



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS TÓXICOS AGUDOS DE
LAS CASIOPEÍNAS III-ia[®] y IIgly[®] EN PERROS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LUIS ENRIQUE GARCÍA ORTUÑO

TUTOR: Biól. MC ISABEL GRACIA MORA
COMITÉ TUTORAL: Dr. FERNANDO CONSTANTINO CASAS
Dr. JAN BOUDA

México, D.F.

2007

DEDICATORIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres:

Sra. Rosario Ortuño Maldonado y Sr. José Luis García Ortiz.

En agradecimiento por su infinito amor, paciencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores y maestros: MC Isabel Gracia, Dr. Fernando Constantino y Dr Jan Bouda, por su exigencia, sinceridad, confianza y apoyo, pero principalmente por enseñarme el camino correcto para hacer ciencia.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por darme la confianza y oportunidad de participar en su intención por un mundo mejor.

A mis sinodales Dr. Héctor Sumano López y MVZ MC Joaquín Aguilar Bobadilla, por el tiempo y atención dedicado a la revisión y estudio de la tesis.

A las personas que participaron en cierta medida con su esfuerzo y conocimiento, para la elaboración de este trabajo. MV MC Marco Leal García, MVZ EAPV Carlos Cedillo Peláez, Dra. Graciela Tapia, QFB Guadalupe Mendoza.

A la persona más allegada a mi, a quien comparte muy de cerca mis logros, pero también mis defectos, Wendy Fonseca Aguilar.

Al apoyo económico proporcionado por el proyecto CONACYT-2002-C01-7677 y a la beca de maestría otorgada por el CONACYT y la Dirección General de Estudios de Posgrado UNAM

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Cáncer.
- 1.2. Quimioterapia.
- 1.3. Casiopeínas.
- 1.4. Estudios preclínicos de los fármacos.
- 1.5. Estudios de toxicidad aguda.
- 1.6. Estudios clínicos de los fármacos.

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

- 4.1. Objetivo general.
- 4.2. Objetivos específicos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- 5.1. Selección de animales.
- 5.2. Diseño experimental.
 - 5.2.1. Anestesia y conexión al fisiógrafo.
 - 5.2.2. Administración de Casiopeína y toma de muestras.
- 5.3. Procedimientos diagnósticos.
 - 5.3.1. Fisiógrafo.
 - 5.3.2. Hemograma.
 - 5.3.3. Bioquímica sanguínea.
 - 5.3.4. Urianálisis.
 - 5.3.5. Determinación del equilibrio ácido-base.
 - 5.3.6. Necropsia.
 - 5.3.7. Histopatología.

5.3.8. Microscopía electrónica.

5.4. Análisis estadístico.

6. RESULTADOS

6.1. Casiopeína III-ia.

6.1.1. Signos clínicos y fisiógrafo.

6.1.2. Hemograma.

6.1.3. Bioquímica sanguínea.

6.1.4. Equilibrio ácido-base.

6.1.5. Hallazgos en la necropsia y peso de los órganos.

6.1.6. Evaluación histopatológica.

6.1.7. Evaluación ultraestructural.

6.2. Casiopeína IIgly.

6.2.1. Signos clínicos y fisiógrafo.

6.2.2. Hemograma.

6.2.3. Bioquímica sanguínea.

6.2.4. Equilibrio ácido-base.

6.2.5. Hallazgos en la necropsia y peso de los órganos.

6.2.6. Evaluación histopatológica.

6.2.7. Evaluación ultraestructural.

7. DISCUSIÓN

8. CONCLUSIONES

9. REFERENCIAS

RESUMEN

Las Casiopeínas son una familia de compuestos de coordinación de cobre(II) como centro metálico. Estos fármacos han demostrado importante actividad antineoplásica por diversos mecanismos de acción. El objetivo del presente trabajo fue realizar estudios preclínicos de las Casiopeínas III-ia y IIgly para evaluar los efectos tóxicos agudos en perros. Se utilizaron 6 perros (por fármaco) clínicamente sanos, los cuales fueron anestesiados con pentobarbital y se les administró 10 mg/kg de peso EV de Casiopeína III-ia y 8 mg/kg de peso EV de Casiopeína IIgly, en un volumen de 100 mL, durante 30 min. Durante la administración del fármaco, los perros se encontraban conectados a un fisiógrafo para determinar constantes fisiológicas. Se tomaron muestras para hemograma, bioquímica sanguínea, urianálisis y equilibrio ácido-base, antes y después de la administración de las Casiopeínas. Los perros mueren por efecto del fármaco en un tiempo promedio (después de terminada la administración) de 24.8 min para Casiopeína III-ia y 7.2 min para Casiopeína IIgly. Se realizó la necropsia y se tomaron muestras para evaluación histopatológica y ultraestructural. Los signos clínicos en los perros previo a la muerte fueron: disnea, taquipnea, cianosis y salida de líquido por la sonda endotraqueal. El fisiógrafo indicó disminución abrupta de las constantes fisiológicas. En el equilibrio ácido-base se encontró acidosis metabólica por ganancia de ácidos. En la necropsia los pulmones estaban edematosos. Por histopatología se apreció sobredistensión vascular de arterias pulmonares y edema pulmonar. Ultraestructuralmente, en miocardio se encontró desarreglo de miofibrillas, así como mitocondrias aumentadas de tamaño y con pérdida en las crestas mitocondriales. Nuestros resultados sugieren que las Casiopeínas pueden tener efectos cardiotóxicos afectando a mitocondrias cardiacas, lo cual disminuye el aporte energético produciendo así insuficiencia cardiaca aguda y de manera secundaria edema pulmonar cardiogénico por incremento en la presión hidrostática en pulmones. Finalmente la muerte ocurre por insuficiencia cardio-respiratoria.

Palabras clave: casiopeína, cáncer, perro, toxicidad aguda, edema pulmonar.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cuerpo humano está formado por más de 10^{14} células, miles de millones de estas células sufren mutaciones cada día rompiendo potencialmente los controles normales de proliferación. Lo que resulta más peligroso, es que una mutación de este tipo puede proporcionar a una célula cierta ventaja selectiva, permitiendo que se divida más rápidamente que sus vecinas convirtiéndose entonces en la formadora de una célula cancerosa.¹

El cáncer es considerado una enfermedad genética resultado de un cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyas funciones normales están relacionadas con un buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas las células del organismo.²⁻⁴

Las células neoplásicas se caracterizan por 2 propiedades genéticas que las distinguen de las no neoplásicas: 1) se dividen a pesar de las restricciones normales y 2) invaden y colonizan tejidos reservados a otras células. La combinación de estas dos características es lo que puede hacer que el cáncer sea particularmente peligroso. Esta capacidad invasiva implica generalmente la habilidad de las células neoplásicas para liberarse y entrar en el torrente sanguíneo o vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros tejidos del cuerpo.^{1,4}

De acuerdo con el modelo de incidencias múltiples, el cáncer se origina por un proceso de selección clonal no muy diferente de la selección de animales individuales en una población. Una mutación en una célula le confiere una ventaja de proliferación; posteriormente, la progenie de esa célula sufre una segunda mutación que le permitirá proliferar en una forma más descontrolada y formar un pequeño tumor benigno. Una tercera mutación en una célula dentro de este tumor le permitirá superar el crecimiento de las demás y su progenie formará una masa de células, cada una de las cuales tendrá estas 3 mutaciones. Una mutación

adicional en una de estas células le permitirá a la progenie escapar al torrente sanguíneo y establecer colonias en otros sitios, la característica principal del cáncer metastático.^{5,6} La transformación maligna puede ser vista ahora en términos de alteraciones específicas de un reducido número de reguladores genéticos que trabajan dentro de las células para controlar el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular.⁴

