



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

### “CARACTERIZACIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS EFECTOS TÓXICOS CARDIOPULMONARES DE LAS CASIOPEÍNAS III-ia<sup>®</sup> y II-gli<sup>®</sup>”

#### T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS

PRESENTA

MARCO GIOVANNI LEAL GARCÍA

TUTOR: DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ  
COMITÉ TUTORAL: DRA. LENA RUIZ AZUARA  
M. en C. ISABEL GRACIA M.

MÉXICO, D.F.

2006



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.

**a Dios, mi luz de cada día;  
a mis Padres y hermanos, mi vida entera;  
a Diana, mi fuerza, mi apoyo, mi amor.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco de manera especial al Dr. Héctor Sumano López por el tiempo y la confianza que depositó en mí.**

**Igualmente a la Maestra Isabel Gracia y Dra. Lena Ruiz Ramírez por el apoyo brindado durante este camino.**

**A mi compañero Luis Enrique García, por las horas de trabajo y agradable compañía.**

**A la Dra Rosa Helena Méndez por la colaboración y enseñanzas en el área de imagenología y al Dr Jorge Luna del Villar Velasco quién nos apoyó durante la investigación.**

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Toxicidad conocida de los quimioterapéuticos usados contra el cáncer	6
Cuadro 2. Tasas de supervivencia relativa a cinco años (%), en los Estados Unidos entre 1974 y 2000	9
Cuadro 3. Dosis empleadas para ambos tipos de casiopeína en un número variable de perros para determinar la DL <sub>99</sub> y DL <sub>50</sub>	19
Cuadro 4. Protocolos terapéuticos usados con el fin de disminuir o evitar los efectos tóxicos de las Casiopeínas®	25
Cuadro 5. Resultados obtenidos para cada variable antes, durante y después de la administración de Cas III-ia y Cas II-gli.	34

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fórmulas estructurales de Cas III-ia y Cas II-gli	12
Figura 2. Efectos de Tiletamina-zolacepam y pentobarbital (grupo control)	28
Figura 3. Relación dosis-letalidad para Cas III-ia	30
Figura 4. Relación dosis-letalidad para Cas II-gli	31
Figura 5. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg sobre diferentes variables fisiológicas	35
Figura 6. Efectos de Casiopeína II-gli 8mg/kg sobre diferentes variables fisiológicas	36
Figura 7. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg dentro del protocolo de tratamientos No.1	38
Figura 8. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg dentro del protocolo de tratamientos No.2	39
Figura 9. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg dentro del protocolo de tratamientos No.3	40
Figura 10. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg dentro del protocolo de tratamientos No.4	42
Figura 11. Luz del ventrículo izquierdo durante la diástole previo a la administración de Cas III-ia a dosis letal	44
Figura 12. Inicio del signo de “aplastamiento” que precede a los signos principales que conllevan a la muerte	45
Figura 13. Ventrículo izquierdo con evidente disminución en la luz debido a hipertensión pulmonar	46
Figura 14. Patrón bronquial propio del edema pulmonar causado por la administración de Cas III-ia y Cas II-gli	52

## ÍNDICE

	Página
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
Ciclo celular y cáncer	2
Segunda causa de mortalidad	3
La quimioterapia	4
Nuevas soluciones al problema	8
Toxicidad de las Casiopeínas (CasIII-ia y CasII-gli)	11
<b>HIPÓTESIS</b>	13
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	14
<b>CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	15
Preparación y anestesia	16
Establecimiento de la seguridad anestésica	16
Medición de variables fisiológicas	17
Fase I. Establecimiento de la DL <sub>50</sub> y DL <sub>99</sub>	18
Análisis estadístico de la primera fase	18
Fase II. Caracterización de los efectos tóxicos de las Casiopeínas <sup>®</sup> III-ia y II-gli	20
Análisis estadístico de la segunda fase	20
Fase III. Evaluación de esquemas terapéuticos	21
Protocolo 1	21
Protocolo 2	22
Protocolo 3	23
Protocolo 4	23
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b>	26
Establecimiento de la seguridad anestésica	27
Fase I. Obtención dosis letales	29
Fase II. Caracterización de los efectos tóxicos de las Casiopeínas <sup>®</sup> III-ia y II-gli	32

Periodo de infusión IV	32
Periodo de crisis	32
Desarrollo de edema pulmonar y muerte	33
Fase III. Protocolos terapéuticos	37
Protocolo 1	37
Protocolo 2	39
Protocolo 3	40
Protocolo 4	41
Resultados ecocardiográficos	43
<b>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>58</b>



## RESUMEN

Las Casiopeínas<sup>®</sup>, son compuestos de coordinación de cobre que han demostrado actividad antineoplásica contundente contra varias líneas tumorales *in vitro* e *in vivo*.

Después de haber sido sintetizadas y probadas, requieren ser evaluadas por sus posibles efectos tóxicos antes de ser usadas por primera vez en seres humanos que padezcan cáncer. Por esta razón, se instauró un protocolo que permitió encontrar la dosis letal de dos tipos de Casiopeínas<sup>®</sup> en perros, el mecanismo fisiopatológico y finalmente disminuyó los efectos tóxicos mediante medicamentos preventivos. El estudio se realizó con perros bajo anestesia general.

La primera fase nos permitió encontrar las DL<sub>50</sub> y DL<sub>99</sub> que fueron 7mg/kg y 10mg/kg respectivamente para Casiopeína III-ia y 4.5mg/kg y 8mg/kg respectivamente para Casiopeína II-gli.

La segunda fase reveló que los animales sometidos a la DL<sub>99</sub>, mueren por edema pulmonar causado por fallo cardíaco y consecuente incremento de la presión venosa y capilar pulmonar. Se ha propuesto que el fallo cardíaco se debe a liberación de radicales libres que son lesivos sobre las células cardíacas.

En un intento por salvaguardar la vida de los animales sometidos a la DL<sub>99</sub> se brindaron terapias con captadores de radicales libres que aunque retardaron la muerte por tan solo algunas horas, corroboran que el daño es causado por especies reactivas de oxígeno y brindan una herramienta a los clínicos humanos para disminuir los efectos tóxicos de dichos fármacos cuando sean empleados en pacientes oncológicos.

Sin embargo, el uso de Casiopeínas<sup>®</sup> en seres humanos, requerirá de dosis mucho menores a las empleadas en el presente trabajo, razón por la cual podemos considerar la tolerancia de los pacientes sometidos al tratamiento y

esperar un margen de seguridad alto, en especial si estas dosis terapéuticas son acompañadas con el uso prolongado de captadores de radicales libres, previos a la administración de la quimioterapia.

Palabras clave: toxicidad, dosis, tratamiento, Casiopeínas, cáncer.

## ABSTRACT

Casiopeinas are a new group of coordination compounds with a copper core and high antineoplastic activity *in vitro* Vs. various tumor cell lines. More than 100 derivatives with demonstrated antineoplastic activity have been patented. Although its mechanism of action has not been defined, it has been shown that they uncouple the cell respiratory by interacting with succinate and 2-oxoglutarate dehydrogenases. Also, these drugs are known to bind to DNA through formation of adducts with nitrogen moieties.

It has been postulated that Casiopeínas may be less toxic than other antineoplastic drugs, based on the fact that copper participates in normal metabolic reactions and some of them appear to possess a superoxide dismutase activity.

Also, they shows low potency to alter the rate of sister chromatide exchange. A similar coordination compound, cisplatin has well defined ototoxic and nephrotoxic side effects. In contrast, cardiotoxic side effects of this latter drug are regarded as moderated.

Previous trials to assess acute toxicity of Casiopeínas have shown that it is directly linked to the rate at which the drug is injected. Evidence from *in vitro* rat heart-preparations suggests that toxic concentrations of casiopeina III-ia induce cardiac arrhythmias, decrease in cardiac output and a drop in heart rate.

Acute toxicity in rats and mice as well as some evidence from dogs suggest that approximately a ten fold the therapeutic dose (10 mg/kg) induce either fatal pulmonary and/or cardiac toxicity. Yet no *in vivo* evaluations of these functions are available at this moment.

Hence, this study was carried out to assess the cardiovascular and respiratory responses (arterial and venous blood pressure, oxymetry, capnography, electrocardiography, cardiac rate and respiratory rate) of anesthetized dogs to lethal doses of two different forms of Casiopeínas: Casiopeína III-ia (Cas III-ia)

[(4,4-dimethyl-2,2-bipyridine)(acetylacetonate)copper(II)]nitrate (10 mg/kg), and Casiopeína II-gly (Cas II-gly) [(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinate)copper(II)]nitrate (9 mg/kg) (see Fig 1).

Additionally, an attempt to prevent the lethal outcome of the administration of Cas III-ia and Cas II-gly, applying various drugs was carried out.

# **CAPÍTULO 1**

# **INTRODUCCIÓN**

### CICLO CELULAR Y CÁNCER

En un organismo, las células, unidades estructurales que lo componen, se encuentran en constante crecimiento, desarrollo y multiplicación cumpliendo ciclos completos durante toda la vida de un individuo. Cada célula debe pasar por una etapa de maduración y síntesis de su propio material hereditario para posteriormente entrar en una fase de división. Esto se ha denominado ciclo celular el cual puede equipararse al de un ser vivo; es decir “nace, crece, se reproduce y eventualmente muere”. Este ciclo comprende cuatro períodos que han sido denominados G1, S, G2 y mitosis. El período G1, llamado “fase de crecimiento”, se inicia con una célula que aumenta de tamaño y sintetiza nuevo material citoplasmático, en especial proteínas y ARN. Esto ocurre entre el final de la mitosis y el inicio de la síntesis de ADN (1). El período S o de síntesis es en el que tiene lugar la duplicación de ADN. Cuando acaba este período el núcleo posee el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio (2). G2, o segunda fase del crecimiento, se caracteriza porque la célula continúa sintetizando ARN y proteínas pero la diferencia es que al final de este período se observan cambios en la estructura celular que indican el principio de la mitosis (1) o división celular (última etapa del ciclo celular), dividida en sub-etapas conocidas como profase, metafase, anafase y telofase. La mitosis culmina con citocinesis es decir la división de la célula en dos células hijas (3). El período comprendido entre G1 y G2 se conoce también como interfase.

Cada célula es susceptible de fallar en cualquier momento de este ciclo. Los errores de duplicación del ADN son comunes. Pero la célula cuenta con mecanismos para salvaguardar la integridad de su progenie, asegurándose que cada producto sea idéntico a ella. Algunos de estos mecanismos, como los genes de verificación, incluyen al gen inductor de apoptosis (bax); la proteína del retinoblastoma (Rb); o la proteína p53 que detienen el ciclo celular en G1 al activar otro grupo de proteínas inhibitorias como son p21 o p16 (4).

A pesar de lo anterior, dichos mecanismos en ocasiones sufren alteraciones que hacen que los errores no sean reparados, generando una mutación cuya causa directa generalmente se desconoce y otras veces se atribuye a diversos

factores que solos o en combinación, pueden dar inicio a un proceso neoplásico. Por ejemplo, la exposición del individuo a ciertas sustancias potencialmente carcinogénicas que puedan estar presentes en contaminantes ambientales, la dieta, los desechos industriales, la radiación, traumatismos repetidos, ciertos virus oncogénicos, la posible predisposición genética y el proceso de envejecimiento generando lo que conocemos como cáncer (5).

Existen muchas definiciones que intentan explicar qué es el cáncer. El diccionario de la real academia de la lengua, lo define como una enfermedad neoplásica en la que las células se transforman y proliferan de manera anormal e incontrolada (6). Sin embargo, la mejor explicación se encuentra en cualquier texto de biología molecular. Allí se define al cáncer como una familia de enfermedades que tienen en común la alteración de las pautas de crecimiento y comportamiento más fundamentales de las células de un organismo pluricelular y que a su vez tienen la capacidad de migrar y colonizar otros tejidos en un proceso denominado metástasis (1).

### SEGUNDA CAUSA DE MORTALIDAD

En México, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública ya que a pesar de los avances en investigación y tratamiento, se le ubica como la segunda causa de muerte de la población después de las enfermedades cardiovasculares, (7) con 5191 casos nuevos registrados para cáncer de mama en el 2004 que corresponde a 1465 casos más que en el 2000; y 3647 registros de cáncer cervicouterino en 2004, 52 más en comparación con el año 2000 (8).

En el mundo entero y en especial en los países más desarrollados, se han hecho esfuerzos invaluable para detener o por lo menos controlar el avance epidemiológico del cáncer. Sin embargo y a pesar de los grandes avances de la ciencia y la tecnología, esta enfermedad continúa siendo un problema progresivo de enorme impacto en la salud pública mundial.

### LA QUIMIOTERAPIA,

La primera información escrita sobre el tratamiento a un paciente con cáncer data del año 1600 antes de Cristo. Se trata de un papiro egipcio que relata la primera operación quirúrgica para la extracción de un tumor sólido.

