



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"REACCIONES ADVERSAS Y TOXICAS DEL PRODUCTO  
A Y B (HIDRAZINA Y MORFOLINICO) EVALUACION  
HISTOPATOLOGICA"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

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

**JAVIER GARRIDO MARTINEZ**

ASESORES: M. EN F.C. MA. EUGENIA R. POSADA GALARZA  
M.V.Z. JORGE TORRES MARTINEZ

CUAUTITLAN, IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2005

m 346324



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Reacciones Adversas y Tóxicas del Producto A y B  
(Hidrazina y Morfolínico) Evaluación Histopatológica"

que presenta el pasante: Javier Garrido Martínez  
con número de cuenta: 09659107-9 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Abril de 2005

- |                  |   |  |
|------------------|---|--|
| PRESIDENTE       | <u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u> |  |
| VOCAL            | <u>QFB. Ma. Virginia Oliva Arellano</u>   |  |
| SECRETARIO       | <u>QFB. Martha P. Campos Peón</u>         |  |
| PRIMER SUPLENTE  | <u>MFC. Cecilia Hernández Barba</u>       |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>  |  |

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan de la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos mis profesores por el apoyo y el espacio otorgados en mi formación profesional.

Al proyecto PAPIIT No. IN205902 por el apoyo a la investigación.

A la Maestra Ma. Eugenia R. Posada Galarza por la dirección, confianza y el apoyo brindados durante todo el proceso de este trabajo.

Al M.V.Z. Jorge Torres Martínez por su valiosa asesoría en la parte histopatológica de este trabajo.

Al Dr. Enrique Angeles Anguiano y al grupo de diseño de fármacos que el dirige, por permitirme formar parte de este equipo de trabajo multidisciplinario.

Al MVZ German Garrido Fariña por el apoyo técnico en el tratamiento de las muestras en el laboratorio de histología de la FESC-4.

## DEDICATORIA

A mis padres Maria Martínez Pérez e Israel Garrido González por sus palabras de motivación en los momentos difíciles, por su cariño, apoyo y sobre todo confianza incondicional que me brindaron durante toda la carrera.

A mis hermanos Silvia G.M, Osvaldo G.M, Esther G.M, Israel G.M, Ricardo G.M y Ramiro G.M, por creer en mí y por todo su amor y apoyo que siempre me han dado.

A mis tíos Miguel Ángel M. P, Imelda C, José Luis M. P, Polo M. P y Carmen M. P, por sus consejos de superación.

A los que fueron como mi segunda familia: Víctor B. M. A, Eduardo I. Ch. V. Jeanette R. M, Araceli, Gustavo Ch. S, L. Omar T. D, Ernesto C., Adán, Nora. Hugo, Iván P. N, Angeles T, Esmeralda, Magdalena, Ana y en especial a Gabriela S. M, por los momentos inolvidables que día a día vivimos.

A mis amigos Consuelo, Alejandra, Edna, Cintia, Gustavo, Xavier, Oscar. Zuleika, Raúl, Fabiola, Arturo, Rogelio, Humberto, Maria, Sahara, Tania, Mónica, Wendy, Janet, Luz, Ricardo, Paola, Cecilia, Saúl, Jesús, Mario, Israel. Alejandro, Jazmín, Gabriela, a los Ebrios Boys, a las chicas de QFB 28 y al equipo de americano "Leones de la FESC " por los grandes momentos.

El conocimiento es un tipo de actividad de los hombres, es su actividad teórica. Pero la teoría por sí sola no está en condiciones de transformar la realidad, cosa que la distingue de la práctica. La teoría sólo refleja el mundo y generaliza la experiencia práctica de la humanidad. Más, al generalizar la práctica, ejerce en ella una acción recíproca, contribuye a que se desarrolle. La teoría sin práctica no tiene objeto. La práctica sin teoría es ciega. La teoría le señala el camino, le ayuda a encontrar los medios más eficaces para alcanzar los fines prácticos.

Lenin.

El camino dialéctico del conocimiento de la verdad, del conocimiento de la realidad objetiva, es de la contemplación viva al pensamiento abstracto y de éste a la práctica.

Lenin.

## INDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Actividad biológica de moléculas similares.....	4
2. OBJETIVOS.....	5
3. GENERALIDADES.....	6
3.1 Clasificación de las RAM según la OMS.....	7
3.2 Clasificación de las RAM según Naranjo.....	8
3.3 Reacciones por Intoxicación.....	11
3.4 Elección de los animales utilizados en las pruebas de toxicidad.....	13
3.5 Número de animales utilizados en las pruebas de toxicidad.....	14
3.6 Duración de las pruebas de toxicidad.....	15
3.7 Dosis y Vías de administración utilizadas en las pruebas de toxicidad.....	16
3.8 Analogía de las RAM en los animales con respecto al ser humano.....	17
3.9 Manipulación molecular en el desarrollo de nuevos fármacos.....	18
4. PRUEBAS DE TOXICIDAD.....	21
4.1 Factores de riesgo de las RAM.....	21
4.2 Pruebas Preclínicas de Nuevos Fármacos.....	29
4.3 Estudios Clínicos.....	33

<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	37
5.1 Inducción de las Reacciones Adversas.....	37
5.2 Perfusión intracardiaca.....	38
5.3 Análisis Histológico mediante Microscopia Óptica.....	41
<b>6. RESULTADOS</b> .....	43
<b>7. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	65
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>9. ANEXO I Análisis Estadístico</b> .....	72
9.1 Pasos para la prueba de hipótesis.....	72
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	75



## INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS

	<b>Página</b>
T.1. Factores que modifican el efecto farmacológico	28
T.2. Daños ocasionados al estómago por el fármaco LQM 311	55
T.3. Daños ocasionados al intestino delgado por el fármaco LQM 311	56
T.4. Daños ocasionados al hígado por el fármaco LQM 311	57
T.5. Daños ocasionados al riñón por el fármaco LQM 311	58
T.6. Resultados estadísticamente significativos ocasionados por LQM 311	59
T.7. Daños ocasionados al estómago por el fármaco LQM 502	60
T.8. Daños ocasionados al intestino delgado por el fármaco LQM 502	61
T.9. Daños ocasionados al hígado por el fármaco LQM 502	62
T.10. Daños ocasionados al riñón por el fármaco LQM 502	63
T.11. Resultados estadísticamente significativos ocasionados por LQM 502	64
G.1. Peso promedio semanal de los animales tratados con LQM 311	43
G.2. Peso promedio semanal de los animales tratados con LQM 502	44
G.3. Peso promedio semanal de los animales control	44
G.4. Región de rechazo y no rechazo de los datos experimentales	74

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
F.1.Estructura molecular de la hidrazina (LQM 502).	3
F.2.Estructura molecular del bismorfolinico (LQM 311).	3
F.3.Estudios preclínicos y clínicos de nuevos fármacos.	30
F4.Diagrama de flujo de la metodología.	42
F.5.Corte histológico de la mucosa del estómago de una rata control.	46
F.6.Corte histológico del estómago de una rata tratada con LQM 311.	47
F.7.Corte histológico del hígado de una rata control.	48
F.8.Corte histológico del hígado de una rata tratada con LQM 502.	49
F.9.Corte histológico del Intestino D. de una rata tratada con LQM 311.	50
F.10.Corte histológico del Intestino D. de una rata control.	51
F.11.Corte histológico del Intestino D. de una rata tratada con LQM 502.	52
F.12.Corte histológico del riñón de una rata control.	53
F.13.Corte histológico del riñón de una rata tratada con LQM 311.	54

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

RAM	Reacciones Adversas a los Medicamentos
OMS	Organización Mundial para la Salud.
ED <sub>50</sub>	Dosis efectiva media.
LD <sub>50</sub>	Dosis letal media.
TD <sub>50</sub>	Dosis tóxica media.
FDA	Administración de Alimentos y Drogas.
ECG	Electrocardiograma.
EEG	Electroencefalograma.
SSF	Solución salina fisiológica.
LQM 311	Bismorfolinico.
LQM 502	Hidrazina.
Reactivo de Bouin	(ácido pícrico + formol + a. acético)

## INTRODUCCION.

Alguna vez los productos naturales fueron la única fuente de fármacos. En muchos casos, los remedios tradicionales proporcionaron indicios sobre plantas con actividad farmacológica importante, hoy en día la manipulación molecular se emplea ampliamente para obtener nuevos fármacos; a menudo, la intención es conseguir un producto patentable que compita con otro ya existente en el mercado. Sin embargo, puede haber otras razones importantes para la búsqueda de nuevas sustancias, como producir fármacos con acción más selectiva y que posean menos efectos adversos.<sup>9</sup>

Uno de los objetivos fundamentales de la química terapéutica es la búsqueda de nuevos fármacos que resulten más potentes, más selectivos y menos tóxicos en su acción terapéutica. Desgraciadamente y puesto que no existen pautas concretas que aseguren la consecución de estos logros, el descubrimiento de un nuevo compuesto "cabeza de serie" es uno de los aspectos que requiere mayor creatividad, intuición y acierto en cada proceso de desarrollo de un nuevo fármaco. Salvo contadas excepciones, la mayoría de los nuevos cabezas de serie hasta la década de los setenta procedían de descubrimientos fortuitos u observaciones casuales. No obstante, con el avance experimentado por la Bioquímica y la Biología Molecular durante las últimas décadas, se han desarrollado métodos más racionales basados en el conocimiento y la regulación de nuevas enzimas, receptores y ligandos endógenos, así como en el conocimiento de las disfunciones bioquímicas implicadas en ciertos procesos patológicos.<sup>11</sup>

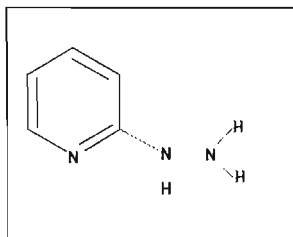
El efecto deseado debe estar bien definido y es necesario un procedimiento que pueda determinar si un fármaco en particular tiene o no un efecto especificado.<sup>1</sup>

Para asegurarse de que un fármaco nuevo es seguro se llevan a cabo estudios detallados de los efectos de distintas dosis y de la administración corta y prolongada de ese fármaco.

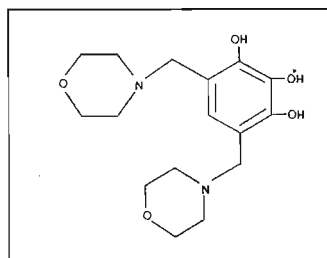
El farmacólogo provee los datos de la toxicidad aguda en animales de laboratorio para comenzar los estudios, durante el periodo de la prueba se observa a los animales con gran cuidado en busca de todos los síntomas adversos. Al final de este periodo y de manera ocasional durante su desarrollo se sacrifica a los animales y se les extraen los órganos vitales (Hígado, Riñón, Intestino Delgado, etc.) para su estudio macroscópico y microscópico. »

## 1. ANTECEDENTES.

Las dos moléculas estudiadas en el presente trabajo son el LQM 502 con propiedades antineoplásicas y el LQM 311 con propiedades antihipertensivas, dichos fármacos fueron sintetizados por el grupo de Investigación de Diseño de Fármacos de la FES-Cuautitlan, el LQM 311 fue diseñado con la ayuda de un programa sofisticado de diseño molecular asistido por computadora, el LQM 502 que se diseño también por el mismo grupo de investigación, deriva de la hidralazina, a la cual se la detectaron efectos anticancerígenos en el Instituto de Cancerología.



**Fig. 1**  
HIDRAZINA  
LQM 502



**Fig.2**  
BISMORFOLINICO  
LQM 311

Estos productos han dado buenos resultados a nivel in vitro e in vivo en su acción terapéutica, por esta razón, siendo una parte del equipo de trabajo multidisciplinario de la UNAM, hicimos los estudios toxicológicos reportados en este trabajo.

## 1.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE MOLECULAS SIMILARES EN ESTRUCTURA.

Se han hecho algunos estudios de moléculas "similares"; como por ejemplo el titulado **"Síntesis, caracterización estructural y actividad biológica de p-fluorobenzaldehído tiosemicarbazonas de complejos de níquel"**, en donde estudios previos de la actividad biológica in vitro de una molécula similar a el LQM 502 en su estructura llamado p-fluorobenzaldehído tiosemicarbazona ha revelado que tiene la capacidad para inducir apoptosis sobre varias líneas celulares humanas.

Este ensayo biológico desarrollado en colaboración con el Instituto de Patología Medica Especial de la Universidad de Parma reporto que estos nuevos productos mostraron afinidad y selectividad por líneas celulares leucémicas humanas U937 en los ensayos de proliferación celular, en este contexto, una de las moléculas de interés en el presente estudio (LQM 502) es también candidata a estudios como agente terapéutico antineoplásico.<sup>30</sup>

Por otro lado haciendo una analogía sobre el otro compuesto de interés (LQM 311) en este trabajo, también se han realizado estudios de moléculas similares como lo es el realizado en el Departamento de Química de la Universidad de Bharathidasan en la India cuyo título es **"Síntesis , caracterización, propiedades redox y actividad biológica de Ru (II) complejos carbonílicos que contienen O, N y bases heterocíclicas"** demostraron una actividad antibacteriana in vitro de los complejos investigados; evaluados con bacterias como *Sthapilococcus aureus* y *E. coli* a través de un método de difusión usando agar nutritivo como medio, reportaron la zona de inhibición en el agar con buenos resultados.<sup>29</sup>

## 2. OBJETIVOS.

- Realizar el análisis histopatológico de muestras de estómago, intestino delgado, hígado y riñón de ratas tratadas con los productos LQM 311 y LQM 502 a través de microscopía óptica.
- Evaluar los efectos adversos y tóxicos de dichos productos en los órganos de interés, con la finalidad de conocer el riesgo potencial de los compuestos analizados.
- Determinar si existe una relación entre las dosis administradas, el tiempo de administración y los efectos tóxicos.



### 3. GENERALIDADES.

Después de administrar un fármaco, es posible observar dos tipos de acciones: el efecto deseado, esto es, la acción clínicamente conveniente y beneficiosa buscada y los efectos indeseados, que son fenómenos adicionales no buscados originalmente. Estas últimas alteraciones pueden ser dañinas o inocuas y si son lesivas, reciben el nombre de reacciones adversas o indeseables a los fármacos.<sup>6</sup>

Los fármacos pueden provocar diferentes tipos de reacciones indeseables o adversas. Ciertas reacciones pueden ser, en sentido estadístico, fácilmente predecibles en tanto que otras pueden ser difícilmente predecibles o, como llaman algunos autores, inesperadas. Pero predecibles o inesperadas, lo que tienen de común es que son indeseables por inconvenientes, por peligrosas, por nocivas.