Se han establecido 3 etapas en el desarrollo del cáncer: 1) la “iniciación”, que es el proceso por el cual un daño crítico al ADN se hace permanente en la célula, debido a que esta se divide antes de que se repare o bien por una falla en el proceso de reparación; 2) la “promoción”, que se define como el proceso mediante el cual determinados sucesos epigenéticos influyen de forma selectiva en la proliferación de la célula iniciada y 3) la “progresión”, que implica la producción de mutaciones genéticas que aparecen a medida que la población celular se divide y por lo tanto se desarrolla el cáncer.⁷

Dado que el cáncer puede ser una enfermedad genética, se han podido identificar más de 100 genes que habitualmente se encuentran alterados en esta patología. Dichos genes se agrupan en 2 grandes grupos, en función de si el cáncer se produce por un exceso de actividad de su producto génico (ganancia de función) o por su falta de actividad (pérdida de función). Los genes del primer grupo se llaman proto-oncogenes y el gen hiperactivo debido a una mutación se denomina oncogen. Los genes del segundo grupo se llaman genes supresores de tumor.^{3,5,8}

Un oncogen es cualquier gen que codifica una proteína capaz de transformar las células de un cultivo o de inducir cáncer en animales o humanos. De los muchos oncogenes conocidos, todos, salvo escasas excepciones derivan de genes celulares normales (proto-oncogenes), cuyos productos participan en las vías de control de crecimiento celular. La conversión o la activación de un proto-oncogen a oncogen suele comprender una mutación con ganancia de función. Por lo menos tres mecanismos pueden producir oncogenes a partir de los correspondientes proto-oncogenes: 1) mutaciones en un proto-oncogen que genera un producto

proteico activo, 2) reduplicación localizada (amplificación génica) de un segmento de ADN que incluye un proto-oncogen, lo que conduce a la expresión excesiva de la proteína codificada, 3) traslocación cromosómica que ubica un gen regulador del crecimiento bajo el control de un estimulador diferente e induce la expresión inadecuada del gen.^{1,6}

Por lo general los genes supresores de tumor codifican proteínas que inhiben la proliferación celular de alguna manera. La pérdida de uno o más de estos “frenos” contribuye al desarrollo de numerosos tipos de cáncer. Por lo general se reconocen 5 clases amplias de proteínas codificadas por genes supresores de tumor: 1) proteínas intracelulares que regulan o inhiben un estadio específico del ciclo celular, 2) receptores de hormonas secretadas que actúan como inhibidores de la proliferación celular, 3) proteínas de control de puntos clave que detienen el ciclo celular si está dañado el ADN, 4) proteínas que estimulan la apoptosis y 5) enzimas que participan en la reparación del ADN. Los genes supresores de tumor de muchos tipos de cáncer presentan mutaciones puntuales que impiden la síntesis de alguna proteína o conducen a la producción de una proteína no funcional.^{1,6}

En la actualidad el cáncer es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en el mundo; anualmente se registran más de 10 millones de nuevos casos y más de 6 millones de defunciones por esta enfermedad. En el mundo hay más de 20 millones de personas con diagnóstico de cáncer. Según las proyecciones, para el 2020 se registrarán anualmente 15 millones de nuevos casos de cáncer y 10 millones de defunciones por esta enfermedad.⁹

El cáncer es, sin duda, una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico en México desde finales del siglo XX, convirtiéndose en un problema de salud pública, no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo individuales y ambientales con los que se asocia.¹⁰ En el año 2004 se registraron en México 473,417 defunciones, 55.3% sucedieron en hombres y 44.7% en mujeres. Las enfermedades del corazón, la diabetes mellitus

y los tumores malignos son las tres causas con mayores porcentajes de defunciones en el país, el valor porcentual de los decesos por dichas causas en mujeres (17.8%, 16%, y 14%, respectivamente) es mayor al de los hombres (15.2%, 10.8% y 11.4%). En los varones los tumores malignos representaron la segunda causa de muerte de este grupo demográfico con 29 mil 797 defunciones, lo cual significó 11.4% de los fallecimientos de hombres. En las mujeres, se ubica en el tercer lugar de las principales causas de muerte con 32 mil 443 decesos, es decir, 14.9% de las defunciones en la población femenina. En los hombres, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año corresponden a los de tráquea, bronquios y pulmón (15.5%), próstata (15.2%) y estómago (9.4%). En las mujeres, 14.5% de las defunciones por cáncer maligno corresponden a los del cuello del útero (cervico-uterino) y 13.3% más al de mama; así mismo, el hígado y las vías biliares ocasionó 8.1% de las muertes.¹¹

1.2. Quimioterapia

Entre los tratamientos comúnmente utilizados se encuentran: radioterapia, cirugía y quimioterapia.¹² La quimioterapia consiste en el uso de sustancias químicas para destruir o prevenir el crecimiento, multiplicación y diseminación de las células malignas. Es uno de los métodos terapéuticos más importantes para combatir el cáncer¹³ y presenta ciertas ventajas debido a su capacidad para tratar neoplasias que han causado metástasis, dado que la radioterapia y la cirugía son adecuadas sólo para padecimientos en zonas localizadas, sin embargo, cuando se utilizan en combinación ofrece mayores posibilidades para el paciente.^{14,15} La historia de la quimioterapia contra el cáncer es relativamente reciente. Durante los años 50 y principios de los 60 se demostró que diversas sustancias químicas tenían efectos antitumorales en modelos experimentales en animales y fueron investigadas en el tratamiento del cáncer en humanos. Al final de la década de los 60 estaba claro que la quimioterapia sistémica podía inducir remisiones clínicas completas y de larga duración, en una variedad de neoplasias malignas diseminadas. En la actualidad la poliquimioterapia intensiva ha conseguido remisiones clínicas y

curaciones aparentes, en los estadios avanzados de muchos tumores malignos, sin embargo, los tipos de cáncer más habituales del adulto (mama, colon, pulmón y próstata) siguen mostrando respuestas insatisfactorias.¹⁶

Existe una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos antineoplásicos y con muy diversos mecanismos de acción. En términos generales se pueden clasificar en 5 grandes grupos: 1) alquilantes, 2) antimetabolitos, 3) productos naturales, 4) agentes hormonales y antagonistas y 5) agentes diversos (cuadro 1).

De manera particular la aceptación de los agentes metálicos como fármacos avanzó de manera importante cuando se utilizaron compuestos de Pt(II) para tratar cáncer testicular y ovárico. Esto inició en el año de 1965 con los estudios de Rosenberg, Van Camp y Krigas, los cuales de manera fortuita encontraron compuestos del platino capaces de detener el crecimiento tumoral. De esta forma, el primer compuesto metálico autorizado para este propósito fue llamado Cisplatino, $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$.¹⁷ Desafortunadamente la mayoría de los compuestos antineoplásicos utilizados tienen un margen terapéutico muy estrecho y por lo tanto, mayor probabilidad de ocasionar efectos adversos.¹⁸ En general, las células que están experimentando división activa son más susceptibles a los efectos de estos fármacos, por lo tanto, la toxicidad refleja grados variables de daño a las células normales principalmente en médula ósea, tracto gastrointestinal, folículos pilosos y gónadas. Otra desventaja importante a considerar es la resistencia a la quimioterapia que pueden presentar diversos tipos de tumores, lo cual hace que el pronóstico del paciente empeore.^{19,20} Aunado a esto, la dependencia de la industria farmacéutica extranjera provoca que los actuales agentes quimioterapéuticos tengan costos excesivos, lo cual dificulta el acceso de esta terapia a ciertos sectores de la sociedad. Esto ha estimulado el diseño, síntesis y evaluación de muchos nuevos compuestos que puedan presentar menor toxicidad, diferentes propiedades biológicas, mayor actividad antineoplásica y a su vez costos más accesibles.

