



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

278
leg.

**FARMACOCINETICA BASICA DE LA
CASIOPEINA II EN PERROS CON TUMOR
' VENEREO TRANSMISIBLE**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

por

ANDREA MARISA GABRIELA DE VIZCAYA RUIZ

ASESORES: BIOL. ISABEL GRACIA MORA

M. en C. EUGENIA CANDANOSA ARANDA

MVZ. JESUS PAREDES PEREZ

M. en C. GABRIELA MATEOS TRIGOS



MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Ma. Esther G. Ruiz Santoyo quien me ha enseñado el gran significado de vivir y me ha impulsado siempre para seguir adelante. Gracias mamá.

A Victor M. De Vizcaya Torres quién siempre estará conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo:

Biól. Isabel Gracia Mora, GRACIAS por la ayuda, guía, apoyo, paciencia, confianza y amistad que me has dado. Este trabajo también es tuyo.

M. en C. Eugenia Candanosa A. y MVZ. Jesús Paredes P., por su ayuda, apoyo, consejos y paciencia.

M. en C. Gabriela Mateos T. por su apoyo.

Un especial agradecimiento al Dr. Héctor Sumano López por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Lena Ruiz, al Dr. Rafael Moreno y a su grupo de trabajo por toda la ayuda y buena voluntad brindada para la realización de este trabajo.

A la MVZ. Mabel Tinoco M. y al Biól. Adolfo Rivero Müller por su ayuda, consejos y por su gran amistad y cariño.

A todos los del Laboratorio de Bioinorgánica por su participación y ayuda, a la Dra. Ma. Esther, a Mabel, Adolfo, Tere, Luz Ma. y a Jorge G.

A mi hermana Lorena, a Marú, a Bettie porque sin saberlo siempre han sido un gran apoyo, y a todos mis tíos y primos.

A mis amigas Betty, Jana, Ale y María ¡Gracias por ser como son! A mis amigos Isabel Arzeta, Omar Escalante, Juan Luis García y a todos por todo lo que hemos compartido.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como a todos mis maestros, amigos y compañeros.

A todos los que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo del:

Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química.
Departamento de Diagnóstico Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A los miembros de mi jurado:

MVZ. Socorro Lara Díaz

MVZ. Maricela Ortega Villalobos

MVZ. Sara Caballero Chacón

MVZ. Jorge Alanís Calderón

M. en C. Gabriela Mateos Trigos.

En especial a la Güera, a la Cindy negra, a la Cane y a la Cindy blanca así como a todos los animales que generosamente brindan su vida para que podamos aprender de ellos, y por darle un gran significado a la mía.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVO.....	19
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
VI. RESULTADOS.....	25
VII. DISCUSIÓN.....	29
VIII. LITERATURA CITADA.....	34
IX. CUADROS.....	38
X. FIGURAS.....	48

I. RESUMEN

DE VIZCAYA RUIZ ANDREA MARISA GABRIELA. Farmacocinética básica de la casiopeína II en perros con tumor venéreo transmisible. (Bajo la asesoría de: Biol. Isabel Gracia Mora, M. en C. Eugenia Candanosa Aranda, MVZ. Jesús Paredes Pérez y M. en C. Gabriela Mateos Trigos).

En trabajos de investigación realizados en la Facultad de Química de la UNAM se han sintetizado alrededor de 90 compuestos con potencial antineoplásico, los cuales se han patentado con el nombre de casiopeínas. Dentro de los estudios terapéuticos de un fármaco de nueva síntesis es de suma importancia realizar la farmacocinética para poder determinar su actividad dentro del organismo, por lo que con este trabajo se pretendió obtener los parámetros farmacocinéticos básicos de la casiopeína II. Se procedió a tratar 5 perros criollos infectados con TVT, administrándoles casiopeína II a una dosis de 4 mg/kg por vía endovenosa por infusión continua, cada cuatro días por seis ocasiones. En el proceso se tomaron muestras sanguíneas de 2 ml por vena cefálica en la primera y última aplicación a distintos tiempos para poder determinar la cantidad de Cu (en ppm) en plasma por la técnica de absorción atómica, debido a que la casiopeína II tiene como centro a este metal. Se determinaron las cinéticas del cobre por medio de relaciones semilogarítmicas de concentración plasmática vs. tiempo por medio de las cuales se encontró que el mejor modelo para describir a la casiopeína II es de 3 exponenciales. La casiopeína II mostró una cinética de 1 compartimento abierto, una buena distribución extraplasmática, una depuración lenta, una vida media promedio de 22 horas lo que indica que se requiere de cerca de 10 días para la eliminación completa del medicamento. No hay una acumulación del fármaco de la primera a la última aplicación, y el fármaco tiene una buena liposolubilidad. El intervalo de dosificación de la casiopeína II se encuentra en los 4 a 7 días ya que tiene un alto volumen de distribución. Definido el comportamiento de este fármaco se puede obtener una guía general para la familia de las casiopeínas, y así determinar los parámetros farmacocinéticos básicos los cuales servirán en estudios posteriores de estos compuestos.

II. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la incidencia de cáncer ha presentado un notable incremento dentro de las enfermedades crónico degenerativas que afectan tanto al ser humano como a los animales, presentando altos índices de mortalidad. En humanos el cáncer se encuentra dentro de las principales causas de mortalidad hospitalaria en México ya que los tumores malignos ocupan el 5o. lugar (Cuadro 1). Es por esto que se considera que el cáncer en México representa un grave problema de salud pública (3). Dentro de la Medicina Veterinaria se tiene menos ubicada la incidencia de las enfermedades neoplásicas; sin embargo, son comunes los casos de tumores malignos, como se puede juzgar por el creciente número de autores que los reportan (27). En pequeñas especies la importancia del cáncer, se ha manifestado con más relevancia en los últimos 10 a 15 años, dado que ha aumentado el número de casos reportados, la frecuencia de tumores (Cuadro 2), los métodos diagnósticos, la longevidad de los animales y la exposición de éstos a los mismos contaminantes que el hombre; siendo los dos últimos factores predisponentes para que se presente un mayor número de casos (9,51).

El cáncer a menudo es letal, imprevisible y ataca a muy diversos individuos además de ser una enfermedad crónico-degenerativa que tiene un alto impacto en el Sector Salud. Debido a ésto los investigadores continúan en la búsqueda de

tratamientos más eficaces para poder curar o aminorar los efectos de esta enfermedad (11,15,31).

Existen tres modalidades clásicas para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas: la cirugía, la radiación y la quimioterapia; hay otras alternativas como la criocirugía, la inmunoterapia y la hipertermia que no son tan comunes (9). En el tratamiento por medio de la cirugía se retira quirúrgicamente el tumor o área neoplásica; en la irradiación se emiten rayos α , β y γ que matan a las células tanto neoplásicas como sanas; y la quimioterapia consiste en la administración de uno o varios fármacos que poseen actividad antineoplásica. La irradiación y la cirugía están limitadas por el número de células cancerosas, mientras que la quimioterapia resulta ideal para neoplasias diseminadas ya que los fármacos son transportados por la sangre a todas las células del organismo (15).

La quimioterapia del cáncer se practicó formalmente por primera vez con éxito cuando se emplearon las mostazas nitrogenadas para inhibir el crecimiento de los tumores en el año de 1969, las cuales resultaron sumamente tóxicas, por lo que el uso de agentes quimioterapéuticos eficaces fue restringido (15,49). Sin embargo en la década de 1970-1980 la cura del cáncer por quimioterapia se difundió ampliamente, representando una alternativa terapéutica en algunas neoplasias prolongando así las expectativas de vida de los pacientes (11,39).

El éxito de la quimioterapia radica en la muerte de las células cancerosas, en la existencia de una diferencia significativa entre la proporción de células cancerosas y normales muertas y en que se reponga más rápidamente el número de células normales. También dependerá de elegir los fármacos con mayor afinidad por células tumorales o bien que influyan sobre procesos en los que estas células se desarrollan más rápidamente. La muerte celular inducida por fármacos es de primer orden lo cual quiere decir que una proporción de células presentes, tanto sanas como cancerosas, muere con cada unidad de fármaco (9).

Existe una gran variedad de fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer. Para poder estudiarlos se les clasifica según su mecanismo de acción en: alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, alcaloides, hormonas y otros. La mayoría de los compuestos utilizados en la quimioterapia tienen 3 orígenes:

- a) compuestos aislados de productos naturales
- b) compuestos sintéticos con estructuras iguales o semejantes a aquellas de compuestos aislados de productos naturales y
- c) compuestos sintéticos cuyas estructuras son producto de un diseño molecular (9,49).

Debido a la toxicidad de los medicamentos utilizados en la quimioterapia del cáncer, las células que realizan el ciclo celular rápidamente se ven notablemente afectadas por los fármacos quimioterapéuticos, al igual que las células

neoplásicas. Así, los compuestos antitumorales son tóxicos para diversos tejidos ya que actúan directamente sobre ellos; por ejemplo: linfocitos, células plasmáticas y células de la médula. Esto provoca que se presente anemia, leucopenia y trombocitopenia, por lo que en los pacientes tratados son comunes las hemorragias y la mayor susceptibilidad a las infecciones, lo que obliga a que exista una estrecha vigilancia de los recuentos leucocitarios, así como de la salud de los pacientes. Algunos fármacos antineoplásicos provocan diarrea, vómito y ulceraciones de la mucosa, debido a que las células basales del epitelio son sumamente susceptibles a éstos. Las células hepáticas y renales responden de forma distinta a los fármacos anticancerosos y frecuentemente la respuesta no está relacionada con su efecto sobre los compartimientos proliferativos. Las células del Sistema Nervioso Central (SNC) son las menos afectadas por estos fármacos debido a que las protege la barrera hemato-encefálica y por su crecimiento lento. Sin embargo, hay muchos fármacos que provocan toxicosis del SNC y a veces es difícil independizar un efecto directo del fármaco sobre el comportamiento de los efectos combinados del tumor, residuos de las células que mueren, mala nutrición y régimen terapéutico (9,11,39).

Por otro lado los riesgos a largo plazo de ciertos fármacos anticancerosos son consecuencia de sus propiedades oncogénicas, mutagénicas y teratogénicas (39).