En cuanto a la quimioterapia, el primer compuesto citotóxico (venenoso para ciertos tipos de células) no se empleó precisamente con fines médicos. El gas mostaza se utilizó por primera vez como arma militar durante la primera guerra Mundial. En 1945, después de que varios militares fueran expuestos accidentalmente en la segunda guerra mundial se descubrió que sus niveles de glóbulos blancos eran sorprendentemente bajos (9). Esta observación llevó a los científicos a pensar en la capacidad de este agente para matar células, por lo que se comenzó su uso como medicamento oncológico con enfermos de linfoma (10), precisamente una variedad de la enfermedad relacionada con los glóbulos blancos. Se empleó para ello la administración intravenosa en lugar de la inhalación del gas. A partir de este evento el número y variedad de fármacos anticancerígenos se ha multiplicado espectacularmente.

Dentro de los numerosos protocolos contra el cáncer, pocos son los compuestos de origen inorgánico y casi todos estos protocolos incluyen el uso de agentes como el cisplatino, oxaliplatino y carboplatino. El cisplatino (*cis*-diamino-dicloroplatino (II)), por ejemplo, es un agente formado por un complejo metálico con centro de platino que provoca daño al ADN mediante la formación de puentes entre las bases nitrogenadas, particularmente en el nitrógeno 7 de la guanina además de interactuar de manera covalente\* con adenina y citosina. Este fármaco fue descubierto por Rosenberg (11), quién observó que los complejos de platino neutros inhiben la división e inducen el desarrollo de filamentos en *Escherichia coli*. Se le ha empleado con éxito en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en cáncer genitourinario, testicular, ovárico y de vejiga, entre otros. En medicina veterinaria se ha demostrado su eficacia en osteosarcoma apendicular en perros (12). Sin embargo, este fármaco es costoso y puede producir disfunción renal y daño al octavo par craneal (nervio estatoacústico) (10). También se ha informado que genera

---

\*Tipo de enlace químico en el que los dos átomos enlazados comparten sus electrones.

cardiotoxicidad cuando ha sido combinado con vinblastina y bleomicina (13). Otra desventaja del cisplatino es que no escapa a la posibilidad de resistencia tumoral que haría refractarios los tratamientos (11).

Se tienen identificados otros fármacos quimioterapéuticos cardiotóxicos como la doxorubicina, especialmente con el uso crónico cuando se acumulan dosis mayores a  $500 \text{ mg/m}^2$  (12). La doxorubicina puede tener una baja actividad con resistencia celular debido al incremento de glutatión-s-transferasa que protege a la célula contra los radicales libres liberados por acción del fármaco (14). En el cuadro 1 se presenta una relación de los principales agentes anticancerígenos y su toxicidad.

Cuadro 1. Toxicidad conocida de los quimioterapéuticos usados contra el cáncer.

CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRES GENÉRICOS	TOXICIDAD	
Agentes de alquilación	Mostazas Nitrogenadas	Mecloretamina	<b>Introducción</b> Mielosupresión aguda, destrucción de mucosa intestinal, inmunosupresión humoral y celular	
		Ciclofosfamida		
		Ifosfamida		
	Alquilsulfonatos	Clorambucil		
		Hexametilmelamina		
	Etileniminas y Metilmelaminas	Tiotepa		
	Nitrosoureas	Busulfán		
		Triazenos		Carmustina
				Estreptozocina
		Análogos de ácido fólico		Dacarbazina
Temozolomida				
Antimetabolitos	Análogos de pirimidina	Metotrexato		
		Fluorouracilo		
		Floxuridina		
	Análogos de purina	Citarabina		
		Gemcitabina		
		Mercaptopurina		
Productos naturales	Alcaloides de la vinca	Tioguanina		
		Pentostatina		
	Taxanos	Cladribina		
		Fludarabina		
	Epipodofilotoxinas	Vinblastina		
		Vincristina		
	Camptotecinas	Paclitaxel		
		Docetaxel		
		Etopósido		
		Tenipósido		
Antibióticos	Enzimas	Topotecán		
		Irinotecán		
	Modificadores de respuesta biológica	Actinomicina D		
		Daunorrubicina		
		Doxorrubicina		
Agentes diversos	Platinos complejos por coordinación	Bleomicina		
		Mitomicina		
	Antracendiona	L-asparaginasa		
		Interferón alfa		
	Urea sustitutiva	Interleucina 2		
Cisplatino				
	Carboplatino			
	Mitoxantrona			
	Hidroxiurea			

Adaptado de Goodman A. Bases farmacológicas de la terapéutica. Décima edición. Mc Graw Hill, 2003

### NUEVAS SOLUCIONES AL PROBLEMA

Durante años la quimioterapia ha ofrecido una esperanza de supervivencia a quienes padecen algún tipo de cáncer. En el cuadro 2 se presenta una visión estadística de dicha premisa para varias formas de cáncer en Estados Unidos y comparando tres épocas. Sin embargo, hay muchos tumores que no responden a ninguna terapéutica conocida y es pertinente agregar que tanto para México, como para otros países de América Latina, es muy costoso importar los medicamentos, razón por la cual esta terapia no está al alcance de todos.

Si la perspectiva quimioterapéutica es la correcta, resulta congruente asegurar que es imperiosa la necesidad de producir nuevos principios activos que sean capaces de abatir las neoplasias malignas al tiempo en que se disminuyen los efectos tóxicos y se cumple con una síntesis de costos razonables. Para considerar a una molécula como viable para desarrollo farmacéutico, el Nacional Cancer Institute\*, organismo de control epidemiológico, requiere un éxito previo en algunas pruebas; p. ej., investigaciones *in vitro* en las que se demuestre eficacia en al menos una línea tumoral murina (L1210 leucemia,

---

Nacional Cancer Institute: [www.cancer.gov/clinicaltrials/developments](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments)

B16 Melanoma, S180 Sarcoma) y una humana (CX1 Colon, MX1 Pecho, LX1 Pulmón) (16,17). Posteriormente se deben realizar ensayos clínicos y toxicológicos en animales, para que después de un diseño farmacéutico adecuado y estudios de farmacocinética, se llegue al uso en seres humanos (Fase I, encargada de farmacocinética en individuos sanos, seguridad, tolerancia y farmacodinamia) (15).

Si estos resultados son favorables, se realizan ensayos clínicos iniciales (fases II y III) y finalmente se pasa a la Fase IV en la que el fármaco se somete a pruebas clínicas multicéntricas de las que se deriva la información para que se le permita comercializarse. El costo del desarrollo farmacológico puede superar los cien millones de dólares y requerir una media de once años. Empero, cabe anotar que menos del 0.1% de las sustancias que comienzan este proceso alcanzan la meta final por lo que el capital de riesgo necesario difícilmente se encuentra en países en desarrollo (18).

Cuadro 2. Tasas de supervivencia relativa a cinco años (%), en los Estados Unidos entre 1974 y 2000.

Tomado de American Cancer Society. Cancer facts and figures 2005. Atlanta: American Cancer Society 2005  
<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2005f4PWSecured.pdf>

Sitio	1974-76	1983-1985	1995-2000
Todos los cánceres	50	53	64
Cerebro	22	27	33
Mamario	75	78	88
Colon	50	58	63
Esófago	5	8	14
Linfoma Hodgkin	71	79	85
Riñón	52	56	64
Laringe	66	67	65
Leucemia	34	41	46
Hígado	4	6	8
Pulmón y bronquios	13	14	15
Melanoma de piel	80	85	91
Melanoma múltiple	24	28	32
Linfoma No Hodgkin	47	54	59
Cavidad oral	54	53	59
Ovario	37	41	44
Páncreas	3	3	4
Próstata	67	75	99
Recto	49	55	64
Estómago	15	17	23
Testículo	79	91	96
Tiroides	92	94	97
Vejiga urinaria	73	78	82
Cérvico-uterino	69	69	73
Uterino	88	83	84

A pesar de los obstáculos dichos, se concibió en México un grupo de compuestos de síntesis *de novo* que contienen cobre como metal central, quelatos diiminas (N-N) y quelatos aminoacidatos (N-O) o donadores O-O

(acetilacetionato o salicilaldehidato), denominados Casiopeínas<sup>®</sup>, desarrollados y patentados por el Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (19).

Una de las ventajas de estos nuevos fármacos es que en teoría, pueden ser menos tóxicos que otros antineoplásicos, dado que se ha postulado que el cobre participa en reacciones metabólicas normales (20). Además algunas pueden simular la actividad de la super óxido dismutasa (21) y tener bajo potencial de genotoxicidad (22). Otras ventajas que pudieran ponderarse son:

- Se cuenta con altos rendimientos en su síntesis (19)
- Actividad antineoplásica *in vitro*, contundente (19)
- Interacción con el ADN (23, 24)
- Inducción de apoptosis y aumento del tiempo del ciclo celular (23, 24)
- Inhibición de la cadena respiratoria en células cancerosas *in vitro* (25)

Dado que los resultados logrados a la fecha son alentadores, dentro del protocolo de desarrollo farmacéutico de las Casiopeínas<sup>®</sup> es necesario detallar su toxicidad en diversos modelos, en especies superiores. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la toxicidad de dos tipos de Casiopeínas<sup>®</sup> que han demostrado actividad antitumoral *in vivo* e *in vitro* (23, 24). Estas son Casiopeína III-ia (Cas III-ia): Nitrato de [(4,4-dimetil-2,2-bipiridina)(acetilacetionato)cobre(II)]; y la Casiopeína II-gli (Cas II-gli): Nitrato de [(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)cobre(II)]. En la figura 1 se presentan sus fórmulas estructurales.

Actualmente se han sintetizado más de cien derivados de Casiopeínas<sup>®</sup>, algunas de las cuales han demostrado eficacia *in vivo* e *in vitro* como antineoplásicos, cubriendo de forma satisfactoria los requisitos de actividad exigidos por los paneles internacionales sobre los modelos de isotransplatación y heterotransplatación (26); la Cas III-ia y la Cas II-gli se encuentran entre los derivados con mejor potencia para promover su desarrollo farmacéutico (23, 24).

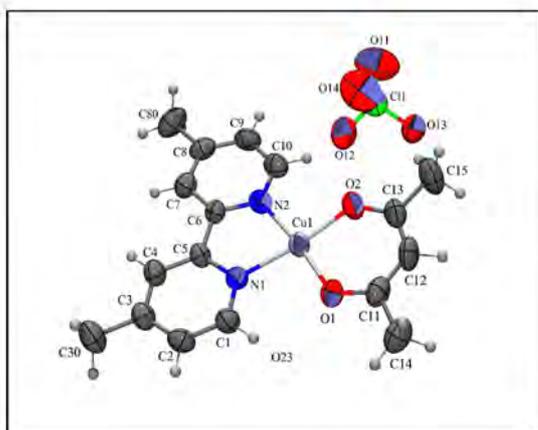
### TOXICIDAD DE LAS CASIOPEÍNAS® (Cas III-ia; Cas II-gli)

Los ensayos encaminados a determinar sus efectos tóxicos han mostrado que, en buena medida, dependen de la velocidad de administración. Su toxicidad aguda ratones es relativamente baja para un quimioterapéutico. Se requieren dosis de 12.82 mg/kg/IV en hembras de la cepa ICR para lograr una DL<sub>50</sub>, y 15.84 mg/kg/IV para alcanzar la DL<sub>90</sub> (24). Se conoce que la muerte por toxicidad aguda en perros está relacionada con edema pulmonar y colapso cardiovascular (27).

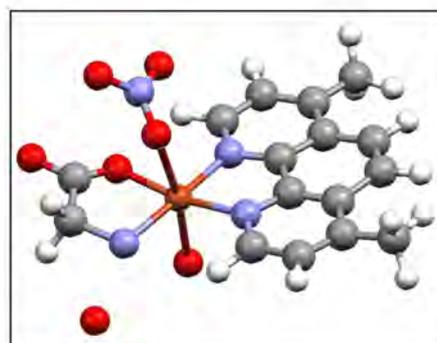
A pesar de los estudios mencionados, no se conocen las manifestaciones primarias que pueden tomarse como inicio de la compleja serie de cambios tóxicos *in vivo*. Esto obviamente es necesario para proyectar el uso de las Casiopeínas® en humanos (en particular Cas III-ia y Cas II-gli), razón por la cual se requieren estudios que definan la dosis máxima que especies superiores puedan soportar y que se sepa el papel de la velocidad de infusión. Así mismo es esencial que se investigue qué fármacos pudieran contrarrestar una posible cardiotoxicidad, toxicidad vascular y edema pulmonar, efectos adversos encontrados en estudios de toxicidad aguda previos (27).

Es importante mencionar que los estudios *in vivo*, siguen patrones bioéticos estrictos que buscan reducir al máximo el sufrimiento de los animales, por lo tanto es necesario realizar los estudios de toxicidad en el animal anestesiado.