Cuadro 1. Clasificación de los fármacos quimioterapéuticos antineoplásicos.

GRUPO	TIPO DE FÁRMACO	NOMBRE GENÉRICO
Alquilantes	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina
		Ciclofosfamida
		Ifosfamida
		Melfalán
		Clorambucil
	Etileniminas y metilmelaminas	Hexametilmelaminas
	Tiotepa	
	Alquilsulfonatos	Busulfán
Antimetabolitos	Análogos de ácido fólico	Carmustina
		Estreptozotocina
	Análogos de pirimidina	Triazenos
		Dacarbazina, temozolmida
		Metatroxato
	Análogos de purina e inhibidores relacionados	Fluorouracilo
		Floxuridina
Citarabina		
Gemcitabina		
Mercaptopurina		
Tioguanina		
Productos naturales	Epipodofilotoxinas	Pentostatina
	Camptotecinas	Cladribina
		Fludarabina
	Antibióticos	Etopósido, tenipósido
		Topotecán
		Irinotecán
		Dactinomicina
		Daunorrubicina
Enzimas	Doxorrubicina	
Hormonas y antagonistas	Corticosteroides suprarrenales	Bleomicina
		Mitomicina
	Progestágenos	L-Asparaginasa
	Estrógenos	Prednisona
		Carproato hidroxiprogesterona
	Antiestrógeno	Acetato medroxiprogesterona
	Andrógenos	Acetato de megestrol
		Flutamida
Antiandrógeno	Dietilestilbestrol	
Agentes diversos	Complejos de coordinación con platino	Etinilestradiol
		Tamoxifeno, anastrozol
	Urea sustitutiva	Propionato de testosterona
	Derivados de metilhidrazina	Fluoximesterona
	Supresor de corteza suprarrenal	Leuprolida
	Inhibidor de la cinasa de tirosina	Cisplatino
		Carboplatino
Imatinib		

1.3. Casiopeínas

Los nuevos fármacos surgen de la necesidad de tratar las enfermedades y los síntomas para los cuales no existe una terapia eficaz o de mejorar los tratamientos ya existentes.²¹ Es por ello que a finales de la década de los 70's en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruiz inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos análogos al cisplatino y con posible actividad antineoplásica, generados a partir de metales de transición,^{22,23} de preferencia esenciales biológicamente, con el propósito de disminuir toxicidad y costo, pero que a su vez presenten igual o mejor actividad antineoplásica que el cisplatino.

De esta forma se diseñó la familia de Casiopeínas que es un grupo de compuestos de coordinación de cobre(II) como centro metálico, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O). Estos compuestos ya han sido sintetizados, caracterizados y patentados.²⁴⁻²⁷

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

- 1) estos compuestos deben intercambiar rápidamente solo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- 2) los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante dentro del organismo.
- 3) son necesarios dos ligantes cis monodentados (o uno bidentado) como grupos salientes. Los isómeros trans son inactivos.
- 4) las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- 5) los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.²⁸

Actualmente se han realizado numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* en los cuales las Casiopeínas han demostrado tener una gran actividad antineoplásica a través de diversos mecanismos. Las Casiopeínas han sido eficaces en diferentes líneas neoplásicas dentro de las cuales están: carcinoma ovárico (CH1) y leucemia murina (L1210),²⁹ varios carcinomas cérvico-uterinos,³⁰ glioma C6 de rata,³¹ así como el panel *in vivo* del modelo sugerido por el Cancer Chemotherapy National Service Center, del National Cancer Institute utilizando las líneas de leucemia linfocítica (L1210), sarcoma (S180), melanoma B16 y un clon de L5178 en ratones.²²

Con respecto al mecanismo de acción, se han sugerido diversas vías por las cuales las Casiopeínas pueden ejercer su efecto antineoplásico. Se ha demostrado que interactúan fácilmente con el ADN y estudios *in vitro* muestran que se enlaza a bases púricas y pirimídicas, mediante una interacción de apilamiento.³² Se ha descrito también que debido a la presencia de cobre en su centro puede inducir apoptosis mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO), producto de reacciones de óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weis en la cual participa el cobre. Las ERO pueden causar pérdida del potencial de membrana mitocondrial con cambios en su permeabilidad y liberación de factores apoptogénicos.³¹

Por último, en un estudio demostraron que las Casiopeínas actúan directamente sobre la mitocondria desacoplando la fosforilación oxidativa y la síntesis del ATP, mediante la inhibición de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, lo cual puede comprometer los procesos dependientes de energía dentro de los cuales se encuentra la duplicación celular.³³

1.4. Estudios preclínicos de los fármacos

El descubrimiento de un nuevo fármaco parte del conocimiento de un determinado proceso biológico, o bien de una sustancia con potencial terapéutico ya conocido.³⁴ Una vez que se ha identificado un compuesto con potencial terapéutico comienza su desarrollo en el cual se identifican dos etapas denominadas estudios preclínicos y estudios clínicos.³⁵

Los estudios preclínicos comprenden una serie de procedimientos necesarios que se realizan a un fármaco antes de ser utilizado en humanos.³⁶ Estos estudios constan a su vez de dos grupos de procedimientos:

- 1) estudios de síntesis química, análisis de impurezas y estabilidad en relación con el compuesto o la formulación a administrar.
- 2) estudios farmacológicos, toxicológicos y de ADME (administración, distribución, metabolismo y excreción) destinados a investigar los efectos de la sustancia o su interacción con el organismo intacto.

Con respecto al primer grupo, el método de síntesis, las posibilidades de producción a escala industrial y el precio de la materia prima son elementos importantes a tener en cuenta al decidir la estrategia a seguir. La solubilidad y su estabilidad en forma sólida y en solución son factores esenciales para conseguir una formulación galénica adecuada.

Dentro del segundo grupo, los estudios farmacológicos constan de los experimentos necesarios para poner en evidencia el supuesto efecto terapéutico y su mecanismo de acción. Además, se realizan estudios complementarios de seguridad, destinados a descartar los efectos no deseados sobre otros órganos o tejidos. Así mismo, se estudian las posibles interacciones farmacológicas que el compuesto en desarrollo puede tener con otros fármacos. Toda actividad farmacológica potencial suele estar acompañada de efectos no deseados, en algunos casos claramente perjudiciales, por lo tanto, los estudios de toxicidad tienen una gran importancia en los programas de identificación y selección de los compuestos a desarrollar. En la fase preclínica los estudios de ADME son de

especial importancia para explicar los hallazgos farmacológicos o tóxicos. En este último contexto se denominan estudios toxicocinéticos.^{34,35,37}

Los estudios en animales son fundamentales en la fase preclínica ya que proporcionan un perfil general de la toxicidad, la actividad farmacológica y la farmacocinética de un fármaco nuevo, sin embargo, incluso con esta información el inicio de los estudios clínicos es arriesgado. Existen muchos ejemplos de fármacos que pasaron todos los criterios preclínicos de inocuidad, pero que produjeron efectos adversos graves en los humanos. No solo existen grandes variaciones de toxicidad entre las especies, sino que existen efectos adversos que no pueden detectarse en animales. Entre ellos se encuentran: somnolencia, náuseas, aturdimiento, nerviosismo, jaqueca, insomnio, fatiga, ardor de estómago, urticaria, etc. Debido a estas discrepancias, entre los datos obtenidos en animales y la respuesta en los humanos, los estudios clínicos iniciales sobre cualquier fármaco deben realizarse con mucho cuidado y con una metodología planificada cuidadosamente.³⁸