Debido a la creciente necesidad de contar con nuevas opciones para combatir la problemática de las enfermedades neoplásicas se ha dado énfasis al estudio de nuevos productos antineoplásicos, y para lograr esto el "Cancer Chemotherapy National Service Center" (CCNSC) dictamina que los estudios preclínicos de cualquier tipo de fármaco para combatir enfermedades neoplásicas deben ser tratados primero en la rama de la Medicina Veterinaria antes de pasar a la Fase Clínica I en humanos (10). Dentro del desarrollo de un fármaco es importante conocer los aspectos farmacocinéticos básicos de éste para poder determinar su actividad dentro del organismo (9,10,18). Los fármacos existentes para poder controlar o curar enfermedades antineoplásicas tienen grandes limitantes ya que resultan sumamente tóxicos para los pacientes, y algunas neoplasias resultan refractarias a ellos (39). Todo esto justifica la búsqueda de nuevos agentes con una menor toxicidad y con diferentes propiedades biológicas como :

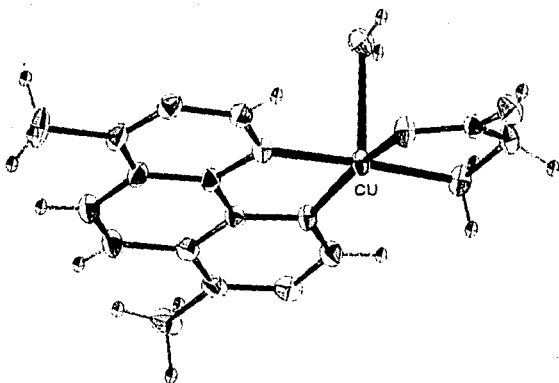
- a) Ausencia de resistencia cruzada.
- b) Un espectro más amplio de actividad.
- c) Mayor efectividad clínica antitumoral.
- d) Disminución de efectos eméticos y renales.
- e) Sinergismo en terapias combinadas. (9,18,42,49).

Un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la UNAM ha obtenido compuestos de coordinación que pueden tener actividad antineoplásica, de éstos

se han sintetizado y caracterizado alrededor de 90 derivados. A estos compuestos se les ha patentado bajo el nombre casiopeínas (43,45,46).

Las casiopeínas tienen un centro metálico de Cu y son compuestos de coordinación análogos al cisplatino, que se diseñaron considerando diferentes parámetros y propiedades químicas como son: el metal y su estado de oxidación, el número de coordinación del metal, propiedades de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad del mismo.

Todo esto para favorecer la interacción de estos compuestos con ADN entre otras posibilidades de mecanismo de acción. La estructura química de las casiopeínas esta formada por Cu (II) como centro metálico y quelatos diiminas (NN) con quelatos aminoacidatos o donadores (OO) (43):



Estructura de Casiopeína II por difracción de rayos X.

Tomando en cuenta lo anterior, se infiere que el mecanismo de acción de las casiopeínas es semejante al de otra molécula de origen inorgánico ya mencionada, el cisplatino, ya que estructuralmente son semejantes (43,45,46).

En el proyecto global de diseño, síntesis, caracterización pruebas preclínicas y clínicas de esta nueva familia de compuestos, se requiere como un paso importante, definir la farmacocinética de las casiopeínas como parte de su desarrollo. En la figura 1 se presenta el flujograma en el que se destaca la ubicación de los estudios cinéticos (43,44,45,46).

En este trabajo se pretendió obtener los valores farmacocinéticos más importantes del fármaco, y así conocer su absorción, distribución, biotransformación o metabolismo, biodisponibilidad y eliminación. Esto se lleva a cabo a partir de la obtención de los siguientes parámetros farmacocinéticos:

- **Concentración máxima lograda (C_{po})** será la cantidad máxima de fármaco alcanzada en el plasma.
- **Área bajo la curva (ABC)** es una herramienta de biodisponibilidad que en la concentración plasmática-tiempo es útil para medir la ocupancia, el tiempo durante el cual es ocupado determinado volumen de plasma por el fármaco.
- **1er. momento del área bajo la curva (MABC)** será el primer valor detectado en la curva de concentración plasmática-tiempo en el que el fármaco ocupa un determinado volumen de plasma.
- **Vida media plasmática (T_{1/2 β})** que se define como el tiempo necesario para que se reduzca en un 50% la concentración del fármaco en el plasma.
- **Volumen de distribución central (V_{d c})** que es la cantidad de fluido extraplasmático necesario para diluir el medicamento a la misma concentración que la existente en el plasma.
- **Volumen de distribución por área (V_{d área})** se define como el volumen de líquido necesario para contener la cantidad de fármaco en el cuerpo, si fuera distribuido uniformemente a una concentración igual a la que existe en el plasma.

- Volumen de distribución estable (V_{dss}) es la cantidad de fluido que permanecerá estable durante la aplicación constante del fármaco a un intervalo de dosificación determinado.
- Determinación del número de compartimientos (1 ó 2) para poder conocer la distribución, el movimiento y el equilibrio que tiene un fármaco dentro del organismo. Puede ser un modelo abierto de un compartimiento en el que el organismo se considera como un solo cuerpo sin barreras internas y el fármaco se distribuye casi inmediatamente en todo el organismo. Y también existen otros modelos similares al anterior, en los que se considera al organismo como un cuerpo con entidad central (plasma) y otra periférica extraplasmática, y en este caso la eliminación va a ser a partir del compartimiento central e inmediatamente se establecerá un equilibrio con la periferia.
- Determinación del tipo de cinética al intervalo de dosificación utilizado (de orden 0 o de 1er. orden) para conocer el desplazamiento del fármaco. Puede ser por una cinética de primer orden en donde el medicamento pasará de un lado a otro de la membrana en función de la cantidad del fármaco en un compartimiento. También puede ser por una cinética de orden cero en la que hay una participación de un sistema enzimático o de transporte saturable, y la eliminación no se incrementa al aumentar la concentración, una vez que el sistema enzimático o de transporte se ha saturado.
- Tangente del ángulo de distribución-eliminación (β) es la constante aparente de distribución total y de velocidad de eliminación total del fármaco.

- **Depuración total o corporal del organismo (Cl_a)** es la cantidad de sangre que queda libre del fármaco por varias vías en una unidad de tiempo. (9,18,50).

Estos parámetros sirven para determinar el comportamiento de un fármaco dentro del organismo y conocer su farmacocinética. La cual representa el estudio y las características en el tiempo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco. Además de la relación de estos procesos con la intensidad y duración de los efectos característicos de un fármaco, la farmacocinética nos ayuda a conocer la dinámica de la absorción, la distribución, la biotransformación y la excreción y explica las fluctuaciones plasmáticas, urinarias, histológicas, entre otras de los fármacos (9,18,50).

Las casiopeínas han mostrado actividad en ensayos previos y en evaluaciones preclínicas *in vitro* e *in vivo*; a continuación se enlistan algunos de los resultados logrados a la fecha:

- 1.- Evaluación citostática *in vitro* sobre cultivo de linfocitos humanos sanos, con resultados comparables e incluso superiores a la mayoría de los quimioterapéuticos de uso comercial (44).
- 2.- Evaluación antineoplásica *in vitro* empleando clones tumorales humanos de cáncer cérvico-uterino de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), obteniéndose resultados comparables a la actividad de la mitomicina-C y cisplatino (23,25).

3.- Evaluación citostática *in vivo* empleando el método de intercambio de cromátidas hermanas en el ratón. Este tipo de experimentos se encuentran en una fase inicial, pero los resultados que se obtengan nos darán indicio no sólo de su actividad citostática, sino también sobre su mecanismo de acción (45).

4.- Pruebas de actividad antineoplásica *in vivo* empleando los modelos tumorales murinos recomendados por el "National Cancer Institute". Los resultados en este panel de evaluación son muy alentadores ya que algunas casiopeínas sobrepasan por mucho los requerimientos exigidos por los protocolos internacionales e incluso, dependiendo de la casiopeína de elección así como del esquema de tratamiento y dosis empleada, se han logrado remisiones totales y sobrevidas que van hasta un 200% (24,28,29,46).

5.- Pruebas de potencial mutagénico *in vitro*. Estas pruebas hasta el momento han mostrado una baja actividad mutagénica, y cabe mencionar que algunas de las drogas han mostrado una marcada actividad bactericida (48).

6.- Pruebas para evaluar mutaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*. Los resultados de los ensayos mutagénicos *in vitro* e *in vivo* muestran ligera actividad mutagénica de estos compuestos (14).

7.- Comprobar la interacción de estos compuestos con ADN lineal y superenrollado evaluada a través de electroforesis en gel (47).

8.- Farmacocinética básica de casiopeína I, II y III en ratones y ratas. Este trabajo nos permitió conocer la concentración del compuesto en los sitios de acción así como la intensidad de sus efectos en función del tiempo para cada uno de los

compuestos para así poder determinar su comportamiento en el organismo. Los resultados obtenidos a partir de las muestras en ratones indican que los órganos con mayor retención en los tres compuestos son hígado, bazo y riñón (26).

9.- Cardiotoxicidad y ototoxicidad. Estas pruebas se encuentran en el inicio de su desarrollo y han sido diseñadas para poder determinar el efecto de las casiopeínas en órganos de suma importancia como lo es el corazón. Por otro lado, en base a los efectos de toxicidad que se han observado en el oído con el tratamiento con cisplatino (40) se ha decidió estudiar este otro efecto con casiopeínas en ratones.

10.- Ensayos toxicológicos en ratón. Se evaluó la toxicidad provocada por las casiopeínas en ratones (41,53).

11.- Eficacia en el tratamiento de Leucemia Viral Felina (LVF). Este estudio se encuentra en inicio dado que la cantidad de casos clínicos remitidos han sido pocos.

12.- Evaluación de la toxicidad aguda de la casiopeína I en perros, el resultado en este caso nos revela una situación clínica favorable ya que la dosis letal por vía intravenosa en *bolus*, resulta ser inocua cuando la aplicación es por infusión continua (22).

En vista de los resultados alentadores que se han obtenido en la evaluación preclínica de las casiopeínas se decidió obtener los valores farmacocinéticos y a la vez hacer un intento en la clínica veterinaria con alguna enfermedad

neoplásica. Se escogió en este caso al tumor venéreo transmisible (TVT) debido a que tiene un buen pronóstico en su tratamiento con quimioterapia, y además es uno de los tumores más frecuentes que se presentan dentro de la clínica veterinaria de perros, lo que permite un mayor reclutamiento de casos.

El TVT o también llamado tumor de Sticker o sarcoma de Sticker (35) es una enfermedad neoplásica común y exclusiva de los perros caracterizada por la aparición de masas tumorales de rápido crecimiento en los genitales externos principalmente, de hembras y machos transmitida naturalmente por el coito. La transmisión natural del TVT se da por la abrasión de la mucosa y el implante directo de células de TVT viables de un perro infectado en contacto con mucosa genital lesionada de un perro sano. La etiología y el origen histogénico no es bien conocida pero se sabe que las células de este tumor tienen 59 ± 5 cromosomas y la mayoría de las células tienen 16 a 19 cromosomas metacéntricos y 40 a 42 cromosomas acrocéntricos, mientras que las células somáticas normales caninas tienen 78 cromosomas. Perros con enfermedades integumentarias o genitales tienen mayor predisposición a que se implante más fácilmente un TVT que en perros sanos (4,5,8,19,33,34,51,52).