Algunas de estas reacciones son de carácter tóxico y dependen más del fármaco en sí y de su dosis que del paciente mismo, en cambio otras, dependen más bien del paciente en sí, como las reacciones alérgicas, muchas de las cuales son inesperadas. Pero no toda reacción inesperada es de naturaleza alérgica. Se ha abusado frecuentemente del calificativo de "alérgicas", utilizado para denominar la mayoría de las reacciones inesperadas.<sup>7</sup>

Muchas veces, ante la imposibilidad momentánea de encontrar otra explicación de una reacción inesperada, se ha recurrido al fácil, aunque arbitrario procedimiento, de calificarla como alérgica. Algunas de tales reacciones comienzan a ser desglosadas de la alergia para pasar a la categoría de reacciones idiosincrásicas, tóxicas, por liberación de histamina, etc.<sup>7</sup>

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) han sido definidas por la Organización Mundial de la Salud como "cualquier respuesta a un fármaco que sea nociva e indeseable y que se observa con las dosis utilizadas en el hombre para la profilaxis, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades".<sup>7</sup>

### **3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).**

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S) diferencia dos tipos de reacciones adversas:

#### **1; Tipo A o Predecibles.**

Son las más comunes y pueden reproducirse mediante estudios en animales; lo que hace posible su detección en la etapa previa de la comercialización del producto. »

Estos efectos se relacionan con la dosis y su posibilidad de aparición puede ser disminuida, si la terapia se inicia con las dosis mínimas terapéuticas y se incrementa la dosis paulatinamente, ó en su efecto la corrección de la dosis en cada paciente. Su incidencia es mayor si las dosis administradas son elevadas y en ciertos subgrupos de población. »

#### **2; Tipo B o Impredecibles.**

Son menos comunes y no están con la dosis administrada. En la mayor parte de los casos solo pueden detectarse, una vez que, el medicamento ha sido utilizado por una alta proporción de individuos. La mayoría de estos efectos persisten a pesar de la disminución de la dosis, y cuya aparición en relación con el momento de la exposición al medicamento es variable. »

La O.M.S clasifica las reacciones adversas de acuerdo a su gravedad, como:

**Leve:** Se presentan molestias leves con actividad normal del individuo.

**Moderada:** Requieren de cambios en el tratamiento farmacológico, aunque no necesariamente requiere de la suspensión del medicamento causante de la reacción.<sup>9</sup>

**Grave:** Constituye una amenaza grave para la vida del paciente, requiriendo la suspensión del medicamento causante de la reacción y la administración de un tratamiento específico para la reacción adversa.<sup>9</sup>

**Letal:** Contribuye directa o indirectamente a la muerte del paciente.<sup>10</sup>

### **3.2 CLASIFICACION DE LAS RAM DE ACUERDO A PLUTARCO NARANJO (Autor del libro “Manual de Farmacología”).**

Teniendo en cuenta su naturaleza, su mecanismo de producción, podrían dichas reacciones agruparse en las siguientes categorías:

#### **GRUPO I:**

Reacciones de tipo tóxico;

1. Reacciones por intoxicación.
2. Reacciones idiosincrásicas.

#### **GRUPO II:**

Efectos colaterales o secundarios;

1. Un mismo efecto producido por distintos fármacos.
2. Efectos producidos por un mismo grupo farmacodinámico.

#### **GRUPO III:**

Reacciones por distorsión del metabolismo normal;

1. Por alteraciones enzimáticas.
2. Por deficiencias inducidas.

**GRUPO IV:**

Reacciones por acostumbramiento;

1. Hábito (dependencia psíquica).
2. Adicción (dependencia física).

**GRUPO V:**

Reacciones por sensibilización;

1. Reacciones alérgicas:
  - a) Reacciones de tipo inmediato.
  - b) Reacciones de tipo tardío.
2. Reacciones anafilácticas.
3. Trastornos alérgicos similares por liberación de histamina.

**GRUPO VI:**

Reacciones fotoinducidas;

1. Fenómenos fototóxicos.
2. Fotosensibilización.

**GRUPO VII:**

Reacciones teratogénicas y embriotóxicas;

1. Efectos teratogénicos.
2. Toxicidad embriotrópica.
3. Toxicidad neonatal.
4. Toxicidad selectiva en el recién nacido.

En el primer grupo de reacciones se engloban todas aquellas dependientes, por una parte, de la acción de altas dosis de un fármaco y, por otra, de variaciones cuantitativas de la capacidad de reaccionar de los individuos. Esta variabilidad puede deberse a muchas causas. Unas son adquiridas y, por consiguiente pueden ser ocasionales y temporales, como la insuficiencia hepática que impide momentáneamente el metabolizar un fármaco, en cuyo caso, con dosis terapéuticas pueden producirse reacciones tóxicas; otras, son de carácter permanente por alteraciones congénitas, por carácter racial, o por la presencia de genes atípicos. 5

El segundo grupo, muy rico en reacciones, abarca aquellas dependientes de las propiedades farmacodinámicas de los fármacos, y que, a veces, no están directamente relacionadas con sus propiedades terapéuticas. 5

El tercer grupo corresponde a ciertas reacciones inesperadas con trastornos en apariencias no vinculados a la acción del fármaco, y que se producen secundariamente a una modificación o distorsión del metabolismo normal inducido por el fármaco. 5

El cuarto grupo de reacciones depende del acostumbramiento y el desarrollo de dependencia, sea de carácter psíquico o de carácter físico. 5

El quinto grupo esta constituido por los trastornos dependientes de variaciones cualitativas de la capacidad de reaccionar de los individuos. En esencia, es el tipo de reacción inesperada. Está condicionada a la sensibilización previa. Es la reacción violenta y a veces fatal, que desconcierta al médico, como en el caso de una inyección de penicilina que ocasiona choque y muerte. Es cierto, desde luego, que una vez que se produjo la primera reacción alérgica, las subsiguientes son predecibles y deben evitarse. 5

En las reacciones por sensibilización se agrupan las de naturaleza alérgica y las anafilácticas y, por extensión, se han colocado también las reacciones producidas por simple liberación de histamina, sin que medie un proceso antigénico. s

En el sexto grupo, por sus características singulares, se ha colocado en grupo aparte a las reacciones fotoinducidas, tienen en común en que la luz, directa o indirectamente condiciona la producción de la reacción indeseable. Por su naturaleza, en cambio, unas son alérgicas y otras de tipo tóxico. s

Finalmente, el séptimo grupo incluye fármacos que al administrarse a la madre embarazada o al recién nacido, pueden provocar una variedad de reacciones indeseables y en extremo como las reacciones teratogénicas. s

### **3.3 REACCIONES POR INTOXICACION.**

Son aquellas provocadas por dosis relativamente grandes de un fármaco y consisten en cambios bioquímicos o tisulares que interfieren el normal funcionamiento de un tejido, órgano o sistema, o del organismo en su conjunto. s

Cualquier fármaco puede causar fenómenos tóxicos si se administra la dosis apropiada para producirlos. No existen fármacos atóxicos. Los hay poco o muy tóxicos. s

La intoxicación puede ser aguda o crónica. La primera depende de la administración de una dosis alta del fármaco. Los efectos son violentos y pueden producir la muerte. La intoxicación crónica depende de la administración prolongada, de pequeñas pero frecuentes dosis de una sustancia y los trastornos pueden ser de leve intensidad, pero de tipo progresivo. Algunas de las intoxicaciones crónicas entran en la categoría de enfermedades profesionales. s

Las reacciones por intoxicación deben considerarse, por consiguiente, como fenómenos naturales y predecibles, pero producidas ya por dosis varias veces más altas que las terapéuticas o por administración crónica de pequeñas dosis. Sin embargo, las reacciones de tipo tóxico, pueden ser producidas también y en forma aguda por dosis terapéuticas, cayendo así dentro de la categoría de las reacciones inesperadas e indeseables. Esto se debería a una excesiva susceptibilidad de ciertos individuos.<sup>5</sup>

Desde el punto de vista amplio, cualquier efecto adverso de los fármacos se puede considerar como una manifestación de toxicidad de los mismos. Algunas veces el efecto tóxico es solo una manifestación del efecto terapéutico a un nivel mayor de dosis.<sup>1</sup>

Si la evaluación cuantitativa de eficacia y toxicidad se pudiera llevar a cabo rutinariamente en los humanos, la decisión de si un fármaco nuevo se debe adoptar para su uso clínico sería una decisión bastante fácil. Se comenzaría con una dosis baja y con cautela se aumentaría la dosis, observando con cuidado si hay efectos tóxicos. Es obvio que esta exploración intencional de las dosis tóxicas en humanos no se puede llevar a cabo, por lo tanto las evaluaciones iniciales se tienen que basar en experimentos con animales inferiores y esto tiene que explorar tanto los aspectos cuantitativos como cualitativos de la toxicidad.<sup>1</sup>

En esta etapa es importante encontrar el tipo de efectos dañinos que se puede esperar y a que dosis se manifiestan. Debido a que las diferencias de especie son considerables, se tienen que usar varias especies de animales. Una medida conveniente de la potencia es la dosis efectiva media ( $ED_{50}$ ) que es la dosis que produciría el efecto específico en el 50% de todos los sujetos. Si el efecto que se mide es la muerte, la medición correspondiente es la dosis letal media ( $LD_{50}$ ). y si el efecto es uno tóxico, la expresión apropiada es la dosis tóxica media.<sup>1</sup>

El atributo esencial que se busca en un fármaco es la eficacia a una dosis segura. Idealmente, esto significa que debe haber un rango muy amplio entre la dosis efectiva y la tóxica. La relación  $TD_{50}/ED_{50}$  (o con frecuencia en animales  $LD_{50}/ED_{50}$ ), se denomina coeficiente terapéutico, (también "índice terapéutico"). Un fármaco potente se caracteriza por una  $ED_{50}$  baja; pero si la  $TD_{50}$  es también baja, el margen de seguridad puede ser por completo inadecuado. <sup>1</sup>

Un procedimiento sencillo para la valoración preliminar de la toxicidad de un fármaco es la determinación de la dosis letal en ratones. Debido a que es aplicable a cualquier cálculo de un efecto farmacológico cuántico. Cada individuo se clasifica como reaccionante o no reaccionante, de acuerdo con el tipo de criterio que se adopte como respuesta. <sup>1</sup>

El objeto de las pruebas de toxicidad es determinar la naturaleza de estos efectos en la experimentación animal. Sin embargo los efectos tóxicos de los fármacos pueden también no estar relacionados con sus acciones terapéuticas y en este caso se habla de efectos colaterales. <sup>1</sup>

### **3.4 ELECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD.**

Se recomienda la utilización de tantas especies como sea posible, pero consideraciones de índole práctica limitan el número de las que realmente se utilizan. Son muy frecuentes los ensayos que utilizan ratas y ratones por su economía y por la facilidad con que se pueden alojar y alimentar. Las pruebas adicionales se han de realizar al menos en otra especie animal que no sean roedores, siendo el perro el más utilizado habitualmente en los laboratorios. <sup>2</sup>



Actualmente se realizan considerables esfuerzos para desarrollar pruebas de toxicidad en animales que puedan detectar efectos tóxicos graves y que pueden ser posteriormente producidos en el hombre. La manifestación de un efecto tóxico en una especie puede ser debida a una sensibilidad anómala, como ocurre en la penicilina, que es altamente tóxica en el cobayo, por este motivo se han de valorar adecuadamente los resultados para evitar desechar fármacos que puedan resultar de utilidad en la clínica.<sup>2</sup>

### **3.5 NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD.**

Si al investigar un fármaco nuevo se observan efectos colaterales tóxicos frecuentes, probablemente la molécula no llegara nunca al ensayo clínico, o si lo hace su uso no podrá ser continuo; sin embargo, la mayor parte de los medicamentos utilizados clínicamente muestran cierto grado de toxicidad.<sup>2</sup>

Las pruebas en la preclínica se deben efectuar lo más extensamente posible para conseguir algún indicio sobre su naturaleza, incluso de los efectos tóxicos raros.<sup>2</sup>

Desgraciadamente, esto no es factible en la mayoría de los casos, por lo que no se detectan los efectos tóxicos que poseen una incidencia baja, ya que la probabilidad de observar un efecto tóxico depende del número de animales utilizados en la prueba. Si el efecto tiene una incidencia de 1 en cada 100 animales, se necesitaran 300 animales para poder detectar el efecto con un nivel de probabilidad del 5%. Además, la información obtenida a partir de este grupo de animales sobre los efectos tóxicos serian los correspondientes a un solo nivel de dosificación.<sup>2</sup>

Aunque fuera posible administrar un fármaco a varios centenares de animales resultaría imposible realizar el examen de cada animal con el suficiente detenimiento. Se reconoce generalmente que es preferible examinar un número pequeño de animales siempre que se obtengan más datos de cada uno de ellos. Consecuente mente los efectos tóxicos de baja incidencia suelen detectarse en las pruebas animales y en los ensayos clínicos preliminares, y por esta razón es necesario prestar gran atención a los posibles efectos tóxicos de los fármacos incluso después de llevar cierto tiempo en uso clínico. 2

### **3.6 DURACIÓN DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD.**

Es relativamente fácil establecer la naturaleza de los efectos tóxicos agudos de los fármacos en los experimentos animales, y estos rara vez constituyen un problema en los ensayos clínicos en los cuales es práctica habitual comenzar con una dosis baja que se va aumentando gradualmente. La determinación de toxicidad crónica crea problemas más complejos.2

La duración de las pruebas de toxicidad generalmente se hallan en relación con el uso que se pretende dar al fármaco en el hombre; muchos medicamentos están destinados para ser administrados una sola vez o solamente en muy pocas ocasiones a un paciente, otros medicamentos se dan por tiempos prolongados; naturalmente las pruebas en este último caso serán de mayor duración. Sin embargo las pruebas de toxicidad de más de dos años de duración son aproximadamente iguales al tiempo de vida normal de ratones y de ratas. Como garantía de las pruebas de toxicidad muchos autores afirman que la información más útil se obtiene en los tres primeros meses de pruebas en animales, aunque la inducción por los fármacos de cambios de tipo canceroso pueden manifestarse solamente después de largos periodos de pruebas.2

### **3.7 DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN UTILIZADAS EN LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD.**

La práctica habitual en los laboratorios de farmacología es determinar la  $DL_{50}$  aguda de un fármaco por varias vías de administración (intravenosa, subcutánea y oral). En las pruebas para la toxicidad crónica, los niveles de dosificación deben ser lo más altos posibles, pero que permitan la supervivencia de gran número de animales durante el tiempo de duración de la prueba.<sup>2</sup>

La vía de administración utilizada en las pruebas de toxicidad crónica será la misma que para la administración humana. Para ilustrar la influencia que puede tener la vía de administración en la aparición de la toxicidad citaremos como ejemplo la griseofulvina, que no produce efectos perniciosos después de la administración oral en animales, pero que administrada por vía parenteral posee una potente acción inhibidora de las mitosis.<sup>2</sup>

Como la griseofulvina se proyectó para su uso oral en el hombre, estos resultados no interfirieron con los ensayos clínicos, aunque indicaron la necesidad de estar precavidos, encontrándose que se podía administrar con seguridad a los pacientes por la vía oral.<sup>2</sup>

Todos los fármacos tienen propiedades tóxicas pero es la toxicidad selectiva de ciertas sustancias químicas y biológicas lo que puede hacerles agentes terapéuticos útiles. Las pruebas farmacológicas deben guiar: al experimentador, y al médico en el uso seguro y racional de esos agentes.<sup>3</sup>

Para disminuir riesgos en el desarrollo y pruebas de nuevos fármacos, la Administración de Alimentos y Drogas (F.D.A) del Depto. De Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos de América hizo la publicación de reglas reformadas en 1963.<sup>3</sup>