1.5. Estudios de toxicidad aguda

La toxicología, es la ciencia que estudia entre otras cosas los efectos nocivos provocados por los agentes químicos sobre los sistemas biológicos.³⁹ Se sabe que el manejo o consumo de una sustancia puede ser más o menos peligrosa en función de sus propiedades físico químicas, de su potencial tóxico o de la facilidad que tenga de penetrar en aquellos organismos sometidos a su exposición. Como es imprescindible que se procure minimizar el riesgo vinculado a dicha exposición, no puede extrañar que exista un gran interés por valorar la toxicidad consecuente a ella. En términos generales, con las pruebas toxicológicas se intenta investigar que tipo de condiciones han de darse para que las células de un organismo puedan verse afectadas por la actividad tóxica de una estructura química determinada.⁴⁰

La exposición de algunos animales de experimentación a dosis altas de agentes tóxicos es un método necesario y válido para identificar posibles riesgos para

humanos expuestos a dosis mucho menores.³⁹ Los resultados de cualquiera de estas pruebas experimentales no pueden ser totalmente extrapolados para conocer lo que pueda suceder con los humanos, ya que las diferencias existentes entre la especificidad de sus diversos sistemas enzimáticos, así como las barreras protectoras propias de cada especie pueden modificar completamente el fenómeno tóxico.^{34,40}

El debate acerca de los aspectos éticos de la experimentación con animales es cada vez más intenso, sin embargo, los estudios de toxicidad, como requisito previo a la realización de estudios clínicos en humanos para el registro de nuevos fármacos, siguen siendo obligatorios en todos los países y hasta el momento no existen alternativas que los puedan sustituir.³⁴

En términos generales los estudios de toxicidad se deben realizar en dos especies animales diferentes: roedores (rata o ratón) y no roedores (perro, mono o cerdo).³⁴ Estos estudios buscan principalmente tres objetivos: 1) demostrar la seguridad del fármaco bajo condiciones de uso similares a las que se ha destinado, 2) describir los signos y efectos asociados con su toxicidad y 3) determinar el margen de seguridad.⁴¹

De manera particular, los estudios de toxicidad aguda son necesarios como la evaluación toxicológica inicial en el desarrollo de un nuevo fármaco⁴² y se pueden definir como el análisis de los efectos adversos ocurridos después de la administración o exposición de una sola dosis de alguna sustancia. La concentración de la dosis comúnmente es alta⁴³⁻⁴⁶ y el tiempo transcurrido de presentación de los signos en los animales debe ser menor a los 14 días.^{42,43} Estos estudios, se realizan con el fin de caracterizar los efectos biológicos agudos de un compuesto químico; no sólo su letalidad, sino también los órganos principalmente afectados y los signos clínicos, de tal manera que los pacientes intoxicados puedan ser diagnosticados y tratados de manera adecuada,⁴⁰ además, proporcionan información de utilidad para el diseño y selección de las dosis en estudios de toxicidad más prolongados.⁴⁵ Se puede administrar el fármaco por diversas vías (oral, endovenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o

dermal). La ruta que se escoge usualmente corresponde a la que se utilizará en la clínica.⁴⁷ Las pruebas de toxicidad aguda también pueden ser convenientes para evaluar la toxicidad que puede ser causada entre la interacción entre 2 fármacos.⁴²

El número de animales requeridos para estas pruebas puede ser muy variable y dependerá del tipo de estudio, así como la especie utilizada, la disponibilidad de la misma, características de crecimiento, alimentación, facilidad de manejo, etc. Por cuestiones bioéticas es deseable utilizar el mínimo número de animales posibles para obtener la información requerida. En términos generales se considera que un número entre 2 y 6 animales puede ser adecuado para realizar estos estudios.⁴⁰

Los estudios preclínicos de toxicidad, son necesarios y tienen gran importancia en los programas de identificación y elección de los fármacos a desarrollar³⁴ por tal razón, deben ser aplicados a todos los compuestos químicos que presenten algún interés de tipo biológico.⁴⁰

Con respecto a las Casiopeínas, se han realizados diversos estudios de toxicidad. Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos corresponden a especies menores como ratas y ratones, en donde se ha evaluado hematotoxicidad,⁴⁸ cardiotoxicidad,⁴⁹ estudios anatomo-histopatológicos,⁵⁰⁻⁵² ultraestructurales⁵³ y de toxicidad reproductiva,⁵⁴ sin embargo, con respecto a especies mayores, se ha realizado sólo un trabajo en perros.⁵⁵

1.6. Estudios clínicos de los fármacos

Los estudios clínicos comienzan después de que se han generado suficientes datos para justificar las pruebas del nuevo fármaco en humanos.⁵⁶ Su principal finalidad es confirmar las propiedades benéficas de los nuevos fármacos observados a través de los estudios preclínicos en animales.⁵⁷ La realización de estos estudios representan alrededor del 60-70% del tiempo y 30% del costo total del desarrollo.³⁴

Los estudios clínicos constan de las siguientes fases:

Fase I: Se empieza administrando dosis muy bajas a voluntarios. Los objetivos consisten en evaluar la toxicidad y determinar la mejor vía de administración y los límites posológicos más inocuos. Es también esencial la determinación de la absorción, el metabolismo y la excreción del nuevo fármaco. En esta fase se estudian aproximadamente entre 20 y 100 personas y aproximadamente el 50% de los compuestos probados se abandonan por toxicidad, por falta de eficacia o por ambas.³⁸ Tradicionalmente se estudian sólo voluntarios sanos, sin embargo, si se trata del desarrollo de un fármaco muy tóxico, (por ejemplo antineoplásicos), la fase uno se realiza únicamente con pacientes enfermos.⁵⁸

Fase II: Comienza después de haber definido el intervalo de dosis tolerada. Estos estudios se llevan a cabo en pacientes enfermos para los que se considera que el nuevo fármaco pueda tener potencial benéfico. El objetivo principal es presentar evidencias de que el fármaco presenta los efectos sugeridos por las pruebas preclínicas. En estas pruebas también se investigan datos farmacocinéticos, se relacionan las concentraciones plasmáticas con sus efectos, y se definen interacciones farmacológicas.⁵⁶ El número de pacientes varía entre 100 y 200.^{38,57}

Fase III: Comprende estudios clínicos en donde se incluyen a un número amplio de enfermos (250 a 1,000) y la población regularmente es más heterogénea.³⁸ Estos estudios se destinan a determinar si el uso crónico proporciona una relación favorable riesgo-beneficio, y por otro lado establece la utilidad del fármaco comparada con otras modalidades terapéuticas de eficacia

probada.⁵⁷ Suponiendo que los estudios demuestran de forma satisfactoria que el fármaco es inocuo y eficaz se podrá aprobar para su distribución y uso.³⁸

Fase IV: Muchos de los efectos secundario inusuales, idiosincrasias y alergias se pueden observar solamente tras el uso amplio por un gran número de pacientes. Aún cuando se tienen datos de miles de pacientes, pueden no detectarse efectos adversos graves que ocurren con frecuencias de 1 en 5000 o incluso menos. Debido a ello, algunos fármacos se someten a vigilancia, en la que se reúnen sistemáticamente datos de eficacia y toxicidad después de que el fármaco se ha comercializado.^{38,59}

Cabe mencionar, que en la actualidad la sociedad espera compuestos cada vez más seguros y eficaces, lo que está haciendo que el tiempo para el estudio de estos nuevos fármacos vaya aumentando, calculándose que el tiempo necesario para que un compuesto pase del laboratorio de síntesis al mercado farmacéutico sea de aproximadamente 15 años.³⁵ De igual forma se sabe que por cada 10,000 moléculas probadas solo 10 alcanzan la etapa de notificación de medicamentos en fase de investigación clínica y es probable que de estas 10 moléculas sólo una se convierta en un medicamento nuevo.⁶⁰

2. JUSTIFICACIÓN

Dado que las Casiopeínas III-ia y IIgly han demostrado importante actividad antineoplásica, es necesario realizar estudios para conocer los efectos tóxicos agudos, que pueden producir estos fármacos, con el fin de contar con datos clínico-patológicos suficientes para estimar los probables efectos adversos que pudieran presentarse al ser utilizado en fases de experimentación clínica en medicina humana.