Figura 1. Fórmulas estructurales de Cas III-ia y Cas II-gli



CASIOPEÍNA III-ia



CASIOPEÍNA II-gli

### HIPÓTESIS

- La Cas III-ia y la Cas II-gli producen la muerte de manera aguda en perros sometidos a dosis letales mediante infusión IV y por ello es posible definir los valores de DL<sub>99</sub> y DL<sub>50</sub>.
- Es posible caracterizar los cambios cardiovasculares y respiratorios que conducen a la muerte a perros anestesiados y tratados con dosis DL<sub>99</sub> de Cas III-ia; Cas II-gli.
- Es factible encontrar esquemas terapéuticos que prevengan o contrarresten la muerte inducida por sobredosis de Cas III-ia; Cas II-gli, en perros anestesiados.

### OBJETIVOS

- Establecer curvas de dosis-letalidad para Cas III-ia y Cas II-gli aplicando estas Casiopeínas® por infusión IV en un volumen de 100 mL de dextrosa 5% y un tiempo de 30 minutos y calcular los valores de DL<sub>99</sub> y DL<sub>50</sub>.
- Realizar mediciones de electrocardiografía, frecuencias cardíaca y respiratoria, presión arterial, capnografía, oximetría de pulso y temperatura, en animales que reciban una DL<sub>99</sub> de Cas III-ia y Cas II-gli y caracterizar los cambios producidos que conducen a la muerte.
- Establecer diferentes protocolos terapéuticos preventivos o correctivos que permitan lograr la supervivencia de los animales tratados con DL<sub>99</sub> de Cas III-ia y Cas II-gli.



# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en tres fases. La primera se encargó de establecer las DL<sub>50</sub> y DL<sub>99</sub>. En una segunda fase se realizó la medición de los cambios fisiopatológicos y se caracterizaron los efectos tóxicos de ambos tipos de Casiopeínas® a nivel cardiorrespiratorio. En una tercera fase se establecieron diferentes protocolos de tratamiento con el fin de evitar la muerte de los animales sometidos a dosis letales de Cas III-ia.

Para correlacionar los hallazgos obtenidos con lo que puede ocurrir en un paciente con cáncer, en un caso se realizó ecocardiografía mientras se administraba una dosis letal de Cas III-ia a un paciente terminal destinado a eutanasia.

#### Preparación y Anestesia

Como protocolo anestésico común para las fases descritas, se indujo la anestesia con tiletamina-zolacepam (Zoletil® Virbac-México) 4 mg/kg IV. Posteriormente, se rasuraron las áreas correspondientes a las venas cefálicas y arteria femoral. Se canalizó la vena cefálica derecha y se mantuvo con solución salina fisiológica 0.9% a razón de 1.6 ml/kg/h. El tiempo transcurrido antes de la profundización anestésica fue de 10 minutos; para ello se utilizó pentobarbital sódico (Anestesal® Pfizer-México) 24 mg/kg IV, administrando la mitad del volumen total en bolo y la otra mitad a efecto. Posteriormente se introdujo una sonda endotraqueal para asegurar la viabilidad de la vía respiratoria.

#### Establecimiento de la seguridad del protocolo anestésico

Para definir la influencia de la anestesia en la toxicidad de las Casiopeínas® en estudio, se llevaron a cabo cuatro eventos anestésicos sin la aplicación de Casiopeínas® pero midiendo las variables cardíaca y respiratoria.

### Medición de variables fisiológicas (común para las tres fases).

Se utilizó un monitor de parámetros fisiológicos (Life-Window™ 6000V Digicare Biomedical Technology Inc. Fl. USA); que midió las siguientes variables:

- Electrocardiografía (ECG): número de complejos/minuto, morfología del trazo en DII, posibles alteraciones en la morfología de los trazos, posibles arritmias.
- Frecuencia cardíaca (FC): número de latidos por minuto.
- Oximetría de pulso (saturación de oxígeno sanguíneo): %PO<sub>2</sub>
- Temperatura (°C)
- Presión arterial sistémica (presión sistólica, diastólica y media): mmHg
- Capnografía (Et CO<sub>2</sub>); presión de CO<sub>2</sub> al final de la espiración: mmHg
- Frecuencia respiratoria (FR): número de respiraciones por minuto.

Los registros se realizaron durante todo el evento anestésico y experimental. El tiempo transcurrido del inicio de la anestesia hasta la administración de la Casiopeína fue de aproximadamente 40 minutos, dentro de los cuales se tomaron 10 minutos de mediciones basales, posteriormente se mantuvo el registro constante hasta la muerte del animal.

### FASE I. ESTABLECIMIENTO DE LA DL<sub>50</sub> Y DL<sub>99</sub>

Para la primera fase del estudio se seleccionaron un total de 52 perros. Los animales fueron sometidos previamente a examen físico y pruebas hematológicas (hemograma, bioquímica sérica y urianálisis). Se seleccionaron animales de entre 2 a 7 años de edad con un peso promedio de  $16.8 \pm 2.2$  kg.

Se les alojó en el área de Investigación y Enseñanza Quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se mantuvieron en observación durante 48 horas previas al experimento con agua y alimento *ad libitum* mismos que fueron retirados 10 horas antes de la aplicación de la anestesia la cual ya ha sido explicada en detalle.

El cuadro 3 muestra las dosis empleadas para ambos tipos de Casiopeina en un número variable de perros para determinar la DL<sub>99</sub> y DL<sub>50</sub>.

#### Análisis estadístico de la primera fase:

Los valores anteriores se incorporaron a una relación de probabilidad (eje de las "y") Vs. dosis (eje de las "x") y se establecieron curvas de regresión obtenidas con la función de Boltzmann\* con el programa "Origin Pro 7.5".

---

\*Modelo de Boltzmann: modelo que permite predecir el comportamiento de una serie de datos dentro de una distribución de probabilidad.

Dosis Cas III-ia	Número de perros	Dosis Cas II-gli	Número de perros
3 mg/Kg	4	1 mg/Kg.	1
4 mg/Kg	3	2 mg/Kg	1
5 mg/Kg	1	5 mg/Kg	1
7 mg/Kg	2	6 mg/Kg	6
8 mg/Kg	7	8 mg/Kg	4
10 mg/Kg	12		

Cuadro 3. Dosis empleadas para ambos tipos de casiopeína en un número variable de perros para determinar la DL<sub>99</sub> y DL<sub>50</sub>

Para esta segunda fase del estudio se seleccionaron 12 perros de raza mestiza tomados del grupo de animales utilizado para la primera fase. Los primeros seis perros (3 hembras y 3 machos) fueron utilizados para la medición de los efectos tóxicos de Cas III-ia y seis perros más (3 hembras y 3 machos) para caracterizar la toxicidad de Cas II-gli. Todos los perros se mantuvieron bajo las mismas condiciones de alojamiento y exámenes previos descritos en la fase anterior.

Estos animales fueron sometidos a la  $DL_{99}$  mientras se realizaba la medición de variables fisiológicas explicada anteriormente.

Cas III-ia y Cas II-gli fueron diluidas previamente en 100 ml de dextrosa al 5% y administradas IV durante 30 minutos.

### Análisis estadístico de la segunda fase:

Los datos obtenidos durante la segunda fase se presentan en el cuadro 5 como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las gráficas y el análisis estadístico fueron realizados con el programa "Origin Pro 7.5". Se aplicó la prueba "Anova" para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados.

FASE III. EVALUACIÓN DE LOS ESQUEMAS TERAPÉUTICOS PARA PREVENIR O CONTRARRESTAR LA TOXICIDAD LETAL DE Cas III-ia Y Cas II-gli.

En la tercera etapa del estudio se seleccionaron 12 perros (3 perros por cada esquema terapéutico), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para realizar el tratamiento de los efectos tóxicos de Cas III-ia y así tratar de evitar la muerte de los animales. Posteriormente se sometieron a diferentes protocolos de tratamiento como se indica en el cuadro 4.

Los animales sometidos a la tercera fase de la experimentación recibieron de igual manera una dosis de Tiletamina-Zolacepam (4 mg/kg/IM) y luego profundizados con pentobarbital sódico (24 mg/kg/IV). Se incluye en la figura 2 (control), los efectos de Tiletamina-Zolacepam y Pentobarbital, los cuales demuestran ser inocuos para el individuo. Después de la anestesia, se administraron las Casiopeínas<sup>®</sup> en las mismas condiciones de la primera fase.

Los protocolos empleados en la tercera fase del trabajo, tuvieron como objetivo aumentar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de acción tóxico de las Casiopeínas<sup>®</sup>, además de brindar información útil al médico sobre como evitar dichos efectos secundarios. Junto con cada medicamento nombrado se incluye una breve monografía que afirma las bases del tratamiento empleado.

### Protocolo No. 1

- Nitroglicerina; 0.5 µg/kg/min/IV (Nitratos orgánicos)
- Furosemida; 2 mg/Kg/IV (Diuréticos de asa)

La furosemida fue administrada por vía IV 10 min antes de la administración de Cas III-ia. Se administró Nitroglicerina por la misma vía en cuanto se observaron los primeros signos de disnea (previos a la muerte del animal). Se trataron tres animales con Cas III-ia a dosis de 10 mg/kg.

- Nitratos orgánicos: la nitroglicerina es un vasodilatador relajante del músculo liso arterial y venoso. La venodilatación origina decremento de la presión al final de la sístole de ambos ventrículos. De esta manera la presión arterial disminuye, especialmente la presión arterial pulmonar contrarrestando el edema, afectando muy poco la frecuencia cardíaca

(28). Además la nitroglicerina colabora en la restitución del flujo sanguíneo coronario durante la isquemia (29). El mecanismo de acción de los nitratos orgánicos consiste en la formación del radical libre reactivo, óxido nítrico (NO), que pueden activar la ciclasa de guanililo y aumentar la síntesis de cGMP en músculo liso (30, 31). La biotransformación es hepática, catalizada por la enzima reductasa de glutation-nitrato orgánico (32). La acción se consigue entre 1-4 minutos y su vida media es de 1-3 minutos.

- Diuréticos de asa: la furosemida, es un inhibidor de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  que actúa en la rama ascendente gruesa del asa de henle. De esta manera aumentan la liberación de solutos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y agua hacia fuera del asa permitiendo la diuresis (33, 34). También posee acción inhibitoria sobre la anhidrasa carbónica aumentando la excreción urinaria de  $\text{HCO}_3^-$  y fosfato. Una acción importante relevante al presente estudio consiste en el incremento de la capacitancia venosa sistémica disminuyendo la presión de llenado del ventrículo izquierdo (35) lo que beneficia a los pacientes con edema pulmonar incluso antes de que aparezca la diuresis (36). La acción se inicia entre 5-10 minutos después de la administración IV y su vida media es de 1.5 horas.

### Protocolo No.2

- Dexametasona; 2.2 mg/kg/IV (Glucocorticoides)
- Furosemida; 2 mg/Kg/IV (Diuréticos de asa)

La furosemida se administró de la misma manera que en el protocolo No. 1; Dexametasona fue administrada en cuanto se observaron los signos de disnea. Se trataron tres animales con Cas III-ia a 10 mg/kg.

- Glucocorticoides: los corticosteroides tienen múltiples acciones orgánicas. Particularmente en la terapia de corrección de los efectos de las Casiopeínas<sup>®</sup>, la Dexametasona sería de utilidad al contrarrestar la reacción inflamatoria causante del edema pulmonar (si este fuera el

caso). La supresión de la función leucocitaria (37), posee enorme utilidad clínica especialmente en casos de choque anafiláctico en donde intervienen algunas sustancias pro-inflamatorias. Se sabe que los glucocorticoides inhiben la producción de estos factores por parte de diversas células que se requieren para que surja la respuesta inflamatoria. Como resultado hay disminución de la producción de factores vasoactivos y quimioatrayentes, la secreción de enzimas proteolíticas y la extravasación de leucocitos en zonas de lesión.

### Protocolo No. 3

- Acepromacina; 1.1 mg/kg/IV

Se administró Acepromacina vía IV, 10 minutos antes de Cas III-ia a dosis de 10 mg/kg. En total se trataron tres animales.

- Derivados fenotiacínicos: la Acepromacina es un derivado fenotiacínico que produce sedación en animales al ser un inhibidor de la dopamina y un potente hipotensor. Sus efectos se observan a los pocos segundos de la inyección intravenosa y se presume que tienen un efecto protector de la membrana celular y que puede prevenir el daño pulmonar causado por algunos agentes tóxicos (38).

### Protocolo No. 4

- Carvedilol; 6.25 mg/kg/PO/12 horas
- Furosemida; 2 mg/kg/IV

El carvedilol fue administrado por vía oral cada 12 horas durante 7 días. La furosemida se aplicó de la misma forma que los protocolos No. 1 y No. 2. Se utilizaron tres animales con Cas III-ia a 10 mg/kg.

