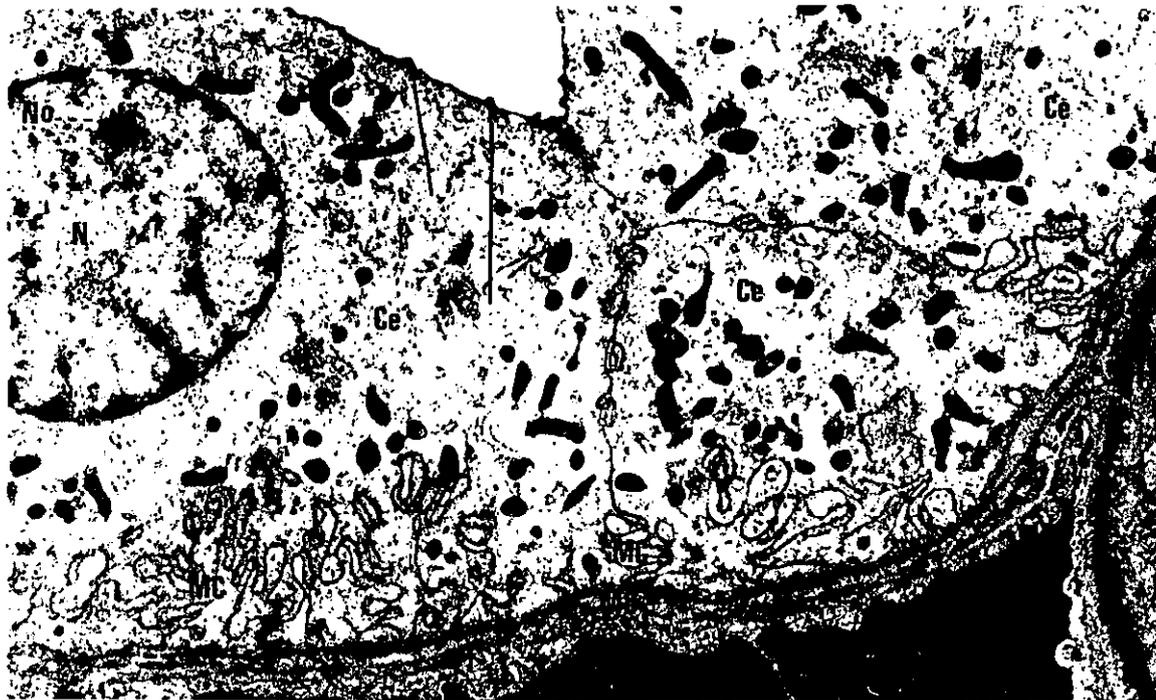


Figura 18.- Microfotografía electrónica de células renales en donde se evidencia nucleolo prominente(No), pérdida de microvelocidades en túbulo contorneado distal (flecha), depleción de membranas celulares en la base (MC), células epiteliales del túbulo (Ce), núcleo (N), mitocondrias (M), membrana basal (Mb), eritrocitos (E).8000X.

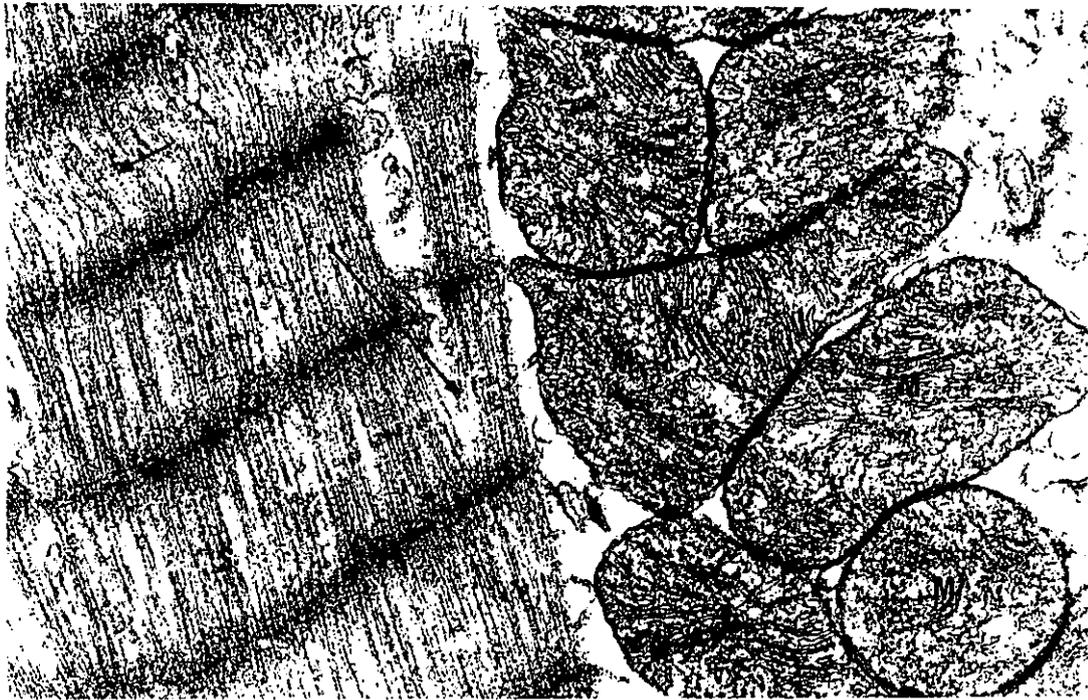


Figura 19.- Microfotografía electrónica de Fibra muscular cardiaca en la cual se aprecia distorsión y debridación de miofibrillas (flechas), bandas Z (Bz), sarcómeros (Z), megamitocondrias (M). 58C00X.



Figura 20.- Microfotografía electrónica de neumocito tipo II (N2), donde se demuestra ligero pérdida de material surfactante (flechas) y degeneración de célula endotelial (Ce), Núcleo (N), mitocondrias (M), membrana celular (Mc), membrana basal (Mb), eritrocitos (E), nucleolo (No). 8000X.

## 7. DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos durante el experimento, la administración intraperitoneal de Casiopeína® III, induce en los animales tratados el desarrollo de cuadros clínicos que manifiestan signos y lesiones a diferentes escalas morfológicas. La mayor parte de los cambios patológicos observados, pueden tener sustento fisiológico atribuible directa o indirectamente a los mecanismos de acción del fármaco estudiados con anterioridad como interacción con el ADN nuclear mediante enlaces no covalentes con guaninas o citosinas y conjunción con citocromos en mitocondria <sup>39 153 154</sup>.

No hubo toxicidad aguda, en base a que no presentó ninguna muerte prematura o aguda durante el transcurso del experimento que duró 96 h, sin descartar efectos crónicos posteriores, además las lesiones cursaron con distribuciones focales y en grado leve, sin comprometer áreas importantes de órganos. En estos términos es conveniente diferenciar las posibles lesiones originadas por los mecanismos de acción del fármaco o subproductos del mismo, a aquellas originadas a partir del solvente utilizado, punto de aplicación, modo de inducción, sacrificio, fijación y procesamiento general de las muestras que pueden darnos como consecuencia, la visualización esporádica de artificios o datos erróneos de interpretación morfológica que en este tipo de estudios es común observar. Así mismo es necesario distinguir alteraciones primarias de las secundarias de tipo morfológico y fisiológico. Por ejemplo para dichos fines se considera un cambio primario morfológico el daño a membrana plasmática y como cambios secundarios o de consecuencia serían el aumento de líquidos visibles intracelularmente, vacuolización, degeneración turbia de otras estructuras<sup>28</sup>. Al hacer una relación clinicopatológica de los signos clínicos observados en los ratones, correspondientes a alteraciones cardiorrespiratorias y nerviosas, se pueden distinguir lesiones tanto microscópicas como ultramicroscópicas que bien pueden ser el origen fisiológico de dicha semiología. Por ejemplo las manifestaciones de ataxia, midriasis, e hiperestesia vistas en varios de los grupos, pueden ser evidencia de lesiones que se suscitaron tales como edema perivascular cerebral y a nivel subcelular distorsión y ruptura de membranas basales en endotelios; o bien signos clínicos como:

taquicardia y polipnea pueden ser consecuencia de la degeneración de fibras musculares cardíacas y a menor nivel distorsión de bandas Z y discos intercalares<sup>29</sup>.

Para entender la fisiopatología que interviene en los mecanismos de acción tóxica de un fármaco, se tienen que relacionar todos los procesos involucrados desde escalas mínimas (moleculares) hasta la observación de las manifestaciones clínicas del organismo tratado y en estos rubros el conocimiento de los procesos que se suscitan a nivel celular y subcelular son parte importante para entender mejor la relación estructura-actividad.

Los hallazgos macroscópicos y ultramicroscópicos observados en este experimento, son más notorios en animales con tiempos de sacrificio de 24, 48, y 72 h, mientras que los animales que recibieron la menor dosis de aplicación que fue de 6mg/kg tuvieron menor frecuencia e intensidad de lesiones macroscópicas sobre todo durante las primeras 3h después del sacrificio. Las lesiones degenerativas como tumefacción y degeneración hídrica se observaron en 70% de los animales abarcando la totalidad de los grupos conformados, a excepción del grupo control. Dichas lesiones, no necesariamente son atribuibles a los mecanismos de acción directo del fármaco, sino que pueden corresponder a cambios circulatorios secundarios por acción osmótica o hemodinámica de distribución del medicamento experimental<sup>131</sup>  
<sup>171</sup>.

Uno de los factores que pueden intervenir con los mecanismos desencadenadores de lesiones degenerativas como degeneración renal (paracortical y tubular), centrolobulillar hepática y muscular cardíaca (sarcolémica), es sin duda el método de sacrificio que en este caso fue mediante dislocación cervical. Este tipo de eutanasia induce shock neurogénico al interrumpirse vías nerviosas propioceptivas de presión vascular e interacción con el sistema yuxtaglomerular, senos carotídeos incluyendo centros ganglionares nerviosos paracardíacos, lo que conduce a una descompensación total de aporte sanguíneo con inmediata desigualdad en el aporte de oxígeno sistémico<sup>5 17 29 94 118</sup>.

Trastornos circulatorios relacionados a efecto tóxico del compuesto experimental, se observan casi de inmediato o en las primeras horas después de su aplicación, distinguiéndose arritmia, taquicardia, polipnea, disnea, agitación, convulsiones y ataxia. La mayor parte de esta signología es igualmente descrita en la descripción preclínica de otros compuestos antineoplásicos como la ciclosfosfamida, el cisplatino y la vincristina<sup>30 40 48 76</sup>.