Esta es una enfermedad de distribución mundial, en donde no hay predisposición de raza ni de sexo; la estación del año no tiene ninguna influencia sobre la presentación del tumor, es más común en perros sexualmente maduros y en

lugares en los que hay alta densidad de población lo que provoca una alta población canina callejera o silvestre en zonas rurales y los perros andan libres aumentando las posibilidades de que haya mayor contacto sexual entre ellos y más transmisión del TVT (7,20,33). En algunos casos se puede localizar en sitios extragenitales concomitantes o no, presentándose metástasis de TVT a hígado, bazo, riñones, huesos, útero, piel, nódulos linfáticos inguinales, fosas nasales, cerebro y ojos. En los casos de metástasis nodular las masas pueden observarse a simple vista (32,33,36,51).

El diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente por signos como secreción hemorrágica o serosanguinolenta de los genitales, hematuria, constante lamido de la zona y en ocasiones secreción de moco; así como por estudios de citología. El TVT se presenta como masas pequeñas hiperémicas que van de una coloración crema a una coloración rojiza en la mucosa, es de forma irregular y con apariencia de coliflor aunque también puede ser pedunculado, nodular, papilar o multilobulado (8,17,33,35).

Macroscópicamente el TVT asemeja a un mastocitoma o a un histiocitoma (34). Tiene un crecimiento simple polipoidal, con un pedúnculo, granuloma o una masa multilobulada en el fornix de la vagina o cerca de los labios de la vulva y en los machos en la base del pene o pared prepucial. En tumores muy grandes y

protruidos se observa un crecimiento extenso por fuera del tubo vaginal o del prepucio (36).

El diagnóstico definitivo se confirma mediante un estudio histopatológico del tejido tumoral por medio de citología, histopatología o biopsia (4,12,13,17,33,35,38).

Para combatir este tipo de neoplasia se puede recurrir a distintas modalidades de tratamiento como a la excisión quirúrgica, radioterapia, inmunoterapia con sueros hiperinmunes y quimioterapia, cada uno de los cuales tendrá un grado de respuesta o efectividad distinto (4,6,33,37). Higgins y Powers en 1966 reportan regresión espontánea del TVT pero no existe un estudio amplio de este hecho con un número significativo de animales (8).

Varios autores han informado que la quimioterapia es más efectiva en el tratamiento de TVT que la cirugía, debido a que existe una menor posibilidad de que se presente recidiva del tumor pues con la cirugía hay de un 17 a un 58% de recurrencia (2,4,20). El tratamiento tradicionalmente efectivo contra el TVT metastásico y multifocal es el de la quimioterapia aplicando sulfato de vincristina que es un inhibidor mitótico clasificado como un alcaloide de la vinca derivado de la *Vinca rosea* que actúa sobre la metafase de la mitosis celular interfiriendo en las espirales proteicas de las células según Burgen, 1985 (4,8,13,33). La vincristina también se ha utilizado en combinación con metotrexato o

ciclofosfamida dando buenos resultados; sin embargo si alguno de estos se aplica sin combinarse, no hay una buena respuesta, provocando efectos colaterales adversos (2,16).

El sulfato de vincristina se aplica por vía endovenosa a una dosis de 0.025 mg/kg cada 7 días a intervalos semanales hasta la regresión total del tumor. Se han probado otros esquemas de dosificación similares a dosis de 0.5 a 1 mg/kg I.V. (4,8,12,13,16,17,20,21,32,33). En general, los signos clínicos dejan de manifestarse a los 14 a 21 días del tratamiento y la evaluación de la efectividad sobre el tumor depende de los cambios en el tamaño, forma, localización, coloración y sangrado del tumor (2,33).

Los efectos colaterales que se pueden presentar con la aplicación de sulfato de vincristina son tenesmo, alopecia, vómito, necrosis de la mucosa intestinal, leucopenia transitoria, disminución de la libido e irritación perivascular. Debido a la cicatrización posterior al tratamiento en algunos casos se presenta estenosis vaginal o prepucial (1,2,9,12,16,20,21,33).

Para poder conocer el comportamiento de las casoipeínas dentro del organismo se decidió realizar estudios farmacocinéticos en perros. Para realizarlo se escogió a la casoipeína II, la cual ha mostrado actividad antineoplásica en tumores sólidos en ratones, además de ser soluble en agua (28,30).

Habitualmente se utilizan animales sanos para establecer los valores farmacocinéticos de un medicamento. Sin embargo, esta tendencia ha sido ampliamente criticada en función de que el destino de dichas sustancias es de aplicarlas en animales enfermos (18). De tal manera se ha sugerido que se lleven a cabo estudios dobles clínico-farmacocinéticos en animales que padezcan la enfermedad para la cual se está estudiando la casiopeína II (9,18,50). Con esta perspectiva se llevó a cabo este estudio utilizando pacientes afectados de TVT.

Se escogió al TVT como modelo debido a que tiene una excelente respuesta a la quimioterapia y además es un tumor común en perros, por su alta frecuencia.

Por todo lo descrito se decidió realizar la farmacocinética de la casiopeína II, siendo esta la de elección debido a que ha mostrado tener actividad antineoplásica en tumores sólidos además de ser soluble en agua. Debido a los efectos terapéuticos que ha mostrado la casiopeína II en ensayos previos y a que el TVT tiene un excelente pronóstico al tratamiento quimioterapéutico con vincristina, aunado a su alta frecuencia es que se eligió para ser tratado con casiopeína II en este trabajo (43,44).

III. HIPÓTESIS

La casiopeína II tiene una cinética de primer orden de un solo compartimiento abierto a una dosis de 4 mg/kg administrada cada 4 días por 6 ocasiones por vía endovenosa.

IV. OBJETIVO

- **Determinar los valores farmacocinéticos básicos de la casiopeína II en perros con tumor venéreo transmisible.**
- **Evaluar por medio de estudios citológicos la actividad antitumoral de la casiopeína II en TVT en perros a la dosis y esquema de tratamiento utilizados.**

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 5 perros criollos con un TVT en fase activa, los tumores se clasificaron conforme a Amber *et al.* (2):

CLASIFICACIÓN DEL TUMOR	TAMAÑO	INVASIÓN
T 0	SIN TUMOR	NULA
T 1	TUMOR DE 0-1 cm.	NULA
T 2	TUMOR DE 1-3 cm	MÍNIMA
T 3	TUMOR DE MÁS DE 3 cm	PROFUNDA
T 4	TUMOR QUE AFECTA ESTRUCTURAS ALEDAÑAS	INVASIVO

La reseña de los pacientes se detalla en el cuadro 3, en el cual se describe la edad, sexo, peso y clasificación del tumor.

Por medio de un examen clínico general se determinó el estado físico de los animales. A cada perro se le realizó un examen físico completo en el cual se le tomaron las constantes físicas; y se le realizaron exámenes de laboratorio de biometría hemática y química sanguínea. Dentro del examen de química sanguínea se evaluó la función hepática y renal principalmente por medio de los valores de aspartato transferasa (ALT), fosfatasa alcalina sérica (FAS), albúmina así como urea y creatinina respectivamente. Se llevaron a cabo estudios

histopatológicos para evaluar si durante el tiempo que duró el tratamiento ocurría algún cambio del tumor, así como estudios hematológicos para estimar el impacto de la casiopeína II sobre las células sanguíneas y de química sanguínea para determinar el grado de lesión que pudiera producir la casiopeína II en las funciones hepática y renal.

El diagnóstico del TVT se realizó mediante un análisis citopatológico a través de una punción con aguja delgada (PAD). La cual se llevó a cabo con una jeringa de 10 cm³ y aguja de 21 x 1 1/4 pulgada, la cual se introdujo con el émbolo en el fondo a la masa del tumor, después se retrajo el émbolo despacio introduciendo y sacando la aguja hasta que el émbolo llegó al tope como si ya estuviera llena la jeringa. Regresando el émbolo lentamente a su posición original se sacó la aguja de la masa y se retiró de la jeringa, se cargó de aire la jeringa y se colocó la aguja nuevamente, con un impulso fuerte se vació el contenido de la aguja en una laminilla. Inmediatamente con la ayuda de otra laminilla se realizaron frotis que fueron fijados en alcohol durante 10 a 15 minutos. En los casos que quedó algo de material biológico dentro de la aguja se repitió la misma operación realizando otro frotis.

La PAD se repitió en diferentes áreas de la masa tumoral para obtener material de toda la masa, en los casos en que el tumor estaba ulcerado se procedió a realizar improntas de el área, realizando frotis con el material obtenido y se fijó de la

misma manera antes mencionada. Una vez fijadas las muestras se tiñeron con Papanicolaou y Giemsa, y posteriormente fueron observadas al microscopio óptico. Para confirmar el diagnóstico se deben de observar células redondas u ovals, grandes, y acomodadas en columnas, patrones epiteliales o paquetes celulares con un sólo anillo nuclear y una membrana celular clara. En las células se debe observar escaso citoplasma y múltiples vacuolas redondas y claras organizadas en cadenas. Se observa un núcleo basófilo y grande, con nucleolos excéntricos redondos y prominentes, con un cordón homogéneo de patrones finos de cromatina, con lo que se diferenció de otros tumores de células redondas y se diagnosticó el TVT (5,6,8,17,28).

Una vez establecido el diagnóstico, se inició el tratamiento empleando la casiopeína II a una dosis de 4 mg/kg disuelta en 250 ml de solución salina fisiológica y administrada mediante infusión continua por vía endovenosa a goteo lento por un lapso de 1 a 2 horas.

La dosis de 4 mg/kg se determinó a partir de la DL50 utilizada en ensayos previos en ratones que es de 16 mg/kg (41); Busch (1967) (10) señala que se debe utilizar $\frac{1}{4}$ de la DL50 en ratones para comenzar la búsqueda de la dosis terapéutica en perros.

Este tratamiento se repitió cada 4 días por 6 ocasiones (qd 4 x 6): los días 1, 5, 9, 13, 17, y 21. En la primera y última administración de casiopeína II se llevó a cabo la toma de muestras para determinar la farmacocinética sanguínea, tomando 2 ml de sangre por vena cefálica con un catéter del No. 20, en los siguientes tiempos post-inyección: 0, 20, 40 y 60 minutos y 2, 4, 8, 12 y 24 horas.

Dichas muestras fueron analizadas por medio de la técnica de absorción atómica determinando cobre (en partes por millón en base seca), debido a que la casiopeína II tienen como centro a este metal.

Posteriormente se determinó la cinética de la casiopeína II incorporando los valores plasmáticos de cobre a una relación semilogarítmica de concentración plasmática vs. tiempo, de la que se obtuvieron los siguientes datos por medio del programa RSTRIP II¹:

- Concentración máxima lograda (C_{po}).
- Área bajo la curva (ABC).
- 1er. momento del área bajo la curva (MABC).
- Vida media plasmática ($T_{1/2\beta}$).
- Volumen de distribución central (Vd c).
- Volumen de distribución por área (Vd área).
- Volumen de distribución estable (Vdss).

¹ RSTRIP II. Versión 2.03. Número de serie: 1881R2203. Micromath Scientific. Software P.O. box 21550. Salt Lake City, Utah, 84121.