- Antagonistas de los receptores beta-adrenérgicos: carvedilol, es un bloqueador beta que ha recibido una enorme atención clínica por su

eficacia para tratar la hipertensión, la cardiopatía isquémica, algunos tipos de arritmias y más recientemente un poderoso efecto captador de radicales libres (39). En pacientes con presión normal, por lo general no hay disminución de presión arterial. Sin embargo, este fármaco baja la presión en animales y seres humanos hipertensos. Se ha propuesto que el bloqueo realizados por los beta-adrenérgicos es responsable de la inhibición de la renina en el aparato yuxtaglomerular (40).

**Cuadro 4. Protocolos terapéuticos usados con el fin de disminuir o evitar los efectos tóxicos de las Casiopeínas®**

### PROCOLO 1 (3 PERROS)

Nitroglicerina; 0.5µg/kg/min/IV \*

Furosemida; 2 mg/Kg/IV \*\*

\* Se administró cuando se observaron los signos de edema

\*\* Administrada 10 min antes de la infusión de Casiopeína

Adaptado de: KITTLESON, Mark. Medicina cardiovascular de pequeños animales. Multimédica. España, 2000

### PROCOLO 2 (3 PERROS)

Dexametasona; 2.2mg/kg/IV \*

Furosemida; 2 mg/Kg/IV \*\*

\* Se administró cuando se observaron los signos de edema

\*\* Administrada 10 min antes de la infusión de casiopeína

Adaptado de: Bonagura John D. Terapéutica Veterinaria de pequeños animales XIII. Mc Graw Hill. 2001

### PROCOLO 3 (3 PERROS)

Acepromacina 1.1 mg/Kg/IV \*

\* A cambio de Zoletil®

Adaptado de: Townsley M, Taylor E, Korthuis R. Promethazine or DPPD pretreatment attenuates oleic acid-induced injury in isolated canine lungs. J. Appl. Physiol 59(1):39-46,1985

### PROCOLO 4 (3 PERROS)

Carvedilol 6.25 mg/perro/PO/12 h/7 días \*

Furosemida 2 mg/kg/IV \*\*

\* Vía oral durante 7 días antes de administrar Casiopeína

\*\* Administrada 10 min antes de la infusión de Casiopeína

Adaptado de: Oliveira P, Gonçalves L, Monteiro P, Providencia L, Moreno A. Are the Antioxidant Properties of Carvedilol Important for the Protection of Cardiac Mitochondria? Current Vascular Pharmacology, 2005, 3, 147-158  
147



# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS**

### RESULTADOS

#### Establecimiento de la seguridad del protocolo anestésico:

Inicialmente se estableció un grupo control para descartar la posibilidad que los cambios observados durante cada fase del experimento tuvieran relación con la administración de tiletamina-zolacepam (Zoletil®-Virbac) y pentobarbital sódico (Anestesal®-Pfizer).

En la figura 2 se presentan las tendencias de las variables estudiadas. De los 8 perros anestesiados en ningún caso se presentaron variaciones que sugirieran la presentación de una urgencia anestésica. Los valores numéricos individuales así como medias y desviaciones estándar se presentan en el anexo A al final de este escrito. La duración de la anestesia fue de 162.5 min  $\pm$  19.3 min DE y los animales se incorporaron en 183.7 min con un rango de 165 a 200 min. No se detectaron efectos adversos clínicos posteriores a la anestesia.

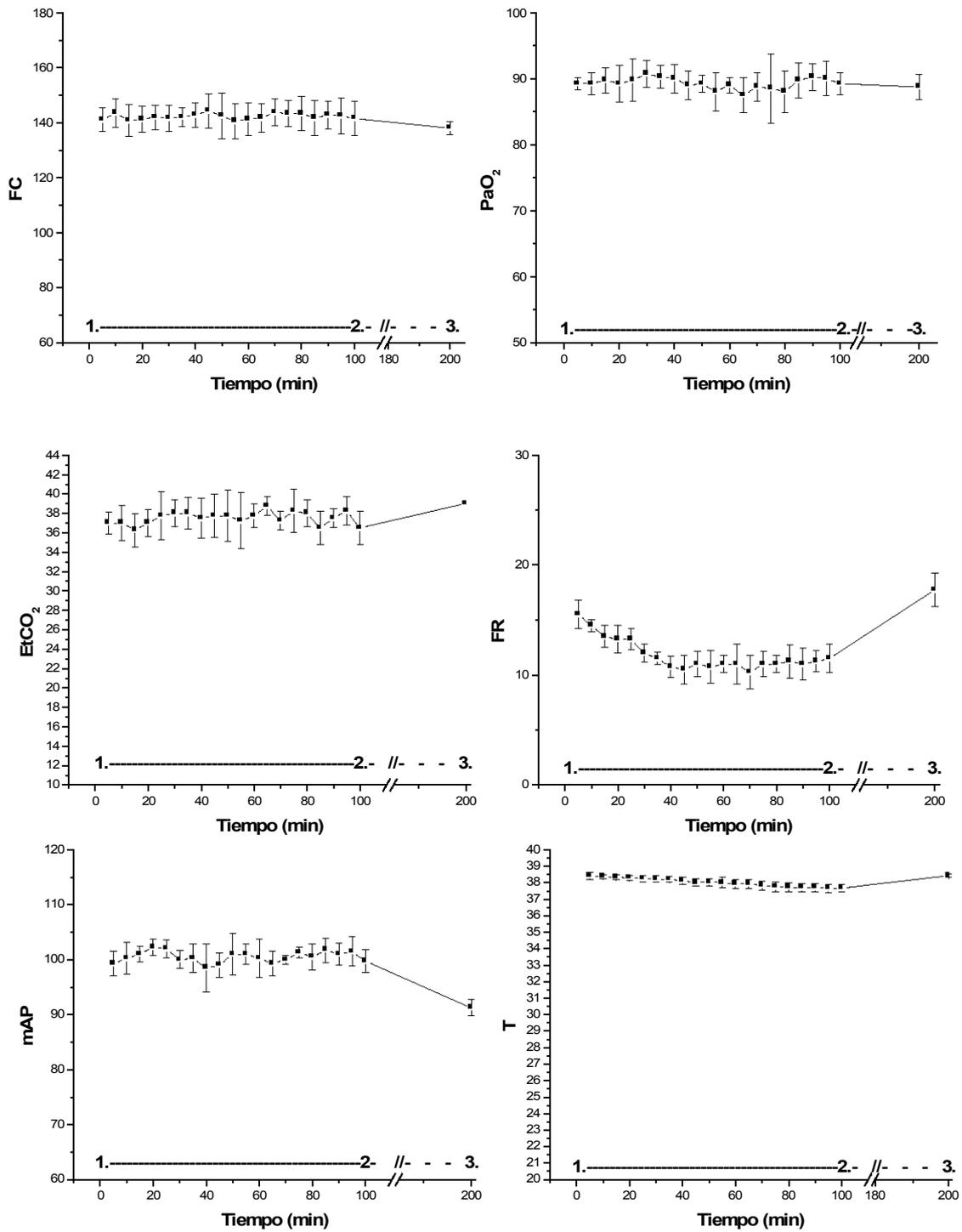


Figura 2. Efectos de Tiletamina-Zolacepam y Pentobarbital sobre: Frecuencia cardíaca, FC (lats/min); Saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); Saturación de CO<sub>2</sub> al final de la espiración, EtCO<sub>2</sub>(mmHg); Frecuencia respiratoria, FC (resp/min); Presión arterial media, mAP (mmHg); Temperatura, T (°C).

Evento 1: Profundización con pentobarbital sódico

————— Período anestésico

- - - - Período de recuperación

Evento 3: Recuperación

FASE I. OBTENCIÓN DE LA DL<sub>50</sub>-DL<sub>99</sub> PARA Cas III-ia Y Cas II-gli

La relación entre dosis y letalidad para ambas Casiopeínas® se resume en el cuadro 5 y en la figura 3 para la Cas III-ia y figura 4 para la Cas II-gli se presentan gráficamente los valores de la  $DL_{50}$  y  $DL_{99}$  para Cas III-ia que fueron de 7 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente, vía IV en una infusión en dextrosa al 5% con duración de 30 minutos. Estos mismos datos para la Cas II-gli fueron de 4.5 mg/kg y 8 mg/kg para la  $DL_{50}$  y  $DL_{99}$  respectivamente. Para las figuras mencionadas se utilizó un modelo de regresión múltiple basada en el modelo de Boltzmann, con una  $R^2= 0.9124$  para Cas III-ia y  $R^2= 0.9468$  para Cas II-gli.

Considerando que las dosis empleadas en quimioterapia contra el cáncer son dadas en  $mg/m^2$ , las  $DL_{50}$  y  $DL_{99}$  para Cas III-ia fueron de 140 y 200  $mg/m^2$  respectivamente y las  $DL_{50}$  y  $DL_{99}$  para Cas II-gli fueron de 100 y 160  $mg/m^2$  respectivamente.

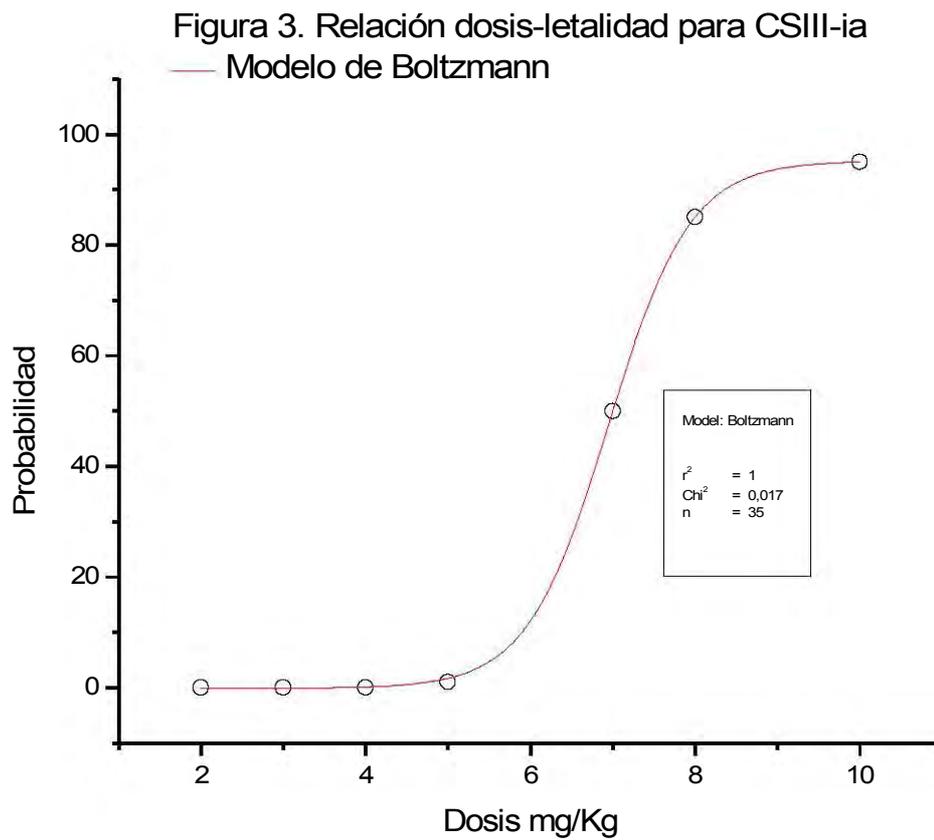


Figura 3. Curva de regresión múltiple con el modelo de Boltzmann en la que se establece la letalidad de la Casiopeína III-ia