Un factor muy importante que se tiene que considerar, es que en el caso de la Casiopeína® III los cambios morfológicos inducidos no son tan drásticos en comparación con los descritos por la acción quimioterapéutica de otros compuestos, sobre todo aquellas lesiones microscópicas irreversibles en parénquima hepático y renal <sup>74-16</sup>. Los mecanismos de acción de la mayoría de los compuestos anticancerígenos son evidentes en epitelios como los del aparato gastrointestinal, en donde se observan signos crónicos de diarrea, vómito, lesiones ulcerativas, gastritis, enteritis, colitis supurativas severas que en el caso de las Casiopeínas no son aparentes <sup>152</sup>. Algunas lesiones localizadas en este experimento como peritonitis, enteritis mucoides, ascitis, epimetritis, peripancreatitis e inflamación supurativa de la cápsula renal, corresponden al efecto directo traumático e irritativo originados en el punto de aplicación local de la Casiopeína. Este compuesto se puede comportar a la hora de ingresar al organismo como un cuerpo extraño, produciendo trastornos vasculares con reacción inflamatoria aguda. Los animales de los grupos 5-9, presentaron una hiperplasia de nódulos hemales y de acúmulos linfoides (hiperplasia linfoide) de forma aislada no organizada, posiblemente por respuesta celular hacia el compuesto dando como resultado un aumento clonal de sus poblaciones localizadas en varios órganos tales como pulmón, hígado y riñón; es probable que los mecanismos que inducen una clonación o división celular múltiple de estas líneas celulares, resulten como consecuencia del daño directo que sufre el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) en las células afectadas por el fármaco, expresándose en la activación del sistema de reparación y tolerancia (SOS) sobre todo en el bazo con aumento importante de su peso y volumen (esplenomegalia) <sup>35-119-136</sup>. El aumento intersticial de tipos celulares mononucleares en el parénquima de los órganos afectados no es característico en condiciones normales, estos acúmulos linfoides se presentaron como agregados celulares de tamaño y distribución irregular ubicados por lo general cerca o alrededor de vasos sanguíneos dentro del pulmón y el riñón, este último al tener propiedades hematopoyéticas es descartado de la lesión. Aunque estos cambios no están justificados como una respuesta inmune inmediata de menos de 4 días que es el tiempo máximo de sacrificio de este experimento, el proceso puede estar potencializado o activado por otras vías en donde intervengan además de linfocinas, factores de multiplicación celular linfoide no específicos, tales como TNF, IL1, IL2, prostaglandinas, tromboxanos, factores de diferenciación de células plasmáticas entre otros, que son los

primeros en presentarse ante una respuesta celular quimioterapéutica tóxica como preámbulo a una respuesta posterior ya sea mas o menos compleja <sup>13 20 75 155</sup>.

La mayoría de los medicamentos antineoplásicos están dirigidos para actuar bloqueando y destruyendo células de rápida división, debido a que el ADN se expresa y expone más eficazmente en sus núcleos activos; esto involucra a muchas estirpes celulares y básicamente aquellas de continua sustitución como epitelios, células sanguíneas y células neoplásicas, que al ser afectadas por el fármaco desarrollan como consecuencia complicaciones secundarias tales como alopecia, inmunosupresión, mielosupresión, anemias, exantemas, y exfoliaciones cutáneas.

Las moléculas anfipáticas como el caso de las Casiopéinas, pueden tener efectos adversos al mezclarse entre las fases acuosa y lipídica de la membrana como sucede con la administración de procaína, dorpromazina. Además, su estabilidad termodinámica, labilidad e inercia química pueden permitir un efecto sostenido siempre y cuando se siga con un esquema de tratamiento crónico <sup>35</sup>. Se sabe que algunos complejos con iones metálicos son citotóxicos y mutagénicos debido a la coordinación directa del metal a las bases nucleótidas en los sitios aniónicos (fosfatos), los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del esqueleto del ADN y a los pares solitarios del nitrógeno en las purinas y pirimidinas en especial el N7 de la guanina <sup>19</sup>. Este tipo de interacción conduce a cambios morfofisiológicos que aparecen posteriormente como resultado de estas alteraciones moleculares y que pueden desencadenar al final la pérdida total de una célula o grupos celulares <sup>154</sup>; aunque en términos reales las Casiopéinas pueden tener diferentes mecanismos de acción por varias vías y algunas de ellas pueden conducir a diferentes procesos de degeneración celular como apoptosis vía activación de proteasas <sup>38</sup>.

Con respecto a las lesiones subcelulares provocadas por el compuesto experimental, membranas alteradas pueden propiciar el desencadenamiento de trastornos secundarios como isquemia, disminución en el transporte de iones y agua, mala absorción de glucosa entre otros, originando con ello consecuencias anexas como serían trastornos por deficiencias de nutrientes con lesiones histológicas relacionadas como degeneración centrolobulillar hepática e incluso necrosis<sup>137</sup>. Algunas células vasculares endaustradas en vasos sanguíneos o espacios intersticiales de los órganos estudiados presentaron membranas muy inestables, aparentemente algunas se fragmentaron y otras desarrollaron cuerpos de gemación y esferocitosis caracterizadas por dilatación de segmentos en la membrana plasmática con posible

seguimiento de contenido citoplasmático, debido a estas características de lesión es posible que la pérdida de colesterol se vea favorecida por el paso de fármaco a través de la membrana<sup>32</sup>. En este contexto otro tipo de alteraciones morfológicas membranales como piropliquilicosis y eliptocitosis que fueron observadas muy aisladamente, se pueden deber a varios factores de alteración molecular del citoesqueleto, tales como la sustitución de aminoácidos en la espectrina, dineínas o miosinas, lo cual puede ser debido a que la reducción de la fosforilación oxidativa en procesos degenerativos reduce a su vez la producción de proteínas acarreadoras y de membrana como el caso de la proteína banda 4.1 lo que afecta directamente la fluidez y arquitectura de las membranas plasmáticas y al citoesqueleto<sup>40</sup>.

No es posible saber si el efecto de la Casiopeína®III en este tipo de lesiones subcelulares sea de tipo primario o secundario, ya que se ha demostrado por un lado interacción directa del compuesto con membranas y por otro la inducción de defectos postraduccionales alterando entre otras cosas la fosforilación de espectrina<sup>39 67</sup>.

En glomerulos renales, la pérdida y fusión de podocitos observada en varios grupos de ratones, pueden tener como resultado la reducción considerable de la superficie de absorción y filtración selectiva, en caso de no tratarse de un artificio de fijación, es posible pronosticar como resultado de lo anterior, el desarrollo de cuadros clínicos con ciertos trastornos urinarios tales como cistinuria, glicinuria, aminoaciduria, fosfaturia, glucosuria; sobre todo si se aplicara un tratamiento crónico del compuesto experimental. Por otro lado las precipitaciones en fibras nerviosas mielínicas relacionadas con fijación del producto (Casiopeína® III) puede dar origen a una acantocitosis perineuronal con deposición brusca del contenido de colesterol disminuyendo el potencial de membrana para impulso nervioso.

Con respecto al engrosamiento de membranas basales principalmente vasculares, pulmonares y renales, en donde se observó desplazamiento celular con distorsión de la arquitectura celular local, estudios resientes de ME en la evaluación tóxica de ciclofosfamida, revelan una marcada tendencia de que células adjuntas a membranas basales presentan distorsión y degeneración por engrosamiento de la misma, sobre todo en riñón y pulmón lo cual también se aprecia en animales tratados con agentes antimetabólicos y diuréticos, lo cual deteriora la fluidez de las membranas como sucede en el caso de perros con dietas altas en colesterol durante tratamientos antineoplásicos o por la hiperlipoproteinemia originada por agentes quimioterapéuticos en humanos<sup>22 139 157</sup>.

Las anomalías en cuanto a la morfología y número de mitocondrias denotan patología del mecanismo generador de energía que puede comprometer la integridad física de las células afectadas, resulta de suma importancia definir el papel de dichas anomalías, como gigantismo e hiperplasia en fibras musculares, debido a la importancia que infieren los órganos que se estudiaron. Es posible que pacientes mamíferos no humanos puedan presentar mioglobinuria debido a la degeneración y necrosis de fibras musculares cardíacas que acontecieron, y en estados severos complicarse con acidosis láctica y reducción de las concentraciones plasmáticas de bicarbonato, debido a que el organismo trata siempre de superar la deficiencia funcional aumentando hasta el límite la utilización de glucosa al aumentar sus tasas de respiración anaerobia <sup>45 58 138</sup>

En estos términos, el exceso de piruvato producido puede no ser oxidado por completo por las mitocondrias afectadas, o en su defecto los mecanismos de evacuación (shuttle) no consiguen mantener el equilibrio adecuado de estado óxido-reducción (Redox), lo cual provocaría aumento de la acidosis láctica <sup>90</sup>. Los daños observados en fibras musculares cardíacas, concuerdan con la evaluación cardiotóxica a la que se sometieron varias Casiopeínas incluyendo la de este estudio <sup>56</sup>, obteniéndose para dicho efecto variables de deterioro como deshidrogenasa láctica (DHL), creatinofosforinasa (CPK), y aspartato sérico transferasa (AST), teniendo en consideración que su efecto es menos tóxico que otros medicamentos anticancerígenos.

Los procesos de hipoxia o anoxia provocados ya sea por acción directa del fármaco al dañar membranas o bien por el mismo mecanismo de choque neurogénico propiciado por el método de sacrificio (estrangulamiento), producen cambios relacionados con el desdoblamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa <sup>46 87 94 95 158</sup>. La menor producción de ATP reduce la capacidad de la célula de llevar a cabo diversos procesos, entre ellos la biosíntesis de proteínas, lo cual a su vez se refleja en la acumulación intracelular de lípidos visibles como en el caso de los hepatocitos, y el desarrollo de gigantismo o megamitocondrias que tratan de normalizar la relación ATP/ADP adaptando una mayor superficie generadora de energía <sup>54 95 106</sup>. Un trastorno primario en un organelo subcelular tiene necesariamente una alteración molecular inicial y es posible relacionar estos efectos adversos al complejo estudiado debido a su naturaleza estructural atómica, la cual corresponde como se dijo anteriormente a una estructura molecular de coordinación que con respecto a los ligantes, se considera de alta capacidad quelante debido sobre todo a su alto

grado de hidrofiliidad <sup>65</sup>. Esto sugiere que al poseer la Casiopeína dos grupos funcionales, estos son capaces de reaccionar con macromoléculas como histónas, nucleótidos del ADN nuclear o mitocondrial o proteínas estructurales de membranas en forma rápida teniendo interacciones distintas con las mismas fracciones originando con ello que su mecanismo de acción sea complejo <sup>39</sup>.

Una característica morfológica indicativa de efecto farmacotóxicos es el exceso de calcio (Ca) en las mitocondrias "Sobrecarga de calcio intracelular"; muchas mitocondrias con este defecto pueden pasar desapercibidas ya que el calcio se deposita en forma de finos gránulos aislados altamente electrolúcidos<sup>106</sup>, a menudo este tipo de precipitado puede anteceder a una lesión celular o no aparece en absoluto en modelos experimentales de muerte celular con fármacos antineoplásicos <sup>47 77 120</sup>.

Con respecto a las megamitocondrias observadas en varios tipos celulares a diferentes dosis, en condiciones experimentales, es común observar mitocondrias gigantes que aparecen en el miocardio y músculo esquelético de ratones adultos hipertiroideos, durante la anoxia, en adrenales de ratas luego de hipofisectomía, en el hígado de ratones intoxicados con derivados de ácido isonicotínico, Cloruro de mercurio, tetracloruro de carbono, Isoproterenol, anfotericina B, así como en deficiencias protéicas, y de riboflavina <sup>93</sup>. Por lo general este defecto es indicativo de una interacción molecular negativa de los compuestos administrados antes mencionados con la estructura afectada provocando un daño tóxico subcelular <sup>146 148</sup>. Las alteraciones en mitocondrias como aberración de la arquitectura normal, espacios intermembranosos muy estrechos, y matriz altamente electrodensa, se hacen evidentes sobre todo en algunas enfermedades metabólicas como la tirotoxicosis humana o síndrome hipermetabólico en animales, en donde alteraciones primarias tóxicas o secundarias genómicas de mitocondrias producen una alteración en el mecanismo generador de energía por desacoplamiento de la cadena respiratoria con la fosforilación oxidativa <sup>37 80 91</sup>. Algunas mitocondrias anormales en células renales principalmente de las áreas tubulares, hepatocitos y las mismas fibras musculares presentaron tumefacción con pérdida de las crestas y de la matriz interna o de alguna de sus membranas. Este mismo cuadro tóxico se observa cuando se han administrado en ratas 1 mg/kg de aflatoxina y en la administración de mas de 8.6mg/kg de emetina <sup>148</sup>.