- **Determinación del número de compartimientos (1 ó 2).**
- **Determinación del tipo de cinética al intervalo de dosificación utilizado (de orden 0 o de 1er. orden).**
- **Tangente del ángulo de distribución-eliminación (β).**
- **Depuración total o corporal del organismo (Cl_B).**

La actividad de la casiopeína II sobre el tumor se evaluó por observación directa para ver si había reducción del tamaño y empleando el análisis citopatológico por PAD después de la 3a. y última aplicación de casiopeína II.

VI. RESULTADOS

Macroscópicamente se podía observar la presencia de TVT en los perros 2, 3, 4 y 5 utilizados en este trabajo (Figuras 2,3,4,5). La punción de las masas tumorales de los 5 perros corroboraron el diagnóstico de TVT, a las cuales se les realizaron una tinción de Papanicolau en donde se mostraron las características típicas del TVT (Figuras 6,7,8,9) y también se les realizó una tinción de Giemsa resultando negativas descartando así la posibilidad de un mastocitoma. Las muestras posteriores (del día 14 y 22) de los perros 2, 3, 4 y 5 no mostraron cambios citológicos relevantes. En estas muestras fue evidente la presencia de células de TVT sin cambios por efecto de la casiopéina II. Se observaron algunos cambios por fijación en 4 de las muestras tomadas. La descripción citológica general para todas las muestras fue la presencia de células tumorales de TVT algunas con mitosis atípicas, cantidades variables de glóbulos rojos, polimorfonucleares y linfocitos.

La actividad de la casiopéina II sobre las células neoplásicas fue evaluada empleando la técnica de citopatología tomando una muestra por medio de PAD después de la 3a. aplicación y al final del tratamiento.

Citológicamente en las muestras se apreciaban las características típicas del TVT, y después de aplicado el fármaco no se observó ningún cambio (Figuras 10,11,12,13).

Los perros fueron tratados con casiopeína II disuelta en 250 ml de solución salina fisiológica, la cual se administró por goteo lento durante 1 a 2 horas aproximadamente como se muestra en la figura 14.

A partir de la obtención de las muestras sanguíneas de los perros 2, 3, 4, 5 (Figura 15) (del perro 1 no fue posible obtener las muestras de la última aplicación debido a que falleció durante el proceso del experimento); a las 0 horas, 20, 40 y 60 minutos, 2, 4, 8, 12 y 24 horas postratamiento de casiopeína II en la primera y última aplicación, se logró la obtención de la cantidad de cobre en partes por millón (ppm; $\mu\text{g/ml}$) en cada muestra de 2-3 ml de sangre, por medio de la técnica de absorción atómica obteniéndose los valores listados (cuadros 4 a 8).

Se determinaron las cinéticas del cobre (casiopeína II) por medio de relaciones semilogarítmicas de concentración plasmática vs. tiempo, de la que se obtuvieron los datos que se resumen en los cuadros 11 y 12 (9,18,50). Utilizando el programa RSTRIP II, para obtener el mejor ajuste a las concentraciones de cobre, se encontró que el mejor modelo para describir la cinética de la casiopeína II es con un modelo de 3 exponenciales, como se muestra en la figura 16.

Sin embargo dado que la fase de infusión inicial es artificial ya que depende de la velocidad a la que se administró el fármaco, los datos farmacocinéticos se calcularon a partir del inicio de la fase de posdistribución (distribución-eliminación), es decir, el momento en el que se termina la infusión continua adoptando un modelo de un solo compartimiento.

En la figura 17 se presenta la forma típica en que ocurre la depuración de las concentraciones plasmáticas de casiopeína II en la fase de posdistribución, coincidente con el fin de la infusión continua. En la figura 18 se integran las relaciones concentración plasmática vs. tiempo en un perro durante la primera y la última aplicación de casiopeína II, es decir con un intervalo de 21 días.

En las figuras 19 y 20 se resumen las tendencias de las células sanguíneas a la aplicación de la casiopeína II así como los valores de química sanguínea. Es importante señalar que aunque no se detectaron alteraciones significativas en la función renal y hepática, si se detectaron variaciones de los valores de eritrocitos y leucocitos.

El perro 1 presentó signos graves de intoxicación a las 2 horas después de aplicar el tratamiento. Se le observó muy deprimido, presentó vómito y su condición física fue deteriorándose falleciendo a las 24 horas postratamiento. A la

necropsia se observó congestión en pulmón, intestino, hígado, bazo. También se encontró un pulmón colapsado (Cuadro 9).

Los otros 4 perros tratados sólo mostraron signos leves postratamiento como temblores, vómito, depresión y diarrea en algunas ocasiones, recuperándose inmediatamente y sin mostrar ninguna otra alteración.

VII. DISCUSIÓN

En cuanto al tamaño del tumor no hubo ningún cambio por lo que se considera que no hubo realmente una remisión. Tanto en citología como en histología no se observó ningún cambio notorio de actividad de la casiopeína II sobre las células del TVT en perros a la dosis y esquema de tratamiento utilizados.

Dinesh *et al.* señalan que en un tejido donde existía un TVT y que es tratado con sulfato de vincristina después de una regresión completa, se observa tejido conectivo maduro sin ninguna evidencia de tumor y en la submucosa vasos sanguíneos en neoformación (17). En el caso de este ensayo no se observaron estas características por lo que se concluye que la casiopeína II no tiene un eficacia notoria en el tratamiento de TVT en perros a la dosis y esquema de tratamiento utilizado.

La causa de muerte de uno de los pacientes posterior a la aplicación de casiopeína II fue por una insuficiencia respiratoria aguda de acuerdo a lo descrito en la necropsia, por causas preexistentes del individuo no determinadas por ser inaparentes en el examen físico y en las pruebas de laboratorio (BH y QS) (Cuadro 10). Al aplicar la droga el paciente presentó un grave estado de estrés y posteriormente aparecieron signos clínicos importantes presentados ya en los resultados.

De acuerdo a los estudios de toxicidad DL50 (22,41) de otros compuestos de la misma familia de las casiopeínas en los casos de toxicidad aguda en las necropsias de ratones y perros se presentan lesiones circulatorias como congestión y edema, mismas que se observaron también en este caso (Cuadro 9).

Los valores farmacocinéticos derivados de una relación triexponencial resultan imprácticos cuando se quieren extrapolar a situaciones clínicas, en particular si la primera fase depende de la velocidad de administración del medicamento y por lo tanto está sujeta al operario y no a al comportamiento cinético del medicamento.

De tal manera que si se separan las fases de infusión continua de la de distribución-eliminación (o de posdistribución), se puede obtener una imagen más real y significativa del comportamiento de la casiopeína II en éstos pacientes.

Por referencia a las figuras 16, 17 y 18, se puede observar fácilmente que una vez transcurrida la infusión durante 1 a 2 horas, se puede obtener una cinética que se ajusta mejor a una cinética de 1 compartimiento abierto.

Los ajustes de las curvas mediante el programa de cinética especializado RSTRIP II revelan una variabilidad moderada, presente aún en estudios farmacocinéticos en animales sanos (9,18,50), y por lo tanto pueden considerarse como confiables. Los volúmenes de distribución central, de área y en estado estable que se

muestran en los cuadros 11 y 12 indican una buena distribución extraplasmática, coincidente con una depuración lenta como lo indican las figuras 16 a 18 y el valor de CL_b de 1.9 ml/min/kg.

Una vida media promedio de 22 horas indica que se requieren cerca de 10 días para la eliminación completa del medicamento. Por lo tanto, un intervalo de dosificación de 4 días permite mantener niveles terapéuticos a la dosis de 4 mg/kg. No obstante, el análisis comparativo de los datos cinéticos del día 1 con el día 21 (6 aplicaciones después) no revela una acumulación ya que el valor de β en la sexta aplicación es mayor que el de la primera. Estas diferencias se pueden apreciar gráficamente en la figura 18. La vida media permaneció constante y las concentraciones plasmáticas máximas no sobrepasaron los niveles de 2.38 μ g/ml.

Se requiere delimitar la actividad de la casiopeína II en ensayos *in vitro*. En la actualidad se ha considerado que una concentración de casiopeína II de 10^{-4} molar (40 μ g/ml) es capaz de tener un efecto biológico, pero no se han establecido límites inferiores que aún mantengan efecto biológico. Por lo tanto y de manera temporal se puede hacer la recomendación de utilizar un intervalo de dosificación basado en la desaparición del exceso de cobre en plasma, dado que el factor limitante no es el efecto terapéutico y si el tóxico. Esto circunscribe el intervalo de dosificación entre 4 y 7 días, y por el elevado Vd_{ss} se puede apoyar que el intervalo de dosificación utilizado fue el adecuado.

Los elevados volúmenes de distribución aparente obtenidos así como los valores de ABC y MABC, concuerdan con la liposolubilidad del fármaco. Por lo tanto, no es aventurado pensar que existe penetración al espacio intracelular.

El diseño de éste trabajo pretendió definir el comportamiento de este compuesto dentro del organismo, como una guía general para la familia de las casiopeínas que pueden abarcar hasta aproximadamente 90 compuestos. La casiopeína II no mostró actividad sobre las células del TVT a una dosis de 4 mg/kg en el esquema de tratamiento utilizado.

Tomando en cuenta los parámetros farmacocinéticos obtenidos se puede considerar que se cumplieron los objetivos, entre los que destaca el hecho de que las concentraciones plasmáticas no pueden tomarse como predictivas de la actividad antineoplásica dado que los volúmenes de distribución en estado estable variaron desde 10.54 hasta 26.22 l/kg.

Existen otros estudios que pueden resultar consecuentes al realizado, como la determinación de las concentraciones tisulares de Cu (como medida de la acumulación de casiopeína II) y su relación con la predicción de dichos valores mediante la ecuación Henderson-Hasselbach, dado que se conoce que esta casiopeína tiene un pKa aproximado de 5.6 y un pH de 4.7.

Cabe señalar que un fármaco antineoplásico puede ser selectivo a ciertos tipos de tumores por lo que se sugiere que se continúen las pruebas de esta casiopeína en otros modelos tumorales comunes en pequeñas especies, como carcinomas mamarios, linfomas, mastocitomas, tumores cérvico uterinos, etc (27,51). Así mismo se sugiere comenzar pruebas sobre TVT con otras casiopeínas.