### **3.8 ANALOGÍA DE LAS RAM EN LOS ANIMALES CON RESPECTO AL SER HUMANO.**

Dos grandes principios respaldan todas las pruebas descriptivas de toxicidad que se realizan en los animales. Primero, los efectos que las sustancias producen en los animales de laboratorio, con las debidas reservas se aplican a la toxicidad en el hombre. Cuando se calculan sobre la base de la dosis por unidad de superficie corporal, los efectos tóxicos en el hombre se encuentran generalmente en los mismos limites de concentraciones que en los animales de experimentación. Sobre la base del peso corporal, el hombre es generalmente más vulnerable que dichos animales por un factor de diez, aproximadamente.<sup>4</sup>

Esta información se usa para seleccionar las dosis para ensayos clínicos de candidatos a agentes terapéuticos, y para tratar de fijar límites a la exposición permisible a los tóxicos ambientales.<sup>4</sup>

El segundo principio citado es que la exposición de animales de experimentación a agentes tóxicos en grandes dosis es un método necesario y valido para descubrir posibles riesgos para el hombre. Este principio se basa en el concepto cuantitativo dosis-respuesta.<sup>4</sup>

La toxicidad selectiva es la capacidad de un compuesto para lesionar una clase de materia viva sin dañar a otras, aunque ambas estén en íntimo contacto. Los fármacos y otros agentes químicos que se usan para este propósito son selectivos por una de dos razones. O bien el compuesto es tóxico para ambas especies pero se acumula en mayor concentración en una de ellas, o bien el agente reacciona de forma bastante especifica con receptores que son únicos para uno de los dos organismos, o más importantes para el mismo. La selectividad en la distribución se debe generalmente a diferencias de absorción, biotransformación o excreción del tóxico.<sup>4</sup>

### **3.9 MANIPULACIÓN MOLECULAR EN EL DESARROLLO DE NUEVOS FARMACOS.**

La manipulación molecular se emplea ampliamente para obtener nuevos fármacos. A menudo, la intención es conseguir un producto patentable que compita con otro ya existente en el mercado. Sin embargo, puede haber otras razones importantes para la búsqueda de nuevas sustancias, como:

1. Modificaciones para mejorar la acción deseada. Por ejemplo, se han probado como anestésicos locales cientos de compuestos derivados de modificaciones de la molécula de procaína en un afán de producir sustancias más estables para una mayor duración de la anestesia local.<sup>11</sup>
2. Modificaciones para alterar la absorción, distribución o eliminación. Se han realizado numerosos esfuerzos para encontrar derivados de fármacos absorbibles de manera eficaz por vía oral. Los trabajos para desarrollar hormonas progestacionales activas por vía oral dieron lugar a anticonceptivos orales.<sup>11</sup>
3. Modificaciones para mejorar la selectividad de acción. Por ejemplo, la conversión de un nitrógeno terciario en la atropina en un nitrógeno cuaternario mediante la adición de un grupo metilo (metaatropina), reduce su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y, por tanto, mejora su selectividad para efectos periféricos.<sup>11</sup>

Los cambios en la molécula de un fármaco pueden influir de manera notable su distribución y por ende su actividad farmacológica. Por ejemplo, reemplazar el oxígeno en el pentobarbital por un azufre produce tiopental y convierte la molécula de un anestésico de acción moderadamente prolongada en uno de acción ultracorta. La razón estriba en la liposolubilidad extrema del tiopental, que le permite entrar y salir del encéfalo con rapidez. 11

Las modificaciones estructurales también pueden influir el tiempo que un fármaco permanece activo mediante alteraciones de su biotransformación. La procaína puede suprimir ciertas arritmias cardíacas, pero es un ester hidrolizado con rapidez por el hígado y las esterasa del plasma, lo que limita su valor. La simple sustitución del grupo ester por una amida genera la procainamida, con mayor duración de acción debido a su mayor resistencia a la hidrólisis. 11

Aunque existen excepciones a la regla (p.ej, síntesis de antagonistas del receptor  $H_2$  como cimetidina), en general, los fármacos nuevos no se producen como resultado de programas demasiado razonados basados en el conocimiento completo de relaciones entre la estructura y la actividad. 11

Por lo regular, el azar afortunado y la observación fortuita lleva a identificar la actividad farmacológica de una sustancia específica. En años recientes casi todas las compañías farmacéuticas han desarrollado programas sistemáticos, usando modelos animales con valor predictivo conocido, a fin de evaluar sustancias químicas para actividades farmacológicas específicas. Por ejemplo, de este modo se han desarrollado varios antidepresivos nuevos sin los efectos colaterales anticolinérgicos de los tricíclicos. 11

Sin embargo, recientemente un mayor conocimiento de la estructura tridimensional de enzimas, receptores y otras macromoléculas brinda la posibilidad de diseñar moléculas sintéticas que pueden interactuar con sitios específicos en estas moléculas blanco. Esta puede convertirse en una técnica cada vez más importante para el diseño racional de fármacos en un futuro cercano. <sup>11</sup>

El patrón más común en el desarrollo de nuevos fármacos no es la invención de novo, sino más bien el aprovechamiento de los efectos colaterales de fármacos ya existentes. La sagacidad para aprovechar dichos efectos de sulfamidas condujo al desarrollo de fármacos útiles que no son agentes antibacterianos sino más bien diuréticos (inhibidores de anhidraza carbónica y tiacidas) y agentes antidiabéticos (sulfonilureas). <sup>11</sup>

En Estados Unidos y Canadá, todo medicamento no utilizado en clínica durante suficiente tiempo y en cantidad suficiente para establecer de manera satisfactoria su seguridad y eficacia debe definirse como fármaco nuevo por las Regulations of the Food and Drugs Act. Esta misma definición también se aplica a toda forma o uso nuevos para un medicamento que ya se halla en el mercado. Antes de que se pueda administrar una sustancia a seres humanos, debe someterse a pruebas para demostrar sus actividades farmacológicas y toxicológicas in vitro y en animales. <sup>11</sup>

Las sustancias químicas deben estudiarse de manera sistemática, según el tipo de fármaco en pruebas bioquímicas, fisiológicas, conductuales y farmacológicas diseñadas para identificar sustancias con la actividad deseada. Si una sustancia muestra tal efecto es posible proseguir con estudios más detallados. Sin embargo, se requiere una gran investigación desde el descubrimiento inicial hasta el producto terminado. Los químicos pueden crear o aislar más de 5 000 sustancias diferentes para encontrar un nuevo fármaco comercializable. <sup>11</sup>

#### **4. PRUEBAS DE TOXICIDAD.**

Las pruebas preclínicas determinan las acciones farmacológicas de los medicamentos y también el mecanismo de acción, la especificidad del efecto y la toxicidad. Puesto que todo fármaco tiene la capacidad de producir efectos tóxicos, se llevan estudios de toxicidad en animales de acuerdo con lineamientos bien definidos. Las pruebas toxicológicas se emplean para determinar la toxicidad de los fármacos, de sus metabolitos o de ambos en varios sistemas biológicos para hacer predicciones respecto a posibles riesgos en humanos. En general, las pruebas de toxicidad consisten en estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica diseñados para determinar efectos generales de los compuestos en sistemas animales. También hay un requerimiento para evaluar los efectos del fármaco sobre la reproducción y su potencial carcinógeno o para provocar daño genético. La necesidad de practicar todas las pruebas toxicológicas para una nueva forma o uso de un fármaco existente es dudosa y con frecuencia motivo de debate entre las agencias reguladoras y las compañías farmacéuticas. <sup>11</sup>

##### **4.1 FACTORES DE RIESGO DE LAS REACCIONES ADVERSAS A LOS MEDICAMENTOS.**

Los factores de riesgo para las RAM incluyen la edad del paciente, las enfermedades asociadas, la clasificación de la medicación que se administra y el número de medicamentos que se administra de manera simultánea. Las RAM pueden ocurrir en cualquier grupo de edad, aunque son más frecuentes en los pacientes de más de 65 años. En el Harvard Medical Practice Study, el estudio más extenso realizado hasta la fecha sobre efectos adversos, reveló que la mayor incidencia de ellos se produjo en pacientes de 65 años o más. Classen y col. Informaron hallazgos similares al encontrar que el índice de efectos adversos causados por los fármacos era más del doble en pacientes de mayores de 60 años que en quienes aún no alcanzaban esa edad. <sup>10</sup>



Estos datos no resultan sorprendentes dado que los pacientes mayores de 60 años a menudo padecen varias enfermedades a la vez y necesitan de un número mayor de medicamentos y fisiológicamente pueden eliminar los fármacos a velocidades que son menores que las que ocurren en pacientes más jóvenes. <sup>10</sup>

La naturaleza y el grado de las enfermedades que requieren tratamiento farmacológico también conforman factores de riesgo para el desarrollo de las RAM. Resulta obvio que los pacientes que están gravemente enfermos van a necesitar las mayores dosis de medicamentos durante tiempos más prolongados y en particular si esas enfermedades asociadas involucran el hígado y el riñón. <sup>10</sup>

El número de medicamentos que se administra de manera simultánea es un factor de riesgo importante en el desarrollo de las RAM. Es evidente que a medida que aumenta el número de medicamentos administrados también lo hace el riesgo de las RAM. <sup>10</sup>

Dentro de los factores responsables de la aparición de los efectos adversos se pueden diferenciar los siguientes:

**a) No propios del fármaco:**

- i. Intrínsecos del enfermo: Edad, sexo, características genéticas que modifican el patrón farmacocinético o la acción farmacodinámica, una tendencia a la alergia, situaciones fisiológicas y patológicas que modifican también el patrón farmacocinético o la acción farmacodinámica. <sup>10</sup>
- ii. Extrínsecos al paciente: el propio médico y el ambiente.

Modificaciones farmacocinéticas, los numerosos factores farmacocinéticos que pueden modificar la concentración de un fármaco en los sitios activos y que explican las variables respuestas interindividuales frente a una misma dosis. 10

Algunos de estos factores son fisiológicos (p. ej., diferencias genéticas en los mecanismos de metabolización), pero hay procesos patológicos que pueden alterar los mecanismos de absorción, distribución y eliminación, provocando incrementos excesivos de las concentraciones del fármaco en los líquidos orgánicos. Por ello se debe prestar especial atención a la aparición de reacciones adversas en los siguientes tipos de enfermos:

**a) Enfermedad hepática.** En general suele requerirse un alto índice de lesión parenquimatosa. En la mayoría de los casos disminuye la capacidad de extracción y de metabolización de los fármacos, por lo que las reacciones adversas aparecerán en aquellos que presentan un índice elevado de extracción. Aparte de la lesión parenquimatosa por sí misma, pueden influir, la reducción del flujo hepático y la reducción de las proteínas plasmáticas. 10

**b) Enfermedad renal.** Se debe a un fallo en los mecanismos de secreción o de filtración o de ambos. Pero, además, puede existir una alteración en la capacidad de unión a proteínas. 10

**c) Enfermedad cardíaca.** La insuficiencia cardíaca congestiva puede modificar la absorción gastrointestinal, a causa del edema de la mucosa o del menor flujo esplácnico, la circulación hepática o la perfusión renal, y el volumen de distribución. 10

**d) Variaciones farmacogenéticas.** Pueden implicar cambios cuantitativos en los procesos farmacocinéticos. 10

**Modificaciones farmacodinámicas.** El estado fisiológico y patológico de una persona pueden incrementar las respuestas a los fármacos, tanto respecto a la unidad celular como en órganos y sistemas, dando origen a reacciones adversas.<sup>10</sup>

En algunos casos pueden deberse a modificaciones en el número de receptores, pero en otros intervienen mecanismos muy variados y no siempre bien conocidos. Los ancianos, por ejemplo, muestran mayor sensibilidad a los efectos sobre el sistema nervioso de los depresores centrales o de los anticolinérgicos, por mecanismos independientes de los procesos farmacocinéticos.<sup>10</sup>

La alteración de una función determinada puede significar un estado de hipersensibilidad a los fármacos que actúen sobre dicha función. Así, en enfermedades que cursen con reducción de los factores de la coagulación o con determinada enfermedad vascular (úlceras y varices), habrá mayor riesgo de que los fármacos anticoagulantes produzcan hemorragias. Las modificaciones electrolíticas propias de ciertas enfermedades pueden incrementar profundamente la toxicidad de los compuestos digitálicos y antiarrítmicos.<sup>11</sup>

**Errores de medicación y cooperación del paciente.** En la realidad, pocos pacientes siguen correctamente las instrucciones de administración de un medicamento recomendadas por el médico. Quizás el factor más importante que determina la cooperación del paciente sea la relación que establece con su médico. La confianza del paciente es necesaria, pues a medida que ésta aumente, así también aumentará la responsabilidad del médico para proveer su ayuda profesional.<sup>18</sup>

**Efectos placebo.** Estos se asocian con la toma de cualquier fármaco, inerte o no, y se manifiestan frecuentemente con alteraciones del estado de ánimo y cambios funcionales relacionados con el sistema nervioso autónomo. Es necesario en este aspecto hacer algunas distinciones: placebo *puro* es cualquier sustancia esencialmente inerte (p. ejem., cápsulas de lactosa, inyecciones de solución salina); placebo *impuro* se refiere a una sustancia con propiedades farmacológicas bien establecidas pero que se emplea a dosis insuficientes para producir un efecto propio. 18

**Edad.** Es indispensable tomar precauciones especiales con los niños, en particular al administrar hormonas u otros fármacos que influyan el crecimiento y desarrollo. Dadas las diferencias entre los volúmenes relativos de fluidos biológicos, menor unión a las proteínas plasmáticas, inmadurez de las funciones (Por ejemplo: renal y hepática), de niños prematuros o muy pequeños es forzoso ajustar las dosis. Los ancianos pueden tener respuestas anormales por incapacidad para inactivar o eliminar fármacos o por alguna patología agregada. 18

**Sexo.** En ocasiones las mujeres son más susceptibles a los efectos de una dosis dada del fármaco, quizá por tener menor masa corporal. Durante el embarazo, particularmente en el primer trimestre, debe evitarse todo tipo de fármacos que puedan afectar al feto. 18

**Horarios de administración.** De particular importancia en la administración oral son los irritantes en las comidas, los sedantes o estimulantes en relación con el ciclo sueño-vigilia y los ritmos biológicos en general. En este contexto, la *cronofarmacología*, nueva rama de la farmacología, estudia la interacción entre los ritmos biológicos y la respuesta farmacológica. Pueden existir diferencias hasta del 100% en la intensidad del efecto medicamentoso a una misma dosis, dependiendo del horario en la que el fármaco se administre. 17

**Tolerancia.** Se refiere a la disminución del efecto farmacológico después de la administración repetida de una misma dosis, o a la necesidad de aumentar la dosis para obtener el mismo efecto farmacológico que se conseguía al iniciar el tratamiento. Cuando ésta aparece puede existir también tolerancia *cruzada* por los efectos de fármacos semejantes que interactúan con el mismo sitio receptor. 17

**Variables fisiológicas.** El balance hidroelectrolítico, el equilibrio ácido-básico, la temperatura corporal y otras variables fisiológicas son capaces de alterar el efecto farmacológico. 17

En los casos de *alergia medicamentosa* es crítico realizar un interrogatorio cuidadoso del paciente y sus familiares para detectar oportunamente esta posibilidad y evitar la administración del alérgeno (sustancia que produce la alergia). Aunque en algunas ocasiones es posible una desensibilización, ésta sólo puede intentarse para un caso preciso y sabiendo que los efectos son rara vez permanentes (la alergia puede reaparecer). En caso de sospechar alergia es necesario tener a la mano antihistamínicos, antiinflamatorios y adrenalina. 17

Entre los casos de ***idiosincrasia farmacológica*** (reactividad anormal a un fármaco genéticamente determinada), encontramos varios tipos de respuestas: efectos irregularmente prolongados, mayor sensibilidad al fármaco, efectos totalmente nuevos, capacidad de respuesta disminuida, distribución anormal del agente en el organismo, etc. La base genética de estas alteraciones incluye las deficiencias enzimáticas, la producción de proteínas anormales, moléculas transportadoras alteradas o receptores modificados estructuralmente. 17

Los casos de *resistencia adquirida* (estado de insensibilidad o sensibilidad disminuida a fármacos que en general producen inhibición del crecimiento o muerte celular) que se observan frecuentemente con antibióticos, en particular en el medio hospitalario, deben ser tratados en forma especial. 28.