Alteraciones de membranas aunadas a deficiencias en los mecanismos formadores de lisosomas que dependen sobre todo de la integridad de la derivación de cisternas del complejo de Golgi, pueden incorporar el riesgo fisiopatológico de una disminución del "estallido respiratorio", células con este tipo de alteraciones sobre todo macrófagos, no demuestran un aumento considerable del consumo de oxígeno, ni un aumento en la producción de  $O_2$  y  $H_2O_2$  durante la fagocitosis provocando una disminución considerable de la respuesta del sistema monocítico fagocitario <sup>4 161</sup>. Se cree que una alteración inapropiada de la membrana plasmática en los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos implica fisiológicamente una activación de la NADPH oxidasa provocando la despolarización de la membrana, incrementando el intercambio negativo de iones lo que conllevaría a una degeneración hidrópica <sup>54 136</sup>.

Las alteraciones lisosómicas encontradas en varios grupos celulares, sobre todo en dosis de 10 y 12mg/kg pueden dirigir en casos graves al almacenamiento intracelular de productos por deficiencias de una o más enzimas relacionadas con su digestión o hidrólisis <sup>68 70 71 81 102 159</sup>. En algunas células se observó acumulación de glucógeno, sobre todo en hígado y en fibras musculares cardiacas e inclusive se reconoció la presencia de glucógeno dentro de las vacuolas, dichas características morfológicas se pueden deber a procesos degenerativos causados por la hipoxia inducida en los animales de experimentación al momento de su sacrificio, lo que propicia desnaturalización y destrucción de enzimas glucogenolíticas por proteasas (catepsinas, caspasas, kinasas, etc.) activadas en este proceso y sobre todo en la apoptosis en donde los cambios morfológicos son menos agresivos principalmente en relación al núcleo <sup>23 27 71 103 144</sup>.

En el caso de las acumulaciones exageradas de lípidos en el hígado, estas se pueden deber a la presencia de un trastorno funcional primario del retículo endoplásmico rugoso y ribosomas, debido a que mecanismos comunes de degeneración hidrópica trastorman en estas estructuras la producción de proteínas acarreadoras de complejos lipídicos extracelularmente, y por otra parte podría desarrollarse una esfingoliposis ligada a acumulación por deficiencia estructural de lipasas en los lisosomas <sup>11</sup>. La presencia de precipitado amorfo visto en forma aislada dentro de los lisosomas se debe en gran parte a que el transporte reducido hacia estos organelos disminuye el procesamiento proteolítico durante las primeras fases de degeneración celular y/o apoptosis <sup>39</sup>, de modo tal que las hidrolasas se encuentran en formas de mayor peso molecular visibles con ME <sup>83</sup>. Es posible, que las proteínas plasmáticas que se conjuguen con la Casiopeína experimenten desnaturalización por la absorción de la superficie del compuesto, o en su

defecto estas proteínas pueden ser incluidas junto con la Casiopeína dentro de fagosomas de células fagocíticas como los macrófagos y ser digeridas por proteasas lisosómicas, permitiendo así la aposición de material precipitado en forma de cristales, combinándose con el metal cobre (Cu) del compuesto, con formación de puentes de hidrógeno, pudiendo comprometer la integridad total de la célula afectada si en algún momento se perforara la membrana de los lisosomas <sup>137 159</sup>. Sería recomendable realizar estudios posteriores de microanálisis con rayos X para determinar si efectivamente en la visualización de la ultraestructura de los lisosomas las inclusiones observadas son depósitos de cobre o de otro tipo, es muy probable que metales pesados incluidos intracelularmente den una precipitación exagerada de plomo o el mismo cobre de la Casiopeína® interfiera con el proceso de tinción de las muestras desde su inicio reaccionando desfavorablemente para la buena visualización de estas estructuras en combinación con el acetato de uranilo <sup>25</sup>.

Así mismo una quelación exagerada del Cu y demás componentes de la Casiopeína que tengan interacción electrostática con grupos carboxilo ionizados de residuos de ácido siálico de glucoproteínas, puede favorecer la fusión de membranas entre ellas las de los lisosomas con la membrana plasmática, liberando secreción no selectiva del contenido lisosómico afectando a células anexas, o bien aumentando la permeabilidad de iones a través de la membrana, lo que desencadena desestabilidad osmótica y degeneración <sup>137</sup>, lo cual puede ser uno de los mecanismos que originó en casos aislados lisis de conjuntos celulares (necrosis) en forma aislada. Es posible relacionar alteraciones de uniones tipo nexos y desmosomas con lisis de conjuntos celulares provocados por la Casiopeína, en este sentido se observaron zonas *occludens* de discos intercalares en las fibras musculares cardíacas que carecían de contacto con otras en inicios de degeneración, demostrando con ello un posible aislamiento metabólico. Se ha demostrado en estudios de apoptosis inducida por fármacos, que como consecuencia de los procesos proteolíticos internos, las células tratan de escapar del proceso de degeneración de las células vecinas con modificaciones de membrana desde un inicio <sup>6 41 84 99 105</sup>

<sup>115 163 165</sup>.

En cuanto al aparato o complejo de Golgi y RER, se puede decir que sus alteraciones ya sea proliferativas o degenerativas tienen que ver en su mayoría con alteraciones moleculares en la síntesis de proteínas <sup>90</sup>, ya sean primarias o secundarias si es que el daño producido fue en un principio en el genoma celular o en la transducción de los

ribosomas; para relacionar estos cambios morfológicos con alguna anomalía funcional, se necesitan estudios más precisos para estos fines como marcadores radioactivos de glucosamida o fucosa para determinar actividad relacionada con glucosiltransferasa.

La pérdida de la agregación ribosómica a la membrana del RER, junto con la aparición de cantidades moderada de polisomas y monosomas libres en el citoplasma, es un indicio irrefutable de acción tóxica del compuesto como sucede en muchos exámenes toxicológicos en ratones principalmente con CCL<sub>4</sub><sup>142</sup>. Se ha demostrado que ratones tratados con etionina y actinomicina por vía oral y intraperitoneal como posible sinergismo quimioterapéutico, provoca cambios ultraestructurales del RER, como la pérdida de ribosomas, y la disociación de polisomas libres o en conjuntos<sup>79</sup>. En este caso al parecer la desagregación de ribosomas comienza horas después de la administración de Casiopeína y alcanza su máximo nivel a las 72 h posinoculación aunque es muy posible que el efecto sea reversible al no provocar la inhibición total de la síntesis proteica<sup>44</sup>.

Estudios recientes con tiocetamina en dosis única y cisplatino en dosis comerciales, demuestran que se provocan en los animales tratados una serie de lesiones ultramicroscópicas sobre todo en células hepáticas que muestran amplia dilatación y vesiculización de los sistemas de RER así como proliferación de las membranas del REL, permaneciendo dichos efectos por lo menos 48 h<sup>2</sup>. El displatino tiene mucha similitud con la Casiopeína en cuanto a sus aspectos moleculares y mecanismos de acción, estudios de electroforesis en gel, han demostrado que ambos tipos de compuestos, pueden interactuar directamente con bases del ADN nuclear por lo general con ruptura de la cadena terciaria (hélice) y prácticamente la estructura primaria no se ve afectada, lo cual sostiene algunos de los motivos de la aparición de los cambios morfológicos vistos sin compromiso de la células en general<sup>154</sup>.

En otros ensayos preclínicos con medicamentos antineoplásicos como el taxol, se han demostrado cambios morfológicos celulares sobre todo hepáticos, que coinciden con lo demostrado por la aplicación de Casiopeína® III, destacando a nivel histológico la pérdida de glucógeno citoplasmático, metamorfosis grasa, degeneración centrolobulillar y poca o nada muerte celular (necrosis). A nivel subcelular los hepatocitos afectados mostraron desprendimiento de los

ribosomas de las membranas de RER y la desagregación de polisomas citoplasmáticos, lo cual sugiere que los mecanismos de acción de estos fármacos al estar muy relacionados, también comparten sus mecanismos de citotoxicidad <sup>93</sup>.

Una buena parte de los medicamentos utilizados contra el cáncer inhiben la síntesis de proteínas usurpando el sitio del Ácido Ribonucleico de transferencia (ARNt) en el momento preciso en que debe establecerse en el ribosoma una unión peptídica, moléculas de Casiopeína en su evaluación preclínica han demostrado capacidad para efectuar estos procesos a través de diversas pruebas analíticas de pureza del propio fármaco como determinación de análisis cromatográficos secuenciales. Por lo general el resultado de estos mecanismos de acción es un inevitable daño y compromiso de organelos celulares, los cuales se ven afectados por lo general en forma aguda, con rápida fragmentación y formación de vesículas de RE que parece ser progresiva en la mayoría de los casos, aunque el proceso se detiene e involucre después de terminar con el tratamiento por lo general crónico para la mayoría de los antineoplásicos <sup>28 44 54 90 117</sup>.

En este caso las alteraciones del REL no fueron tan evidentes, salvo lógico, en aquellas células que se encontraban en proceso de degeneración; esto, se debe posiblemente a que los mecanismos de acción de la Casiopeína no están relacionados con la función directa del REL y estos resultados son sumamente favorables, ya que una alteración progresiva y crónica severa en REL, pueden inducir una necrosis masiva y en el caso particular del hígado a una cirrosis aguda <sup>21 24 92 104</sup>.

Es posible que los cambios observados en cuanto a la configuración de los polisomas, caracterizados por la tendencia a formar agregados o complejos de mayor tamaño y número, pueden estar relacionados con alteraciones directas con la síntesis de proteínas, básicamente glucoproteínas (glucosilación incompleta), causadas por el daño que induce Casiopeína en ADN lineal no activo o en fases de G1 o G2 al momento del acoplamiento o daño de tipo circular abierto que es una ruptura simple en una porción de la cadena en ADN superenrollado <sup>82 148 154</sup>.

El aparato o complejo de Golgi, aparece en algunas células con cisternas y vesículas de desprendimiento vacías aparentemente y en ocasiones totalmente tumefactas, probablemente este cambio morfológico tenga una relación directa con trastornos moleculares como inhibición de la síntesis proteica por acción de la Casiopeína® III, como se ha

mencionado existe una interacción directa del compuesto con el ADN y ARN a través de su acoplamiento con las bases nucleótidas, causando una interferencia directa del Ácido Ribonucleico Mensajero (RNAm) con los ribosomas.

En otros estudios se ha demostrado que fármacos antineoplásicos del grupo de los antimetabólitos, son capaces de producir un retraso en la velocidad de duplicación del ADN que afecta sobre todo, ciertas funciones relacionadas con la etapa de Síntesis (S) del propio ADN y de la transcripción proteica <sup>19</sup>. Es factible que las células que sufrieron daño prematuro en sus membranas, tengan una menor capacidad de incorporar aminoácidos libres a la formaciones proteicas de los ribosomas y a los enlaces peptídicos en aparato de Golgi <sup>120 141</sup>. En aparato de Golgi, hubo aumento considerable en el tamaño de algunas cisternas del complejo, lo cual en condiciones experimentales se ha descrito como simplemente "Hipertrofia" por depleción proteica <sup>63 55</sup>.

La Casiopeína®III al poseer ligantes diminas y aminoacidatados donadores (O-O), jugando estos últimos un papel esencial en el reconocimiento celular y otras funciones biológicas, son capaces de unirse a proteínas y al ADN, estas uniones se han descrito mediante interacciones no covalentes de las cuales destaca la interacción por acoplamiento "stacking" entre anillos aromáticos <sup>125</sup> y es factible, que la porción molecular de la Casiopeína responsable de la mayoría de los cambios morfológicos descritos recaiga en el grupo donador N-N.

Con respecto a los pigmentos observados en los espacios intersticiales correspondientes en especial a hemosiderina, se conoce que la fenantrolina de la Casiopeína® III, es utilizada como indicador del hierro, por lo cual la aparición de grandes concentraciones de pigmento hemático se puede deber en primera a citotoxicidad de eritrocitos (hemólisis) <sup>156</sup> y en segundo lugar a la reacción de Casiopeína y el hierro de la hemoglobina liberada <sup>69</sup>.