Los dueños de los pacientes que ingresaron a este estudio recibieron una amplia explicación de las características de este ensayo. Informándoles que de no tener éxito el tratamiento con casiopeína II, una vez terminado el estudio se llevaría a cabo el tratamiento tradicional de la patología. Debido a que no hubo actividad de la casiopeína II sobre el TVT a la dosis y esquema de tratamiento utilizados, los animales fueron totalmente curados por cirugía así como la aplicación posterior con sulfato de vincristina.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Alleman, A.R. and Harvey, J.W.: The morphologic effects of vincristine sulphate on canine bone marrow cells. *Veterinary Clinical Pathology.*, **22**, 2: 36-41 (1993).
2. Amber, E.I., Henderson, R.A., Adeyanju, J.B. and Gyang E.O.: Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumor with cyclophosphamide, metotrexato or vincristine. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, **4**: 144- 147 (1990).
3. Anuario Estadístico de 1993. *Secretaria de Salud*.
4. Bandyopadhyay, B. and Das, B.B.: Treatment of canine transmissible venereal sarcoma with vincristine. *Indian Veterinary Journal.*, **70** : 847-848 (1993).
5. Batamuzi, E.K. and Bittegeko, S.B.P.: Anal and perianal transmissible venereal tumor in a bitch. *Veterinary Record.*, **129**: 556 (1991).
6. Batamuzi, E.K. and Kessy, B.M.: Role of exfoliative cytology in the diagnosis of canine transmissible venereal tumor. *Journal of Small Animal Practice.*, **34**: 399-401 (1993).
7. Batamuzi, E.K., Kassuku, A.A. and Agger, J.F.: Risk factors associated with canine transmissible venereal tumor in Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine.*, **13**: 13-17 (1992).
8. Booth, M.J.: Canine transmissible venereal tumor and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. *Journal of Small Animal Practice.*, **35**:1: 39-42 (1994).
9. Booth, N.H. and McDonald, L.E.: Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Vol. I y II. *Editorial Acribia*, S.A. España. (1988).
10. Busch, H.: Methods in Cancer Research. Vol. I. *Academic Press*. (1967).
11. Cairns, J.: El problema del cáncer, en El Cáncer. Libros de Investigación y Ciencia. *Prensa Científica*. 2a. Edición: 1986.
12. Das, A.K., Das, U. and Das, D.: A clinical report on the efficacy of vincristine on canine transmissible venereal sarcoma. *Indian Veterinary Journal.* **68**: 575-576 (1991).
13. Das, A.K., Das, U., Das, D. and Sengupta, J.: Histopathological study of canine transmissible venereal tumor. *Indian Veterinary Journal.* **67**: 473-474 (1990).
14. De la Rosa, M.E., Gracia, M.I., Pimentel, E., Ruiz-Ramirez, L. and Arenas, C.: Mutagenic activity of casoipeine in *Drosophila*. XXth. *EEMS Meeting Memories*: 22-27. York, England. (1990).
15. De Vita, V.T., Hellman, S. & Rosenberg, S.A.: Cancer. Principles & Practice of Oncology. *J.B. Lippincott Company*. Philadelphia, U.S.A. 1982.
16. Dinesh, N.M., Ranganath, B.N., Jayadevappa, S.M. and Srinivas, C.L.: Effect of vincristine sulphate on canine transmissible venereal tumors-hameatological and biochemical studies. *Indian Veterinary Journal.* **70**: 741-744 (1993).

17. Dinesh, N.M., Ranganath, B.N., Jayadevappa, S.M. and Srinivas, C.L.: Gross and microscopic changes in transmissible venereal tumor following vincristine sulphate therapy. *Indian Veterinary Journal*. **70**: 609-611 (1993).
18. Du Souich, P. Capitulo 6 en Métodos en Farmacología Clínica. Programa de Desarrollo de Servicios de Salud. *Organización Mundial de la Salud*. Enero de 1992.
19. Feldman E.C. & Nelson R.W.: Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. *Editorial Inter-Médica*, 1991.
20. Gandotra, V.K., Chauhan, F.S. and Sharma, R.D.: Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. *Indian Veterinary Journal*. **70**: 854-857 (1993).
21. Ganesh, T.N., Ramesh Kumar, B., Archibald David, W.P., Balasubramanian, N.N., Pattabiraman, S.R. and Dewan Muthu Mohammed, M.S.: Clinical trial on the effect of vincristine on transmissible venereal tumors in dogs. *Indian Veterinary Journal*. **70**: 559-561 (1993).
22. Gómez, D.E.: Determinación de toxicidad aguda de la casiopéina I en perros. Tesis de Licenciatura: *Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México D.F.*, 1992.
23. Gómez-Ruiz, C., De la Garza, J., Arenas, F., Ruiz-Ramírez, L. y Gracia-Mora, I.: Quimiosensibilidad *in vitro* en células de cáncer cervico-uterino por efecto de casiopéinas I, II, III. *Primeras Jornadas Médicas en Cáncer*. Memorias: Instituto Nacional de Cancerología, México. (1993).
24. Gracia-Mora, I. and Ruiz-Ramírez, L.: The antitumor activity of several transition metal complexes. *J. Inorg. Biochem.* **43**: 615 (1991).
25. Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Esparza, R., Díaz, D., Gasque, L., Huerta, L., Mayet, L., Ortiz, V. and Lomeli, C.: Antineoplastic effect of several transition metal complexes. *Fourth Chemical Congress of North America*. Memorias: 25-30. New York. (1991).
26. Hecht, A.M., Guevara, F.L., Ruiz, R.L., Gracia, M.I., Saldívar, L., Tinoco, M.M. y Quiroz, R.G.: Farmacocinética de Medicamentos Antineoplásicos en ratón. VII Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Área de Salud. Memorias. México, D.F. 1994.
27. Hettis, S. and Lagoni, L.: The owner of the pet with cancer. Clinical management of the cancer patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **20** (1990).
28. Huerta, C.M.: Evaluación antineoplásica de nuevos compuestos de coordinación empleando el modelo tumoral murino sarcoma S180. Tesis de Licenciatura. *Facultad de Ciencias Químicas*. Universidad Veracruzana. Orizaba, Veracruz, 1992.
29. Kroger, D., Grey, R.M. and Boyd, J.W.: An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. *Canine Practice*, **16**, 6: 17-21 (1991).
30. Mayet, C. M.: Cernimiento antineoplásico de nuevos compuestos de coordinación empleando el modelo tumoral murino melanoma B16. Tesis de Licenciatura. *Facultad de Ciencias Químicas*. Universidad Veracruzana. Orizaba, Veracruz. 1991.

31. Meneses, G.A., López, S., Ortiz, M.Y. y Sanchez, P.S.: La célula neoplásica. Histología y su nomenclatura. Memorias del curso de Cáncer y Quimioterapia- (Perspectivas en México. *Sociedad Química de México, Facultad de Química de la UNAM e Instituto Nacional de Cancerología*. (1992).
32. Miller, W.W. and Boosinger, T.R.: Ocular metastasis of transmissible venereal tumor. *Canine Practice*, 15, 3: 19-21 (1990).
33. Morales, C., Podetti, M. y Román, T.: Tratamiento del tumor venéreo transmisible en caninos con sulfato de vincristina. Reporte de 16 casos. *Ciencias Veterinarias*. XII. 2-3: 27-33 (1990).
34. Morgan, R.V.: *Handbook of Small Animal Practice*. Churchill Livingstone Inc. USA. 1988.
35. Moulton, J.E.: *Tumors in Domestic Animals*. Univ. of California Press. USA. 1978.
36. Nayak, N.C., Nandi, S.N. and Bhowmik, M.K.: Canine transmissible venereal tumor (CTVT) with a note on metastasis. *Indian Veterinary Journal*. 64: 252-253 (1987).
37. Panchbhai, V.S., Karpe, A.G., Kulkarni, G.B. and Kulkarni, P.E.: Use of autogenous vaccine in transmissible canine venereal tumor. *Indian Veterinary Journal*. 67: 983-984 (1990).
38. Pinheiro, L.E.L., Laus, J.L., Almeida-Junior, I.L. & Daleck, C.R.: Direct demonstration of the canine venereal tumor chromosomes using vincristine. *Ars Veterinaria*. 2. 1: 41-44 (1986).
39. Powis, G.H. and Hacker, M.P.: *The Toxicity of Anticancer Drugs*. Pergamon Press. 1991.
40. Prestayko, A.W. & Crooke, S.T.: *Cisplatin: Current Status & New Developments*. Academic Press. 1980.
41. Quiroz, R.G.: Toxicidad aguda de casiopeína II por administración intravenosa en ratones. Estudio anatomohistológico. Tesis de Licenciatura: *Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM*. México, D.F., 1994.
42. Rosenberg, B., Van Camp, L., Truska, J.G. and Mansour, B.H.: Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature*. 22-26: 385-386 (1969).
43. Ruiz, A.L., Moreno, E.R., Ferrer, S.G. y Gasque, S.L.: Diseño, Síntesis y Caracterización de las Casiopeínas. 1a. *Jornada de Trabajo en Casiopeínas*. Enero (1994).
44. Ruiz-Ramírez L.: Cytostatic effect of some new complexes. *Symposium on Transition Metal-Nucleic Acid Chemistry Metal Complexes as Drugs*. Memories : 100-103. Toronto. (1987).
45. Ruiz-Ramírez, L. and Gracia, M.I.: Design, synthesis, characterisation and *in vivo* antineoplastic tests of a new drug: Casiopeine. *Fourth International Conference of Anticancer Research*. Memories. Crete. Greece. (1992).
46. Ruiz-Ramírez, L. Gracia-Mora, I. y De la Rosa, M.E.: Evaluación de la actividad antineoplásica de las casiopeínas I, II y III. *Congreso Iberoamericano de Química Inorgánica*. Memorias: 270. Guanajuato, México. (1993).

47. Ruiz-Ramírez, L. Gracia-Mora, I. Moreno-Esparza, R. Círiga, C. Tovar, A. and García-Carrancá, A. : Study of the Interaction Between Several Copper (II) Complexes of the Casiopeína's Family with DNA. Latin-American Inorganic Chemistry Meeting (memories). Santiago de Compostela, 1993: 158. *Latin-American Inorganic Chemistry Meeting*. Santiago de Copostela, Spain (1993).
48. Ruiz-Ramírez, L., Gracia-Mora, I., Sumano, H., Gómez, C., Arenas, F., Mayet, L., Huerta, L., Gomez, E., Pimentel, E., Cruces, M., and De la Rosa M.E.: Cytostatic mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeína I, II, III. *J. Inorg. Biochem.* 51: 406. (1993).
49. Ruiz-Ramírez, L.: Naturaleza química y clasificación de los agentes quimioterapéuticos. *Memorias del curso de Cáncer y Quimioterapia- (Perspectivas en México)*. Sociedad Química de México, Facultad de Química de la UNAM e Instituto Nacional de Cancerología. (1992).
50. Sumano, L.H. Ocampo, C.L.: *Farmacología Veterinaria*. McGraw Hill. México, 1992.
51. Theilen, G. H. & Madewell, B. R.: *Veterinary Cancer Medicine*. 2nd. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia, 1987.
52. Thomson, R.G.: *General Veterinary Pathology*. 2nd. Edition. W.B. Saunders Company. 1984.
53. Tinoco, M.M.: Administración de casiopeína I por vía intraperitoneal. Estudio anatomo-histológico en ratones. Tesis de Licenciatura: *Fac. de Med. Vet. y Zool.* UNAM. México D.F., 1994.