3. HIPÓTESIS

Al administrar al perro dosis tóxicas de las Casiopeínas III-ia y IIgly se inducirán daños orgánicos que se podrán identificar, a través de distintas pruebas diagnósticas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar los efectos tóxicos agudos que pueden ser producidos por las Casiopeínas III-ia y IIgly administradas en perros clínicamente sanos.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar alteraciones en parámetros fisiológicos.
- Evaluar componentes celulares sanguíneos a través del hemograma.
- Evaluar integridad renal, hepática y cambios electrolíticos a través de bioquímica sanguínea.
- Evaluar equilibrio ácido-base.
- Evaluar cambios macroscópicos, microscópicos y ultraestructurales de los órganos afectados a través de necropsia, microscopías óptica y electrónica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Selección de animales

Se seleccionaron 6 perros mestizos para Casiopeína III-ia, 3 machos y 3 hembras, con edades entre 2 y 4 años y peso entre 13.5 y 18 kg. Para Casiopeína IIgly se utilizaron 6 perros mestizos, 5 machos y 1 hembra, con edades entre 2 y 5 años y peso entre 14.5 y 21.5 kg. Para los controles se utilizaron 2 perros, hembra y macho, con 2 años de edad y peso de 13.2 y 17.2 kg. Todos los perros fueron proporcionados por el área de investigación y enseñanza quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). A los animales se les realizó un examen clínico general de acuerdo a lo descrito por Jones (1996),⁶¹ pruebas de laboratorio clínico (hemograma, bioquímica sanguínea y urianálisis) y se mantuvieron en observación durante 48 h, esto para corroborar que eran clínicamente sanos.

5.2. Diseño experimental

5.2.1. Anestesia y conexión al fisiógrafo

La fase de investigación se realizó previa revisión y autorización del Subcomité para la Investigación y el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE). La inducción anestésica se realizó con tiletamina-zolacepam (Zoletil®) a dosis de 4 mg/kg de peso endovenoso (EV); posteriormente se rasuraron las áreas de las venas cefálicas y arteria femoral. Se canalizó la vena cefálica derecha y se mantuvo con solución isotónica de NaCl al 0.9% a terapia de mantenimiento, 1.6 mL/kg/h. El tiempo transcurrido antes de la profundización anestésica fue de 10 min aproximadamente.

Los perros fueron anestesiados con pentobarbital sódico a dosis de 24 mg/kg de peso EV, administrando la mitad del volumen en bolo y la otra mitad a efecto. Posteriormente se introdujo una sonda endotraqueal. El animal se colocó en decúbito dorsal, fijando los 4 miembros a la mesa y se realizaron las conexiones al

fisiógrafo. El tiempo transcurrido desde el inicio de la anestesia hasta la administración de las Casiopeínas fue de 30 min (aproximadamente), dentro de los cuales 15 min fueron para estabilización anestésica y 15 min para mediciones basales.

5.2.2. Administración de Casiopeína y toma de muestras

Las Casiopeínas fueron sintetizadas por la QFB Ma. Elena Bravo y proporcionadas por la Dra. Lena Ruiz Azuara de la Facultad de Química de la UNAM. Se administraron las dosis letales 99 (DL99) del fármaco determinadas en el estudio realizado por Leal (2006),⁶² que corresponden a 8 mg/kg y 10 mg/kg de peso para Casiopeína IIgly y III-ia respectivamente. Los mg correspondientes del fármaco para cada perro se pesaron en una balanza analítica, posteriormente se diluyeron en solución dextrosa al 5% y se administraron EV en un volumen de 100 mL medidos con un buretrol. El tiempo de administración fue de 30 min. El volumen y tiempo de administración, se estableció de acuerdo a estudios piloto previamente realizados (los datos no se muestran). Se tomó una muestra basal para equilibrio ácido-base de la arteria femoral (jeringa de 1 mL heparinizada), segundos antes de la administración de la Casiopeína. Para Casiopeína III-ia se tomó una primera muestra sanguínea para hemograma (en tubos con EDTA) de la vena cefálica y para equilibrio ácido base de la arteria femoral, 10 min después de terminada la administración del fármaco. Posteriormente, tanto para Casiopeínas III-ia y IIgly, se tomaron muestras para hemograma, bioquímica sanguínea (tubos sin anticoagulante) y determinación del equilibrio ácido-base. Las muestras se tomaron previo a la muerte y esto se determinó cuando la saturación de oxígeno era menor a 40% y la frecuencia cardiaca menor a 50 latidos por minuto. Una vez muerto el animal se realizó la necropsia dentro de los primeros 15 min.

Los perros controles se manejaron de la misma forma descrita que para los perros problema, a diferencia de que a estos se les administró únicamente solución dextrosa al 5% sin Casiopeína. Después de transcurridos los 30 min de la

administración de dextrosa, se dejaron vivir por un tiempo de 60 min y posteriormente se eutanasiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico.

La anestesia, conexión al fisiógrafo y administración de las Casiopeínas se llevaron a cabo en el laboratorio de Farmacología de la FMVZ-UNAM.

5.3. Procedimientos diagnósticos

5.3.1. Fisiógrafo

Se utilizó un fisiógrafo marca Digicare modelo Life Window 6000V (EUA). Las determinaciones correspondieron a: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, CO₂ espirado determinado a través de capnografía, presión arterial no invasiva, saturación de oxígeno (SO₂) determinado por oximetría de pulso y medición de temperatura corporal.

5.3.2. Hemograma

El hemograma se realizó con técnicas manuales de rutina de acuerdo a lo descrito por Tvedten y Weiss (2002).⁶³

5.3.3. Bioquímica sanguínea

El suero se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. El análisis se realizó con un espectrofotómetro semiautomatizado Cobas-Mira, Roche (Suiza). Los analitos determinados fueron: glucosa, urea, creatinina, colesterol, bilirrubina total, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, creatina cinasa, proteínas totales, albúmina, calcio, fósforo y amilasa. La concentración de cloro, potasio y sodio se determinó con un analizador de electrolitos marca Easy Lyte plus[®] (Massachusetts, EUA). Los analitos que fueron calculados son: globulinas, diferencia de iones fuertes, anion gap (ácidos no volátiles) y osmolalidad. Para el cálculo del anion gap se utilizó el bicarbonato determinado a través del análisis de gases.

5.3.4. Urianálisis

Se realizó urianálisis de rutina de acuerdo a la técnica descrita por Barsanti *et al.* (2002).⁶⁴ El examen químico se llevó a cabo con el uso de tiras reactivas de marca Combur Test[®] Roche y se utilizó un lector de tiras reactivas marca Urilux[®]S Roche, (Hungría).