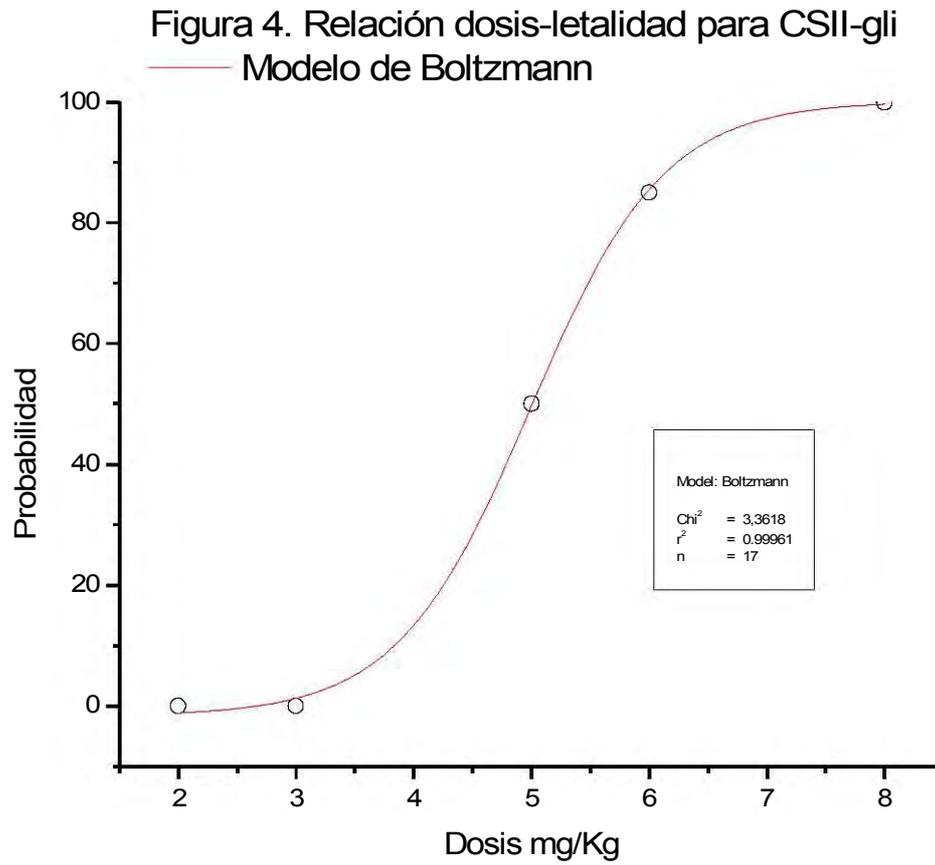


Figura 4. Curva de regresión múltiple con el modelo de Boltzmann en la que se establece la letalidad de la Casiopeína II-gli

### FASE II. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE LAS Cas III-ia Y Cas II-gli

Todos los animales sometidos a la administración de Cas III-ia, 10 mg/kg/IV y Cas II-gli, 8 mg/kg/IV, murieron a causa de edema pulmonar agudo entre 30 y 50 minutos después de terminada la administración. En ambos casos el signo clínico más evidente fue el desarrollo de disnea mixta<sup>1</sup>, aumento de frecuencia respiratoria, estertores a la auscultación de campos pulmonares y finalmente expulsión de líquido transparente y espumoso por la sonda endotraqueal. También se observó para los dos fármacos, aumento importante de la presión arterial durante la infusión endovenosa de las Casiopeínas<sup>®</sup>, misma que empezó a disminuir cuando se interrumpió la administración. A continuación se detallan los cambios más significativos durante cada parte del experimento.

#### *Período de infusión IV de Casiopeínas<sup>®</sup>:*

Durante los 30 minutos correspondientes al período de infusión, se detectaron algunos cambios estadísticamente significativos ( $P < 0.05$  en todos los casos).

La presión arterial media (mAP) en el caso de Cas III-ia se incrementó de  $117.9 \pm 2.5$  DE mmHg hasta  $132.6 \pm 6.8$  DE mmHg; por su parte, mAP para Cas II-gli también se incrementó de  $108.6 \pm 0.4$  DE mmHg hasta  $131.5 \pm 4.2$  DE mmHg. La frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, PaO<sub>2</sub> y temperatura para ambas Casiopeínas<sup>®</sup> no tuvo cambios significativos. Otro hallazgo importante consiste en la observación de la disminución de EtCO<sub>2</sub> solo para Cas III-ia de  $38 \pm 0.2$  DE mmHg a  $31.3 \pm 2.5$  DE mmHg. (Veáse figuras 5, 6 y cuadro 5).

#### *Período de crisis*

Treinta a cincuenta minutos después del terminado el período de infusión, los efectos tóxicos de ambas Casiopeínas<sup>®</sup> se hicieron aparentes. Todos los animales en los dos grupos presentaron primero insuficiencia respiratoria

---

<sup>1</sup> Dificultad respiratoria en ambos eventos de la respiración (inspiración y espiración)

restrictiva como el signo más importante que se intentó compensar con el incremento de la frecuencia respiratoria de  $16.5 \pm 3.2$  DE respiraciones/min hasta  $21.5 \pm 8.16$  DE respiraciones/min en el caso de Cas III-ia; y de  $12.2 \pm 0.8$  DE respiraciones/min hasta  $16.6 \pm 8.8$  DE respiraciones/min para Cas II-gli observando un pico de elevación en este parámetro hasta de 60 respiraciones/min para Cas III-ia y 50 respiraciones/min para Cas II-gli entre 18-25 minutos de terminado el período de infusión, seguido de lo cual, se presenta el paro respiratorio. También se observa disminución en EtCO<sub>2</sub> que comienza de  $38 \pm 0.2$  DE mmHg hasta  $8.1 \pm 2.7$  DE mmHg en Cas III-ia; y deDEe  $35.1 \pm 2.1$  DE mmHg hasta  $11.2 \pm 5.3$  DE mmHg para Cas II-gli. La presión arterial media (mAP) cae de  $117.9 \pm 2.5$  DE mmHg hasta  $51.4 \pm 21.3$  DE mmHg para Cas III-ia; y de  $108.6 \pm 0.4$  DE mmHg hasta  $49.4 \pm 20.6$  DE mmHg en el caso de Cas II-gli; la frecuencia cardíaca cae hasta un valor medio de  $63.1 \pm 16.5$  DE latidos/min de un valor previo de  $158.2 \pm 0.4$  latidos/min para Cas III-ia y  $56.8 \pm 21.6$  DE latidos/min de un valor previo de  $148 \pm 0.8$  DE latidos/min para Cas II-gli. Consecuentemente la PaO<sub>2</sub> fue reducida hasta un valor medio de  $26.5\% \pm 7.6$  DE de un valor previo de  $82.5\% \pm 0.3$  DE para Cas III-ia y  $37.5\% \pm 12.9$  DE de un previo  $88.6\% \pm 0.8$  DE para Cas II-gli como se presenta en las figuras 5, 6 y en el cuadro 5.

### *Desarrollo del edema pulmonar y muerte*

Seguido de lo anterior se desarrolla el edema pulmonar agudo manifestado por la salida de abundante líquido espumoso por la sonda endotraqueal y finalmente se produce la muerte del animal aproximadamente entre 2-3 min de observado el edema. Todos los cambios son presentados en las figuras 5 y 6 y en el cuadro 5 para ambos tipos de Casiopeína (Cas III-ia y Cas II-gli), respectivamente.

**Cuadro 5. Resultados obtenidos para cada variable antes, durante y después de la administración de Cas III-ia (10mg/Kg IV en 30 min, en un volumen de 100 mL de dextrosa 5%) y Cas II-gli (8mg/Kg IV en 30 min, en un volumen de 100 mL de dextrosa 5%)**

Fármaco	Variables	Inducción Anestésica	Período anestésico (40 min)	Período de Infusión (30 min)	Período de latencia	Disnea y muerte (5-10 min entre la disnea y la muerte)
Cas III-ia	FC (lats/min)		158.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	150.8 ± 11.1 <sup>a</sup>		63.1 ± 16.5 <sup>b</sup>
	FR (resp/min)		16.5 ± 3.2 <sup>a</sup>	20.08 ± 2.18 <sup>a</sup>		21.5 ± 8.16 <sup>a</sup>
	PaO <sub>2</sub> (%)	10min	82.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	84.8 ± 3.6 <sup>a</sup>	30-50 min	26.5 ± 7.6 <sup>b</sup>
	EtCO <sub>2</sub> (mmHg)		38 ± 0,2 <sup>a</sup>	31.3 ± 2.5 <sup>b</sup>		8.1 ± 2.7 <sup>c</sup>
	mAP (mmHg)		117.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	132.6 ± 6.8 <sup>b</sup>		51.4 ± 21.3 <sup>c</sup>
	T (°C)		38 ± 0.05 <sup>a</sup>	36.9 ± 0.2 <sup>a</sup>		33.1 ± 0.7 <sup>c</sup>
Cas II-gli	FC (lats/min)		148 ± 0.8 <sup>a</sup>	142.6 ± 0.7 <sup>a</sup>		56.8 ± 21.6 <sup>b</sup>
	FR (resp/min)		12.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	12 ± 0.11 <sup>a</sup>		16,6 ± 8.8 <sup>b</sup>
	PaO <sub>2</sub> (%)	10 min	88.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	87.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	30-50 min	37.5 ± 12.9 <sup>b</sup>
	EtCO <sub>2</sub> (mmHg)		35.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	34.7 ± 0.3 <sup>a</sup>		11.2 ± 5.3 <sup>b</sup>
	mAP (mmHg)		108.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	131.5 ± 4.2 <sup>b</sup>		49.4 ± 20.6 <sup>c</sup>
	T (°C)		38,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	37 ± 0,2 <sup>a</sup>		34,9 ± 0,4 <sup>b</sup>

a, b, c: literales distintos dentro de una misma fila significan una diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

# Resultados

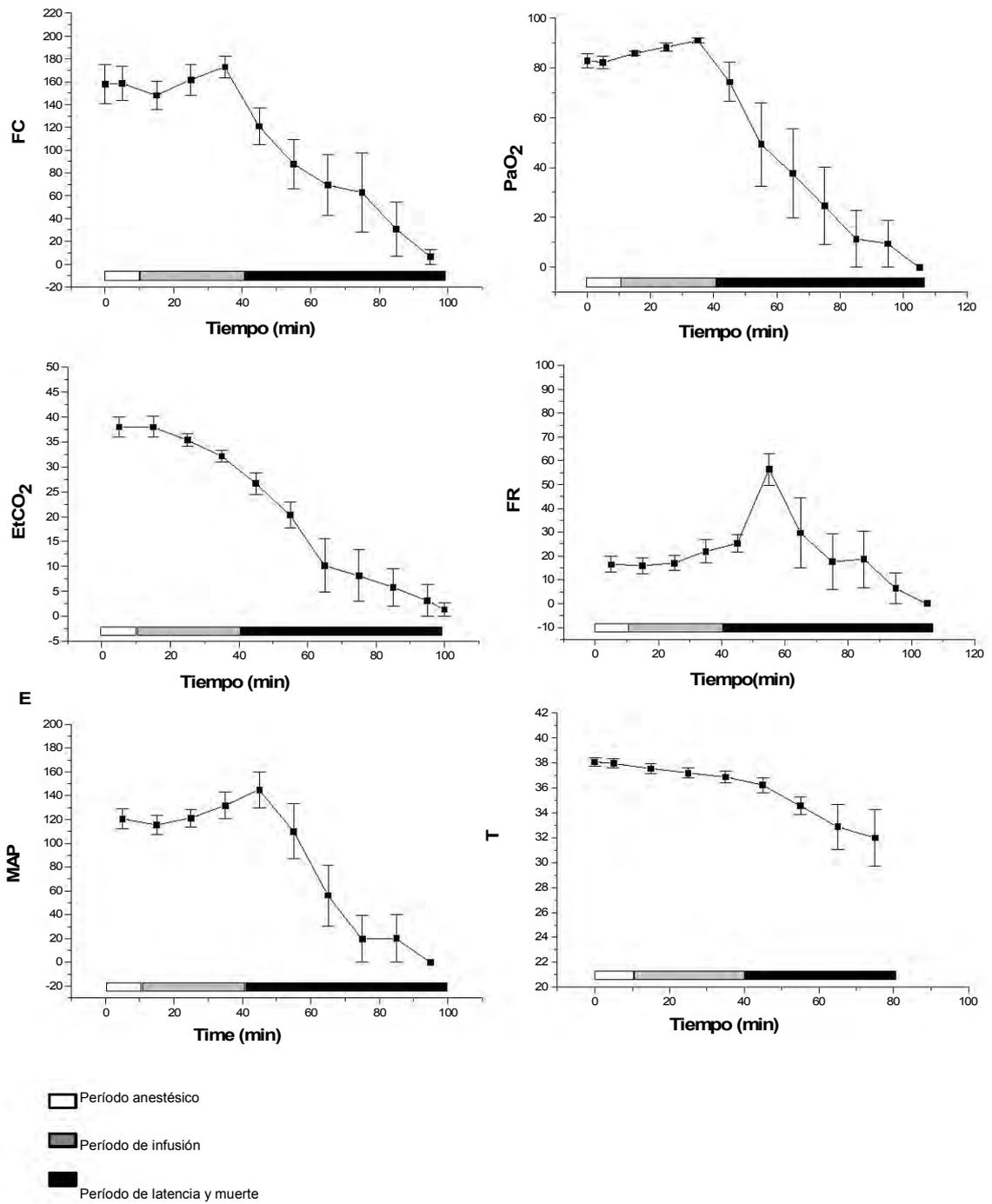


Figura 5. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg sobre: frecuencia cardíaca, FC (lats/min); saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); saturación de CO<sub>2</sub> al final de la espiración, Et CO<sub>2</sub>(mmHg); frecuencia respiratoria, FC (resp/min); presión arterial media, mAP (mmHg); temperatura, T (°C). El fármaco fue administrado en solución dextrosa 5% (100ml) durante 30 min.