IX. CUADROS

CUADRO 1. Principales causas de Mortalidad Hospitalaria General en los Estados Unidos Mexicanos en el año de 1993 (3).

Num. de orden	CAUSA Total	Defunciones 20,434	% 100
1	Afecciones del periodo perinatal:	4,285	20.97
	- Hipoxia, Asfixia y otras afecciones respiratorias del feto o del recién nacido	2,308	11.29
2	Enfermedades Degenerativas:	1,425	6.97
	Diabetes mellitus		
	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	1,277	6.25
3	Accidentes	1,272	6.22
4	Enfermedades Cardiovasculares:	1,258	6.16
	Enfermedades del corazón		
	- Isquémica	578	2.83
	Enfermedad Cerebrovascular	1,072	5.25
5	Tumores malignos	992	4.85
	- Leucemia	138	0.68
	- De tráquea, bronquios y pulmón	123	0.60
	- Del estómago	91	0.45
6	Anomalías congénitas:	959	4.69
	- Del corazón y del aparato cardiovascular	311	1.52
7	Neumonía e influenza	731	3.58
8	Enfermedades Infecciosas Intestinales	719	3.52
9	Disritmia Cardíaca	118	0.58
10	Signos, síntomas y estados morbosos mal definidos	90	0.44
11	Las demás causas	6,236	30.52

CUADRO 2. Frecuencia general de tumores en perros (52).

ELEVADA	MODERADA
Tumor de células basales	Tumor venéreo transmisible
Tumores linfoides y hematopoyéticos	Tumor del cuerpo aórtico
Tumores mamarios	Hemangioma cutáneo
Tumor de células cebadas	Hemangiomapericitoma
Melanoma	Carcinoma hepático
Adenoma perianal	Carcinoma intestinal
Sarcoma cutáneo	Leiomioma
Tumores testiculares	Lipoma cutáneo
	Carcinoma nasal
	Neurofibroma
	Carcinoma oral
	Epulis oral
	Osteosarcoma
	Tumores del ovario
	Carcinoma pancreático
	Papiloma cutáneo
	Carcinoma pulmonar
	Tumores de la tiroides

CUADRO 3. Reseña de los perros con TVT.

PERRO:	EDAD	SEXO	PESO	CLASIFICACIÓN DE LOS TVT SEGÚN AMBER <i>et. al.</i> (21)
1	3 años	Macho	30 kg.	T2
2	3 años	Hembra	21 kg.	T3-T4
3	2 años	Hembra	10 kg.	T3
4	6 años	Hembra	19 kg.	T4
5	3 años	Hembra	25 kg.	T3

CUADRO 4. Cantidad de cobre en ppm ($\mu\text{g/ml}$) en las muestras sanguíneas del perro 1 con TVT en la primera aplicación de casiopeína II.

PERRO 1	TRATAMIENTO 1 (Nov. 24 de 1994)	TRATAMIENTO 6 (Dic. 14 de 1994)
TIEMPO	Concentración de Cu en ppm	Concentración de Cu en ppm
0 horas	1.0126	--
20 minutos	2.2408	--
40 minutos	3.3144	--
60 minutos	3.4573	--
2 horas	2.2710	--
4 horas	2.0266	--
8 horas	1.8257	--
12 horas	1.8052	--
24 horas	1.3625	--

CUADRO 5. Cantidad de cobre en ppm ($\mu\text{g/ml}$) en las muestras sanguíneas del perro 2 con TVT en la primera y última aplicación de casiopeína II.

PERRO 2	TRATAMIENTO 1 (Nov. 24 de 1994)	TRATAMIENTO 6 (Dic. 14 de 1994)
TIEMPO	Concentración de Cu en ppm	Concentración de Cu en ppm
0 horas	0.5833	1.464
20 minutos	1.2168	2.185
40 minutos	1.3536	1.904
60 minutos	1.4626	2.432
2 horas	1.9004	2.565
4 horas	1.6210	1.5173
8 horas	1.6000	1.2688
12 horas	1.7753	1.0376
24 horas	0.9531	0.8064

CUADRO 6. Cantidad de cobre en ppm ($\mu\text{g/ml}$) en las muestras sanguíneas del perro 3 con TVT en la primera y última aplicación de casiopeína II.

PERRO 3	TRATAMIENTO 1 (Nov. 24 de 1994)	TRATAMIENTO 6 (Dic. 14 de 1994)
TIEMPO	Concentracio de Cu en ppm	Concentración de Cu en ppm
0 horas	0.5371	0.6284
20 minutos	0.6582	0.9415
40 minutos	0.8254	1.0342
60 minutos	1.2883	0.8466
2 horas	1.8960	1.1415
4 horas	0.9993	0.8760
8 horas	1.7200	0.8763
12 horas	1.0780	0.8621
24 horas	0.9206	0.698

CUADRO 7. Cantidad de cobre en ppm ($\mu\text{g/ml}$) en las muestras sanguíneas del perro 4 con TVT en la primera y última aplicación de casiopeína II.

PERRO 4	TRATAMIENTO 1 (Enero 12 de 1995)	TRATAMIENTO 6 (Febrero 1 de 1995)
TIEMPO	Concentracio de Cu en ppm	Concentración de Cu en ppm
0 horas	0.27325	0.7065
20 minutos	0.60913	1.1912
40 minutos	0.89078	1.552
60 minutos	1.36000	1.724
2 horas	1.7127	2.253
4 horas	1.1106	1.214
8 horas	0.9776	1.417
12 horas	0.9733	1.299
24 horas	0.80995	1.299

CUADRO 8. Cantidad de cobre en ppm ($\mu\text{g/ml}$) en las muestras sanguíneas del perro 5 con TVT en la primera y última aplicación de casiopeína II.

PERRO 5	TRATAMIENTO 1 (Febrero 9 de 1995)	TRATAMIENTO 6 (Marzo 1 de 1995).
TIEMPO	Concentracio de Cu en ppm	Concentración de Cu en ppm
0 horas	1.203	0.91442
20 minutos	2.786	1.8082
40 minutos	3.978	2.4484
60 minutos	3.393	2.2658
2 horas	4.292	3.3208
4 horas	3.010	2.9251
8 horas	2.567	2.0576
12 horas	2.1768	1.3095
24 horas	2.1130	0.2252



DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Informe final de estudio posmortem.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

Cd. Universitaria, D.F 28 DE JUNIO DE 1995

CASO No.1 N94 569 **EXPEDIENTE:**
NOBRE DEL RESIDENTE: ANDREA D. VIZCAYA
DIRECCION: PEQUERAS ESPECIES
 Informe del estudio posmortem, llevado a cabo en un (a)
 CANINO (M)
 de raza: CRIOLLO
 color: BLANCO
 edad: 3 AÑOS APROX.
 No. de identificación:
 propiedad de:
 remitido el día:
 Diagnóstico clínico presuntivo de: **COMPLICACION
 RESPIRATORIA.**

Los principales hallazgos en el estudio macroscópico fueron:

Corazón, engrosamiento moderado difuso de válvula tricúspide, así mismo estaba opaca, blanquesina y poco elástica.

Pulmón, los lóbulos pulmonares estaban rojo oscuro, no colapsaron y al corte fluía moderada cantidad de líquido rojizo.

Hígado, estaba rojo oscuro, firme y al corte fluía moderada cantidad de líquido rojizo.

Intestino delgado, presencia de moco rojizo, abundante, en todo lo largo. La mucosa estaba hemorrágica.

Riñones, estaban rojo oscuro.

Próstata, ligeramente aumentada de volumen, con algunos nódulos (2-3) en el parénquima, en promedio de 0.5cm de diámetro.

Los principales hallazgos en el estudio histopatológico fueron:

Ciudad Universitaria 3000, Circuito Exterior. Delegación Coyoacán México, D.F., C.P. 04510

Tel. 622-58-88 y 616-10-60

2

Congestión y edema pulmonar moderados, difusos, agudos. Congestión hepática moderada, difusa y presencia de moderada cantidad de pigmento café-ocre en forma multifocal.

Nefritis intersticial no supurativa ligera, multifocal con esclerosis glomerular. Presencia de moderada cantidad de pigmento café en túbulos renales.

Necrosis esplénica moderada, multifocal. Presencia de moderada cantidad de pigmento café.

Endocardiosis valvular, (tricúspide), moderada, difusa.

COMENTARIO: Con base en las lesiones observadas la causa de muerte estuvo asociada a una insuficiencia respiratoria aguda, por los cambios circulatorios encontrados. El origen de esto pudo tener como origen la administración del fármaco.

La causa del pigmento hemático encontrado en varios órganos no se pudo determinar.

A T E N T A M E N T E

HVZ. FERNANDO CONSTANTINO CASAS.

CUADRO 9.

CUADRO 10. Valores sanguíneos del perro 1 con TVT.

BIOMETRÍA HEMÁTICA	Resultados	Valores normales
Hematocrito %	46.5	37-55
Hemoglobina g/dl	15.6	12-18
CMHC g/l	33.5	32-36
Proteínas plasmáticas g/dl	7.8	6-7.5
Leucocitos /mm ³	12,250	6,000-17,000
Neutrófilos /mm ³	8,452.5	3,000-11,500
Linfocitos /mm ³	2,817.5	1,000-4,800
Monocitos /mm ³	122.5	150-1,350
Eosinófilos /mm ³	857.5	100-1,250

QUÍMICA SANGUÍNEA	Resultados	Valores normales
TGP	31	4-66
FAS	72	0-88
Urea	31	20-40
Creatinina	1.1	0.5-1.5
Albúmina	2.7	2-4

CUADRO 11. Valores farmacocinéticos de los 5 perros con TVT obtenidos a partir de los valores de cobre con el programa RSTRIP, en la primera aplicación de casiopeina II.

1era. Aplicación PERRO:	Integral Trapezoidal AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	1er. Momento AUMC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$)	Vd c (l/kg)	Vd área (l/kg)	Vd ss (l/kg)	K1 (hr^{-1})	A1 $\text{B}\mu\text{g}/\text{ml}$	Vida Media $T_{1/2}\beta$ (hr)	Cl_e	Concentración máxima Cpo ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	44.279	445.8	1.553	2.524	19.3576	0.03937	2.8322	17.606	1.656	2.8322
2	36.953	388.56	2.2356	4.9223	15.4684	0.02419	1.9681	28.645	1.984	1.9681
3	29.509	321.81	2.0618	5.6013	11.9079	0.02662	1.6911	26.032	2.4851	1.6911
4	24.831	257.38	2.9	5.1676	10.5406	0.03429	1.5172	20.212	2.9533	1.5172
5	61.884	642.96	1.1253	1.9535	26.2217	0.03639	3.9098	19.045	1.185	3.9098
Promedio:	39.4912	411.302	1.9751	4.0337	16.6992	0.03217	2.3836	22.3082	2.0527	2.3836
D.E.	14.5376	147.5411	0.6773	1.6688	6.3274	0.0065	0.9916	4.7746	0.6916	0.9916
Me	36.953	388.56	2.0618	4.9223	15.4684	0.03429	1.9681	20.212	1.984	1.9681

CUADRO 12. Valores farmacocinéticos de los 5 perros con TVT obtenidos a partir de los valores de cobre con el programa RSTRIP, en la última aplicación de casiopeína II.