Finalmente, mencionemos la tolerancia y la *dependencia física* que se advierte en casos de agentes que afectan la función cerebral y mental (los llamados psicotrópicos) y que pueden asociarse a cuadros de abstinencia potencialmente peligrosos para el sujeto. 28

#### **b) Propios del fármaco:**

- i. Debido a sus propiedades: Efectos secundarios, colaterales y efectos tóxicos del fármaco o su metabolito. 28
- ii. Interacciones de fármacos. 28

#### **c) Mal uso del fármaco.**

Por lo general son predecibles y evitables. Pueden afectar el órgano diana u otros órganos.

28

**Tabla 1. Factores que modifican el efecto farmacológico.**

DOSIS PRESCRITA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cooperación del paciente</li><li>• Errores de medicación</li></ul>
DOSIS ADMINISTRADA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ritmo y magnitud de la absorción</li><li>• Tamaño y composición corporal</li><li>• Distribución en fluidos biológicos</li><li>• Unión en plasma y tejidos</li><li>• Ritmo de eliminación</li></ul>
CONCENTRACIÓN EN EL SITIO DE ACCIÓN	<ul style="list-style-type: none"><li>• Variables fisiológicas</li><li>• Factores patológicos</li><li>• Factores genéticos</li><li>• Interacción con otros fármacos</li><li>• Desarrollo de tolerancia</li></ul>
INTENSIDAD DE EFECTO	<ul style="list-style-type: none"><li>• Interacción fármaco-receptor</li><li>• Estado funcional</li><li>• Efectos placebo</li></ul>

Estos factores capaces de modificar el efecto farmacológico son de índole farmacocinética o farmacodinámica relativas al sujeto. No debemos olvidar que las interacciones medicamentosas son otra fuente potencial de cambios de la respuesta al tratamiento médico. El uso de varios fármacos al mismo tiempo es una práctica relativamente habitual y en ocasiones esencial para lograr la mejoría del paciente. El médico debe cerciorarse de que la combinación prescrita no dará lugar a interacciones indeseables entre los fármacos.

28

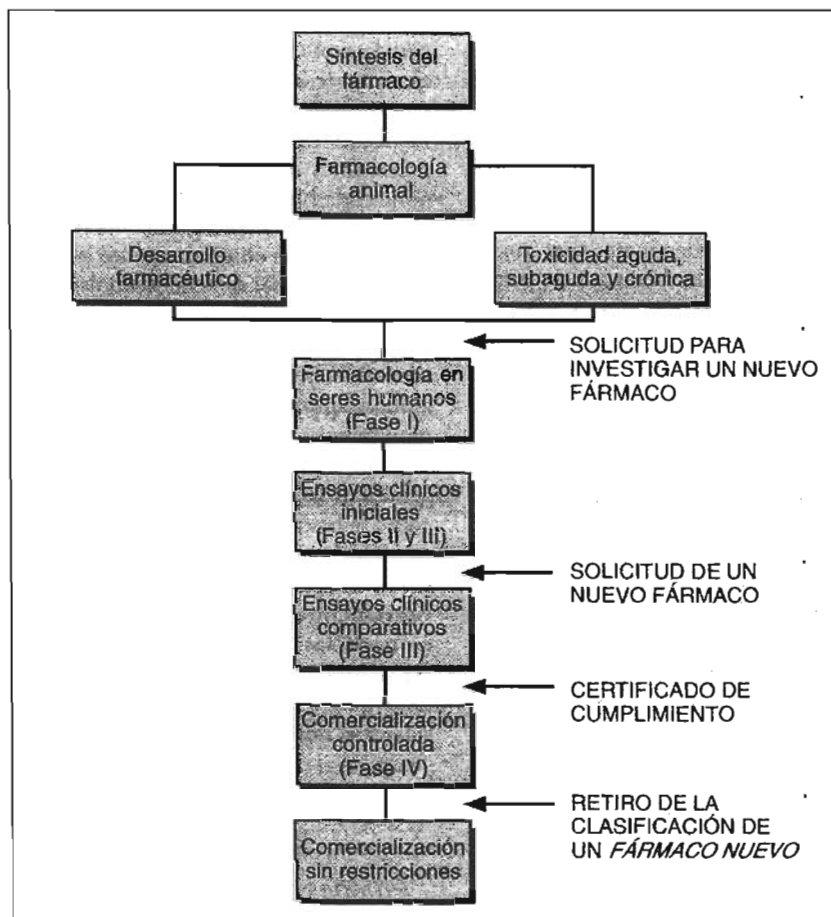
#### **4.2 PRUEBAS PRECLINICAS DE NUEVOS FARMACOS.**

Antes de que se pueda administrar una sustancia a seres humanos, debe someterse a pruebas para demostrar sus actividades farmacológicas y toxicológicas in vitro e in vivo. Las sustancias químicas deben estudiarse de manera sistemática, según el tipo de fármaco en pruebas bioquímicas, fisiológicas, conductuales y farmacológicas diseñadas para identificar sustancias con la actividad deseada (esperada). ■

Si una sustancia muestra tal efecto es posible proseguir con estudios más detallados. Sin embargo, se requiere una gran investigación desde el descubrimiento inicial hasta el producto terminado. ■



El nuevo fármaco activo se prueba en animales y humanos conforme a la secuencia que se muestra en la **Figura 3. 8**



Las pruebas preclínicas determinan las acciones farmacológicas, de los medicamentos y también el mecanismo de acción, la especificidad del efecto y la toxicidad. 8

Puesto que todo fármaco tiene capacidad de producir efectos tóxicos, se llevan estudios de toxicidad en animales de acuerdo con lineamientos bien definidos. Las pruebas se emplean para determinar la toxicidad de los fármacos, de sus metabolitos o de ambos en varios sistemas biológicos para hacer predicciones respecto a posibles riesgos en humanos. 8

En general, las pruebas consisten en estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica diseñados para determinar efectos generales de los compuestos en sistemas animales. También hay un requerimiento para evaluar los efectos del fármaco sobre la reproducción y su potencial carcinógeno o para provocar daño genético. 8

Los estudios de toxicidad aguda son los que implican administración de una sola dosis, o unas pocas a intervalos iguales, en un periodo de 24 horas. Los estudios de toxicidad a largo plazo (subaguda y crónica) son los que implican administración diaria de la sustancia durante periodos que comprenden desde unos pocos días hasta varios años. En general, es necesario realizar pruebas en animales al menos en tres especies de mamíferos (una de las cuales debe ser no roedor). 8

Primero se determina la dosis letal media aguda (posología única) ( $DL_{50}$ ); Después, una serie de pruebas usando esta dosis por diferentes vías proporciona el intervalo de posología letal y el intervalo no tóxico para varias especies y cierta indicación de una dosis aproximada que ha de emplearse en seres humanos. Al mismo tiempo se estudian la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco. 8

Los estudios de toxicidad a largo plazo intentan determinar los efectos sobre la conducta, fisiológicos e histopatológicos, cuando el fármaco se administra de manera repetida, se determina la relación entre dosis y respuesta de estos, es importante identificar con claridad el órgano blanco de la toxicidad, la reversibilidad y los factores que influyen la toxicidad (como género, edad, estado nutricional). »

La administración de un fármaco por primera vez a humanos en gran medida se basa en los datos obtenidos en animales y, por lo tanto, depende de que se crea que su toxicidad o la falta de ella, demostrada en animales, es relevante para los seres humanos. »

Sin embargo, las decisiones acerca de casos específicos son inciertas. Así, lo común es tomar decisiones conservadoras y la aparición de cualquier toxicidad grave en animales casi puede considerarse como evidencia suficiente para rechazar la administración del fármaco a humanos. »

Esta decisión puede ser errónea, puesto que algunas formas de toxicidad son específicas de la especie, y es probable que en ocasiones, fármacos nuevos potencialmente útiles sean rechazados de manera innecesaria. Por el contrario, las pruebas toxicológicas en animales en general predicen bien la toxicidad relacionada con dosis en humanos, en tanto que reacciones adversas a medicamentos no relacionadas con la dosis (alérgicas o determinadas genéticamente) no se detectan en las pruebas toxicológicas tradicionales. En consecuencia, la administración de un fármaco por primera vez a un ser humano aún implica cierto riesgo, que debe considerarse con todo cuidado. »

### 4.3 ESTUDIOS CLINICOS

Cuando el nuevo compuesto pasa la evaluación previa, se puede efectuar la investigación clínica. El fabricante debe llenar una solicitud para investigar un nuevo fármaco en la oficina reguladora respectiva y solicitar autorización para distribuir el fármaco a investigadores calificados para que realicen estudios clínicos que permitan obtener suficiente evidencia respecto a dosis, eficacia y seguridad del nuevo fármaco en seres humanos. »

La solicitud preclínica debe contener la siguiente información: objetivos de las pruebas clínicas propuestas; nombre del fármaco, estructura química y origen del nuevo medicamento; datos sobre su toxicidad, farmacología y bioquímica (metabolismo de la sustancia); contraindicaciones y precauciones; tratamiento que se sugiere en caso de sobredosis; los métodos, equipo, planta industrial y controles empleados en la manufactura, procesamiento y empaque del nuevo fármaco; pruebas de potencia, pureza y seguridad; nombre y acreditaciones de los investigadores; y las instituciones donde se llevarán a cabo los estudios. Una vez aprobada la solicitud, el fármaco se distribuye con una etiqueta que establece que es una sustancia de investigación que sólo deben usarla investigadores calificados. »

**Estudios de fase I.** En estos estudios se administra el fármaco por primera vez a seres humanos; en general se efectúan después de concluir los estudios farmacológicos y toxicológicos en animales. El medicamento bajo investigación se administra a voluntarios saludables primero en dosis simple, creciente, y luego se administra varias veces para cubrir el intervalo de uso terapéutico. Estos estudios se llevan a cabo sólo para obtener datos acerca de la seguridad y farmacocinética, puesto que los síntomas relevantes sobre los cuales debe probarse la eficacia raras veces se presentan en voluntarios saludables. »

La selección de la dosis humana inicial es difícil. Como se hizo notar antes, estudios en animales acerca del metabolismo y toxicidad de fármacos (p. ej., DL<sub>50</sub>) son de utilidad limitada para seleccionar esta dosis. »

Una regla común es iniciar con un quinto o un décimo de la posología máxima tolerada (mg/kg) en la especie animal más sensible, asumiendo un peso corporal promedio en el humano de 70 kg. A continuación, se administra el fármaco incrementando la dosis gradualmente hasta alcanzar la cantidad terapéutica eficaz estimada o que se desarrollen efectos colaterales. »

El protocolo suele implicar seis a nueve personas en cada nivel de dosis. Se emplean técnicas placebo y doble ciego. Estudios de tolerancia a varias posologías en general se efectúan en voluntarios saludables, pero más aceptable desde el punto de vista ético, y también más eficiente, es realizado en pacientes. »

Los individuos que participan en la fase I son hospitalizados y se ejerce sobre ellos vigilancia intensa, incluyendo evaluaciones como examen físico diario y determinaciones de presión arterial, pulso, ECG, EEG, y pruebas para evaluar hígado, riñón y toxicidad hematológica. En la fase I es raro un suceso adverso grave. Por ejemplo, en 805 estudios efectuados entre 1964 y 1976 en 29000 individuos, sólo se presentaron 55 casos de reacciones adversas graves, comprobadas atribuibles al fármaco. »

**Estudios de fase II.** En estos estudios se administra por primera vez el fármaco a pacientes. Debe evaluarse la eliminación de la sustancia, puesto que el metabolismo de los pacientes puede ser diferente al de sujetos saludables. Estos estudios se dividen en fases temprana y tardía. Los ensayos tempranos de fase II implican administración del fármaco a pacientes para observar los posibles beneficios terapéuticos y efectos colaterales. »

Se intenta establecer el intervalo de dosis para estudios terapéuticos más definitivos. Los ensayos tardíos de fase II tienen por objeto establecer la eficacia del fármaco para reducir las manifestaciones de la enfermedad específica y comparar su eficacia y efectos colaterales con los de otros que se hallan en el mercado empleados con propósitos similares. »

**Estudios de fase III.** Estos estudios incluyen ensayos clínicos doble ciego, aleatorios y controlados sobre un número suficiente de pacientes para obtener datos que permitan la evaluación estadística de la eficacia y seguridad del fármaco. »

Los procedimientos para evaluar la toxicidad clínica son similares a los empleados en la fase I. Sin embargo, los estudios de fase III proporcionan mejor información debido al tamaño mucho mayor de la muestra. »

Si los estudios en seres humanos indican que el compuesto puede ser un agente terapéutico eficaz y seguro, el fabricante puede llenar una solicitud para un nuevo fármaco (SNF) en la oficina reguladora, solicitando permiso para comercializado. »

La SNF debe contener información adicional, como: datos en humanos que demuestran eficacia, uso que se recomienda; seguridad para ese uso; resultados de estudios adicionales en animales; nombre registrado que se propone, nombre químico y descripción; lista de todos los ingredientes; monografía del producto, etiquetas e impresos insertados en el paquete, y muestras del producto terminado del nuevo fármaco. Con frecuencia una SNF contiene miles de páginas. »

Los datos son revisados por dictaminadores y asesores externos. Las SNF no siempre se aprueban después de la primera entrega de datos y puede requerirse información adicional o aclaraciones. Si la documentación es aceptable para la oficina reguladora, entonces la autoridad firma un Certificado de cumplimiento. »

Este documento indica que la oficina encuentra satisfactorio el contenido de la SNF y que cumple con las regulaciones. El fármaco puede entonces entrar al mercado con la clasificación de fármaco nuevo. »

**Estudios de fase IV.** Estos estudios se realizan después de que se autoriza la comercialización del fármaco. Se vigilan los efectos del fármaco en los años inmediatos después de su ingreso al mercado, cuando su uso amplio puede dar lugar al descubrimiento de efectos colaterales relativamente raros, toxicidad crónica que sólo se desarrolla luego de muchos años de exposición (p. ej., cáncer), interacciones farmacológicas previamente desconocidas o posibles usos terapéuticos nuevos o el desarrollo de recomendaciones para dosis más apropiadas. »

El medicamento puede permanecer con la clasificación de fármaco nuevo por varios años hasta que la oficina reguladora se asegura de que se ha acumulado suficiente información adicional acerca de su uso general para justificar que se libere de los rígidos controles aplicados a los fármacos nuevos. En tanto el producto conserve su calidad de fármaco nuevo, se espera que el fabricante comunique toda nueva información respecto a seguridad o eficacia. »

La oficina reguladora se reserva el derecho de suspender el certificado de cumplimiento cuando es de interés público proceder de ese modo debido a hallazgos como falta de eficacia o toxicidad frecuente o grave. Por tanto, el estudio del desempeño de un nuevo fármaco no termina con su aprobación e ingreso al mercado. Los médicos deben evaluar de manera continua y crítica los efectos clínicos de sustancias viejas y nuevas. »

## **5. METODOLOGIA.**

### **5.1 INDUCCION DE LAS REACCIONES ADVERSAS.**

Primero se formaron los lotes mediante una distribución al azar y se les dio un tiempo de aclimatación a los animales de laboratorio en el bioterio. Fueron divididos en cuatro lotes(D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y el lote control), cada lote lo formaron 6 ratas, este procedimiento se hizo para cada fármaco a estudiar.