Uno de los mecanismos posibles por los cuales la Casiopeína ha demostrado efectos tóxicos es que el átomo de Cu incluido en la molécula, por reacciones de óxido reducción tipo "Haber Weiss", pueden promover la producción de radicales oxidrilo o superóxido que dañan no sólo al genoma sino a otras muchas estructuras celulares <sup>69</sup>.

Finalmente la Casiopeína al igual que varios compuestos antineoplásicos ha demostrado actividad antineoplásica y citostática por entrecruzamientos con el ADN que sin duda alguna tienen como consecuencia las diferentes alteraciones

primarias o secundarias en las estructuras subcelulares vistas las cuales no son autónomos y dependen del genoma celular <sup>140 166</sup>.

Es muy probable que la toxicidad de la Casiopeína pueda llegar a inducir una muerte celular (necrosis, apoptosis) de primer orden; es decir en un paciente con cáncer un porcentaje de células, sean estas malignas o normales sucumbirán por unidad de fármaco <sup>16</sup>. En este sentido las alteraciones observadas en los núcleos de las diferentes estirpes celulares observadas, serán comunes para diferentes localizaciones. La mayoría de las formas nucleares observadas hiper cromáticas y en cariorrexis están relacionadas con mecanismos de degeneración o apoptosis provocadas por daños directos del ADN sustentados por los mecanismos de acción antes descritos.

## 8. CONCLUSIONES

1. Es posible encontrar un efecto tóxico al administrar Casiopeína® III demostrado a través de los cambios morfológicos celulares y subcelulares en cualquier célula, al parecer este tipo de efecto no es proporcional a la cantidad de las dosis empleadas, ni a los tiempos de sacrificio.
2. La toxicidad de Casiopeína® III es menos drástica y acentuada que la demostrada por otros medicamentos similares como el cisplatino, tiotepa y la cidofosfamida. Esto mismo se puede evidenciar desde el momento mismo de su aplicación al llevar un seguimiento referencial de los signos clínicos que se suscitan, lesiones macroscópicas y lesiones microscópicas celulares y principalmente subcelulares.
3. La mayoría de las observaciones subcelulares y celulares observadas tienen relación clinicopatológica tóxica con el cuadro clínico observado en los ratones tratados durante las primeras horas del experimento, y de igual manera coinciden con las lesiones macroscópicas de las necropsias después del sacrificio.
4. Es posible un efecto reversible al dejar de aplicar el compuesto, debido a que los trastornos que induce en su gran mayoría son focales y en grados leves, lo cual no compromete la integridad funcional en relación parénquima-estroma de los órganos que se ven afectados.
5. Las células que demostraron mayor afectación por la administración del compuesto experimental son las del bazo y el hígado con cambios importantes en mitocondrias y núcleos, por lo cual se deben de tomar las medidas correspondientes para consideraciones o contraindicaciones del fármaco en su posible aplicación a humanos y otras especies.
6. Sin contar con interpretaciones funcionales o fisiológicas, desarrollar o construir un sistema preliminar de anatomía patológica subcelular de este compuesto, contribuye en estos casos a fundar y entender las bases de sus mecanismos de acción y fisiopatología en relación estructura-actividad que posteriormente deben reforzarse con los estudios correspondientes.

7. Independientemente de lo drástico o impresionante en la cantidad de alteraciones que pueden surgir de un experimento de este tipo, en muchas ocasiones, es normal apreciar tan variada aberración morfológica sobre todo por que ni la naturaleza por sí misma es perfecta y en algunos casos las lesiones encontradas podrían representar simplemente la distribución, cambio y adaptación de estructuras a un determinado nivel bioquímico o metabólico, sea este mayor o menor a los niveles basales pero no necesariamente anormal lo cual tendría que corroborarse con estudios posteriores.
8. Algunas de las lesiones o alteraciones ultraestructurales más severas observadas en las células, ocasionadas por los efectos del fármaco experimental, son convenientes si el sitio blanco fuera únicamente una masa neoplásica, pero desgraciadamente aun no se cuenta con fármacos específicos para cada tipo de estirpe o grupos celulares neoplásicos.
9. A pesar del daño tóxico inducido por el fármaco, es posible proseguir con su aplicación y régimen terapéutico en la especie estudiada, el cual es sumamente importante al ser un posible fármaco quimioterapéutico en varias especies. Es aun mejor la sobrevivencia de un paciente con posibles complicaciones tempranas o tardías por el método de tratamiento que su muerte inminente, y más cuando los resultados de este tratamiento nos dan como resultado sobre todo un mejor índice y calidad de sobrevivencia en pacientes con cáncer.
10. Al parecer la efectividad de algunos compuestos anticancerígenos, se ve favorecida por su alta citotoxicidad, a pesar de lo anterior, la Casioipeína® III es un medicamento con acción citotóxica menor a la de los antineoplásicos convencionales y ha demostrado igual o mejor función antineoplásica, por lo cual, cualquier daño por muy ligero o severo que parezca o su posible complicación posterior, debe de representar en estos rubros un riesgo importante aunque no comparable con la posibilidad de prolongar la vida de cualquier especie que padezca esta terrible enfermedad , sobre todo la nuestra de la cual dependen muchas más.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Alarcon D, Ruiz A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cell through Fc receptors. *Nature* 1978;271:67-69.
2. Ashworth CT, Werner DJ, Glass MD, et al. Spectrum of fine structural changes in hepatocellular injury due to thioacetamide. *Am J Pathol* 1965;47:917-951.
3. Austen KF. Biologic implications of the structural and functional characteristic of the chemical mediator in immunity. *Science* 1981;213:1469-1474.
4. Baehner RL, Karnovsky MJ, Karnovsky ML. Degranulation of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1980;48:187-192.
5. Barrios R, Inone S, Hogg JC. Intercellular junctions in shock lung. A freeze fracture study. *Lab Invest* 1977;36:628.
6. Batistatou A, Greene LA. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J Cell Biol* 1993;122:523-532.
7. Bertram GK. Farmacología básica y clínica. 6ª ed. México (DF): editorial El Manual Moderno, 1996.
8. Black DJ, Livingston RB. Antineoplastic drugs in 1990: a review. *Drugs* 1990;39:489-501.
9. Bonadonna G, Valagussa P. Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol* 1985;3:259-263.
10. Booth NH, and Mc Donald LE. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Vol. I y II ed. España: Acribia S.A., 1988.
11. Brady R O, Kanfer J N, Bradley R M. et al. Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase enzyme in Gaucher's disease. *J Clin Invest* 1966;45:1112-1115.
12. Cano P, Breña MV. Genotoxicidad de Casiopeínas: Evaluación mutagénica *in vitro*. Memorias de la 3ª jornada en Casiopeínas; 1998 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1988:30a-30e.
13. Bush H. Predinical Methodology for the Selection of Anticancer Agents. *Meth Can Res* 1967;3:1-7.
14. Cairns J. El problema del cáncer. en *El cáncer. Libros de Investigación y Ciencia*. 2ª ed. México: Prensa Científica, 1986.
15. Ceritti PA. Research on Carcinogenesis and Anticarcinogenesis. *Int Can New* 1987;5:10-12.
16. Chabner BA, Collins JM. *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*. 2ª ed. Lippincott, 1990.
17. Chaudry IH, Baue A. Overview of hemorrhagic. Pathophysiology of shock. *N Engl J Med* 1982;306:900-905.
18. Chief L, Hiroshi F. *History of Electron Microscopy*. 2ª ed. Kyoto: Sum press, 1986.

19. Crigo LC, Tovar A, García CA, Moreno R, Ruiz LA. Estudio de la interacción de las casiopeína II con el ADN por espectroscopia electrónica. Memorias de la 1ª jornada de trabajo en Casiopeínas; 1994 enero 20-21; Facultad de Química UNAM; México (DF).
20. Cohen P, Eisenberg RA. Single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991;9:243-269.
21. Cooper DY. Discovery of the function of hemeprotein P-450: A systematic approach to scientific research. *Life Sci* 1973;13:1151-1 161.
22. Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 1987;297:371-377.
23. Collins MK, Rivas AL. The control of apoptosis in mammalian cell. *Trends Biochem Sci* 1993;18:307-309.
24. Conney AH. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev* 1967;19:317-333.
25. Constantino FC. Comunicación personal
26. Correa P, Stella J, Pérez TR, Carbonell LM. *Patología General*. 3ª ed. México (DF): Prensa Médica Mexicana, 1975.
27. Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D. Caspase -3-mediated cleavage of protein kinase C in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:2317-2320.
28. David H. Cellular pathobiology, in Johannessen, JV, (ed.): *Electron Microscopy in Human Medicine*. New York, McGraw-hill Book Co, 1978;2:3-150
29. Davies JO. Mechanisms of salt and water retention in cardiac failure. *Phatobiol Annu* 1976;3:234-237.
30. Dechant KL, Brogden RN, Faulds D. Ifosfamide/Mesna: a review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. *Drugs* 1991;42:428-467.
31. De-Duve C, Bcaufay H. A Short History of Tissue Fractionation. *J Cell Biol* 1982;91:293-299.
32. De-Duve C. Exploring Cells with a Centrifuge. *Science* 1975;189:433-435.
33. De la Garza J. Semblanza Histórica de los Agentes Antineoplásicos. *Cancer y Quimioterapia (Perspectivas México)*. Memorias del tercer congreso de Casiopeínas. México (DF). Facultad de Química. UNAM, 1992:30-35.
34. De la Rosa ME, Gracia MI. Mutagenic Activity of casiopeines in *Drosophila* Xth EEMS Meeting (Memories). New York-England. Academic Press (USA). 1990:22-27.
35. De Vizcaya, Howarth JA, Dobrota M, Ruiz RL. Hematological response after administration of the novel Koper-based anticancer agent casiopeína II. Memorias de la 3ª jornada en Casiopeínas; 1998 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF). 1988:31.
36. De Vita VT. Principles of chemotherapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and practice of oncology*, 3ª ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989:276-300.

37. Di Mauro S Bonilla E Lee CP. Luft's disease: Further biochemical and ultrastructural studies of skeletal muscle in the second case. *J Neurol Sci* 1993;27:217-232.
38. Dobrota M, De-Vizcaya R, Ramirez RL, et al. Casiopeína II Kills cancer cells by apoptosis. *Memorias de la 3a Jornada de Casiopeínas* 1998 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF).1988:26.
39. Dobrota M, De Vizcaya R, Rivero A, et al. Dregradation of DNA by the cooper based anticancer agent casiopeína II. *Memorias de la 3a jornada de Casiopeínas* 1998 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM; México (DF).1998:36.
40. Dobrota M, De Vizcaya R, Rivero A. Blood/plasma. Partitioning binding uptake. *Memorias de la 3a jornada de Casiopeínas* 1988 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1988.
41. Doherty PC. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1993;75:607-612.
42. Dupont CI. Therapy of Antitumor agents *Pharmacology*. Ficha Técnica No. 61:3. 407 - 414 1993.
43. Fairchild CR. Goldsmith ME. Cowan KH. Molecular biology of antineoplastic drugs resistance. In: Cossman J. Ed *Molecular genetics in cancer diagnosis*. New York: Elsevier. 1990:113-141.
44. Farber, E, Kisilevsky, R, Shull, HK, et al. Polysome-ribosome Dynamics in the acute response of the liver to carcinogens. *Adv Enzyme Regul.* 1972;10:383-394.
45. Felig P. Disorders of carbohydrate metabolism. *Biol Med Hosp* 1980;9:281-284.
46. Ferguson DW, Abboud FM. The pathophysiology recognition, and management of shock. *Am J Physiol* 1968; 215:1414-1419.
47. Fleckenstein A, Janke J, Doring HJ. et al. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca<sup>+</sup> overload. A new principle in cardiac pathophysiology: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. Baltimore, University Park Press 1972;4:563-579.
48. Flores J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 2ª ed. Barcelona: Salvat,1992.
49. Foster HL, Small ID. *The Mouse in Biomedical Research*. Academic Press (USA).1988;3:59-63.
50. Fowcett DW. *The Cell*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia W. B.: Saunders Co.1981.
51. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity: Characterising and avoiding the problem. *Drugs* 1991;42:781-795.
52. Fuentes I, Ruiz L. Evaluación preclínica de casiopeínas y su unión a proteínas plasmáticas. *Memorias de la 3ª jornada en Casiopeínas* 1988 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1988:57.
53. Gerard G. Mc-Donald A. *Protocols for in vivo Screening Systems*. National Cancer Institute (USA).1990:15-30.
54. Ghadially FN.: *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matriz*, 2<sup>nd</sup> ed. London, Butterworths-Heinemann; 1982.
55. Gibbons, IR. Cilia and flagella in eukaryotes. *J Cell Biol* 1981;91(3):107-124.