Última Aplicación PERRO:	Integral Trapezoidal AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	1er. Momento AUMC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	Vd c (l/kg)	Vd área (l/kg)	Vd ss (l/kg)	K1 β (hr^{-1})	A1 $\text{B}\mu\text{g}/\text{ml}$	Vida Media $T_{1/2}\beta$ (hr)	Cl_b	Concentración máxima Cpo ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	30.365	262.85	1.7825	2.1646	15.4342	0.06694	2.4684	10.354	2.415	2.4684
3	20.565	227.96	4.1334	11.3314	8.1632	0.01888	1.0645	36.711	3.566	1.0645
4	33.807	379.37	2.4374	6.4728	13.253	0.02010	1.8052	34.472	2.1691	1.8052
5	39.642	302.6	1.0558	1.1551	22.8571	0.09610	4.1674	7.2124	1.85	4.1674
Promedio:	31.0948	293.195	2.3523	5.2810	14.9269	0.0505	2.3764	22.1874	2.5	2.3764
D.E.	7.9962	65.0410	1.3147	4.6482	6.1018	0.0377	1.3246	15.5577	0.7473	1.3246
Me	25.4650	282.725	2.11	6.2462	10.7081	0.0435	2.1368	22.4130	2.2921	2.1368

X. FIGURAS

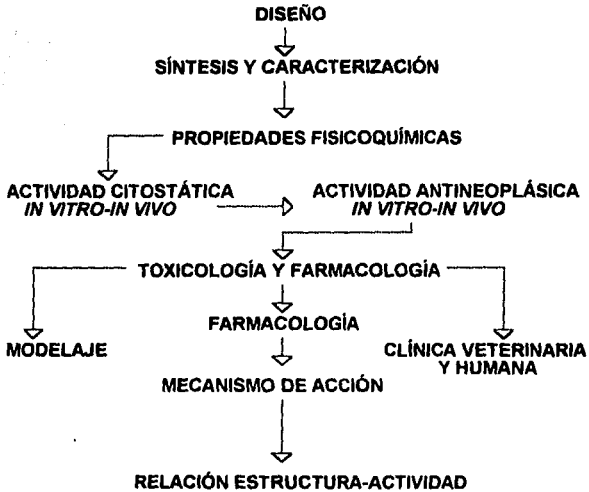


Figura 1. Flujograma del desarrollo de las casiopeínas.



FIGURA 2.

Tumor Venéreo Transmisible del Perro 2.



FIGURA 3.

Tumor Venéreo Transmisible del Perro3.



FIGURA 4.

Tumor Venéreo Transmisible del Perro4.



FIGURA 5.

Tumor Venéreo Transmisible del Perro 5.

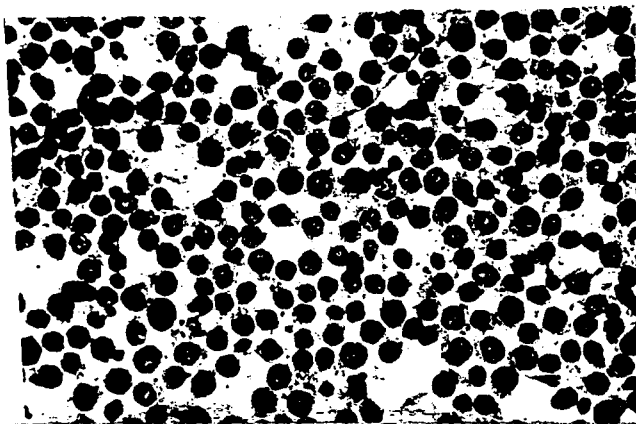


FIGURA 6

Citología de TVT del Perro 2 por medio de PAD teñido con Papanicolau (40 x).

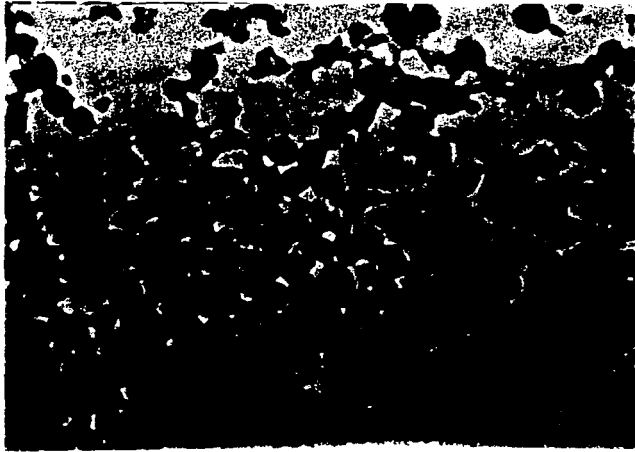


FIGURA 7

Citología de TVT del Perro 3 por medio de PAD teñido con Papanicolau (40 x).

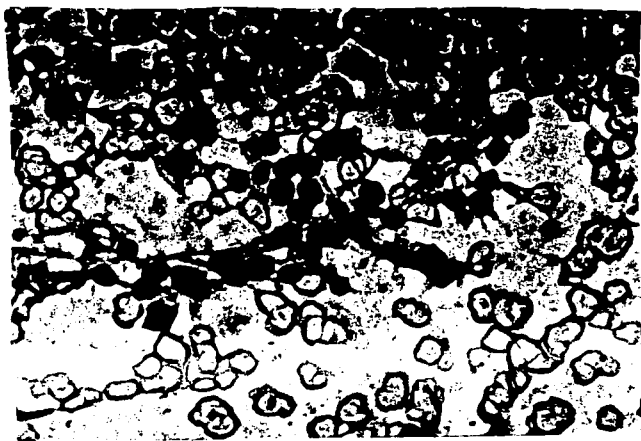


FIGURA 8

Citología de TVT del Perro 4 por medio de PAD teñido con Papanicolau (40 x).

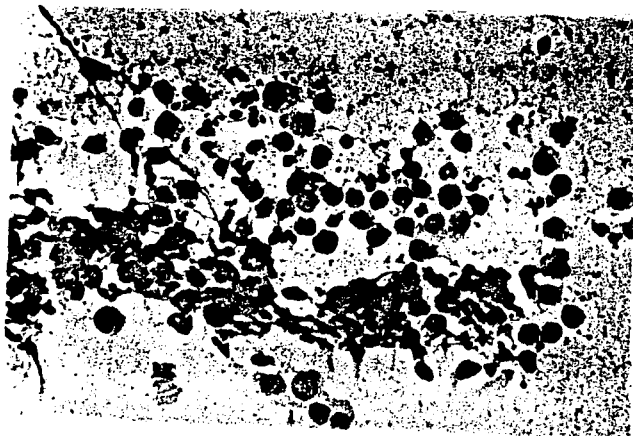


FIGURA 9

Citología de TVT del Perro 5 por medio de PAD teñido con Papanicolau (40 x).

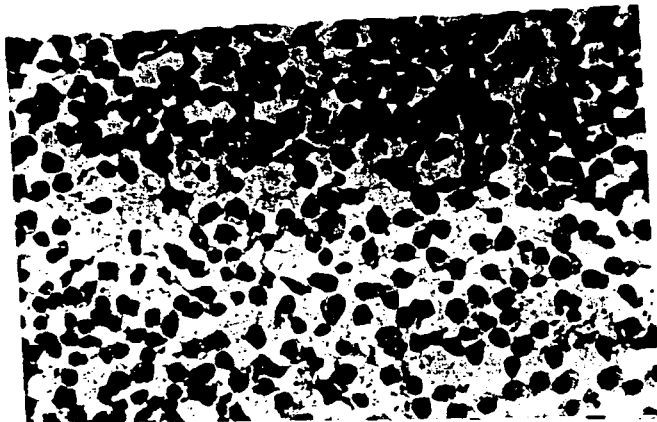


FIGURA 10

Citología de TVT del Perro 2 después de 6 tratamientos con casiopeina II mostrando que no hay actividad (Tinción con Papanicolau 40 x).

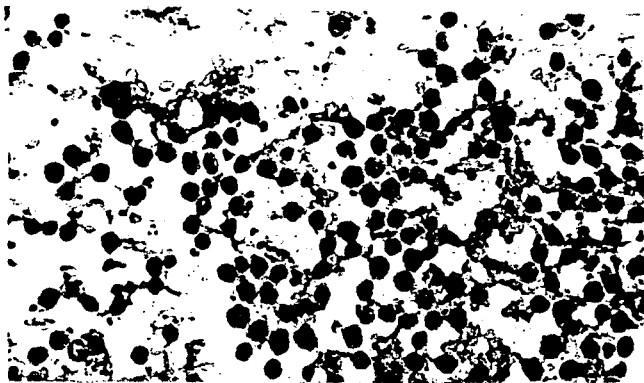


FIGURA 11

Citología de TVT del Perro 3 después de 6 tratamientos con casiopeína II mostrando que no hay actividad (Tinción con Papanicolau 40 x).

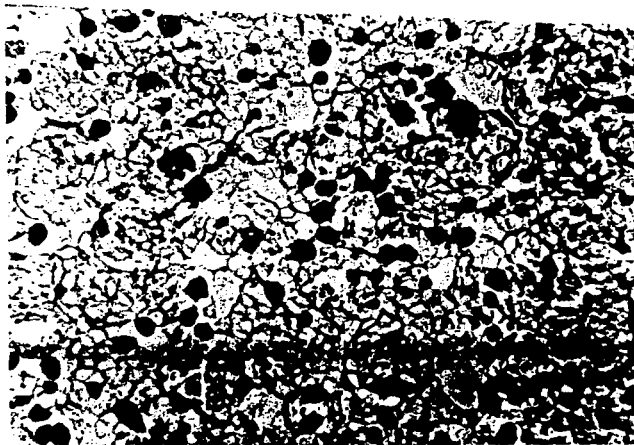


FIGURA 12

Citología de TVT del Perro 4 después de 6 tratamientos con casiopeina II mostrando que no hay actividad (Tinción con Papanicolau 40 x).