Las muestras de hemograma, bioquímica sanguínea y urianálisis fueron procesadas en el laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Patología, FMVZ-UNAM.

5.3.5. Determinación del equilibrio ácido-base

Las muestras fueron colocadas y transportadas en un recipiente hermético con agua y hielo analizándose en un tiempo aproximado de 3 h después de la colección. La determinación se realizó con un gasómetro GEM Premier 3000[®] IL (Italia) y los parámetros evaluados fueron: pH, presión parcial de bióxido de carbono (PCO₂), bicarbonato (HCO₃⁻), exceso de base (EB), presión parcial de oxígeno (PO₂) y saturación arterial de oxígeno (SO₂). Las muestras se procesaron en el laboratorio clínico de urgencias del Instituto Nacional de Cardiología, “Dr. Ignacio Chávez”.

5.3.6. Necropsia

La necropsia se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Aluja y Constantino (2002).⁶⁵ Los órganos de donde se tomaron muestras corresponden a cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñones. Se eligieron estos órganos debido a que en estudios anteriores habían mostrado alteraciones significativas. Los órganos que se pesaron corresponden a: pulmones, corazón, hígado y bazo.

Los sitios específicos de toma de muestra que se determinaron para realizar una evaluación integral de los órganos son los siguientes:

- Cerebro: 1. Corteza, diencéfalo y ventrículo lateral, 2. Cerebelo, IV ventrículo y puente.

- Corazón: 1. Pared del ventrículo y atrio derecho, 2. Pared del ventrículo y atrio izquierdo.
- Pulmón: 1. Parte central del lóbulo craneal izquierdo, 2. Parte central del lóbulo caudal izquierdo, 3. Parte central de lóbulo craneal derecho, 4. Parte central del lóbulo medio derecho y 5. Parte central del lóbulo caudal derecho.
- Hígado: 1. Lóbulo lateral izquierdo, 2. Lóbulo medial izquierdo, 3. Lóbulo lateral derecho, 4. Lóbulo medial derecho y 5. Lóbulo cuadrado.
- Bazo: 1. Parte media.
- Riñones: 1. Corteza y médula del izquierdo, 2. Corteza y médula del derecho.

La necropsia se realizó en la sala destinada para ese fin del Departamento de Patología de la FMVZ- UNAM.

5.3.7. Histopatología

Se realizó evaluación histopatológica de los órganos mencionados, los cuales permanecieron fijados con formalina al 10% por un lapso de 72 h y se procesaron con la técnica de rutina de inclusión en parafina y tinción de H y E de acuerdo a lo descrito por Banks (1996).⁶⁶ Se realizó una evaluación histopatológica preliminar en donde se definieron los órganos que podrían verse afectados por el fármaco, así como las lesiones en los mismos que se presentaban con mayor frecuencia. Las lesiones y características evaluadas fueron las siguientes. 1) edema perivascular en encéfalo y cerebelo: determinado por las veces que cabe el endotelio en el espacio resultado del edema. 2) congestión en encéfalo y cerebelo: determinado por el porcentaje de eritrocitos dentro de los vasos sanguíneos. 3) sobredistensión vascular en pulmones: determinado por las veces que cabe la capa media de las arterias en la sobredistensión vascular. 4) edema pulmonar: determinado por el porcentaje de espacios alveolares ocupados por edema. 5) congestión pulmonar: determinado por el porcentaje de eritrocitos en comparación con el resto de las células del parénquima. 6) separación de fibras miocárdicas: determinado por el porcentaje del ventrículo con presencia de fibras separadas. 7) material granular en miocardio: determinado por el porcentaje de

ventrículo con presencia de material granular. 8) fibras miocárdicas hipereosinofílicas: determinado por el porcentaje del ventrículo con presencia de fibras hipereosinofílicas. 9) sobredistensión vascular y linfangiectasia hepática: determinado por el porcentaje de hígado afectado con la lesión. 10) congestión hepática: determinado por el porcentaje de eritrocitos en comparación con los hepatocitos.

Las muestras se procesaron y evaluaron en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM.

5.3.8. Microscopía electrónica

Para el estudio ultraestructural se tomaron muestras de: 1) pulmón, lóbulo caudal derecho y 2) miocardio, ventrículo izquierdo. Se eligieron estos órganos debido a que en estudios piloto se determinó que están estrechamente relacionados con el proceso de muerte del animal.

Las muestras se tomaron durante la necropsia, aproximadamente 30 min posteriores a la muerte del perro. Los tejidos se cortaron en fracciones entre 2 y 3 mm³ y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 6 h, posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con solución amortiguadora de cacodilato de sodio para retirar el exceso de glutaraldehído. La posfijación se realizó con tetraóxido de Osmio al 1% durante 1h.

Después de 5 lavados con solución amortiguadora de cacodilato de sodio, los tejidos se deshidrataron con acetona a concentraciones crecientes diluidas con agua destilada.

Las muestras se infiltraron primero en una mezcla de acetona y resinas epóxicas a una relación de 2:1 respectivamente durante 30 min y después con una relación de 1:1 durante 48 h. La inclusión se llevó a cabo en resina pura e incubando las muestras de tejido en una estufa a 63°C durante 1 h, por dos ocasiones. Posteriormente los fragmentos fueron depositados en cápsulas, las cuales se cubrieron con resina pura y se incubaron a 63°C durante 24 h. Se utilizó un ultramicrotomo para obtener cortes entre 60 y 70 nm, los cuales se recogieron en

una rejilla y se contrastaron con uranilo y plomo. La observación ultraestructural se realizó con un microscopio electrónico de transmisión modelo EM 900 (Alemania) en la Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología FMVZ-UNAM.

5.4. Análisis estadístico

Para Casiopeína III-ia, los resultados obtenidos de hemograma y equilibrio ácido-base, fueron analizados a través de una prueba para mediciones repetidas y para bioquímica sanguínea se utilizó una *t* de Student para variables dependientes. Los resultados de hemograma, bioquímica sanguínea y equilibrio ácido-base de Casiopeína IIgly se analizaron con una prueba de *t* de Student para variables dependientes. Los resultados de los parámetros fisiológicos y el peso de los órganos se analizaron a través de una *t* de Student para variables independientes.

El análisis de los datos para los hallazgos macroscópicos y ultraestructurales se realizó con estadística no paramétrica utilizando la prueba exacta de Fisher para la medición de frecuencias. Para la evaluación histopatológica se utilizó la prueba de "U" de Mann-Whitney. En todos los resultados, el valor de P considerado con diferencia estadística significativa fue $P < 0.05$. El análisis de todos los datos se realizó con el programa estadístico SPSS versión 10.0.