56. Gómez DE. Determinación de Toxicidad aguda de la Casiopeina® I en perros (tesis de Licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1992.
57. Gomez RC, Ruiz RL, Gracia MI. : Quimiosensibilidad *in vitro* en células de Cáncer Cérvico-Uterino por efecto de Casiopeinas I, II y III. Memorias de las Jornadas Médicas del Cáncer. México DF. Instituto Nacional De Cancerología. 1993.
58. Gore I and Shapiro O. Myocarditis. A classification of 1402 cases. *Am Heart J* 1987;34:827-830.
59. Gracia MI, Candosa E, Quiroz G, Rocha L, Ruiz LA. Dosis letales de Casiopeinas en ratón vía IP e IV. Memorias de la 3a Jornada de Casiopeinas-1998 mayo 18-19. Facultad de Química UNAM. México (DF); 1998:45-52.
60. Gracia MI, Ruiz RL. The Antitumor Activity of Several Transmition Metal Complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1991;43:2-3.
61. Gracia MI, Ruiz RL. Antineoplastic Effect of Several Transmition Metal Complex. Fourth Chemical Congress of North America (Memories) New York, Academic Press (USA).1991:25-30.
62. Gude WD, Cosgrove GE, Hirsch GP. Atlas of . Histological the Laboratory Mouse. New York. Plenum Press, 1882.
63. Haimo, LT, Rosenbaum, JL. Cilia, Flagella, and microtubules. *J Cell Biol* 1991;91(3):125-130.
64. Hall EH, White WJ, Lang CM. Acidification of Drincing Water: Its Effects on Selected Biological Phenomena in Male Mice. *J Lab Anim Science* 1980;29:243-248.
65. Ham AW. :Tratado de Histología. 8ª ed. México: Interamericana, 1983.
66. Hecht AM, Ghevara FL, Ruiz RL, Gracia MI, Sumano H, Saldivan L, Tinoco MM, Quiroz RG. Farmacocinética de Medicamentos Antineoplásicos en Ratón. Memorias del VII Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Área de la Salud. México (DF). 1994:91-98.
67. Helleday T, Jenseen D, De la Rosa ME, Ruiz RL. Recombinogenic effects induced by casiopeina III as detected by reverse mutations in SPD8 cells. Memorias de la 3a jornada de Casiopeinas; 1998 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF);1998:37-39.
68. Hirschhom R, Weissman G. Genetic disorders of lysosomes. *Med Genet* 1976;1:49-101.
69. Hochstein P, Atallat AS. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mut Res* 1988;202:363-375.
70. Holmes B, Page ER, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patiets with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* 1987;46:1422-1432.
71. Howell, R R, Williams, J C.: The glycogen storage diseases, in Stanbury, J B,Wyngaarden, J B, Frededckson, D S. (eds.): *Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed 5. New york, McGraw-hill Book Co, 1983;3:141-166.
72. Huerta CM. \_Evaluación Antineoplásica de Nuevos Complejos de Coordinación Empleando el Modelo Tumoral Murino Sarcoma S180. (tesis de Licenciatura). QFB. Orizaba (Veracruz) México: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana,1992.

73. Huner F, Elaine S, Evelin S. *Electron Microscopy of cells and Tissues*. Academic Press Inc. (USA). 1967:16-32
74. Jackson Laboratories. Bethesda, Maryland. EUA. 1997.
75. Johnson KI, Ward PA. *Biology of disease*. Newer concepts in the pathogenesis of immune complex-induced tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:218-226.
76. Jolivet J. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 1983;309:1094-1098.
77. Judath JD, Ahmed K, Mclean AM. Possible role of ion shifts in liver cell injury. *Ciba Foundation Symposium on Cellular injury*. London, Churchill Livingstone 1994;6:187-197.
78. Kallman RF. *Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Chemotherapy*. 2<sup>nd</sup> ed. Canada: Pergamon Press, 1987:68-83.
79. Kisilevsky, R, Shinozuka, H, Benedetti, EL. Et al.: Ribosomal alterations following ethionine intoxication. *Lab. Invest* 1973;28:8-27.
80. Kluck RM, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
81. Kolodny, EH. Lysosomal storage diseases. *N Engl J Med* 1976;249:1217-1220.
82. Kovacs, E, Kung, SD, Moscarello, MA. The influence of amono-nucleoside on polysome patterns of rat liver. *Can J Biochem*. 1990;48:39-43.
83. Kress, BC, Freeze, H, Herd, J K. et al. Purification and characterization of I-cell disease  $\alpha$ -L-fucosidase. *J Biol Chem* 1980;255:955-961.
84. Kuida K, Zheng TS, Kuan C, Harding MW. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* 1995;267:2000-2003.
85. Land JM, Clark JB. Mitochondrial Myopathies. *Trans Biochem Soc* 1979;7:231-245.
86. Lee, RE, Peters, SP; Glew, R H. Gaucher's disease: Clinical-morphologic and pathogenetic considerations. *Pathol Annu* 1977;12:309-339.
87. Lefer AM. The role of lysosomes in circulatory shock. *Life Sci* 1976;19:1803-1810.
88. Litchfield JT, Wilcoxon J. Determination DL50 of Metal Complexes *Pharmacology* 1979;96:99-103.
89. Litchfield JT, Wilcoxon J. Determination of DL50 la Sourisin. *Pharmacology* 1970;1:407-414.
90. Longnecker, DS., Shinozuka, H, Farber, E. Molecular pathology of in vivo inhibition of protein synthesis. Electron microscopy of rat pancreatic acinar cells in puromycin-induced necrosis. *Am J Pathol* 1968;52:891-915.

91. Luft R, Ikkos D, Palmeri G, et al. A case of severe Hypermetabolism of non-Thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: A correlated clinical, biochemical and morphological study. *J Clin Invest* 1994;41:1776-1804.
92. McLean, AM, Sutton, PM. Instant cirrhosis. *Br. J Exp Pathol* 1969;50:502-506.
93. Magee, PN. Toxic liver necrosis. *Lab Invest* 1996;15:111-130.
94. Majno G, Jones I. *Cell, Tissues and Disease: Principles of General Pathology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York (USA): Blackwell Science, 1996.
95. Martin AM Jr, Hackel DB. The myocardium of the dog in hemorrhagic shock. *Am J Pathol* 1964;44:127-140.
96. Mayet CM. Cernimiento Antineoplásico de Nuevos Compuestos de Coordinación empleando el modelo Tumoral Murino Melanoma B16. (tesis de Licenciatura). QFB. Orizaba (Veracruz) México Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana, 1992.
97. Melby EJ, Black MW. Importance of Laboratory Animal Genetics. Health and the environment in Biomedical Research. Academic Press (USA) 1983;12:4-15.
98. Mepherson CW. Reduction of *Pseudomonas aureginosa* and Culiform Bacterium in Mouse, Drinking water Following Treatment with Hydrochloric acid or Chloric. *J Anim Sci* 1983;13:737-744
99. Milligan CE, Prevetie D, Yaginuma H, Homma S, Cardwell C, et al. Specific peptide inhibitors of the CPP32 like proteases block apoptosis. *Neuron* 1999;15:385-393.
100. Moreno ER, Gasque S, Queré A, Ferrer SG, Ortega N, Ruiz LA, et al. Estabilidad de Casiopeínas. Memorias de la 1ª jornada de trabajo en Casiopeínas; 1994 enero 20-21; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1994.
101. National Cancer Institute Monograph 42: International Symposium on Genes and Chromosomes Structure and Function, 1995.
102. Neufeld, E F.: Lessons from genetic disorders of lysosomes. *Harvey lect.* 1979-80;75:41-60.
103. Nigg EA. Cellular substrates of p34 and its companion cyclin dependent kinases. *Trends Cell Biol* 1993;3:296-301.
104. Orme, M, Breckenridge, A.: Exantimers of warfarin and Phenobarbital. *N Engl J Med* 1976;295:1482.
105. Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Dixit VM. The CED-3/ICE like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin. *A j Biol Chem* 1996;271:16443-46.
106. Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1963;1:188-211.
107. Parson GL, of Stain M. *Manual methods*. Armed Forces Institute of Pathology, Washintong D. C (USA) 1968.
108. Pérez TR. *Introducción a la Patología General: Mecanismos de Enfermedad*. 2da. ed. México (DF). Ed. Panamericana 1991:71-117.
109. Pérez TR.: Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;3:112-120.

110. Pérez TR. Principios de Patología. 3a. edición. México DF: Edit. Panamericana.1991.
111. Pfeiffer J.:La Célula.2ª. ed.México: Time life International,1981.
112. Powis, G. And Hacker, MP. The Toxicity of Anticancer Drugs. Pergamon Press. USA, 1991.
113. Pratt W, Ruddon RW. The Cancer Problem, the Anticancer Drugs. Oxford University Press.1973:3-11
114. Prestayko A, Wand-Crooke ST. Cis-platin: Current Status and New Developments. Academic Press 1980;3:91-106.
115. Pronk GJ, Ramer K, Amiri P, Williams LT. Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation REAPER. Science 1996;271:808-810.
116. Quiroz GF. Toxicidad aguda de Casiopeína II por Administración Intravenosa en Ratones. Estudio Anatonomohistológico. (tesis de Licenciatura). México (DF). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1992.
117. Rendon GE, Tenorio ME, Mendoza MA, Ruiz LA. Determinación Farmacocinética de casiopeínas II y III en raton, por absorción atómica. Memorias de la3ª jornada de Casiopeínas; 1998 mayo 18-19; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1988:43-47.
118. Renkin EM. Multiple pathways of capillary permeability Circ Res 1987;41:735-740.
119. Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J Cell Biol 1963;19:139-157.
120. Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury. III. The nature of calcium-associated electron-opaque masses in rat liver mitochondria following poisoning with carbon tetrachloride. J Cell Biol 1995;25:53-75.
121. Richard F. E. and Karen L. Artifacts in Biological Electron Microscopy .2nd ed. K.Plenum Press- New York London 1988.
121. Rosemberg B, Truska JG, Mansuur BH. Platinum Compunds: A new Class of Potent Antitumor Agents. Nature 1969;22:385-386.
122. Ruiz RL. Registro No. 18801-120579 y 18802-12058005. Dirección General De Invenciones. Marcas y Desarrollo Tecnológico. SECOFI Patent Number. 5. 107,005 1992 abril 21.
123. Ruiz RL : Naturaleza Química y Clasificación de los Agentes Quimioterapéuticos. Cáncer y quimioterapia. Memorias. México DF. Sociedad de Química de México, Facultad de Química, UNAM, Instituto Nacional de Cancerología. 1992:13-20.
124. Ruiz RL, Gracia I, De la Rosa ME, Sumano H, Gómez C, Arenas T, Gómez E, Pimentel E, Cauces M. Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic Activities and Preliminar Toxicity of Copper (II) New Drugs, Casiopeinas I, II and III. Journal of Inorganic Biochemistry 1993;51:250
125. Ruiz RL : Diseño y Síntesis de Compuestos Potencialmente Antineoplásicos. "Cáncer y Quimioterapia"(Perspectivas México). Memorias. México DF. Facultad de Química, UNAM.1992.
126. Ruiz RL. Cytostatic Effect of Some New Complexes; Simposium on Transition Metal-Nucleotic Acid Chemistry Metal Complexes and Drugs (memories). New york. Academic Press (USA) 1986:100103.