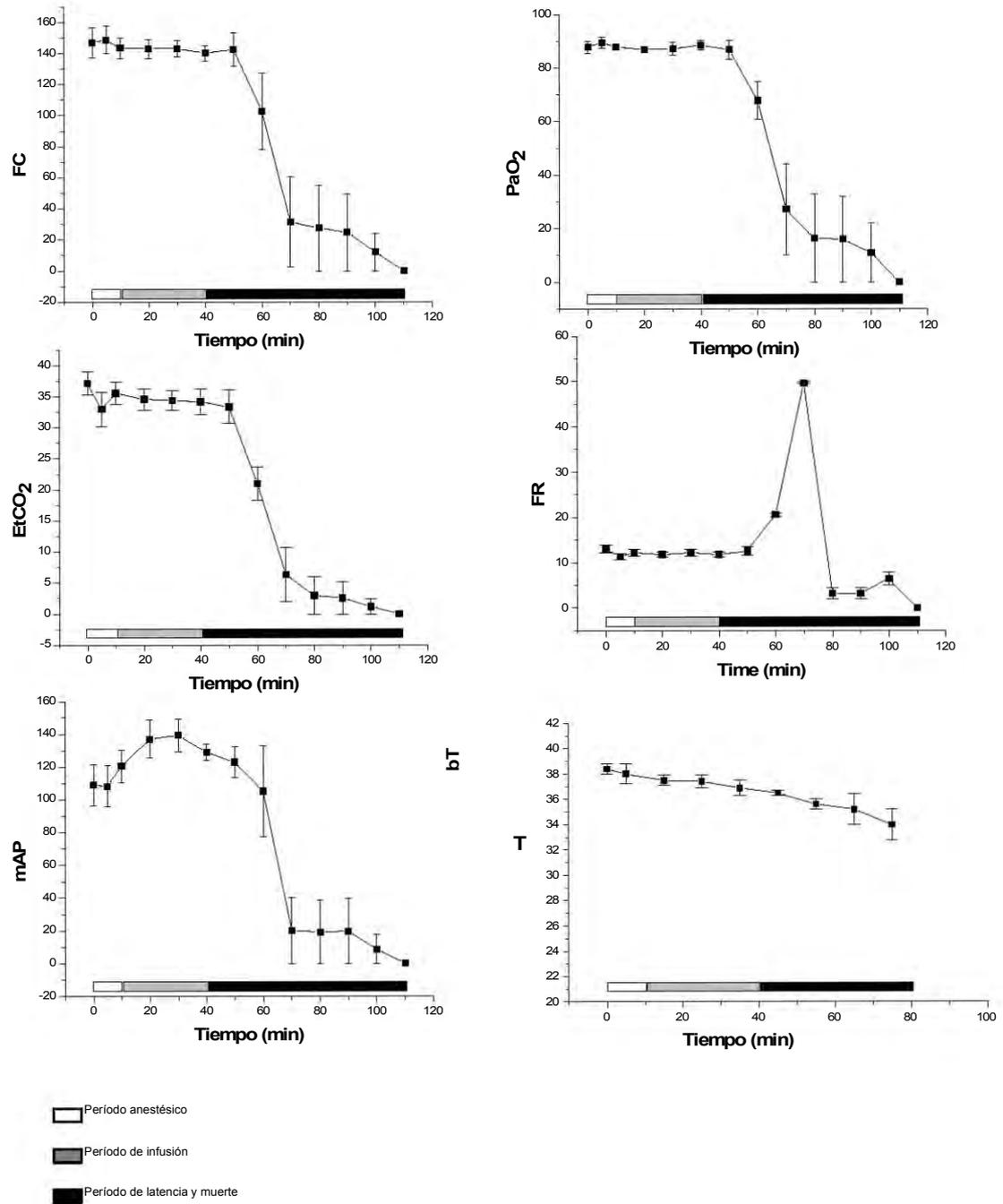


Figura 6. Efectos de Casiopeína II-gli 8mg/kg sobre: frecuencia cardíaca, FC (lats/min); saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); saturación de CO<sub>2</sub> al final de la espiración, Et CO<sub>2</sub>(mmHg); frecuencia respiratoria, FC (resp/min); presión arterial media, mAP (mmHg); temperatura, T (°C). El fármaco fue administrado en solución dextrosa 5% (100ml) durante 30 min.

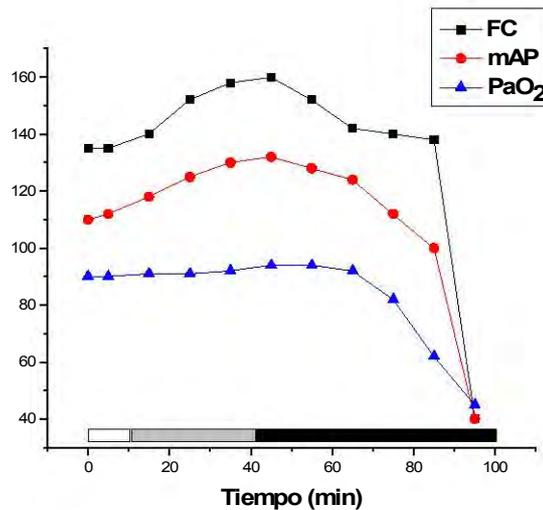
### FASE III. PROTOCOLOS TERAPÉUTICOS PARA PREVENIR O CONTRARRESTAR LA CRISIS AGUDA INDUCIDA POR Cas III-ia.

#### Protocolo 1.

La intervención farmacológica con vasodilatadores (nitratos orgánicos), específicamente nitroglicerina (0.5 µg/kg/min/IV), junto con un diurético de asa (furosemida 2mg/kg/IV), no evitó la muerte de los individuos los cuales recibieron la infusión de Cas III-ia a dosis de 10 mg/kg.

La nitroglicerina fue administrada cuando se empezaron a observar los primeros signos de disnea considerando su farmacocinética. Por otro lado la furosemida fue aplicada 10 minutos antes de la Casiopeína para dar un margen de tiempo y lograr su acción diurética. Además se administró un bolo adicional de furosemida cuando se observó el edema pulmonar.

Aproximadamente 25 minutos después de finalizada la administración de Casiopeína, se observaron los mismos signos que preceden a la muerte con Cas III-ia a 10mg/kg/IV/30 min; 15 minutos después de este último evento, la muerte se produjo de manera abrupta después de observar la caída súbita de los signos vitales de la misma forma que sin medicación, es decir, después del desarrollo de disnea y edema pulmonar agudo (Véase figura 7).



Período anestésico  
 Período de infusión  
 Período de latencia y muerte

n arterial media, mAP (mmHg); T5) una misma fila significan una diferencia estadística.  Figura 7. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg sobre: frecuencia cardíaca, FC (lats/min); saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); Presión arterial media, mAP (mmHg);. El fármaco fue administrado en solución dextrosa 5% (100ml) durante 30 min. Barra blanca: período anestésico; barra gris: período de infusión; barra negra: período de latencia y muerte. Nota: el animal recibió una dosis en bolo de furosemda 2 mg/kg/IV 10 min antes de la administración de Cas III-ia y una dosis de Nitroglicerina 0.5µg/kg/min/IV cuando se observó el primer síntoma de insuficiencia respiratoria. (Protocolo 1).

Protocolo 2.

En los individuos que recibieron una dosis pre-Casiopeína de furosemida y una dosis antichoque de corticoide se observaron exactamente los signos ya descritos en el protocolo 1. (Véase figura 8).

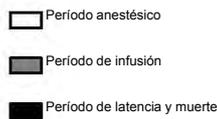
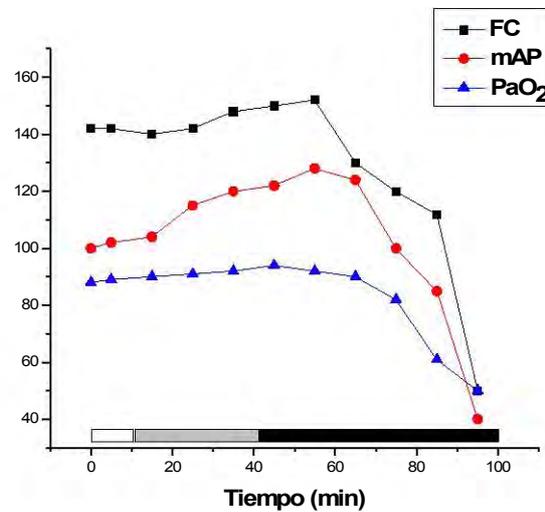
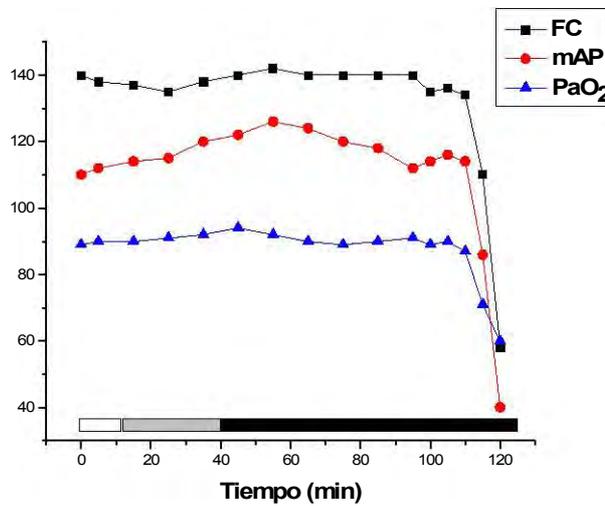


Figura 8. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg sobre: Frecuencia cardíaca, FC (lats/min); Saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); Presión arterial media, mAP (mmHg). El fármaco fue administrado en solución dextrosa 5% (100ml) durante 30 min. Barra blanca: período anestésico; barra gris: período de infusión; barra negra: período de latencia y muerte. Nota: el animal recibió una dosis en bolo de furosemida 2 mg/kg/IV 10 min antes de la administración de Cas III-ia y una dosis de Dexametasona 2.2 mg/kg/IV cuando se observó el primer síntoma de insuficiencia respiratoria (Protocolo 2).

Protocolo 3.

Con el tercer protocolo, en el que se contempló el uso de acepromacina, 10 minutos antes de la infusión con Cas III-ia se logró el retraso de la muerte de los animales en aproximadamente 80 minutos en comparación con lo observado durante la primera fase (véase figura 9). Una vez transcurrido este período la muerte se produjo de la manera ya descrita.



Período anestésico  
 Período de infusión  
 Período de latencia y muerte

Figura 9. Efectos de Casiopeína III-ia 10mg/kg sobre: Frecuencia cardíaca, FC (lats/min); Saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); Presión arterial media, mAP (mmHg). El fármaco fue administrado en solución dextrosa 5% (100ml) durante 30 min. Barra blanca: período anestésico; barra gris: período de infusión; barra negra: período de latencia y muerte. Nota: el animal recibió una dosis de 1.1 mg/kg/IV de acepromacina 10 minutos antes de la administración de Cas III-ia. (Protocolo 3).

### Protocolo 4.

Por último, el protocolo No. 4 en el que se mantuvo durante 7 días la administración oral de carvedilol (6.25mg/kg y furosemida 2 mg/kg/IV 10 minutos pre-Casiopeína); produjo un retraso de la muerte del animal en aproximadamente 5 horas (310 minutos) como se observa en la figura 10. Inicialmente el animal recibió la dosis de Casiopeína durante 30 minutos y posteriormente se observó estabilidad fisiológica hasta el minuto 200 donde tuvo que ser desconectado del fisiógrafo debido a que despertó de la anestesia. El individuo permaneció sin signos clínicos hasta el minuto 310 cuando desarrolló edema pulmonar y murió. Algunos minutos antes de la muerte, al observar los primeros signos de edema pulmonar, se aplicó una dosis adicional de furosemida en bolo a 2 mg/Kg/IV.

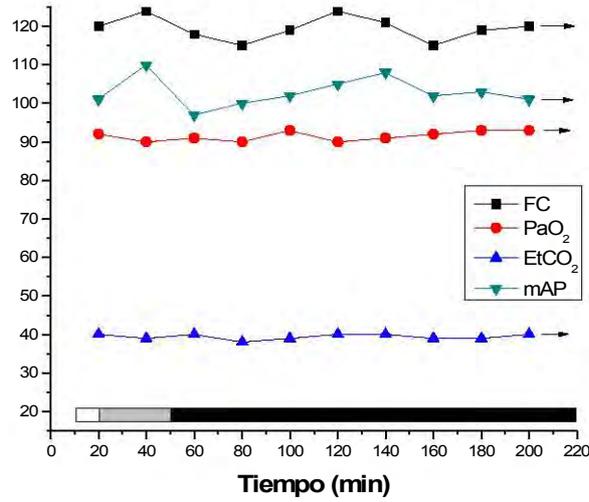


Figura 10. Efectos de Casiopeína III-a 10mg/kg sobre: Frecuencia cardíaca, FC (lats/min); Saturación de oxígeno sanguíneo, PaO<sub>2</sub>(%); Saturación de CO<sub>2</sub> al final de la espiración, EtCO<sub>2</sub>(mmHg); Presión arterial media, mAP (mmHg). El fármaco fue administrado en solución de infusión; barra blanca: período anestésico; barra gris: período de latencia y muerte. Nota: el animal recibió una dosis de 6.25mg/kg/PO/12h de Carvedilol durante 8 días previos a la administración de Cas III-a. (Protocolo 4). El animal despertó de la anestesia en el minuto 200 y se mantuvo en la fisiología clínica hasta el minuto 310, momento en el cual murió repentinamente.