6. RESULTADOS

6.1. Casiopeína III-ia

6.1.1. Signos clínicos y fisiógrafo

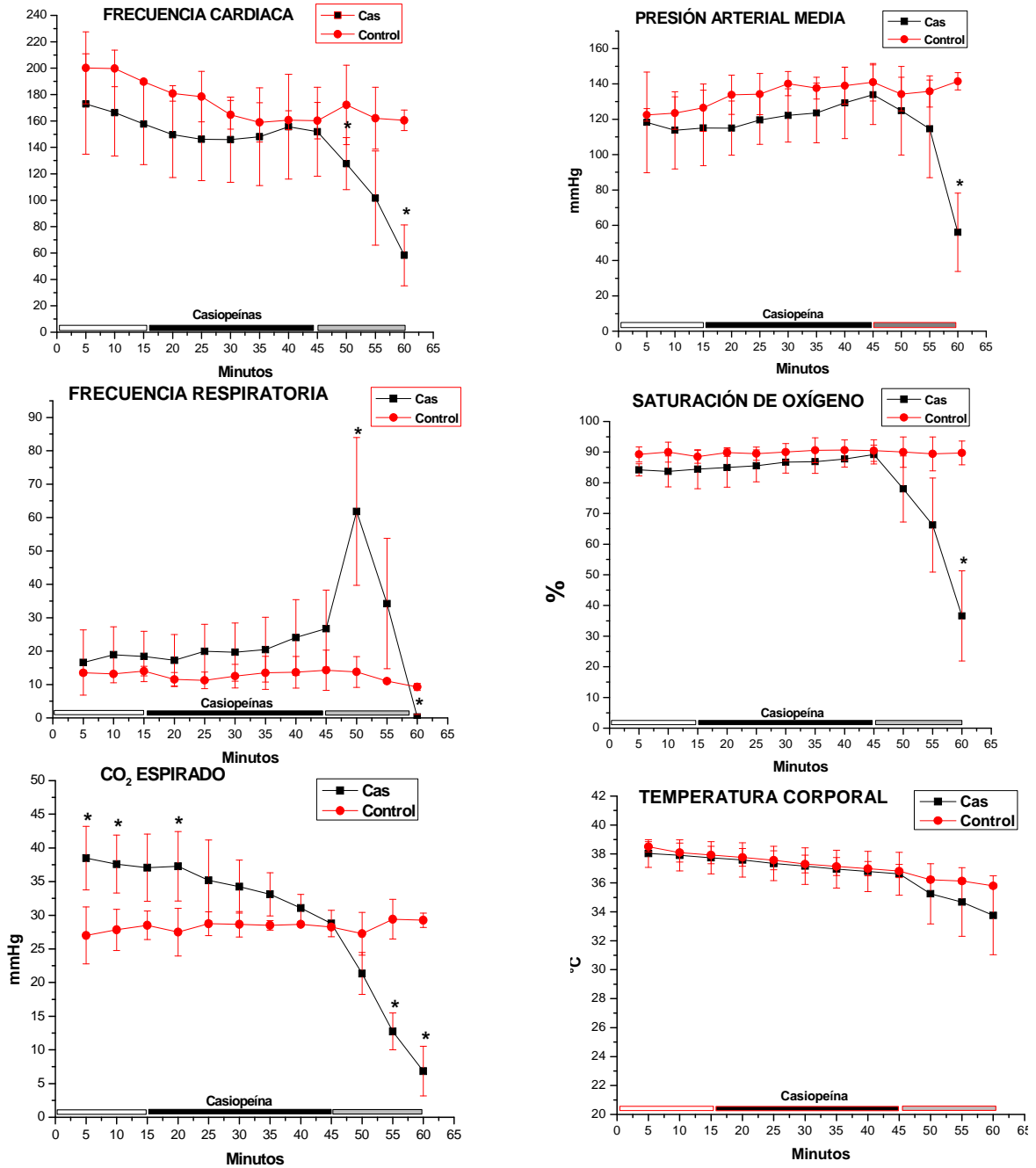
Los signos clínicos observados previo a la muerte de los perros correspondieron a disnea mixta (inspiratoria y espiratoria), taquipnea, cianosis y salida de líquido por la sonda endotraqueal.

Los resultados que presentaron diferencias significativas en el fisiógrafo (figura 1) indicaron bradicardia, la cual se hizo evidente desde los últimos 15 min de vida, disminuyendo hasta los últimos 5 min. La presión arterial media disminuyó los últimos 5 min de vida. La frecuencia respiratoria aumentó marcadamente después de terminada la administración del fármaco y posteriormente disminuyó en los últimos 5 min. La saturación de oxígeno se vio marcadamente disminuida los últimos 5 min. El CO₂ espirado presentó aumento con diferencia significativa los primeros 5 y 10 min de las mediciones basales, así como los primeros 5 min de administración del fármaco y disminuyendo paulatinamente los últimos 10 y 5 min de vida. La temperatura corporal disminuyó progresivamente, sin embargo, no hubo diferencias significativas en comparación con el control. Posterior a la administración de la Casiopeína III-ia, la muerte de los perros sucedió en 24.8±10.1 min.

6.1.2. Hemograma

En los resultados del hemograma (cuadro 2) se encontraron diferencias significativas, aumentando el hematocrito, hemoglobina y cantidad de eritrocitos en las diversas mediciones realizadas. Las diferencias se observaron en la medición basal contra la segunda medición y la primera medición con la segunda medición, no encontrando diferencias entre la basal y la primera medición.

Figura 1. Efecto de la administración EV de Casiopeína III-ia sobre los parámetros fisiológicos en perros.



Los datos son presentados en media \pm DE. El asterisco indica diferencia significativa ($P < 0.05$). Perros problema $n=6$. Perros control $n=2$.
Cas = Casiopeína III-ia

- ▭ Mediciones basales
- ▬ Mediciones durante la administración
- ▨ Mediciones después de la administración

Cuadro 2. Efecto de la administración EV de Casiopeína III-ia sobre los valores del hemograma en perros.

Analito	Basal	Medición 1	Medición 2	P	Valor de referencia
Hematocrito (L/L)	0.41±0.05 ^a	0.44±0.09 ^b	0.53±0.07 ^{ab}	B-1 0.613 B-2 0.039* 1-2 0.002*	0.37-0.55
Hemoglobina (g/L)	139.1±18.9 ^a	148.7±33.2 ^b	178.1±23.6 ^{ab}	B-1 0.610 B-2 0.032* 1-2 0.003*	120-180
Eritrocitos (X10¹²/L)	6.4±1.0 ^a	7.0±1.6 ^b	8.2±1.0 ^{ab}	B-1 0.536 B-2 0.037* 1-2 0.004*	5.5-8.5
VGM (fL)	65±3.2	63.4±2.8	64.2±3.7	B-1 0.454 B-2 0.700 1-2 0.429	60-77
CGMH (g/L)	332.0±0.5	332.1±0.6	334.2±4.3	B-1 0.689 B-2 0.214 1-2 0.204	320-360
Plaquetas (X10 ⁹ /L)	294±104	305±173	277±104	B-1 0.907 B-2 0.818 1-2 0.390	200-550
Proteínas totales (g/L)	66.1±3.0	66.1±6.7	67.2±5.9	B-1 1.000 B-2 0.727 1-2 0.311	60-75
Leucocitos (X10⁹/L)	12.7±2.0 ^{ab}	7.8±1.5 ^a	6.9±1.7 ^b	B-1 0.000* B-2 0.001* 1-2 0.259	6.0-17.0
Neutrófilos (X10⁹/L)	9.1±1.9 ^{ab}	5.8±1.3 ^a	4.8±2.1 ^b	B-1 0.002* B-2 0.006* 1-2 0.169	3.0-11.5
Linfocitos (X10 ⁹ /L)	2.6±1.6	1.5±1.0	1.7±0.9	B-1 0.121 B-2 0.81 1-2 0.508	1.0-4.8
Monocitos (X10⁹/L)	0.4±0.2 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.2	B-1 0.050* B-2 0.163 1-2 0.411	0.1-1.4
Eosinófilos (X10 ⁹ /L)	0.1±0.1	0.3±0.2	0.1±0.1	B-1 0.135 B-2 0.744 1-2 0.068	0-0.9

Los datos son presentados en media ± DE. La misma letra en cualquiera de las tres determinaciones de cada analito indica una diferencia significativa (P<0.05).

Medición 1: La muestra se tomó 10 min después de la administración del fármaco.

Medición 2: La muestra se tomó previo a la muerte.