127. Ruiz RL, Gasque L, Martínez A, Moreno ER, Solans X, Cooper (II) Hydrate Mixeo Chelate Complexes, Part II. *Acta Crystallographica*. 1992;48:1758-1788.
128. Ruiz RL, Gasque L, Martínez A, Moreno ER, Solans X, Cooper (II) Hydrate Mixeo Chelate Complexes, Part III. *Acta Crystallographica*. 1993;43:428-432.
129. Ruiz RL, Gracia M. Desion, Synthesis, Characterization and in vivo Antineoplastic Test of Anticancer Research (Memories). Creta, Grecia. *Olympus Scientist* 1992:37-41
130. Ruiz RL, Gracia MI, Moreno ER, Grigo C, Tovar H, Gracia CA. Study of interaction Between Several Cooper (II) Complexes Casiopeinas® Family With DNA. *Latin American Inorganic Chemistry*
131. Saldívar L, Tinoco M, Gerardo Q, Gracia MI. Distribución de Casiopeínas en ratones evaluadas por absorción atómica. *Memorias de la 1ª jornada de Casiopeínas 1994 enero 20-21; Facultad de Química UNAM. México (DF);1994.*
132. Sartorelli AC. Therapeutic attack of hypoxic cell of solid tumors: Presidential address. *Cancer Res* 1988;48:775-781.
133. Santos E.y Rodríguez J.: *El Cancer*, 2ª edición, Prensa Científica, España. 1986.
134. Secretaría de Salud. Anuario1990. Sec.Salud. México(DF):SSA,1997.
135. Secretaría de Salud. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Dirección General de Epidemiología. México (DF):SSA, 1995.
136. Seligman BE, Gallin II. Use of lipophilic probes of membrane potential to assess human neutrophil activation: Abnormality of cell. *J Clin Invest* 1990;86:493-503.
137. Seeman P. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic and drug-induced lysis. *Fed Proc* 1974;33:2126-2121.
138. Sepúlveda B, Portilla HR, Rojas E. Las alteraciones del hígado en la destrucción celular. *Rev Invest Clin* 1975;9:455-453.
139. Shattil SJ, Anaya GR, Bennett J, et al. Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. *J Clin Invest* 1995;55:636-643.
140. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider DE. A simple Technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res* 1988; 175:184-191.
141. Smucler, EA. Structural and functional alteration of the endoplasmic reticulum during  $CCl_4$  intoxication, in Gran, F.C. (ed.): *Structure and Function of the Endoplasmic Reticulum in Animal Cells*. New York, Academic Press 1968;13-56.
142. Solans X, Ruiz RL, Briansó JL, Gasque L. Structure of (1,10 Phenanthroline)(salicylaldehydato) Cooper (II), Nitrate. *Acta Crystallographica* 1987;43:428-432.
143. Solans X, Ruiz RL, Martínez A, Gasque L, Briansó JL. Structure of Chloro (Glycirato) (1,10 Phenanthroline)(L-Phenylalaninato) Cooper (II), Nitrate Monohydrate *Acta Crystallographica* 1988;44:628.

144. Song Q, Barrows SR, Smith G. Protease cleaves DNA-dependent protein kinase in cell. *J Exp Med* 1996;184:619-626.
145. Sturgess, JM, De la Iglesia FA, Minanker E, et al. The Golgi complex . The effects of aminonucleoside on ultrastructure and glycoprotein biosynthesis. *Lab Invest* 1974;31:6-14.
146. Susuky k. Giant Hepatic mitochondria: Production in mice fed with cuprizone. *Science* 1969;163:81-82.
147. Szymych PS, Wanstrup J, Andersen V. Chronic granulomatous disease of childhood. A morphologic study. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1988;74:179-188.
148. Tandler B, Smith AL, Wynder EL. Mouse hepatic cell structure and function. *J Cell Biol* 1969;41:447-452.
149. Tannock FI. y Hill RO. *The basic Science of Oncology*. Pergamon Press, Canada, 1987.
150. Theilen, GH. and Madewell, BR. *Veterinary Cancer Medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987.
151. Thompson RG. *General Veterinary Pathology*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia (USA): Saunders Company, 1984.
152. Tinoco MC. Administración de Casiopeína® I por vía Intraperitoneal. Estudio Anatómohistológico en ratones. (tesis de Licenciatura). México (DF). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1992.
153. Tovar SE, Moreno E, Ruiz AL. Mecanismo de Acción de las Casiopeínas: Modelo Computacional. Memorias de la 1<sup>a</sup> jornada de Casiopeínas; 1994 enero 20-21; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1984.
154. Tovar TA, Ruiz AL, Gracia MI, et al. Estudio electroforético de mecanismos de interacción de la familia de la Casiopeína I; II Y III con ADN. Memorias de la 1<sup>a</sup> jornada de Trabajo en Casiopeínas; 1994 enero 20-21; Facultad de Química UNAM. México (DF); 1994
155. Uphoff DE, Jacobs BB. Immunologic modification: A basic survival mechanism. *Science* 1974;185:582-587.
156. Valenzuela R, Aikawa M, O'Regan S, et al. Chédiak-Higashi síndrome in a black infant. A light and electron microscopic study with special emphasis in erythrophagocytosis. *Am J Clin Pathol* 1976; 65:483-494.
157. Wallach DF. *Plasma membranes and disease*. New York, Academic Press. 1984.
158. Ward PA, Till GO, Hatherill JR, Annesley TM, Kunkel RG. Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1985;76:517-527.
159. Weissmann, G. Crystals, lysosomes and gout. *Adv Intern Med* 1974;19:239-257.
160. Weissmann, G, Smolen, J E, Hoffstein, S. Polymorfonuclear leukocytes as secretory organs of inflammation. *J Invest Dermatol* 1978;71:75-99.
161. Whithin JC, Chapman CE, Simons ER. Et al. Correlation between membrane potential changes and superoxide production in human granulocytes stimulated by phorbol myristate acetate: Evidence for defective activation in disease. *Science* 1980;255:1874-1978.

162. Winick NJ. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with ectoposide. *J Clin Oncol* 1993;11:209-212.
163. Whyte M. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1996;6:245-248.
164. Young RC . The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl Med* 1981;305:139-141.
165. Yuan j. Molecular control of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:211-214.
166. Zamble DB and Lippard JS. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *TIBS* 1996;20:435-439.
167. Zing D. And Hayat M.A. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. 2<sup>nd</sup> ed. Edward Arnold. 1998.
- (1988)

## 10. ANEXOS

**ANEXO 1. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 1 (45 min)**

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	Tumefacción, degeneración hidrópica +	-	Congestión	-
CEREBRO	-	-	-	Edema +
CORAZÓN	Congestión intersticial +	Congestión focal +	-	-
HIGADO	-	Edema	-	-
PULMON	-	-	-	-
RIÑÓN	-	-	-	Congestión paracortical +

(-)=Sin alteración  
 +=Leve  
 ++=Moderado  
 +++=Severo

**ANEXO 2. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 2 (90 min)**

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	Megacariocitosis +	Congestión, degeneración hidropica +	-	Megacariocitosis +
CEREBRO	Edema perivascular +	-	-	-
CORAZÓN	Degeneración sarcolémica +	Congestión perivascular localizada+	Edema	Degeneración sarcolémica multifocal ++
HIGADO	Tumefacción, degeneración hidrópica centrolobulillar +	Degeneración hidrópica multifocal +	Edema, congestión focal, degeneración hidrópica localizada +	Degeneración hidrópica + Hiperplasia linfoide +
PULMÓN	Neumonía intersticial ++	Hiperplasia linfoide	-	Congestión +
RIÑÓN	Tumefacción, inflamación focal no determinada, hiperplasia linfoide	Hiperplasia linfoide	-	Congestión y edema +

(-)=Sin alteración  
 +=Leve  
 ++=Moderado  
 +++=Severo

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**ANEXO 3. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 3 (3h)**

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	-	-	Megacariocitosis +	Congestión ++
CEREBRO	-	-	Congestión focal perivascular +	Tumefacción, edema difuso ++
CORAZÓN	Edema intersticial difuso ++	Congestión epicárdica +	Congestión multifocal ++	Distensión fibrilar, degeneración sarcotémica + edema
HIGADO	Degeneración hidrópica centrolobulillar +	Degeneración hidrópica centrolobulillar difusa ++	Degeneración hidrópica centrolobulillar multifocal +	Degeneración hidrópica centrolobulillar difusa ++
PULMÓN	Retracción bronquial	Hiperplasia linfoide	Congestión +	-
RINÓN	Infiltración linfocitaria	-	Hiperplasia linfoide +	Nefritis paracortical aguda no diferenciada

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

**ANEXO 4. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 4 (6h)**

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	-	-	Congestión +	hemosiderosis, Necrosis focal
CEREBRO	-	-	-	-
CORAZÓN	-	-	-	Degeneración sarcotémica +
HIGADO	-	-	Degeneración hidrópica centrolobulillar +	Hiperplasia linfoide
PULMÓN	-	-	-	Congestión difusa ++
RINÓN	-	-	-	-

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

**ANEXO 5. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 5 (12h)**

ORGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	Congestión focal +	-	Hemosiderosis, congestión +	Congestión multifocal +
CEREBRO	Congestión perivascular +	-	Tumefacción ++-	Tumefacción ++
CORAZON	Congestión epicárdica +	Degeneración sarcolémica +	Congestión difusa +	Congestión difusa + degeneración sarcolémica
HIGADO	Hiperplasia linfóide	Degeneración hidrópica centrolobulillar +	Degeneración hidrópica multifocal	Degeneración hidrópica difusa ++
PULMÓN	-	Congestión +	-	-
RIÑÓN	-	Degeneración hidrópica de túbulos contorneados proximales y distales +	Degeneración hidrópica de túbulos proximales y distales ++	Congestión ++ hiperplasia linfóide

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

**ANEXO 6. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 6 (24h)**

ORGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	-	hemosiderosis	hemosiderosis	Atrofia linfóide megacariocitosis + hemosiderosis +
CEREBRO	Tumefacción +	-	-	Edema perivascular +
CORAZON	-	Congestión y edema multifocal ++	Degeneración sarcolémica, congestión epicárdica +	Tumefacción, degeneración sarcolémica +
HIGADO	Necrosis coagulativa focal + Degeneración hidrópica centrolobulillar ++	Congestión difusa +	Hiperplasia linfóide +	Degeneración hidrópica centrolobulillar ++ Congestión +
PULMON	-	Edema difuso +	Edema difuso tumefacción +	Neumonía intersticial
RIÑÓN	Hemosiderosis	Congestión paracortical +	Congestión difusa +	Edema intersticial +

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

ANEXO 7. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 7 (48h)

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	Congestión +	Congestión ++ megacariocitosis	Congestión ++ megacariocitosis	-
CEREBRO	Tumefacción +	Congestión localizada +	Tumefacción +	Tumefacción +
CORAZÓN	-	Congestión difusa +	Degeneración sarcolémica +	Congestión pericárdica +
HIGADO	-	Degeneración hidrópica centrolobulillar +	Degeneración hidrópica centrolobulillar +	Hiperplasia linfóide +
PULMÓN	-	-	Edema intersticial +	Edema intersticial +
RIÑÓN	-	Degeneración hidrópica +	Congestión paracortical +	Degeneración hidrópica +

(-)=Sin alteración

+=Leve

++=Moderado

+++=Severo

ANEXO 8. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 8 (72h)