### RESULTADOS ECOCARDIOGRÁFICOS

Se presentan las imágenes ecocardiográficas de un animal tratado con Cas III-ia a 10 mg/Kg como dosis letal 99 y evaluar de esta manera los eventos dinámicos del corazón en el momento en que ocurren.

La figura 11 permite observar la luz del ventrículo izquierdo en el evento diastólico, durante la estabilización anestésica con Zoletil (4mg/Kg/IV), seguida por la aplicación de pentobarbital sódico (24 mg/kg IV). En esta imagen se aprecia el espacio normal correspondiente al ventrículo durante el llenado.

La figura 12 muestra los primeros cambios generados durante la administración de Cas III-ia que indican un “aplastamiento” del ventrículo.

Por último en la figura 13 se aprecia dicho signo de “aplastamiento” evidente cuando se presenta la disnea previa a la muerte del animal.

Figura 11. Luz del ventrículo izquierdo durante la diástole previa a la administración de Cas III-ia a dosis letal.

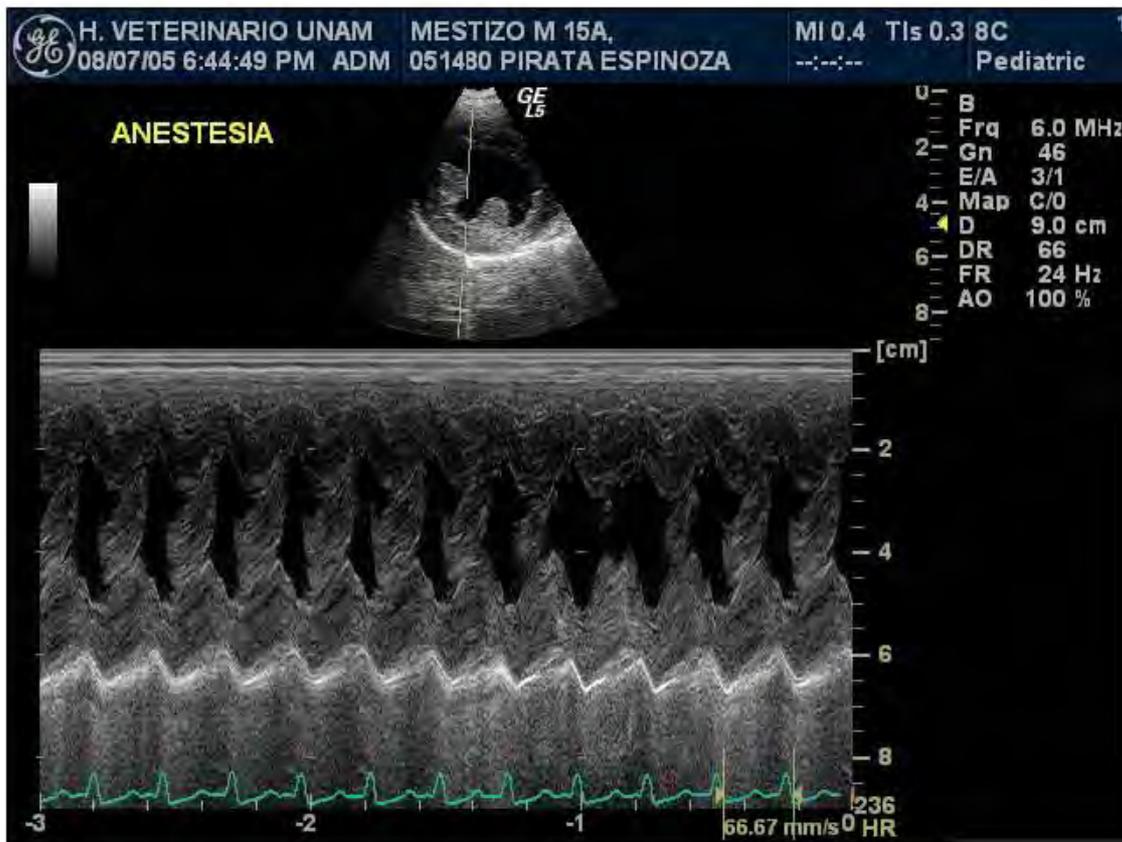


Figura 12. Inicio del signo de “aplastamiento que precede a los signos principales que conllevan a la muerte por edema pulmonar.

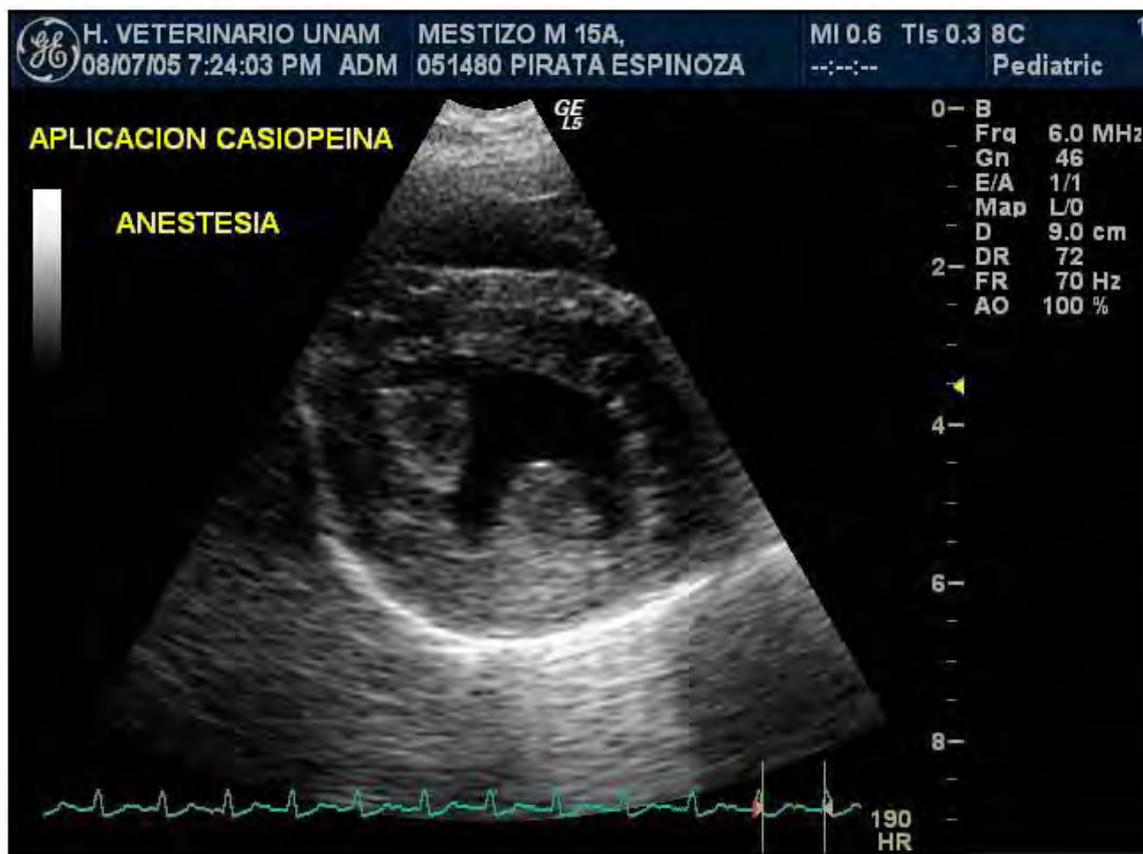


Figura 13. Ventrículo izquierdo con evidente disminución en la luz debido a hipertensión pulmonar y subsecuente hipertensión del ventrículo derecho.





# **CAPÍTULO 4**

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

Es costumbre utilizar animales experimentales para predecir comportamientos farmacológicos en el ser humano (42).

En muchos países el uso de perros se encuentra limitado para estudios de toxicidad aguda en función del apego de esta especie con el hombre (42). Sin embargo, en este estudio se consideró ético incluir como modelo experimental a perros destinados a eutanasia. De la misma manera no hubiese resultado ético inducir la toxicidad letal en perros concientes. Por ello, fue necesario inducir la toxicidad aguda bajo anestesia general. Para tal fin se estableció un protocolo anestésico basado en la aplicación inicial de tiletamina-zolacepam (Zoletil-Virbac® 4 mg/Kg/IV), seguido a los 10 minutos de la administración de pentobarbital sódico (Anestesal-Pfizer® 24 mg/Kg/IV). Esta combinación no se ha reportado en la literatura especializada y fue necesario hacer registros de las variables respiratorias y cardiovasculares durante todo el evento anestésico para tener la certeza de que no había cambios que pusieran en peligro la vida de los animales experimentales. En la figura 2 y anexo A al final del presente trabajo, se puede constatar que no existen cambios significativos en variables clave como: frecuencia respiratoria, capnografía, oximetría de pulso, frecuencia cardíaca, presión arterial y temperatura corporal. Los animales anestesiados con la combinación presentada se recuperan por completo a los 183.7 minutos con un rango de 165-200 minutos, momento en el cual se inicia el periodo de conciencia. Por la regularidad de los registros y la recuperación sin eventos de la anestesia es posible asegurar que se tiene una mínima interferencia anestésica con la toxicidad a probar de las Casiopeínas®.

Para establecer la  $DL_{99}$  de las Cas III-ia y Cas II-gli, se procuró utilizar el mínimo de sujetos posible iniciando la dosificación con los niveles terapéuticos de 1 mg/Kg y extendiéndose hasta 10mg/Kg en el caso de Cas III-ia y 8mg/Kg para Cas II-gli. Con los datos de mortalidad y una regresión utilizando el modelo de Boltzmann se llegó a los valores de  $DL_{99}$  ya especificados con una  $P < 0.01$ .

De esta fase, se notó que la muerte sobrevinía principalmente por edema pulmonar agudo (ver figura 14) y las dosis que se utilizarían para caracterizar dicha muerte serían las mencionadas (DL<sub>99</sub>).

Aunque no se ha referido una dosis terapéutica para estas sustancias se cree que el rango terapéutico fluctúa entre 1 y 3 mg/Kg (24). Por lo tanto la aplicación de hasta tres veces este valor puede representar un buen margen de seguridad para pacientes humanos con patologías agregadas y justifica el modelo empleado en este ensayo.

Los efectos de la administración de las Cas III-ia y Cas II-gli a velocidad de infusión de 100/ml/30 minutos y a las dosis señaladas son muy parecidos de manera tal que se describe en conjunto lo que sucede. Los pacientes anestesiados son considerados estables o con variaciones mínimas en los parámetros medidos a los 40 minutos y es en este tiempo cuando se aplicaron las Casiopeínas®. La aplicación *per se* no altera substancialmente las variables medidas pero aproximadamente 40 minutos después de terminada la infusión se desencadenan los siguientes eventos en orden cronológico:

1. Incremento en la frecuencia respiratoria
2. Observación de mucosas cianóticas
3. Disminución en los valores de EtCO<sub>2</sub>
4. Aumento de la presión arterial
5. Disminución drástica de los valores de oximetría
6. Inversión de la onda T electrocardiográfica
7. Salida de líquido transparente por la sonda endotraqueal
8. Paro respiratorio
9. Muerte

Dada la secuencia descrita se puede especular sobre la fisiopatología del evento haciendo que el análisis de los datos y los signos clínicos observados permiten sugerir dos etiologías que actúan con base en el desacoplamiento de la respiración mitocondrial, el cual ya ha sido reportado para las Casiopeínas® (25). Estas dos causas de edema pulmonar (tratadas más adelante), podrían

iniciarse en una cascada de eventos que implicarían a la Casiopeína como el agente lesivo mitocondrial (a dosis letales).

La interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial haría que disminuyan los niveles de ATP celular en este caso cardíacos, lo que conllevaría a la insuficiencia mecánica de este órgano (insuficiencia cardíaca), con la correspondiente liberación de sustancias vasoactivas que producen vasoconstricción. La insuficiencia cardíaca *per se* produce aumento de la presión arterial generando hipertensión pulmonar y edema por incremento de presión hidrostática (42, 43), (Edema pulmonar cardiogénico).