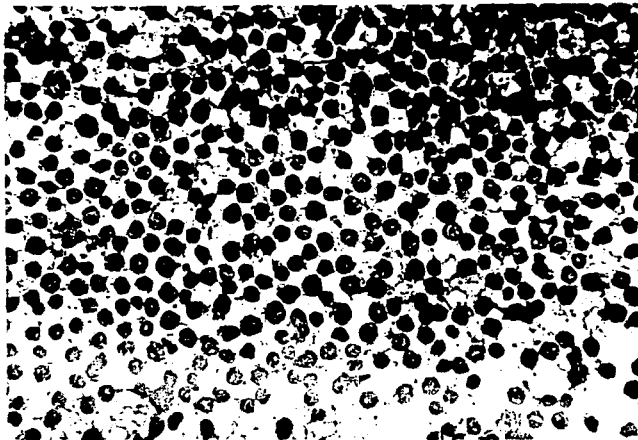


FIGURA 13

Citología de TVT del Perro 5 después de 6 tratamientos con casiopeina II mostrando que no hay actividad (Tinción con Papanicolau 40 x).



FIGURA 14

Aplicación del tratamiento de casiopeína II por vía endovenosa por medio de infusión continua.



FIGURA 15

Demostración de la toma de muestras sanguíneas por vena cefálica a los perros con TVT.

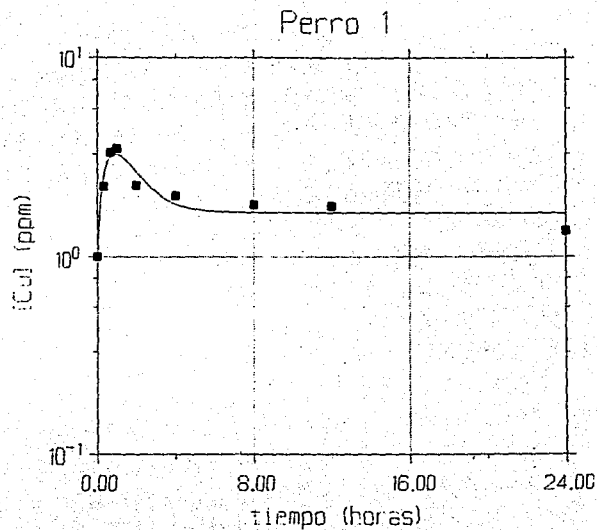


Figura 16. Ajuste a 3 exponenciales de las concentraciones plasmáticas de casiopeína II a una dosis de 4 mg/kg por infusión continua intravenosa en el lapso de una hora en 250 ml de SSF a un perro con TVT.

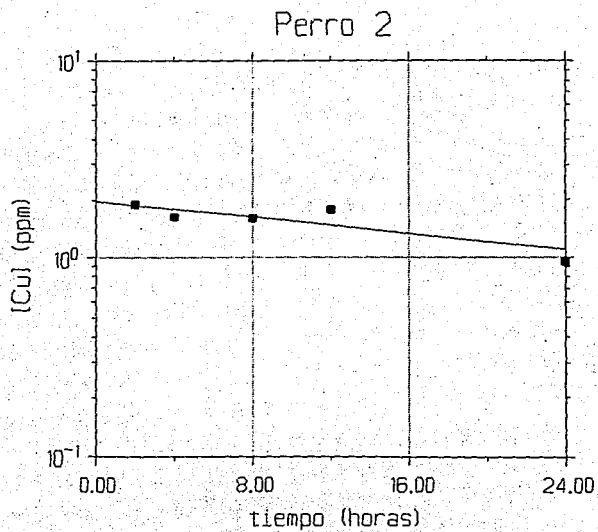


Figura 17. Depuración de las concentraciones plasmáticas de la casiopeína II en la fase de postdistribución, que coincide con el fin de la infusión continua por vía endovenosa en 250 ml de SSF en la que se encuentra disuelta el fármaco a una dosis de 4 mg/kg a un perro.

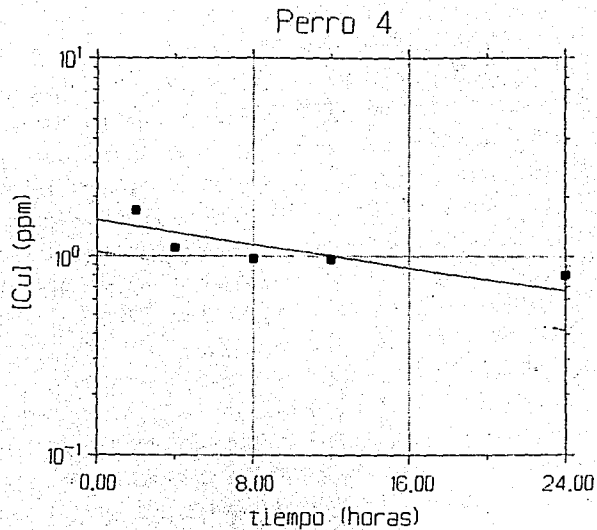
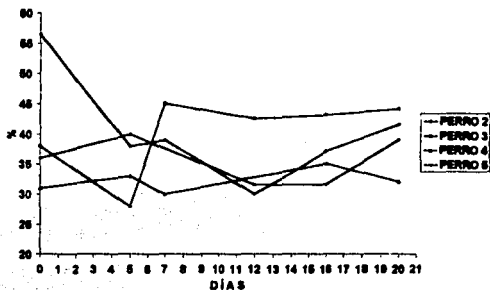


Figura 18. Integración de las relaciones de concentración plasmática vs. tiempo en un perro durante la primera y última aplicación de casiopeína II (con un intervalo de 21 días). Aplicación a una dosis de 4 mg/kg en 250 ml de SSF por vía endovenosa por infusión continua durante 1 hora en cada aplicación.

HEMATOCRITO



HEMOGLOBINA

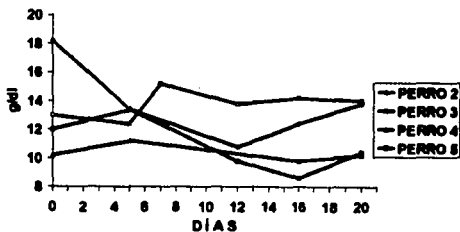
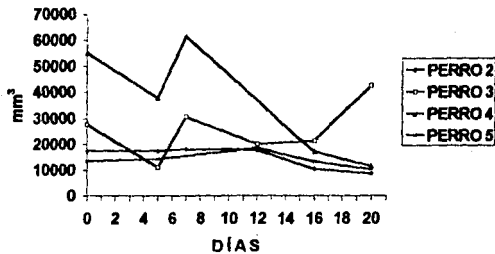


Figura 19a.

LEUCOCITOS



MONOCITOS

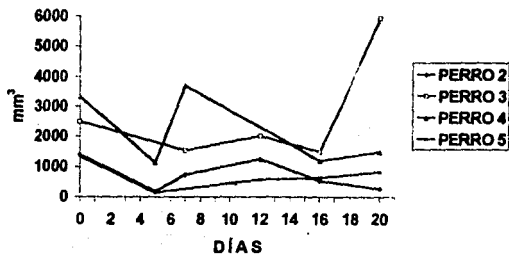
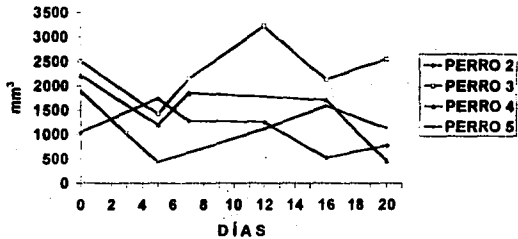


Figura 19b.

EOSINÓFILOS



NEUTRÓFILOS

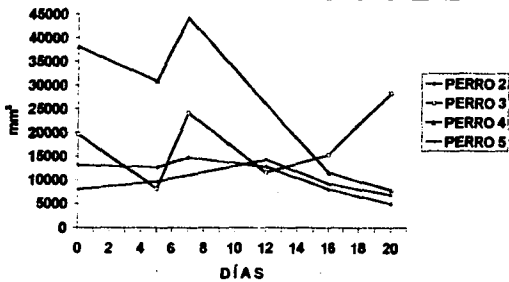
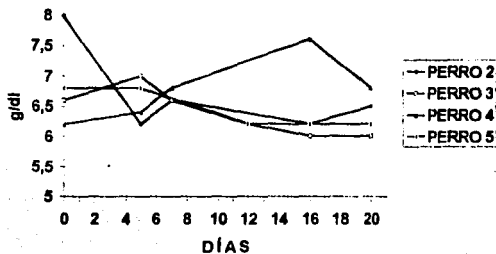


Figura 19c.

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS



LINFOCITOS

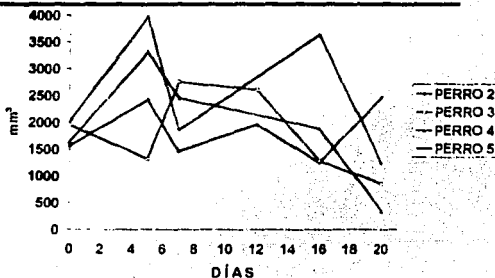
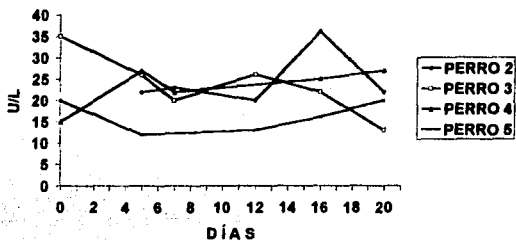


Figura 19d.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

AST

(ASPARTATO TRANSFERASA)



FAS

(FOSFATASA ALCALINA SÉRICA)

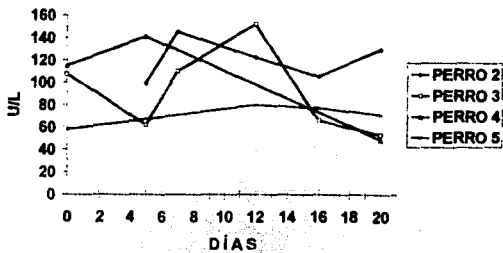
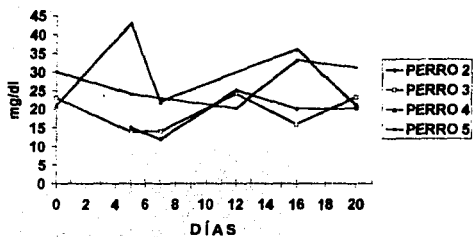


Figura 20a.

UREA



CREATININA

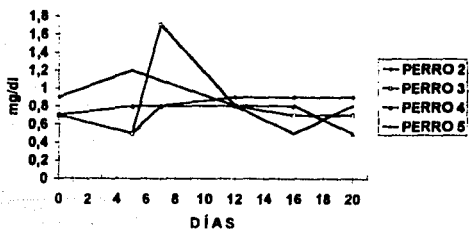


Figura 20b.

ALBÚMINA

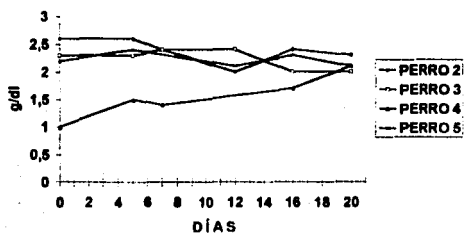


Figura 20c.