Los fármacos analizados fueron el LQM 311 (Bismorfolinico) y el LQM502 una Hidrazina estos se obtuvieron por síntesis orgánica en el área de Postgrado de la FESC-1 preparandose para su administración por vía oral de la siguiente manera, se pesaron 15 mg de cada fármaco, estos se aforaron con aceite de maíz más 3 o 4 gotas de dimetil sulfoxido en un matraz de 10 ml, obteniendo de esta manera la solución stock.

De la solución stock se tomaron 0.1, 0.2 y 0.3 ml, estas alícuotas se aforaron en un matraz de 5 ml de manera individual obteniendo las tres dosis a trabajar 0.075 mg/Kg, 0.15 mg/Kg y 0.225mg/Kg, este procedimiento se realizó cada tercer día para evitar cambios en las moléculas. La DE<sub>50</sub> de ambos fármacos es de 0.05 mg/Kg y se prepararon las dosis mencionadas por triplicado.

Una vez que se prepararon las tres dosis de cada fármaco se continuó con la administración a los animales de laboratorio (ratas winstar machos) su correspondiente dosis a cada lote y de la misma manera se administraron con aceite de maíz más dimetil sulfoxido los lotes control, esto con la ayuda de una sonda oral. Cada semana fueron sacrificados 2 animales por lote para obtener los órganos de interés. Previo a su sacrificio los animales fueron anestesiados con éter etílico en una campana de vidrio.



Los animales utilizados en el presente proyecto fueron pesados todos y cada uno de ellos por lote semanalmente en una balanza granataria, y de estos resultados se obtuvo un promedio en peso representativo de cada lote con el objetivo de apreciar si la administración de las moléculas a los individuos pertenecientes a el lote LQM 502 y a los del LQM 311, les producía algún efecto u alteración fisiológica que pudiera repercutir directamente en el peso de los animales y que al compáralos con los pesos promedio de los animales pertenecientes a el lote control evidenciara dicha alteración.

## **5.2 PERFUSION INTRACARDIACA**

Una vez que el animal estaba bajo anestesia general, con la ayuda de un equipo de venoclisis de 2 vías que contenía por un lado SSF para sustitución parcial de sangre por SSF y por el otro reactivo de Bouin como reactivo fijador, se realizo una incisión a lo largo del tórax de la rata para poder realizar la punción en el ventrículo izquierdo y de esta manera aprovechar al máximo el latido cardiaco como bomba para poder perfundir la SSF y después el reactivo de Bouin, al mismo tiempo se hace una incisión en uno de los miembros pelvianos del animal, en el cual se localiza una vena de gran calibre femoral, para ocasionar una hemorragia y de esta manera, tanto la SSF como el reactivo fijador pudieran llegar a todos los órganos y se pudieran fijar adecuadamente para evitar la autólisis de los tejidos.

Después de la fijación se extrajeron los órganos de interés (Hígado, Riñones, Intestino delgado y estómago) se tomo una área representativa de cada órgano que se lavó en seguida con agua corriente en forma indirecta con la finalidad de eliminar el exceso de fijador y evitar la formación de cristales; estos fueron colocados en un frasco perfectamente etiquetados y que contenían reactivo de Bouin. A las 24 horas se les cambio el reactivo de Bouin por alcohol al 70% (1:9).

Una vez que obtuvimos las muestras por medio del método de perfusión intracardiaca se obtuvieron los cortes histológicos de la siguiente manera: Primero se obtuvo una muestra más pequeña representativa de cada órgano (se cortaron con bisturí); después se **deshidataron** las muestras en concentraciones crecientes de etanol desde 70% hasta el alcohol absoluto (100%) esto con la ayuda de un microondas para acelerar el proceso.

Continuamos con la aclaración de las muestras; el etanol que estaba presente en los tejidos fue sustituido por un líquido miscible llamado estireno. Posteriormente las muestras fueron colocadas en recipientes que contenían parafina para uso histológico a 60°C (punto de fusión) con el fin de evaporar el estireno, esta etapa es conocida como **infiltración**.

Se realizó entonces la **inclusión**, se colocaron las muestras en recipientes cúbicos y rectangulares, los cuales fueron llenados con parafina fundida y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

## **CORTE**

Los bloques de parafina con las muestras de tejido incluidas fueron cortadas con la ayuda de un aparato llamado micrótopo, el cual cuenta con una cuchilla de acero que nos permitió realizar cortes entre 4 y 8  $\mu\text{m}$  de espesor, ideales para la observación histológica.

## **MONTAJE**

Los cortes obtenidos con el micrótopo se extendieron sobre agua caliente a 40°C que contiene grenetina diluida para que los cortes se adhirieran al portaobjetos.

## **COLORACION**

Por último la coloración de las muestras se efectuó en un tren de tinción de Hematoxilina-Eosina de la siguiente manera:

- |   |                   |
|---|-------------------|
| 1) Desparafinar en xileno                   | 5 min             |
| 2) Desparafinar en xileno                   | 5 min             |
| 3) Rehidratar en alcohol absoluto           | 5 min             |
| 4) Rehidratar en alcohol al 96%             | 5 min             |
| 5) Rehidratar en alcohol al 90%             | 5 min             |
| 6) Rehidratar en alcohol al 80%             | 5 min             |
| 7) Rehidratar en alcohol al 70%             | 5 min             |
| 8) Lavar en agua corriente                  | 2 min             |
| 9) Aplicar colorante hematoxilina de Harris | 5-10 min          |
| 10) Lavar en agua corriente                 | 2 min             |
| 11) Lavar en agua amoniacal                 | 2 min             |
| 12) Decolorar en alcohol ácido              | 5-30 seg          |
| 13) Lavar en agua corriente                 | AZUL INTENSO.     |
| 14) Aplicar colorante eosina                | 3-5 min.          |
| 15) Lavar en agua corriente                 | 5 min.            |
| 16) Deshidratar en alcohol al 96%           | 5 min             |
| 17) Deshidratar en alcohol al 96%           | 5 min             |
| 18) Deshidratar en alcohol absoluto         | 5 min             |
| 19) Deshidratar en alcohol absoluto         | 5 min             |
| 20) Aclarar en xileno                       | 5 min             |
| 21) Mantener en xileno limpio               | 5 minutos mínimo. |

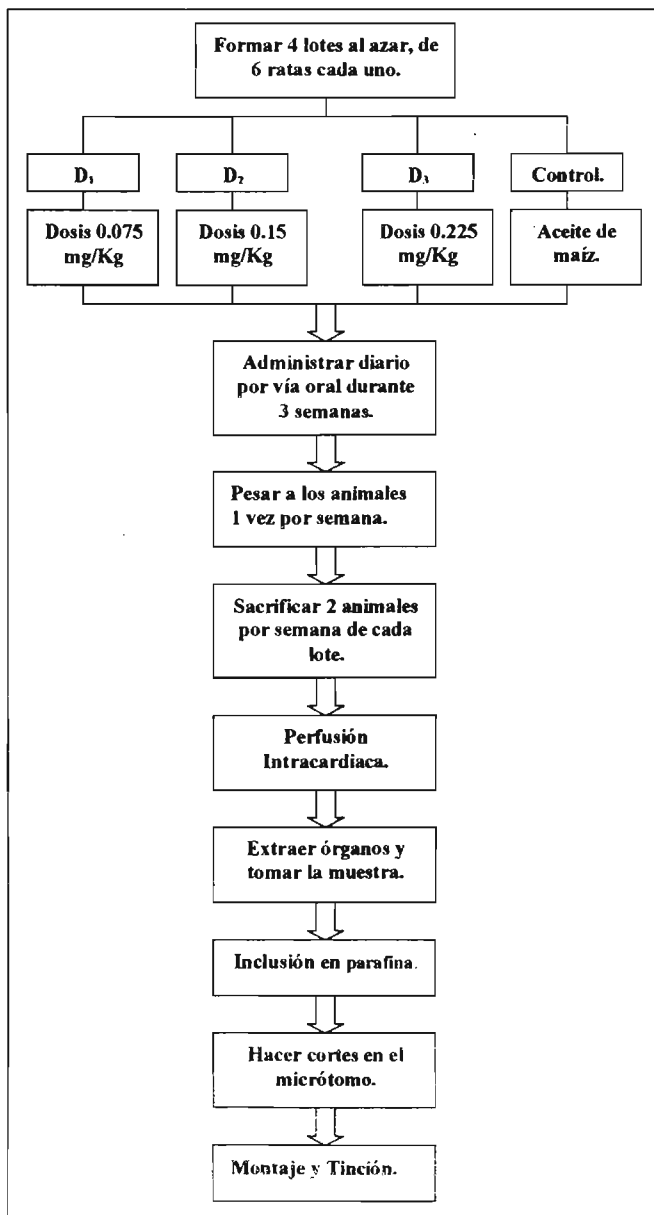
### 5.3 ANALISIS HISTOLOGICO MEDIANTE MICROSCOPIA OPTICA.

La coloración de hematoxilina–eosina es la más empleada en el laboratorio de histología. En esta coloración las estructuras basofilas (núcleos celulares) se tiñen con la hematoxilina y por lo tanto se colorean con una tonalidad que va de azul marino a morado. Las estructuras restantes (cuerpos celulares) se tiñen con la eosina observándose de una tonalidad rosa, rojo o naranja.

Una vez teñidas las muestras, se realizo la lectura de cada laminilla correspondiente a los diferentes órganos y dosis.

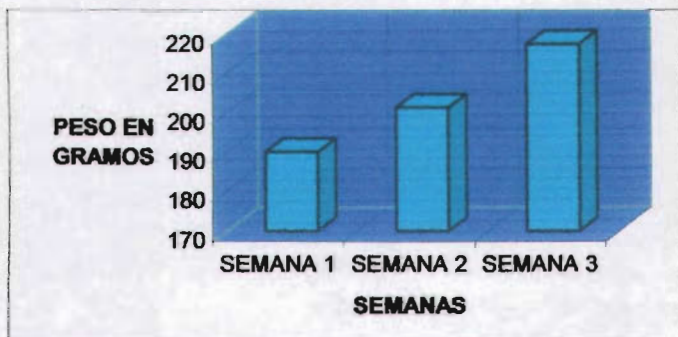
- a. Se enfoco con el objetivo de 10 X para examinar el corte completo y las condiciones del órgano en general y se hicieron las anotaciones respectivas de lo observado.
- b. Con el objetivo de 40 X en el cual se pueden observar posibles anomalías del tejido a nivel celular, descartando los posibles errores de corte o tinción llamados **artefactos**, esta observación se hizo cubriendo toda la muestra campo por campo, cuando se detecta algo extraño, sin perder el campo pasamos al objetivo de inmersión para observar a detalle la morfología celular y los probables daños detectados para después anotarlo en la bitácora, repetimos esto hasta terminar de observar por completo la muestra.
- c. Se seleccionaron las laminillas que contenían los daños más representativos en los órganos en estudio pertenecientes a los animales de laboratorio tratados con las moléculas a prueba y de los no tratados también (control); se tomaron las fotografías a diferentes aumentos.

FIGURA 4. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA.



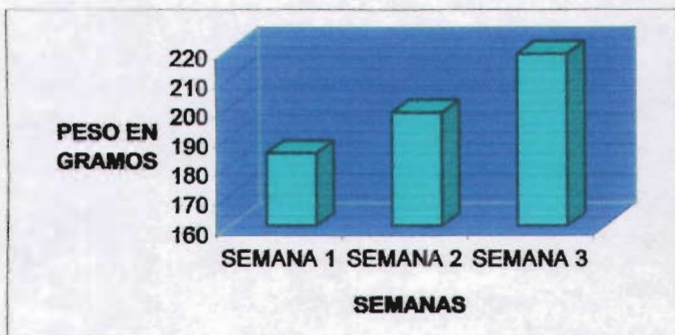
## 6. RESULTADOS.

A continuación se presenta la grafica del cambio registrado en el peso por semana de los animales que fueron administrados por el fármaco LQM 311.



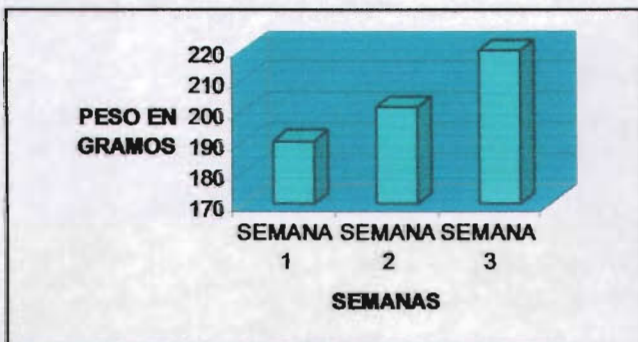
**Gráfica 1.** Correspondiente a el promedio en peso registrado por semana de los animales tratados con LQM 311 en tres semanas de administración por vía oral, en donde podemos observar el incremento promedio de 15 g semanalmente de los animales .

En la grafica 2 podemos observar el incremento de aproximadamente 14 g en el peso por semana de los animales que pertenecen a el lote tratado con el fármaco LQM 502, estos también fueron administrados por vía oral.



**Gráfica 2.** Los datos graficados representan al promedio en peso de los animales tratados con LQM 502 en las tres semanas de administración.

La grafica número 3 representa el cambio en el peso promedio de los animales agrupados en el lote denominado control, en donde podemos observar un incremento semanal de aproximadamente 13 gramos.



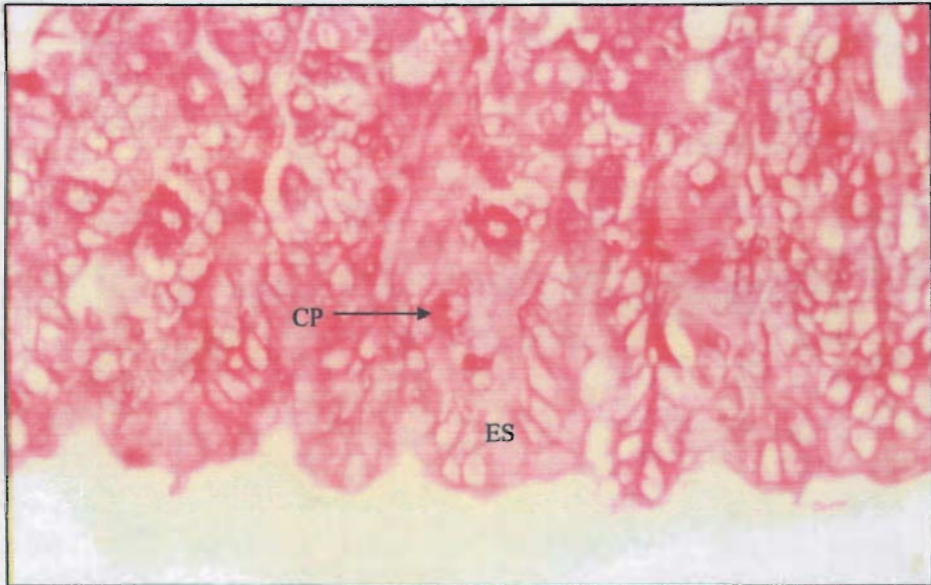
**Gráfica 3.** Representa el promedio en peso de los animales que pertenecen al lote control contra el periodo de administración expresado en semanas.