Por otro lado, la falla mecánica celular produce hipoxia y si ésta persiste aun por breves espacios de tiempo produce el síndrome de isquemia-reperusión en el que el período hipóxico es seguido por una brusca re-oxigenación del tejido, lo que causa que el oxígeno en forma de radical libre sea liberado por las células e interactúe con las membranas celulares de cualquier órgano, en este caso las del endotelio lo que hace que aumente su permeabilidad a nivel del capilar pulmonar (44), y se produzca la salida de líquido (Edema pulmonar no cardiogénico).

Un importante hallazgo que escasamente permitió la supervivencia de los animales por un tiempo más prolongado y aportó información sobre el mecanismo de acción tóxico de ambos tipos de Casiopeínas®, consistió en el uso de carvedilol, un antagonista de los receptores beta-adrenérgicos que ha sido usado como hipotensor y últimamente ha recibido gran atención por su actividad captadora de especies reactivas de oxígeno. El empleo de carvedilol por 8 días previos a la administración endovenosa de casiopeína III-ia confirma en gran medida la liberación de radicales libres producida por el fármaco y puede ser una herramienta valiosa para evitar la cardiotoxicidad aguda inducida por el fármaco.

Sin embargo es necesario demostrar con estudios posteriores que en efecto existe la destrucción por radicales libres ya que este efecto no concuerda con la actividad sugerida como efecto super oxido dismutasa.

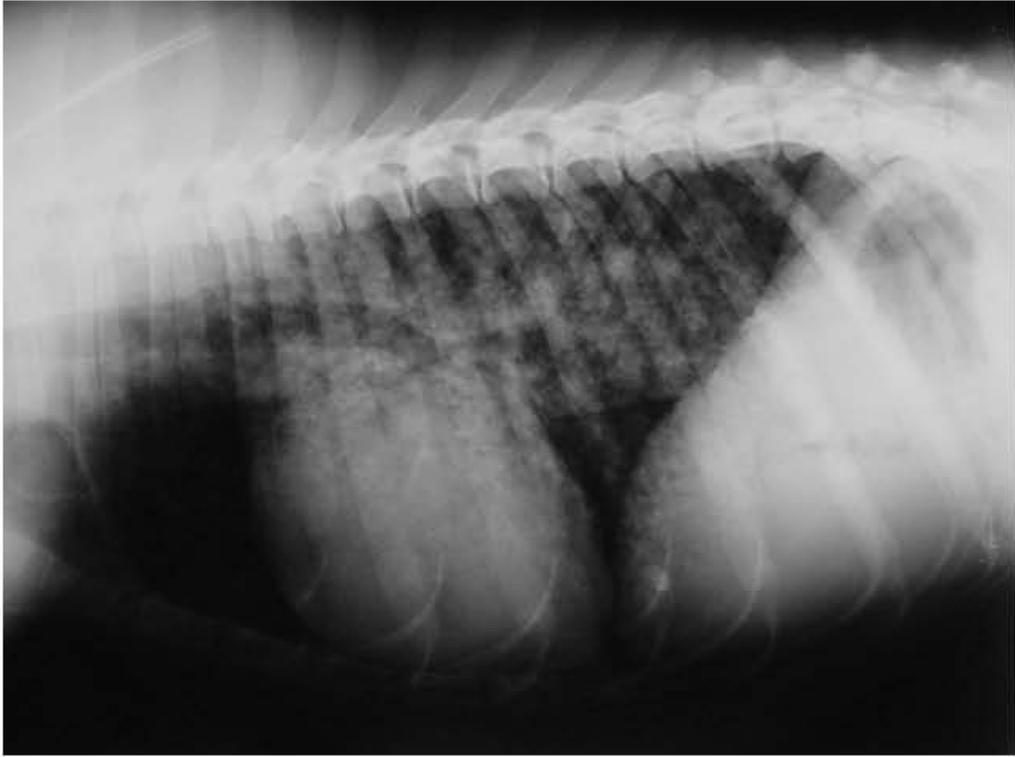
No obstante, ya existe evidencia por microscopia electrónica e histopatología que apoya dicha destrucción celular inducida por especies reactivas de oxígeno.

De cualquier manera se desarrolla un edema pulmonar como patología central y hay daño cardíaco a las dosis señaladas. Desafortunadamente los protocolos destinados a salvaguardar la vida de los animales sometidos a las Casiopeínas<sup>®</sup> no fueron suficientes y sólo se logró la prolongación por unas horas especialmente con el uso de protectores celulares como acepromacina y captadores de radicales libres como ya ha sido descrito. Esto refuerza la teoría presentada de que hay un efecto por especies reactivas de oxígeno sobre las células cardíacas, pulmonares y endoteliales lo que deberá comprobarse en estudios posteriores.

Estos estudios de toxicidad aguda deberán complementarse con estudios de toxicidad subcrónica con la aplicación de esquemas preventivos de captadores de radicales libres para determinar la cantidad de mg/m<sup>2</sup> que puede soportar un animal a dosis terapéuticas. De cualquier manera estos estudios hacen patente que las Casiopeínas<sup>®</sup> pueden ser extremadamente tóxicas si se aplican por vía endovenosa a las dosis ya dichas. Sin embargo, el uso de Casiopeínas<sup>®</sup> en seres humanos, requerirá de dosis mucho menores a las empleadas en el presente trabajo, razón por la cual podemos considerar la tolerancia de los pacientes sometidos al tratamiento y esperar un margen de seguridad alto, en especial si estas dosis terapéuticas son acompañadas con el uso prolongado de captadores de radicales libres, previos a la administración de la quimioterapia.

Figura 14. Patrón bronquial propio del edema pulmonar causado por la administración de Cas III-ia y Cas II-gli a dosis letales.





## REFERENCIAS

1. Alberts B, Bray D. Biología molecular de la célula. 3ª ed. Ediciones Omega, 2002.
2. Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. 3ª ed. Scientific American books, 1996.
3. Karp G. Biología Celular y Molecular. Mc Graw Hill Interamericana, 1998.
4. Paniagua R. Biología Celular. 2ª ed. Mc Graw Hill, 2003.
5. Allan B, Gray J. The Genetics and Genomics of Cancer. Nature Genetics Supplement. Vol 33, Marzo de 2003.
6. Real Academia de la Lengua, Diccionario de español. 22ª ed. editorial Espasa, 2002.
7. Pan American Health Organization. Special Program for Health Analysis Technical Information System: Regional Mortality Database, 2001.
8. Dirección General de Epidemiología. Anuarios de Morbilidad 1984-2004.
9. [Jankowski MK](#), [Schnurr PP](#), [Adams GA](#), [Green BL](#), [Ford JD](#), [Friedman MJ](#). A mediational model of PTDE in World War II veterans exposed to mustard gas. J. Trauma Stress. 17(4):303-10, 2004.
10. Babini J. Historia de la Medicina. Editorial Gedisa, 2000.
11. Katzung B. Farmacología Básica y Clínica. 8ª ed. Manual moderno, 2002.
12. Dobson J, Gorman N. Cancer Chemotherapy in Small Animal Practice. Blackwell Scientific Publications, 1993.

13. Stockley I. Drug Interactions. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Scientific publications, 1994.
14. De Boer G. Drug Absorption enhancement. Harwood Academic Publishers, 1994.
15. Strom B. Pharmacoepidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley Pensilvania University, 2000.
16. Bakke OM, Cladellas CX, García AF. Ensayos clínicos con medicamentos; fundamentos básicos metodología y práctica. Editorial Doyma. España, 1994.
17. Monge A. Evolución de los métodos de búsqueda y descubrimiento de fármacos. Introducción a la química farmacéutica. 2<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill, España, 2001
18. Collichio F, Griggs J, Rosenblatt J. Conceptos básicos sobre el desarrollo de los fármacos y los ensayos clínicos. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 8<sup>a</sup> ed. Elsevier Science. España, 2003.
19. Ruiz Ramírez L. U.S. Patent A.21, 1992. Number 5, 1027,005. US patent Re 35,458 February 18, 1997. US Patent November 19,1996. Number 5,576,326. 407543 SECOFI; 1993.
20. Galassetti PR, Nemet D, Pescatello A, Rose-Gottron C, Larson J. Exercise, caloric restriction and systemic oxidative stress. J. Investig Med. (2):67-75, 2006.
21. Ferrer-Sueta G, Ruíz-Ramirez L, Radi R. Ternary copper complexes and manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin catalyze peroxynitrite-dependent nitration of aromatics. Chem. Res. Toxicol. 10:1338- 44, 1997.

22. Arnaudeau C, Tenorio-Miranda E, Jenssen D, Helleday T. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res.* 461:221-8, 2000.
23. Trejo S, Palencia G, Zuniga S, Gracia Mora I, Ruiz Ramirez L. Cas Igly induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia.* 7(6):563-74, 2005.
24. De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Muller A, Ruiz-Ramirez L, Howarth JA, Dobrota M. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology.* 15;194(1-2):103-13, 2003.
25. Moreno R, Carvajal K. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drug casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and applied pharmacology.* 2005
26. Ruiz-Ramírez. Knighth's move in the periodic table, from cooper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeína, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal based drugs.* Vol 8 No. 1, 2001.
27. Gómez-Eusebio. Determinación de la toxicidad aguda de Casiopeína en perros. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM, 1992.
28. Goodman A. editor. Bases farmacológicas de la terapéutica. 10<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill, 2003.
29. Lawrence D. Richard G, Warren J, Harvey G. Effects of Nitroglycerin on Regional Myocardial Blood Flow in Coronary Artery Disease. *J. Clin. Invest.* 50(8): 1578–1584, 1971.

30. Kamisaki Y, Waldman SA, Murad F. The involvement of catalytic site thiol groups in the activation of soluble guanylate cyclase by sodium nitroprusside. *Arch Biochem Biophys.* 251(2):709-14, 1986.
31. Molina CR, Andresen JW, Rapoport RM, Waldman S, Murad F. Effect of *in vivo* nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 10(4):371-8, 1987.
32. Needleman P, Key S L, Denny S E, Isakson P C. Mechanism and modification of bradykinin-induced coronary vasodilation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(6): 2060–2063, 1975.
33. [Dirks JH](#), [Seely JF](#). Effect of saline infusions and furosemide on the dog distal nephron. [Am J Physiol.](#) 219(1):114-21, 1970.
34. [Dormans TP](#), [Pickkers P](#), [Russel FG](#), [Smits P](#). Vascular effects of loop diuretics. [Cardiovasc. Res.](#) 32(6):988-97, 1996.
35. [Johnston GD](#), [Hiatt WR](#), [Nies AS](#), [Payne NA](#), [Murphy RC](#), [Gerber JG](#). Factors modifying the early nondiuretic vascular effects of furosemide in man. The possible role of renal prostaglandins. [Circ Res.](#) 53(5):630-5, 1983.
36. [Dormans TP](#), [van Meyel JJ](#), [Gerlag PG](#), [Tan Y](#), [Russel FG](#), [Smits P](#). Diuretic efficacy of high dose furosemide in severe heart failure: bolus injection versus continuous infusion. [J Am Coll Cardiol.](#) 28(2):376-82, 1996.
37. [Karalis K](#), [Mastorakos G](#), [Sano H](#), [Wilder RL](#), [Chrousos GP](#). Somatostatin may participate in the antiinflammatory actions of glucocorticoids. [Endocrinology.](#) 136(9):4133-8, 1995.
38. Townsley M, Taylor E, Korhuis R. Promethazine or DPPD pretreatment attenuates oleic acid-induced injury in isolated canine lungs. *J. Appl. Physiol* 59(1):39-46,1985.

39. Oliveira P, Gonçalves L, Monteiro P, Providencia L, Moreno A. Are the Antioxidant Properties of Carvedilol Important for the Protection of Cardiac Mitochondria? *Current Vascular Pharmacology*, 3,147-158 147, 2005.
40. Frishman WH. Multifactorial actions of beta-adrenergic blocking drugs in ischemic heart disease: current concepts. *Circulation*. 67(6 Pt 2):111-8, 1983.
41. Tallarida R, Jacob L. The dose-response, Relation in pharmacology. Springer-Verlag. New York, 1979.
42. Morton D, Griffiths P. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. [Vet Rec](#). 20;116(16):431-6, 1985.
43. Kittleson M. Medicina cardiovascular de pequeños animales. Multimédica. España, 2000.
44. Brian K. Geppert E. The Pulmonary Manifestations of Left Heart Failure. *Chest*. 125;669-682, 2004.
45. Nelson R. Medicina interna de pequeños animales. 2ª ed. Intermédica. Buenos aires, 2000.
46. Bonagura JD. Terapéutica Veterinaria de pequeños animales XIII. Mc Graw Hill, 2001.

## ANEXO A

Valores numéricos individuales, medias y desviaciones estándar del grupo control que estableció la seguridad del protocolo anestésico.

	PERRO 1	PERRO 2	PERRO 3	PERRO 4	Media	DE
Duración de la anestesia (min)	185	170	140	155	162.5	19.3
Tiempo de despertar desde el inicio (min)	200	190	165	180	183.7	14.9