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	Megacariocitosis ++ hemosiderosis +	Megacariocitosis +	Megacariocitosis + congestión	Edema y congestión ++ megacariocitosis ++
CEREBRO	-	Tumefacción multifocal +	Edema perivascular +	Tumefacción, cromatolisis
CORAZÓN	Degeneración sarcolémica +	Degeneración sarcolémica multifocal ++	-	Degeneración sarcolémica multifocal ++
HIGADO	Tumefacción y degeneración hidrópica centrolobulillar +	Tumefacción y degeneración hidrópica centrolobulillar +	Tumefacción y degeneración hidrópica centrolobulillar +	Edema intersticial Tumefacción y degeneración hidrópica centrolobulillar +
PULMÓN	Edema intersticial	-	Hiperplasia linfóide	-
RIÑÓN	-	Degeneración hidrópica local +	Degeneración hidrópica de lúbulos contorneados +	Congestión paracortical ++

(-)=Sin alteración

+=Leve

++=Moderado

+++=Severo

ANEXO 9. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO 9 (96h)

ÓRGANO/DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
BAZO	Megacariocitosis ++ hemosiderosis	Megacariocitosis Congestión +	Megacariocitosis, congestión +	Tumefacción congestión ++
CEREBRO	Edema perivascular	-	Congestión perivascular +	Congestión perivascular +
CORAZÓN	-	Degeneración sarcolémica	Degeneración sarcolémica	Congestión epicárdica +
HIGADO	Degeneración hidrópica centrotubulillar +	Edema difuso + Infarto localizado	Edema intersticial multifocal +	Degeneración hidrópica centrotubulillar ++
PULMÓN	-	Edema intersticial	Hiperplasia linfoide	-
RIÑÓN	-	Hiperplasia linfoide	-	Tumefacción y degeneración paracortical +

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

ANEXO 10. HALLAZGOS HISTOLOGICOS OBSERVADOS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA III VÍA IP. GRUPO CONTROL

ÓRGANO/DOSIS	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
BAZO	-	-	-	-
CEREBRO	-	-	-	-
CORAZÓN	-	-	-	-
HIGADO	-	Edema intersticial +	-	-
PULMÓN	-	-	-	-
RIÑÓN	-	-	-	Congestión

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

## ANEXOS 11-25.

## FRECUENCIAS DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS MÁS SIGNIFICATIVAS OBSERVADAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE CASIOPEÍNA® III EN RATONES.

11)  
BAZO CONGESTIÓN DIFUSA

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg	+				+		+	+		-	4
8mg		+					++		+	-	3
10mg	+			+	+		++	+	+	-	6
12mg			++		+			++	+	-	4
											17

12)  
BAZO HEMOSIDEROSIS

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg						+		+	+	-	3
8mg						+				-	1
10mg					+					-	1
12mg				+					+	-	2
											7

13)  
BAZO PRESENCIA DE ABUNDANTES MEGACARIOCITOS

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg		+							+	-	2
8mg			+			+	+	+	+	-	5
10mg		+					+	+	++	-	4
12mg								+		-	1
											12

14)  
CORAZÓN DEGENERACIÓN HIDRÓPICA (DEGENERACIÓN SARCOLÉMICA)

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg		+			+					-	2
8mg									+	-	1
10mg						+	+		+	-	3
12mg		+	+		+	+				-	4
											10

15)  
CORAZÓN CONGESTIÓN DEL EPICARDIO Y MIOCARDIO

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg	+				+	+		+	+	-	5
8mg	+	+	+			+	+	+		-	6
10mg			++		+					-	2
12mg					++		+	+		-	3
											16

16)  
CORAZÓN EDEMA

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total	
6mg			+							-	1	
8mg						+				-	1	
10mg		+								-	1	
12mg			+							-	1	4

17)  
RIÑÓN CONGESTIÓN PARACORTICAL

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total	
6mg										-	-	
8mg						+				-	1	
10mg						+	+		+	-	3	
12mg	+	+			+	+		++	+	-	6	10

18)  
RIÑÓN DEGENERACIÓN HIDRÓPICA (PARACORTICAL)

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total	
6mg					+		+	+		-	3	
8mg					+			+	+	-	3	
10mg							+			-	1	
12mg										-	-	7

19)  
RIÑÓN HIPERPLASIA LINFOIDE

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total	
6mg										-	-	
8mg		+							+	-	2	
10mg			+		+					-	2	
12mg		+		+				+		-	3	7

20)  
PULMÓN CONGESTIÓN

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total	
6mg										-	-	
8mg					+					-	1	
10mg			+							-	1	
12mg		+		+						-	2	4

21) PULMÓN EDEMA INTERTICIAL (SEPTAL)

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg		+						+			2
8mg	+					+					2
10mg						+	+		+		3
12mg						+	+				2
											9

22) PULMÓN HIPERPLASIA LINFOIDE

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg											-
8mg		+	+								2
10mg								+			1
12mg									+		1
											4

23) HÍGADO DEGENERACIÓN HIDRÓPICA CENTROLOBULILAR

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg		+	+			+		+	+	-	5
8mg		+	+	+			+	+	+	-	6
10mg			+	+	+		+	+		-	5
12mg		+	+		+	+		+	+	-	6
											22

24) HÍGADO HIPERPLASIA LINFOIDE

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg					+					-	1
8mg										-	-
10mg						+			+	-	2
12mg				+			+			-	2
											5

25) HÍGADO CONGESTIÓN

Tiempo	45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Control	Total
6mg										-	-
8mg	+					+				-	2
10mg		+								-	1
12mg										-	-
											3

ANEXOS 26-43. COMPORTAMIENTO ESTADÍSTICO DE LAS PRINCIPALES LESIONES MICROSCÓPICAS

26)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	bazo	Congestión difusa	*				*		*	*				4a
8mg/kg	bazo	Congestión difusa		*						*		*		3a
10mg/kg	bazo	Congestión difusa	*			*	*			*	*	*		6a
12mg/kg	bazo	Congestión difusa			*		*				*	*		4a
			2	1	1	1	3	0	3	3	3	0	17	

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

27)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	bazo	hemosiderosis						*		*	*			3a
8mg/kg	bazo	hemosiderosis						*						1a
10mg/kg	bazo	hemosiderosis					*							1a
12mg/kg	bazo	hemosiderosis				*					*			2a
			0	0	0	1	1	2	0	1	2	0	7	

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

28)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	bazo	Presencia de abundantes megacariocitos		*								*		2a
8mg/kg	bazo	Presencia de abundantes megacariocitos			*			*	*	*	*			5a
10mg/kg	bazo	Presencia de abundantes megacariocitos		*					*	*	*			4a
12mg/kg	bazo	Presencia de abundantes megacariocitos									*			1a
			0	2	1	0	0	1	2	3	3	0	12	

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

29)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total		
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr				
6mg	corazón	degeneración hidrópica	*					*							2a
8mg/kg	corazón	degeneración hidrópica										*			1a
10mg/kg	corazón	degeneración hidropica						*	*			*			3a
12mg/kg	corazón	degeneración hidropica		*	*			*	*						4a
			1	1	1	0		2	2	1	0	2	0		10

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

30)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total		
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr				
6mg	corazón	congestión del epicardio	*					*	*		*	*			5a
8mg/kg	corazón	congestión del epicardio	*	*	*				*	*	*				6a
10mg/kg	corazón	congestión del epicardio			*			*							2a
12mg/kg	corazón	congestión del epicardio						*		*	*				3a
			2	1	2	0		3	2	2	3	1	0		16

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

31)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total		
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr				
6mg	corazón	edema			*										1a
8mg/kg	corazón	edema						*							1a
10mg/kg	corazón	edema		*											1a
12mg/kg	corazón	edema			*										1a
			0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0		4

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

32)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	riñón	congestión												0a
8mg/kg	riñón	congestión							*					1a
10mg/kg	riñón	congestión							*	*		*		3a
12mg/kg	riñón	congestión	*	*				*	*		*	*		6b
			1	1	0	0	1	3	1	1	2	0		10

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

33)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	riñón	deg. Hidrópica					*		*	*				3a
8mg/kg	riñón	deg. Hidrópica					*			*	*			3a
10mg/kg	riñón	deg. Hidrópica							*					1a
12mg/kg	riñón	deg. Hidrópica												0a
			0	0	0	0	2	0	2	2	1	0		7

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

34)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	riñón	hiperplasia Linfoide												0a
8mg/kg	riñón	hiperplasia Linfoide		*							*			2a
10mg/kg	riñón	hiperplasia Linfoide			*		*							2a
12mg/kg	riñón	hiperplasia Linfoide		*	*	*				*				3a
				2	1	1	1	0	0	1	1	0		7

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

35)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	pulmón	congestión												0a
8mg/kg	pulmón	congestión						*						1a
10mg/kg	pulmón	congestión			*									1a
12mg/kg	pulmón	congestión		*	*									2a
			0	1	1	1	1	0	0	0	0	0		4

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

36)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	pulmón	edema		*							*			2a
8mg/kg	pulmón	edema							*					1a
10mg/kg	pulmón	edema						*	*		*			3a
12mg/kg	pulmón	edema						*	*					2a
			0	1	0	0	0	3	2	1	1	0		8

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

37)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	pulmón	hiper. Linfoide												0a
8mg/kg	pulmón	hiper. Linfoide		*	*									2a
10mg/kg	pulmón	hiper. Linfoide								*				1a
12mg/kg	pulmón	hiper. Linfoide									*			1a
			0	1	1	0	0	0	0	1	1	0		4

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

38)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	hígado	deg. Hidrópica		*	*			*		*	*			5a
8mg/kg	hígado	deg. Hidrópica		*	*	*			*	*	*			6a
10mg/kg	hígado	deg. Hidrópica			*	*	*		*	*				5a
12mg/kg	hígado	deg. Hidrópica		*	*		*	*		*	*			6a
			0	3	4	2	2	2	2	4	3	0		22

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

39)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	hígado	hiperp. Linfoide					*							1a
8mg/kg	hígado	hiperp. Linfoide												0a
10mg/kg	hígado	hiperp. Linfoide						*						1a
12mg/kg	hígado	hiperp. Linfoide				*			*					2a
			0	0	0	1	1	1	1	0	0	0		4

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

40)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	higado	congestión												0a
8mg/kg	higado	congestión	*					*						2a
10mg/kg	higado	congestión		*										1a
12mg/kg	higado	congestión												0a
			1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

41)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	cerebro	congestión												0a
8mg/kg	Cerebro	congestión					*	*			*			3a
10mg/kg	Cerebro	congestión			*						*			2a
12mg/kg	Cerebro	congestión												0a
			0	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	5

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

42)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS									Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	cerebro	edema		*							*			2a
8mg/kg	cerebro	edema			*			*						2a
10mg/kg	cerebro	edema						*		*				2a
12mg/kg	cerebro	edema	*	*	*	*								4a
			1	2	2	1	0	2	0	1	1	0	0	10

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

43)

Dosis/tiempo	órgano	FRECUENCIAS Principales lesiones	PRINCIPALES DE LESIONES MICROSCÓPICAS										Control	Total	
			45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr				
6mg	cerebro	tumefacción								*	*				2a
8mg/kg	cerebro	tumefacción					*				*				2a
10mg/kg	cerebro	tumefacción			*		*			*					3a
12mg/kg	cerebro	tumefacción								*	*				2a
			0	0	1	0	2	0	3	3	0	0	0	0	9

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

**ANEXO 44. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS  
DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP  
GRUPO 1 (45 min)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MENBRANAS				
NUCLEO			Hipercromatosis+	Fragmentación de heterocromatina+(R)(Co)(B)(P)(Ce)(H)
NUCLEOLO				
MITOCONDRIA			Dilatación de crestas+(R)	Gigantismo+(Co), (R)(B)
RETICULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS			Pérdida de la agregación ribosómica+(R)	
VACUOLAS LISOSOMAS				
INCLUCIONES			↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina+(B)
OTROS				

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++=Moderado

+++=Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R)RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