En el laboratorio de histopatología se llevo a cabo un diagnostico con base a las alteraciones que presentaron los tejidos de los órganos de los animales que fueron administrados con los fármacos en estudio LQM 502 e LQM 311 así como de los llamados control.

Mediante el uso de la técnica histológica de inclusión en parafina, la tinción H-E se lograron obtener muestras permanentes para hacer el diagnostico y a través de un lente fotográfico adaptado al microscopio óptico se pudieron obtener fotografías de los tejidos en estudio pertenecientes a los animales sacrificados después de la administración de las moléculas LQM 311 y LQM 502 así como de los control. A continuación se presentan una serie de fotografías en donde podemos observar los tejidos de los órganos que pertenecen y representan las características de una muestra control comparada con alguna de las muestras que presento alguna de las alteraciones o anormalidades detectadas más representativas de los daños ocasionados por los fármacos en estudio.

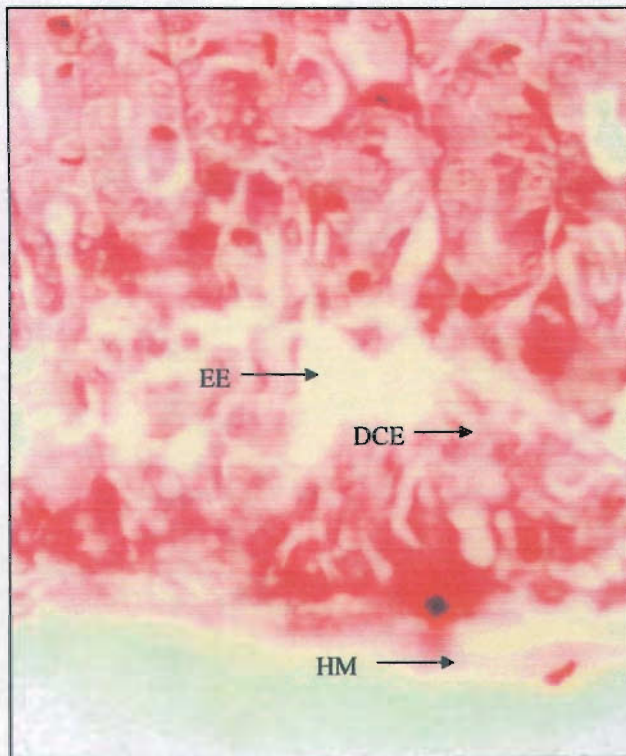


La figura número 5 corresponde a un corte de la superficie de la mucosa gástrica con 40x en donde podemos observar el epitelio superficial del estómago (ES) con su arquitectura normal conservada, también se observan células parietales (CP).



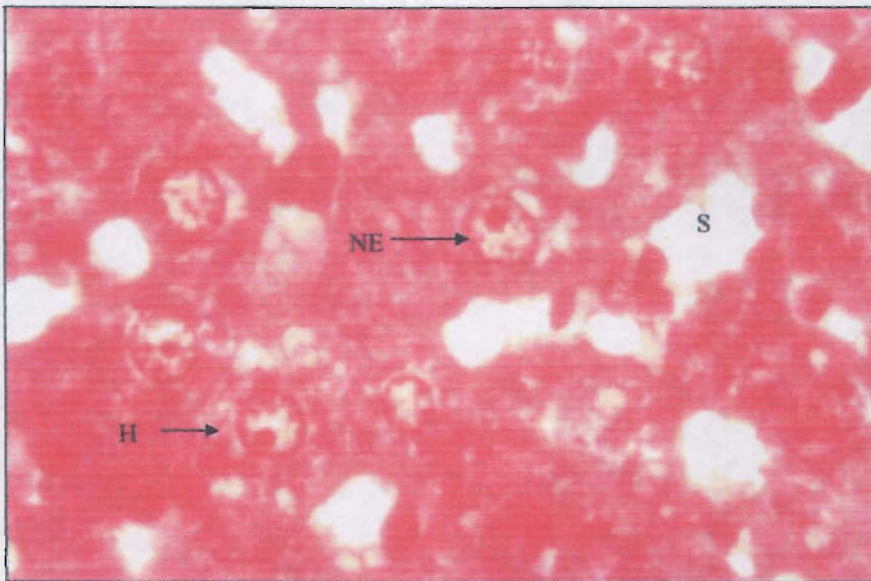
**Fig. 5) Corresponde a un corte de el borde de la mucosa del estómago de una rata control enfocada a 40 X, tinción HE.**

La figura 6 corresponde a un corte de la superficie de la mucosa gástrica con 40x se muestra erosión del epitelio (EE) de la parte superficial de la mucosa, y desprendimiento de las células epiteliales superficiales (DCE) que se encontraban adelgazadas; también se apreció hipersecreción de moco (HM), esto se observó y fue significativo en las ratas administradas por el fármaco LQM 311 en las dosis 0.15 mg/Kg y 0.225 mg/Kg, y en los administrados con LQM 502 con la dosis 0.15 mg/Kg.



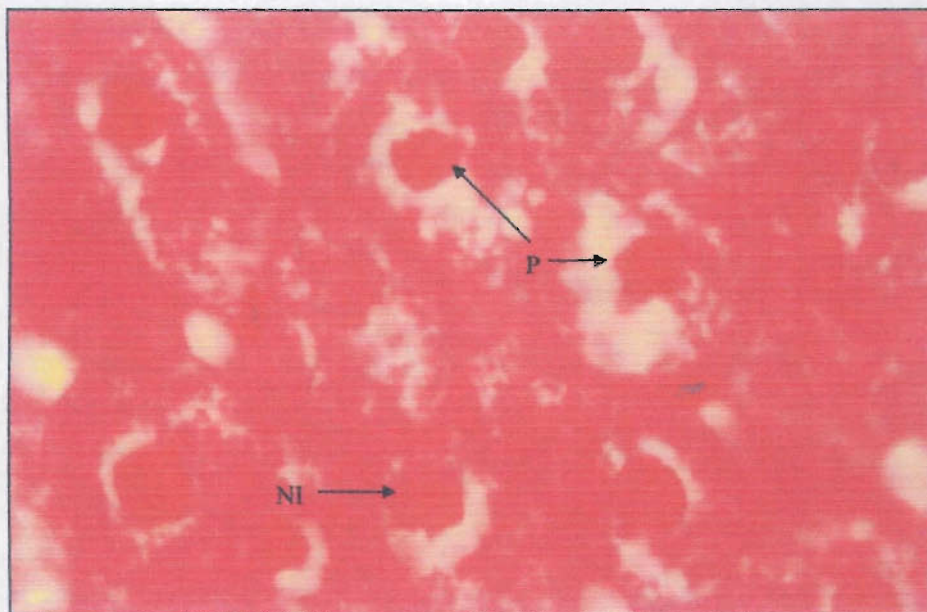
**Fig. 6) Corresponde a un corte de el borde de la mucosa del estómago de una rata tratada con LQM 311, a 40 X, tinción HE.**

La figura 7 corresponde a un corte histológico de hígado de un animal del lote control en donde podemos observar la arquitectura típica de los hepatocitos (H) con su núcleo esférico y de cara abierta (NE), el nucleolo muy evidente, también se aprecian los sinusoides (S) característicos del órgano con su arquitectura normal.



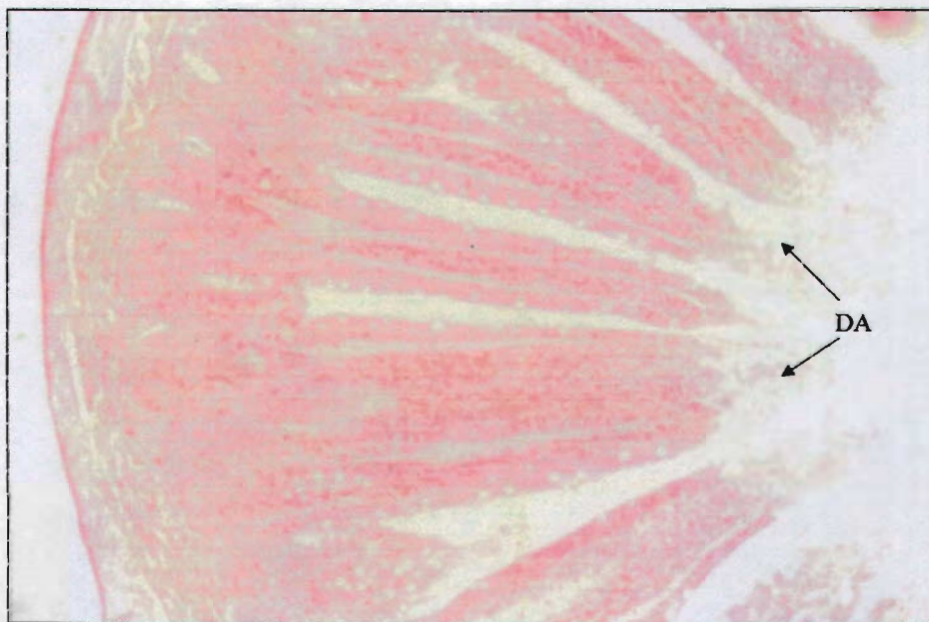
**Fig. 7) Corte de hígado de una rata control a 100 X, tinción HE.**

Por otro lado la figura 8 corresponde a un hígado de los animales tratados con la molécula LQM 311 en donde podemos observar que los sinusoides hepaticos no se observan debido a que los hepatocitos están hinchados, los núcleos de los hepatocitos han perdido su arquitectura normal es decir tienen forma irregular (NI) y la cromatina esta condensada casi son núcleos picnóticos (P), esta lesión se observó tanto en los animales administrados con el fármaco LQM 311 como en los tratados con el LQM 502 en todas las dosis, es preciso mencionar que esto no se encontró generalizado en los cortes explorados solo se encontró en áreas aisladas.



**Fig. 8) Corresponde a un corte de hígado de una rata tratada con LQM 502, 100 X, tinción HE.**

La figura 9 corresponde a un corte de Intestino Delgado con 10 x podemos observar ligera destrucción de la porción apical de las vellosidades (DA) esto se observo tanto en las ratas control como en las tratadas.



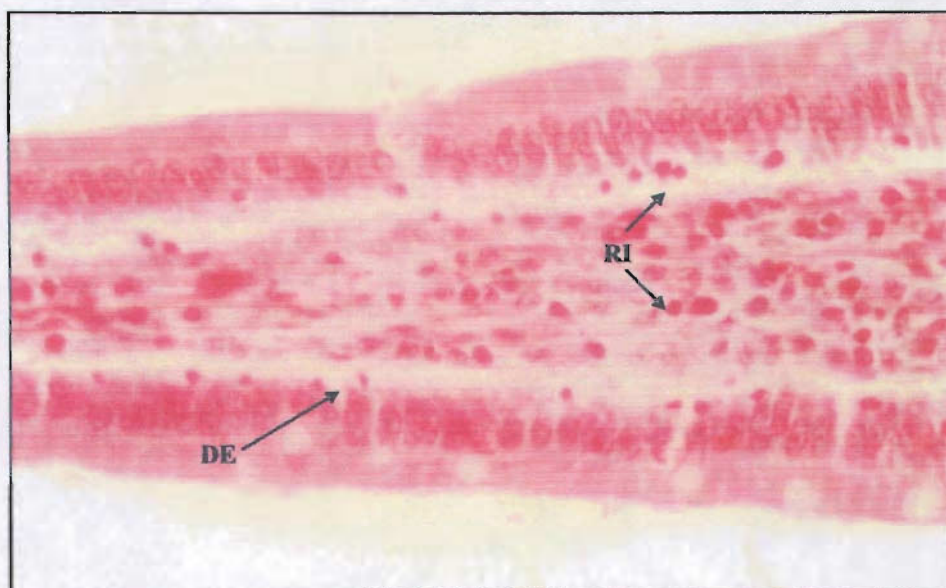
**Fig. 9) Corresponde a un corte de Intestino Delgado de una rata tratada con LQM 311 enfocado a 10 X, tinción HE.**

En la figura 10 se observa una fotografía de intestino delgado de el lote control en donde se aprecian las vellosidades (V), el epitelio (E), lámina propia (LP).



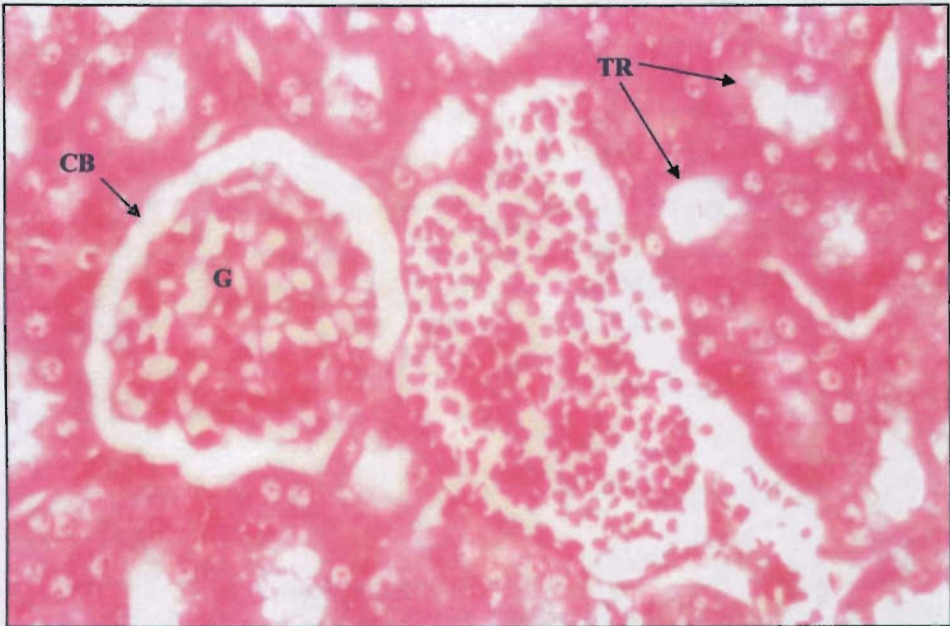
**Fig. 10) Corresponde a un corte de Intestino Delgado de una rata control enfocado a 10 X, tinción HE.**

La figura 11 corresponde a un corte de una vellosidad intestinal con 40 x en donde se apreció desprendimiento del epitelio (DE) y una respuesta inflamatoria (RI) importante localizada en los cortes de las ratas que fueron administradas con los dos fármacos de el presente estudio (LQM 311 y LQM 502) en todas las dosis, el desprendimiento del epitelio se debe probablemente a la técnica utilizada para la deshidratación que se realizó en microondas debido a que también las muestras control lo presentaron en gran número.



**Fig. 11) Corte de Intestino Delgado de una rata tratada con LQM 502, a 40 X, tinción HE.**

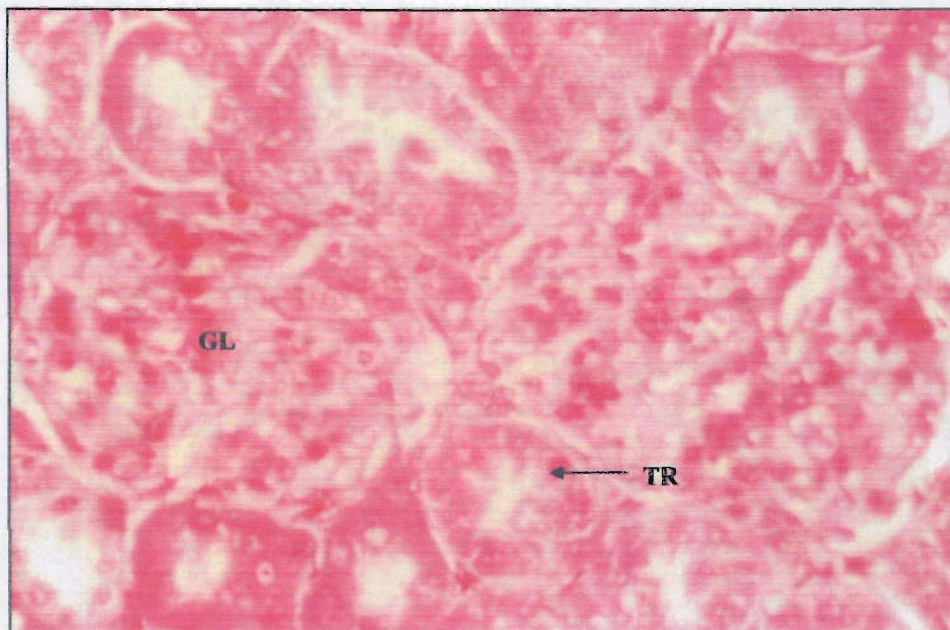
La figura 12 pertenece a un corte de riñón de una rata control con 100 x en donde podemos observar un glomérulo (G), la cápsula de Bowman (CB) que se aprecia claramente y los túbulos renales (TR) en condiciones normales, conservando la arquitectura típica del riñón.



**Fig. 12) Corresponde a un corte de riñón de una rata control enfocado a 100 X, tinción HE.**



La figura 13 corresponde al riñón con 100 x de un animal tratado con el fármaco LQM 311 en la cual se observa el glomérulo inflamado (glomerulitis) (GL) por lo que la cápsula de Bowman no se aprecia, el espacio esta ocupado por el glomérulo hinchado, los túbulos (TR) se observan normales, esto fue significativo en los animales administrados con LQM 311 en las tres dosis manejadas y con los administrados con el fármaco LQM 502 únicamente la dosis de 0.075 mg/Kg.



**Fig. 13) Corresponde a un corte de Riñón de una rata tratada con LQM 311, a 100 X, tinción HE.**

En la tabla 2 se encuentran resumidos los cambios histopatológicos expresados en porcentaje encontrados en el estómago de los animales tratados con la molécula LQM 311 en las tres dosis diferentes y de los control, en la que se identifica principalmente una agresión al estómago manifestada como erosión del epitelio (ulcera) de tipo leve así como congestión en mucosa e Hipersecreción de moco, en estos resultados no se muestra todavía el análisis estadístico corresponde únicamente a el porcentaje de los animales que presentaron estas alteraciones.

ESTÓMAGO			
Dosis.	Erosion del epitelio.	Hipersecreción de moco.	Congestion en mucosa.
0.075 mg/Kg	66.66%	66.66%	
0.15 mg/kg	83.33%	50%	16%
0.225 mg/Kg	100%	66.66%	83.33%
Control.	50%	75%	37.5%

**Tabla 2).** Porcentaje de los animales que presentaron alguna alteración o anomalía en el estómago provocado por la administración de LQM 311 en las tres dosis manejadas y comparadas con los del lote control.

La tabla número 3 nos muestra las alteraciones tisulares ocasionadas por el fármaco LQM 311 a el intestino delgado en donde podemos enlistar hipersecreción de moco, presencia abundante de células inflamatorias como linfocitos y macrófagos principalmente, congestión y destrucción apical, es evidente que la destrucción apical de las vellosidades y la hipersecreción de moco se encontraron en altos porcentajes tanto en las tratadas como en las control por lo que no se puede asegurar que dichos daños pudieran haber sido ocasionados por el fármaco administrado.

<b>INTESTINO DELGADO</b>				
Dosis.	Destrucción apical.	Hipersecreción de moco.	Células inflamatorias.	Congestion.
0.075 mg/Kg	50%	83.33%	66.66%	16%
0.15 mg/kg	50%	33.33%	66.66%	16%
0.225 mg/Kg	50%	66.66%	50%	
Control.	50%	75%	12.5%	12.5%

**Tabla 3).** Porcentaje de animales que en el análisis histopatológico presentaron alguna alteración o anomalía en el tejido de intestino delgado provocado por la administración de LQM 311 en las tres dosis manejadas y del lote control.

El hígado fue uno de los órganos más afectados por la administración de el fármaco LQM 311, siendo la presencia de núcleos irregulares en los hepatocitos y la picnosis una de las lesiones más constantes localizadas como lo muestra la tabla 4.

<b>HÍGADO</b>				
<b>Dosis.</b>	<b>Núcleo irregular</b>	<b>Citoplasma vaciado</b>	<b>Hepatocitos hinchados.</b>	<b>Picnosis.</b>
0.075 mg/Kg	83.33%	66.66%	50%	16%
0.15 mg/kg	83.33%	33.33%	16%	16%
0.225 mg/Kg	50%	33.33%	16%	33.33%
Control.	25%	25%	12.5%	0%

**Tabla 4).** Porcentaje de animales que a la lesión histopatológica presentaron alguna alteración o anomalía en hígado provocado por la administración de LQM 311 en las tres dosis manejadas y de los animales control.

En la tabla 5 podemos observar los daños histopatológicos encontrados en el riñón, tales como la glomerulitis y la salida de líquido a túbulos renales (SLT), que fueron los más significativos y frecuentemente encontrados en los cortes histológicos de este tejido.

RIÑÓN				
Dosis.	Glomerulitis	Destrucción glomerular.	Congestión	SLT
0.075 mg/Kg	83.33%	50%	50%	33.33%
0.15 mg/kg	66.66%		66.66%	33.33%
0.225 mg/Kg	83.33%	33.33%	66.66%	33.33%
Control.	25%	37.5%	87.5%	12.5%

**Tabla 5).** Porcentaje de animales que en el estudio histopatológico presentaron alguna alteración o anomalía en el riñón provocado por la administración de LQM 311 en las tres dosis manejadas y de los animales control.

El análisis estadístico realizado nos demuestra si fue o no significativo el daño tisular encontrado en los diferentes órganos en estudio, aparentemente provocados por la administración de los fármacos en investigación, como lo son el LQM 311 al compararlos con los resultados de los pertenecientes a el lote control.

Después de realizar un análisis estadístico empleando una prueba de hipótesis por diferencia de proporciones estimados con un 95% de confianza se obtuvieron los resultados siguientes.

LQM 311							
Dosis.	HIGADO				RIÑON	ESTOMAGO	I.D
	N.I	C.V	H.H	Picnosis.	Glomerulitis.	E. E	C.I
0.075 mg/Kg	95%	95%	95%	95%	95%		95%
0.15 mg/kg	95%			95%	95%	95%	95%
0.225 mg/Kg				95%	95%	95%	95%

**Tabla 6)** Muestra los resultados significativos después del análisis estadístico empleado para la molécula LQM 311 con un 95% de confianza, los espacios en blanco también presentaron dichas reacciones pero en el tratamiento estadístico no resultaron significativos. En donde N.I = Núcleo Irregular en los Hepatocitos , C.V= Citoplasma Vaciado en Hepatocitos, H.H= Hepatocitos Hinchados, E.E= Erosión del Epitelio en Estómago y C.I= Presencia de Células Inflammatorias principalmente linfocitos y macrófagos en el Intestino Delgado.

La tabla 7 representa las alteraciones titulares expresadas en porcentaje encontradas en Estómago de los animales tratados con el fármaco LQM 502 en las tres dosis diferentes y de los animales control, en la cual se identificó principalmente una agresión al estómago manifestada como erosión del epitelio (ulcera) de tipo leve así como congestión en mucosa e Hipersecreción de moco, en estos resultados no se muestra todavía el análisis estadístico son únicamente el porcentaje de los animales que presentaron estas alteraciones.

<b>ESTÓMAGO</b>			
Dosis.	Erosion del epitelio.	Hipersecreción de moco.	Congestion en mucosa.
0.075 mg/Kg	66.66%	50%	
0.15 mg/kg	83.33%	83.33%	66.66%
0.225 mg/Kg	66.66%	83.33%	66.66%
Control.	50%	75%	37.5%

**Tabla 7).** Porcentaje de animales que en el análisis histopatológico presentaron alguna alteración o anomalía en el estómago provocado por la administración de LQM 502 en las tres dosis manejadas y de los animales control.

En la tabla 8 podemos observar los daños causados por la administración de el fármaco LQM 502 a nivel de intestino delgado principalmente la fracción del yeyuno en donde apreciamos una reacción de tipo inflamatoria manifestada por la presencia de células como linfocitos y macrófagos, la destrucción apical de las vellosidades e hipersecreción de moco parecen no ser significativas debido al alto porcentaje también encontrados en los lotes control.

<b>INTESTINO DELGADO</b>				
Dosis.	Destrucción apical.	Hipersecreción de moco.	Células inflamatorias.	Congestion.
0.075 mg/Kg	83.33%	66.66%	83.33%	
0.15 mg/kg	50%	83.33%	66.66%	33.33%
0.225 mg/Kg	66.66%	66.66%	66.66%	16%
Control.	50%	75%	12.5%	12.5%

**Tabla 8).** Porcentaje de animales que presentaron alguna alteración o anomalía histológica en el intestino delgado provocado por la administración de LQM 502 en las tres dosis manejadas y del lote control.



En el hígado se encontraron daños como: núcleo de forma irregular en los hepatocitos, citoplasma vaciado, hepatocitos hinchados y picnosis, estos resultados corresponden también a el porcentaje de animales administrados con la molécula LQM 502 en las tres dosis manejadas.

<b>HÍGADO</b>				
Dosis.	Núcleo irregular	Citoplasma vaciado	Hepatocitos hinchados.	Picnosis.
0.075 mg/Kg	100%	50%	16%	16%
0.15 mg/kg	100%	50%	33.33%	16%
0.225 mg/Kg	66.66%	100%	33.33%	
Control.	25%	25%	12.5%	0%

**Tabla 9).** Porcentaje de animales que presentaron alguna alteración o anomalía histopatológica en el hígado provocado por la administración de LQM 502 en las tres dosis manejadas y en el lote control.

La tabla 10 nos muestra el porcentaje de animales que manifestaron daños tisulares en el riñón por la administración de la molécula LQM 502 siendo la glomerulitis uno de los más frecuentemente encontrados en este órgano.

RIÑÓN				
Dosis.	Glomerulitis	Destrucción glomerular.	Congestión	SLT
0.075 mg/Kg	100%	33.33%	50%	16%
0.15 mg/kg	33.33%		83%	
0.225 mg/Kg	50%	16%	100%	33.33%
Control.	25%	37.5%	87.5%	12.5%

**Tabla 10).** Porcentaje de casos que a la revisión histológica presentaron alguna alteración o anomalía en el riñón provocadas por la administración de LQM 502 en las tres dosis manejadas y de los animales control. SLT= Salida de líquido a túbulos.

Para la molécula LQM 502 también fue utilizado el mismo tratamiento estadístico, es decir se les aplicó un análisis estadístico empleando una prueba de hipótesis por diferencia de proporciones estimados con un 95% de confianza se obtuvieron los resultados siguientes.

LQM 502						
	HIGADO			RIÑÓN	ESTÓMAGO	I.D
Dosis.	N.I	C.V	Picnosis.	Glomerulitis	E.E	C.I
0.075 mg/Kg	95%		95%	95%		95%
0.15 mg/kg	95%				95%	95%
0.225 mg/Kg	95%	95%	95%			95%

**Tabla 11)** Muestra los resultados significativos después del análisis estadístico empleado para la molécula LQM 502 con un 95% de confianza, los espacios en blanco también presentaron dichas reacciones pero en el tratamiento estadístico no resultaron significativos. En donde N.I = Núcleo Irregular en los Hepatocitos, C.V= Citoplasma Vacío en Hepatocitos, H.H= Hepatocitos Hinchados, E.E= Erosión del Epitelio en Estómago y C.I= Presencia de Células Inflamatorias principalmente linfocitos y macrófagos en el Intestino Delgado.

En la tabla número 11 podemos observar con un 95% de confianza los daños histopatológicos más significativos encontrados en los animales administrados con LQM 502, siendo la glomerulitis significativa únicamente en la dosis 0.075 mg/Kg, la E.E en la dosis 0.15 mg/Kg y la picnosis en 0.075 mg/Kg y 0.225 mg/Kg; también hay presencia de citoplasmas vaciados en los hepatocitos en la dosis 0.225 mg/Kg, esto a diferencia de los resultados obtenidos con la administración del fármaco LQM 311.

## **7. ANALISIS DE RESULTADOS**

### **Cambios de Conducta:**

No se observo ningún cambio importante en el comportamiento de las ratas.

### **El peso corporal:**

Como podemos observar en las gráficas 1, 2 y 3 que representan el peso en promedio expresado en gramos contra el tiempo en semanas tanto de los lotes tratados como los control no se encontró ninguna alteración importante que se le pueda atribuir al las moléculas en estudio ya que el incremento en peso durante el periodo de tratamiento es similar o proporcional al de los lotes control y si tomamos en cuenta que se trataba de ratas jóvenes es normal que hubiera un incremento en su peso no atribuible al las moléculas en cuestión, puesto que los animales control o no tratados tuvieron el mismo comportamiento con respecto al incremento en el peso corporal que fue de 14g en promedio por semana.

### **Observaciones macroscópicas:**

Con el LQM 502 se registraron casos de alteraciones en el hígado a nivel macroscópico ya que parecían estar incrementados en su tamaño (hinchados) y de un color blancuzco en algunas áreas esto se observo en los individuos pertenecientes al lote de la dosis 3.

Por otro lado los individuos administrados con LQM 311 presentaron en algunos casos riñones hinchados, no se observo en todos los individuos sin embargo si en las tres dosis al menos en un caso.

### **Observaciones microscópicas:**

Las anomalías celulares y estructurales reveladas en la observación microscópica en los tejidos de los diferentes órganos en estudio (Hígado, Riñón, Estómago e Intestino Delgado) provocados por los dos compuestos de nueva síntesis (LQM 502 y LQM 311), fueron analizados por un método estadístico de diferencia de proporciones con un 95% de confianza, comparando los resultados de los animales tratados con los control para evidenciar los daños significativos de los que no lo eran.

De esta manera podemos decir que de las moléculas LQM 311 y LQM 502 reportaron lesiones significativas en hígado debido a que como es sabido este es un órgano que se encarga principalmente de el metabolismo o biotransformación de las diferentes moléculas o principios activos ya sea para su activación o para transformarlos en una molécula más fácil de eliminar por lo que se encontraba en constante contacto con este órgano.