**ANEXO 45. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS  
DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP  
GRUPO 2 (90 min)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MEMBRANAS				
NUCLEO			Picnósis+ (R)(Co)(B)(P)(Ce)(H)	Hipercromatosis+
NUCLEOLO				
MITOCONDRIA		Gigantismo+(Co), (R), (B).	Gigantismo+(Co), (R), (B).	Dilatación de crestas+(R)
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS			Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)	Perdida de la agregación ribosómica(R)
VACUOLAS LISOSOMAS				
INCLUCIONES		↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina+(B)	↑De hemosiderina+(B)
OTROS			Distorsión de bandas Z+(Co)	Distorsión de bandas Z+(Co)

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++=Moderado

+++=Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

**ANEXO 46. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP GRUPO 3 (3h)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MEMBRANAS		↑y distorción celular de megacariocitos+	Engrosamiento de la mem. Basal+(R)(P) Desmielinización+(Ce)	↑y distorción celular de megacariocitos+
NUCLEO			Apoptosis+(R)(Co)(P)(H)	Hipercromatosis +Picnósis+(R)(Co)(B)(P)(Ce)(H)
NUCLEOLO				
MITOCONDRIA			Dilatación de crestas+(R) Gigantismo+(Co), (R), (B).	Gigantismo+(Co), (R), (B).
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS	Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)		Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)	Pérdida de agregación ribosómica+(R)
VACUOLAS LISOSOMAS				
INCLUSIONES		↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)		↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)
OTROS		Abundantes filamentos intermedios+(Co)(P)(R)	Edema perivascular+(Ce)	Edema intersticial+(R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de bandas Z+(Co)

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

**ANEXO 47. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS  
DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP  
GRUPO 4 (6h)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MEMBRANAS	Pérdida de microvilli en Túbulos renales	Engrosamiento de la mem. Basal+(R)(P)	↑y distorsión celular de megacariocitos+(B)	Pérdida de podocitos+(R) ↑y distorsión celular de megacariocitos+(B)
NUCLEO		Identación y multiformas(P)(H)(B)	Hipercromatosis+ apoptosis+(R)(Co)(P)(H)	
NUCLEOLO				Nucleolos prominentes(R)(B)
MITOCONDRIA	Gigantismo+(Co), (R), (B).	Gigantismo+(Co), (R), (B).	Gigantismo++(Co), (R), (B).	Dilatación de crestas+(R)
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS		Pérdida de agregación ribosómica(R)+	Pérdida de agregación ribosómica(R)+	Proliferación y dilatación de cisternas de RER.+(Co),(H)
VACUOLAS LISOSOMAS INCLUCIONES		↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina+(B)	↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)
OTROS	Edema perivascular+(Ce)	Edema perivascular+(Ce)	Edema intersticial++(R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de discos intercalares+(Co)	Edema intersticial++(R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de bandas Z+(Co) Edema perivascular+(Ce)

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

**ANEXO 48. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP GRUPO 5 (12h)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MEMBRANAS		↑y distorsión celular de megacariocitos+(B) linfocitos indentados+ Desmielinización+(Ce) Pérdida de microvilli en Túbulos renales	Linfocitos indentados+ Engrosamiento de la mem. Basal+(R)(P) Desmielinización+(Ce) Precipitación de cobre en mem. de neuronas+	Engrosamiento de la mem. Basal+(R)(P) Pérdida de podocitos+(R) ↑y distorsión celular de megacariocitos+(B) Desmielinización+(Ce)
NUCLEO		Hipercromatosis+	Hipercromatosis++ Identación y multiformas(P)(H)(B)	Picnósis+(R)(Co)(B)(P)(Ce)(H) Fragmentación de heterocromatina+(R)(Co)(B)(P)(Ce)(H) apoptosis+(R)(Co)(P)(H) Identación y multiformas(P)(H)(B)
NUCLEOLO		Nucleolos prominentes+(R)(B)	Nucleolos prominentes+(R)(B)	
MITOCONDRIA		Gigantismo++(Co), (R), (B).	Dilatación de crestas++(R) Gigantismo++(Co), (R), (B).	Dilatación de crestas++(R) Gigantismo++(Co), (R), (B).
RETICULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS	Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)	Pérdida de agregación ribosómica(R)++	Dilatación de sistemas en RE+(H)	Pérdida de agregación ribosómica(R)+ Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)
VACUOLAS LISOSOMAS				
INCLUCIONES	↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑fibrina(P) ↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina++(B)
OTROS	Edema intersticial+(R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de bandas Z+(Co)	Edema intersticial+(R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de bandas++ Z(Co) Edema perivascular+(Ce) Distorsión de discos intercalares+(Co)	Abundantes filamentos intermedios+(Co)(P)(R) Edema perivascular+(Ce)	↑de células mesangiales+(R) Edema intersticial++(R)(H)(Ce)(P)(Co) Dilatación de sinusoides hepáticos

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

**ANEXO 49. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP GRUPO 6 (24h)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MEMBRANAS	linfocitos indentados+	↑y distorsión celular de megacariocitos+(B) Desmielinización+(Ce) Precipitación de cobre en mem. de neuronas+	Engrosamiento de la mem. Basal++(R)(P) ↑y distorsión celular de megacariocitos+(B)	Pérdida de podocitos+(R) Engrosamiento de la mem. Basal+(R)(P) Precipitación de cobre en mem. de neuronas+
NUCLEO	Hipercromatosis+		Picnósis+(R)(Co)(B)(P)(Ce)(H) Hipercromatosis+	Apoptosis+(R)(Co)(P)(H) Fragmentación de heterocromatina+(R)(Co)(B)(P)(Ce)(H)
NUCLEOLO			Nucleolos prominentes(R)(B)	Nucleolos prominentes+(R)(B) Identación y multiformas(P)(H)(B)
MITOCONDRIA	Gigantismo++(Co), (R)(B)	Gigantismo++(Co), (R)(B)	Gigantismo++(Co) (R)(B)Dilatación de crestas++(R)	Gigantismo++(Co) (R)(B)Dilatación de crestas(R)
RETICULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS	Dilatación de sistemas en RE+(H)	Hiperplasia de golgi+(H) Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)	Pérdida de agregación ribosómica+(R) Dilatación de sistemas en RE+(H)	Pérdida de agregación ribosómica++(R) Dilatación de sistemas en RE+(H)
VACUOLAS LISOSOMAS	Gigantismo+(Co) (R)(B)	Gigantismo++(Co), (R)(B)	Gigantismo++(Co) (R)(B)	
INCLUCIONES	↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina++(B)	Pérdida de sulfactante+(P) ↑del colágeno+(R)(P)(Co)
OTROS	+ Dilatación de sinusoides hepáticos Distorsión de discos intercalares+(Co)	↑de células mesangiales+(R) Edema intersticial++ (R)(H)(Ce)(P)(Co)	Abundantes filamentos intermedios+(Co) (P)(R) Edema intersticial++ (R)(H)(Ce)(P)(Co) Edema perivascular+(Ce)	↑de células mesangiales+(R) Edema intersticial++ (R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de bandas Z++(Co)

(-)=Sin alteración

+ =Leve

++ =Moderado

+++ =Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

**ANEXO 50. LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CASIOPEÍNA® III VÍA IP  
GRUPO 7 (48h)**

ESTRUCTURAS / DOSIS	6mg/Kg	8mg/Kg	10mg/Kg	12mg/Kg
MEMBRANAS		Linfocitos indentados+ complejos de unión alterados+(Co)(P) Desmielinización+(Ce)	Pérdida de podocitos++(R) Engrosamiento de la mem. Basal++(R)(P) ↑y distorsión celular de megacariocitos+(B) Desmielinización+(Ce) Pérdida de microvilli en Túbulos renales	Engrosamiento de la mem. Basal++(R)(P) Pérdida de podocitos++(R) ↑y distorsión celular de megacariocitos+(B) Precipitación de cobre en mem. de neuronas+ complejos de unión alterados++(Co)(P) Desmielinización+(Ce)
NUCLEO		Hipercromatosis+ Picnósis+ (R)(Co)(B)(P)(Ce)(H)	Picnósis+ (R)(Co)(B)(P)(Ce)(H) Hipercromatosis+ Identacion y multiformas(P)(H)(B)	Apoptosis+(R)(Co)(P)( H) Identacion y multiformas(P)(H)(B)
NUCLEOLO			Nucleolos prominentes+(R)(B)	Nucleolos prominentes+(R)(B)
MITOCONDRIA		Gigantismo++(Co) (R)(B)	Gigantismo++(Co) (R)(B)	Gigantismo++(Co) (R)(B)
RETICULO ENDOPLÁSMICO APARATO DE GOLGI Y RIBOSOMAS	Dilatación de sistemas en RE+(H)	Pérdida de agregación ribosómica+(R)(Co)(H)	Perdida de agregación ribosómica++ (R)(Co)(H) Hiperplasia de golgi+(H)	Perdida de agregación ribosómica++(R) (Co)(H) Hiperplasia de golgi+(H) Proliferación y dilatación de sistemas de RER.+(Co),(H)
VACUOLAS LISOSOMAS			Gigantismo++(Co) (R)(B)	Gigantismo++(Co) (R)(B)
INCLUSIONES	↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina+(B) ↑del colágeno+(R)(P)(Co)	↑De hemosiderina++(B) ↑De lípidos intracitoplasmáticos+(H)	↑De hemosiderina++(B) ↑fibrina(P) Pérdida de sulfactante+(P)
OTROS	Edema intersticial+ (R)(H)(Ce)(P)(Co) Engrosamiento del endotelio vascular+(R)(B)(P)	↑de células mesangiales+(R) Edema intersticial+ (R)(H)(Ce)(P)(Co)	↑de células mesangiales++(R) Distorsión de bandas Z++(Co) Engrosamiento del endotelio vascular+(R)(B)(P)	Pérdida de fibras elásticas+(P) Edema intersticial++ (R)(H)(Ce)(P)(Co) Distorsión de bandas Z+(Co) Edema perivascular+(Ce)

(-)=Sin alteración

+=Leve

++=Moderado

+++=Severo

ÓRGANO AL QUE PERTENECE LA CÉLULA AFECTADA: (B) BAZO, (Ce) CEREBRO, (Co) CORAZÓN, (H) HÍGADO, (R) RIÑÓN Y (P) PULMÓN.

ANEXOS 54-. COMPORTAMIENTO ESTADÍSTICO DE LAS PRINCIPALES LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS.

54)

Dosis/tiempo	FRECUENCIAS Organelo o estructura subcelular afectada	PRINCIPALES DE LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS										Control	Total
		45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	membranas				*		*		*	*			4a
8mg/kg	membranas			*	*	*	*	*	*	*			7a
10mg/kg	membranas			*	*	*	*	*	*	*			7a
12mg/kg	membranas		*	*	*	*	*	*	*	*			8a
	total	0	1	3	4	3	4	3	4	4	0		26

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

55)

Dosis/tiempo	FRECUENCIAS Organelo o estructura subcelular afectada	PRINCIPALES DE LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS										Control	Total
		45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	nucleo						*						1a
8mg/kg	nucleo				*	*		*	*				4a
10mg/kg	nucleo	*		*	*	*	*	*	*	*			8b
12mg/kg	nucleo	*		*		*	*	*	*	*			7b
	total	2	0	2	2	3	3	3	3	3	2	0	20

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

56)

Dosis/tiempo	FRECUENCIAS Organelo o estructura subcelular afectada	PRINCIPALES DE LESIONES ULTRAMICROSCÓPICAS										Control	Total
		45'	90'	3hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	96hr			
6mg	nucleolo										*		1a
8mg/kg	nucleolo					*			*				2a
10mg/kg	nucleolo					*	*	*	*	*			5a
12mg/kg	nucleolo		*		*		*	*	*	*			6a
	total	0	1	0	1	2	2	2	3	3	0		14

Valores con diferente literal son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

total

1a  
2a  
3a  
4a  
5a  
6a  
7a  
8a

al

Total

1a

3a

4a

4a

12