Los hepatocitos por su alto grado de actividad metabólica, son alterados fácilmente por toxinas, exhibiendo las respuestas celulares histológicas conocidas como tumefacción turbia, transformación grasa y necrosis o la inflamación aguda del parénquima hepático que suele estar caracterizada por la acumulación focal de células inflamatorias habitualmente en relación con el lugar donde hay hepatocitos afectados o necróticos.<sup>15</sup>

El daño más común a nivel celular de los hepatocitos en este estudio fue la presencia de núcleos con forma irregular es decir de una forma atípica de lo que normalmente los son (completamente esféricos), en comparación con las células de el lote control, el núcleo de cada célula afectada es más pequeño e irregular condensado e intensamente teñido por hematoxilina (basofilia).

Esta alteración estructural y condensación nuclear se denomina picnosis y se debe a una formación progresiva de grumos de cromatina, posiblemente como resultado de la disminución del pH debida al metabolismo anaeróbico terminal; esto nos habla de una pérdida estructural y por lo tanto funcional del hepatocito debido a que la cromatina de dichas células se encontraba condensada por lo que se hacía muy evidente y nos habla de una inactividad del hepatocito lo cual es anormal puesto que los hepatocitos son células muy activas por naturaleza y por que en caso necesario constantemente se están regenerando;<sup>15</sup> la literatura nos dice que una molécula en estudio de alguna manera similar a el LQM 502 se le ha comprobado la capacidad de inducir a las células a apoptosis es decir muerte celular programada o inducida por el mencionado compuesto en estudio.

Con el fármaco LQM 502 también se detecto la presencia de citoplasmas vaciados en hepatocitos en al menos una dosis.

El riñón es responsable de la excreción de productos de desecho procedentes de los procesos metabólicos del cuerpo, que son eliminados en forma de una solución acuosa, la orina.

El riñón presentó como anomalía más común la glomerulitis principalmente en el caso de el LQM 311 que lo manifestó en las tres dosis y por otro lado el LQM 502 únicamente en la dosis 0.075 mg/Kg, probablemente por que la celularidad del glomérulo esta aumentada por la tumefacción y proliferación de las células endoteliales, que prácticamente han obliterado las luces capilares; también se encontraron neutrofilos en los penachos glomerulares, y suele existir algún grado de proliferación celular mesangial. <sup>15</sup>

El espacio de la capsula de Bowman se observa inaparente probablemente también por la proliferación de los podocitos; este órgano cumple una función muy importante al participar en la eliminación o reabsorción de las moléculas útiles o de las moléculas de desecho, entre otras funciones más, aseverando presuntuosamente la presencia de dicha molécula y desencadenando la hinchazón de los glomérulos.

El Intestino delgado mostró una respuesta de tipo inmunológico en ambos compuestos debido probablemente a la presencia de estos en los tejidos manifestándose por la aparición numerosa de células inflamatorias como los macrófagos y linfocitos principalmente localizados en la lamina propia, en este órgano es donde la absorción de las moléculas se lleva a cabo principalmente en el yeyuno, tomando en cuenta que la administración fue vía oral es probable que los causantes de esta reacción fueran las moléculas a las que nos hemos referido en el presente estudio .

Por otro lado también se observó una atrofia o acortamiento de las vellosidades en Intestino Delgado, tanto en las ratas administradas con el fármaco LQM 311 como en las tratadas con LQM 502 y en los controles en un porcentaje alto y similar en los tres casos. En la bibliografía encontramos que la hipersensibilidad al gluten (un constituyente del trigo, el centeno y la cebada da lugar a la **enfermedad celiaca** (enteropatía por gluten), una condición en la que las vellosidades de la mucosa del intestino delgado experimentan atrofia total o subtotal dejando una superficie mucosa plana con gran disminución de la capacidad de absorción. Desde el punto de vista clínico esto conduce a un síndrome de mal absorción caracterizado por esteatorrea (diarrea que contiene lípidos no absorbidos).

En la enfermedad celiaca, existe infiltración de la mucosa duodenal por linfocitos y células plasmáticas también en la lámina propia con pérdida de vellosidades.

Si comparamos el cuadro de dicha enfermedad con las características observadas en los animales tratados y control nos lleva a pensar que el alimento de los animales contiene alguno de estos granos causantes de dichas alteraciones en un proceso inicial ya que nuestros resultados presentaron un acortamiento inicial de las vellosidades, presencia de células inflamatorias en la lamina propia y las heces comenzaban a perder consistencia. Descartando así que los causantes de dichas anomalías fuesen los fármacos en estudio (LQM 311 y LQM 502).

En la figura 6 se observa un corte que pertenece al estómago en donde podemos destacar erosión de la parte superficial de la mucosa, y por lo general acompañada de desprendimiento de las células epiteliales superficiales que se encontraban adelgazadas; también se apreció hipersecreción de moco, esto se observó y fue significativo en las ratas administradas por el fármaco LQM 311 en las dosis 0.15 mg/Kg y 0.225 mg/Kg, y en los administrados con LQM 502 con la dosis 0.15 mg/Kg.

La ulceración esta causada por un desequilibrio entre factores dañinos (ácido gástrico y enzimas pépticas) y factores protectores (secreción gástrica de moco, secreción local de álcali), al parecer los fármacos administrados causaron un daño directo a las células epiteliales, liberando enzimas capaces de destruir la capa superficial de moco. Esto permite que el ácido entre en contacto con la mucosa y conduce a la formación de una ulcera aguda que en este caso la clasificamos como de tipo leve.

Es importante mencionar que los daños detectados en los diferentes tejidos no fueron generalizados en ningún órgano; es decir que se encontraron solo en áreas localizadas.



Como podemos observar en las tablas 6 y 11 en algunos casos como por ejemplo en LQM 311 en Hígado D<sub>3</sub> no fue significativo el daño de núcleo irregular en hepatocitos pero si en D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> contrario a lo que esperaríamos, sin embargo si presentaron núcleos picnóticos en las tres dosis que es un daño más grave que el núcleo irregular (NI) en hepatocitos; en citoplasma vaciado (CV) de este mismo fármaco ocurre lo mismo; esta tendencia también se observa en algunos otros casos como con LQM 502 en riñón y estómago. Estos casos nos permiten sugerir que como es bien sabido, la idiosincrasia de cada individuo también influye en las reacciones adversas a las diferentes moléculas, es decir que de un grupo o población de individuos tratados con algún fármaco algunos presentaran RAM y otros no.

## **8. CONCLUSIONES.**

El análisis histológico mediante microscopía óptica determinó que el hígado es el órgano más afectado, lo que se dio en ambas moléculas; la lesión hepática se manifestó por: hepatocitos con núcleo de forma irregular y casos aislados de núcleos picnóticos.

En el riñón se detectó glomerulitis (LQM 311 principalmente), en estómago erosión de epitelio de tipo leve y superficial y una respuesta inflamatoria en el intestino delgado.

Las moléculas LQM 502, LQM 311 a las dosis estudiadas resultaron de baja toxicidad. La toxicidad mostrada no tiene relación con las dosis ni con la duración del tratamiento.

Las alteraciones se localizaron de manera aislada en los diferentes cortes histológicos.

## ANEXO I

### 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se llevo a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos, empleando una técnica por diferencia de proporciones y una prueba de hipótesis para saber si las desviaciones sucedidas invalidan los resultados o los hacen dudosos. Si los resultados de los animales tratados discrepan mucho de los lotes control se deben de tratar con prudencia y de esta manera hacer un análisis objetivo.

Uno de los propósitos de la prueba de hipótesis es ayudar al investigador en la toma de decisiones. En general, la decisión clínica depende de la decisión estadística.

#### 9.1 PASOS PARA LA PRUEBA DE HIPÓTESIS.

- 1) Datos. Es necesario comprender la naturaleza de los datos que forman la base de los procedimientos de prueba; es decir si los datos constan de conteos o medidas.
- 2) Hipótesis. Se trabaja con dos hipótesis estadísticas que deben anunciarse explícitamente. La primera es la hipótesis que debe probarse o hipótesis nula ( $H_0$ ). La hipótesis alternativa, identificada mediante el símbolo  $H_A$ , es una suposición que se creará cierta si los datos de la muestra llevan al rechazo de la hipótesis nula.
- 3) Estadística de prueba. La estadística de prueba es alguna estadística que se puede calcular a partir de los datos de la muestra, conforme a las siguientes formulas:

$$Z_i = \frac{P_{1,2,3} - P_0}{\sigma_p}$$

$$\sigma_p = \sqrt{P_0 q_0 / n}$$

$$q_0 = 1 - P_0$$

En donde:

$P_0$ = promedio de animales control que presentaron alguna anomalía.

$\bar{P}_1$ = promedio de animales que presentaron alguna anomalía en la dosis de 0.075 mg/Kg.

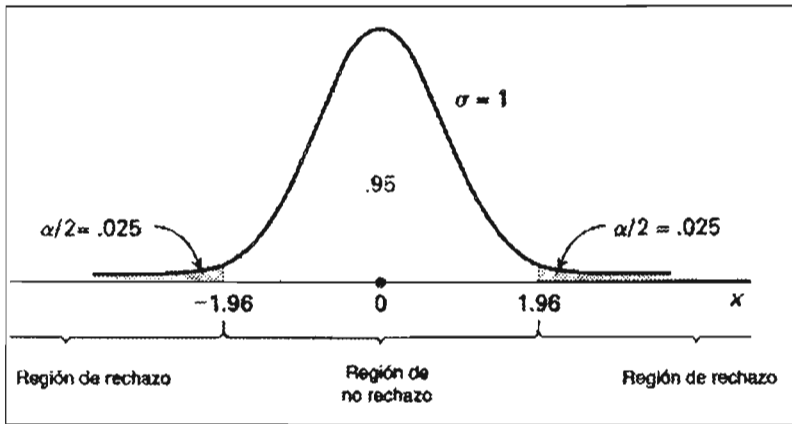
$\bar{P}_2$ = promedio de animales que presentaron alguna anomalía en la dosis de 0.15 mg/Kg.

$\bar{P}_3$ = promedio de animales que presentaron alguna anomalía en la dosis de 0.225 mg/Kg.

$n$ = número de animales o tamaño de la muestra.

$\sigma_p$ = el error estándar de la media.

- 4) Regla de decisión. La regla de decisión señala que se debe rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) si el valor de la estadística de prueba que se calcula a partir de la muestra es uno de los valores de la región de rechazo, y que no se debe rechazar la hipótesis nula si el valor calculado de la estadística de prueba es uno de los valores de la región de no rechazo, como se observa en la gráfica 4.



Grafica 4. Región de rechazo y no rechazo para los datos experimentales.

Ejemplo: en los resultados correspondientes a los cortes histológicos del hígado de los animales administrados con LQM 311 en la dosis de 0.075 mg/Kg se obtuvo un promedio de 83% de alteraciones manifestadas por núcleo irregular de los hepatocitos y un 25% en los controles. Calcular  $Z_i$ .

$$H_0: P_0 = \bar{P}_1$$

$$H_A: P_0 \neq \bar{P}_1$$

$$\bar{P}_1 = 0.83$$

$$P_0 = 0.25$$

$n = 6$  entonces;

$$q_0 = 1 - 0.25 = 0.75$$

$$\sigma_p = \sqrt{((0.25)(0.75))/6} = 0.1767$$

$$Z_i = 0.83 - 0.25 / 0.1767 = \underline{\underline{3.29}}$$

Como  $Z_i = 3.29$  cae fuera de  $(-1.96, 1.96)$  se rechaza  $H_0$ , esto lo afirma un 95% de confianza y un 5% de significación.

## 10. BIBLIOGRAFIA.

1. Goldstein (2000) "Farmacología" Editorial Limusa México D.F. pp 449,456,858
2. Bowman W. C. (1999) "Farmacología" Editorial Jims, Barcelona España.
3. Dipalma R. J. (2001) "Farmacología Médica" Editorial la Presa Médica Mexicana, México D. F. pp.97.
4. Goodman S. L. , Gilman A. (1981) "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" 6ª Edición Editorial Médica Panamericana México D.F. pp. 1563, 1564.
5. Naranjo P. (1999) "Manual de Farmacología" editorial Fournier México D.F. pp 8-19.
6. Bevan A. J. (1982) "Fundamentos de Farmacología" 2ª Edición Editorial Sagitario pp 62.
7. Alfonso R. G. (2003) "Rémington Farmacia" 20ª Edición Tomo I Editorial Médica Panamericana Buenos Aires pp 103.
8. Kalant H. (2002) "Principios de Farmacología Médica" 6ª Edición Editorial Oxford pp 931,1370.
9. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 1999(1) "Reacciones Adversas" p 11-28, 29-32.
10. Flores J. "Farmacología" 3 Edición. pp. 107-135
11. Cirilo D. A. (2000) "Introducción a la Química Terapéutica" 1ª Edición Editorial PPU Barcelona España pp. 102
12. De Falgas B. J. (2000) "Farmacia Clínica" Vol. II Editorial Síntesis España
13. Ross H. Michael (2001) "Histología Texto y Atlas Color" 3ª Edición Editorial Médica Panamericana Buenos Aires Argentina pp. 514-521.
14. Wayne W. D. (2002) "Bioestadística" 4ª Edición Editorial Limusa México D.F. pp. 204-215
15. Stevens A. (2003) "Histopatología Básica" 4ª Edición Editorial Elsevier España, Madrid España pp. 6-11, 154-162, 138-42, 165-184.

16. Litter M. (1992). "Compendio de Farmacología " 4ª Edición Editorial el Ateneo.
17. Katzung B. (2002) "Farmacología Básica y Clínica" Editorial el Manual Moderno pp. 73-84.
18. Meyers F. (2001) "Manual de Farmacología Clínica" Editorial el Manual Moderno.
19. Taylor M. K. (2001) "Pharmacy Practice" Editorial Taylor and Francis, pp. 381-388.
20. Geneser F. (2002) "Histología", 3ª Edición Editorial Médica Panamericana, pp. 465-475.
21. Figueroa H. J. I. (2001) "Glosario Farmacológico", Editorial Limusa México D.F. pp. 183-187.
22. Gartner L. P., Hiatt J. I. (2003) "Atlas a Color de Histología" 3ª Edición Editorial Médico Panamericana México D.F. , Madrid España pp. 314-333.
23. Junqueira I. C., Caneiro J. (2002) "Histología Básica" 5ª Edición Editorial Masson Barcelona-España pp. 1-20.
24. García G. D. (1997) "Historia del Medicamento" Editorial Harcourt Brace de España pp. 119-128.
25. Smith C. (1993) "Farmacología" Editorial Medica Panamericana Madrid España, pp. 27-40.
26. Lehn R. A. (1994) "Pharmacology for Nursing Care" Second edition USA pp. 1131-1151.
27. Dipro J. (1999) "Pharmacotherapy" Editorial Appleton and Lange, USA, pp. 62-70.
28. Avendaño L. M. C. (1997) "Introducción a la Química Farmacéutica" Editorial Mcgraw-Hill Interamericana, Madrid-España, pp. 31-33 y 47-63.

29. Kumar N. K., Ramesh R. (2004) "Synthesis, Characterization, Redox Property and Biological Activity of Ru(II) carbonyl complexes containing o, n-donor Ligands and Heterocyclic Bases", available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
30. Albertini R., Pinelli S. (2000) "Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity of p-fluorobenzaldehyde thiosemicarbazones and of a Nickel Complex" *Journal of Inorganic Biochemistry*.