VGM: Volumen globular medio.

CGMH: Concentración globular media de hemoglobina.

La cantidad de leucocitos y neutrófilos disminuyó, encontrando diferencias significativas entre la medición basal y la medición 1, así como la basal y la medición 2, no habiendo diferencias entre las mediciones 1 y 2. La cuenta de monocitos disminuyó con diferencia significativa entre la basal y la medición 1.

6.1.3. Bioquímica sanguínea

Los resultados de la bioquímica sanguínea indicaron incrementos significativos en las bilirrubinas, el fósforo y el anion gap (cuadro 3).

6.1.4. Equilibrio ácido-base

Los resultados de equilibrio ácido-base muestran disminuciones significativas en el pH, HCO_3^- , EB (exceso de base), PO_2 y SO_2 cuando se comparan las tres mediciones. La PCO_2 disminuyó únicamente entre la basal y la medición 1 (cuadro 4). Los resultados se interpretaron como acidosis metabólica no compensada e hipoxemia severa.

6.1.5. Hallazgos en la necropsia y peso de los órganos

Los hallazgos observados en la necropsia (cuadro 5) que presentaron diferencias significativas se encontraron en aparato respiratorio y sistema linfático. En aparato respiratorio se apreció en el interior de la tráquea y bronquios, abundante líquido espumoso blanquecino secundario a edema pulmonar. Los pulmones no estaban colapsados y tenían aspecto edematoso. En la superficie de corte de todos los lóbulos pulmonares se encontró material gelatinoso y transparente, el cual estaba rodeando a vasos sanguíneos, esto indicativo de edema perivascular (figura 2). En sistema linfático, los perros control presentaron congestión esplénica y esplenomegalia ya que el bazo estaba aumentado de tamaño y en la superficie de corte rezumaba abundante cantidad de sangre. Con respecto al peso de los órganos, (cuadro 6) únicamente el porcentaje de peso de los pulmones fue mayor en los perros problema que en los perros control con diferencia estadística significativa.

Cuadro 3. Efecto de la administración EV de Casiopeína III-ia sobre los valores de la bioquímica sanguínea en perros.

Analito	Basal	Problema	P	Valor de referencia
Glucosa (mmol/L)	5.2 ± 0.8	5.8 ± 1.4	0.426	3.88 – 6.88
Urea (mmol/L)	5.0 ± 1.6	6.2 ± 1.1	0.288	2.1 – 7.9
Creatinina (µmol/L)	77.1 ± 9.2	81.9 ± 19.7	0.601	60 – 132
Colesterol (mmol/L)	5.5 ± 2.5	3.5 ± 0.7	0.730	2.85 - 7.76
Bilirrubina total (µmol/L)	2.7 ± 1.7	5.0 ± 2.4*	0.042	1.7 – 5.16
ALT (U/L)	35.5 ± 9.3	28.7 ± 17.5	0.052	< 70
AST (U/L)	40.6 ± 10.1	40.0 ± 15.7	1.000	< 55
Fosfatasa alcalina (U/L)	82.2 ± 60.0	41.7 ± 24.9	0.143	< 189
Amilasa (U/L)	544.2 ± 225.8	553.6 ± 151.4	0.966	< 1110
Creatina cinasa (U/L)	281.3 ± 154.9	233.8 ± 149.7	0.450	< 213
Proteínas totales (g/L)	62.3 ± 2.9	64.0 ± 8.0	0.896	55 – 75
Albúmina (g/L)	29.6 ± 4.6	29.0 ± 6.2	0.380	29 – 40
Globulina (g/L)	32.7 ± 4.6	35.0 ± 2.9	0.247	23 – 39
Calcio (mmol/L)	2.5 ± 0.08	2.6 ± 0.05	0.169	2.17 – 2.94
Fósforo (mmol/L)	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3*	0.005	0.80 – 1.80
Potasio (mmol/L)	4.8 ± 0.4	5.0 ± 0.2	0.156	3.8 – 5.4
Sodio (mmol/L)	145.5 ± 1.2	145.3 ± 0.5	0.478	141 -152
Cloro (mmol/L)	113.7 ± 1.9	113.6 ± 0.5	0.423	108 – 117
†Bicarbonato (mmol/L)	22.2 ± 2.7	17.0 ± 1.9*	0.001	17 – 25
Anion gap (mmol/L)	14.5 ± 3.7	19.6 ± 2.8*	0.002	12 – 24
DIF (mmol/L)	31.8 ± 1.7	31.6 ± 1.1	1.000	30 – 40
Osmolalidad (mOsm/kg)	285.8 ± 3.2	287.3 ± 0.5	0.874	280-305
Triacilglicéridos (U/L)	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.295	0.6 - 1.2

Los datos son presentados en media ± DE. El asterisco indica una diferencia significativa (P<0.05).

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

DIF: Diferencia de iones fuertes

† El valor del bicarbonato se obtuvo a partir de la gasometría.

Cuadro 4. Efecto de la administración EV de Casiopeína III-ia sobre los valores del equilibrio ácido-base en perros.

Analito	Basal	Medición 1	Medición 2	P	Valor de referencia
pH	7.33 ± 0.02 ^{ab}	7.27 ± 0.04 ^{ab}	7.22 ± 0.03 ^{ab}	B-1 0.012* B-2 0.000* 1-2 0.014*	7.32 – 7.45
PCO₂ mm/Hg	42.5 ± 5.0 ^a	35.4 ± 3.8 ^a	38.5 ± 6.6	B-1 0.019* B-2 0.142 1-2 0.208	26 - 46
HCO₃⁻ mmol/L	22.2 ± 2.7 ^{ab}	19.3 ± 2.5 ^{ab}	17.0 ± 1.9 ^{ab}	B-1 0.004* B-2 0.001* 1-2 0.006*	17 - 24
EB mmol/L	-4.1 ± 1.9 ^{ab}	-7.7 ± 2.4 ^{ab}	-8.8 ± 2.6 ^{ab}	B-1 .003* B-2 0.001* 1-2 0.032*	-5.8 – 3.6
PO₂ mm/Hg	66.2 ± 7.8 ^{ab}	53.4 ± 8.3 ^{ab}	23.2 ± 3.8 ^{ab}	B-1 0.002* B-2 0.000* 1-2 0.000*	> 60
SO₂ %	88.5 ± 7.8 ^{ab}	77.5 ± 8.7 ^{ab}	46.4 ± 7.9 ^{ab}	B-1 0.003* B-2 0.000* 1-2 0.001*	> 90

Los datos son presentados en media ± DE. La misma letra en cualquiera de las tres determinaciones de cada analito indica una diferencia significativa (P<0.05).

Medición 1: La muestra se tomó 10 min después de la administración del fármaco.

Medición 2: La muestra se tomó previo a la muerte.

Cuadro 5. Hallazgos macroscópicos en la necropsia después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.

Observación	Control	Problema	P
Espuma en tráquea*	0/2	6/6*	0.036
Pulmones no colapsados*	0/2	6/6*	0.036
Pulmones con aspecto edematoso*	0/2	6/6*	0.036
Congestión pulmonar*	0/2	6/6*	0.036
Edema perivascular en pulmones	0/2	6/6*	0.036
Intestino con serosa irregular	1/2	2/6	0.643
Pared intestinal engrosada	1/2	2/6	0.643
Presencia de parásitos (<i>Dypilidium sp</i>)	1/2	2/6	0.643
Ligera dilatación del ventrículo derecho	1/2	2/6	0.643
Esplenomegalia*	2/2	0/6*	0.036
Congestión esplénica*	2/2	0/6*	0.036

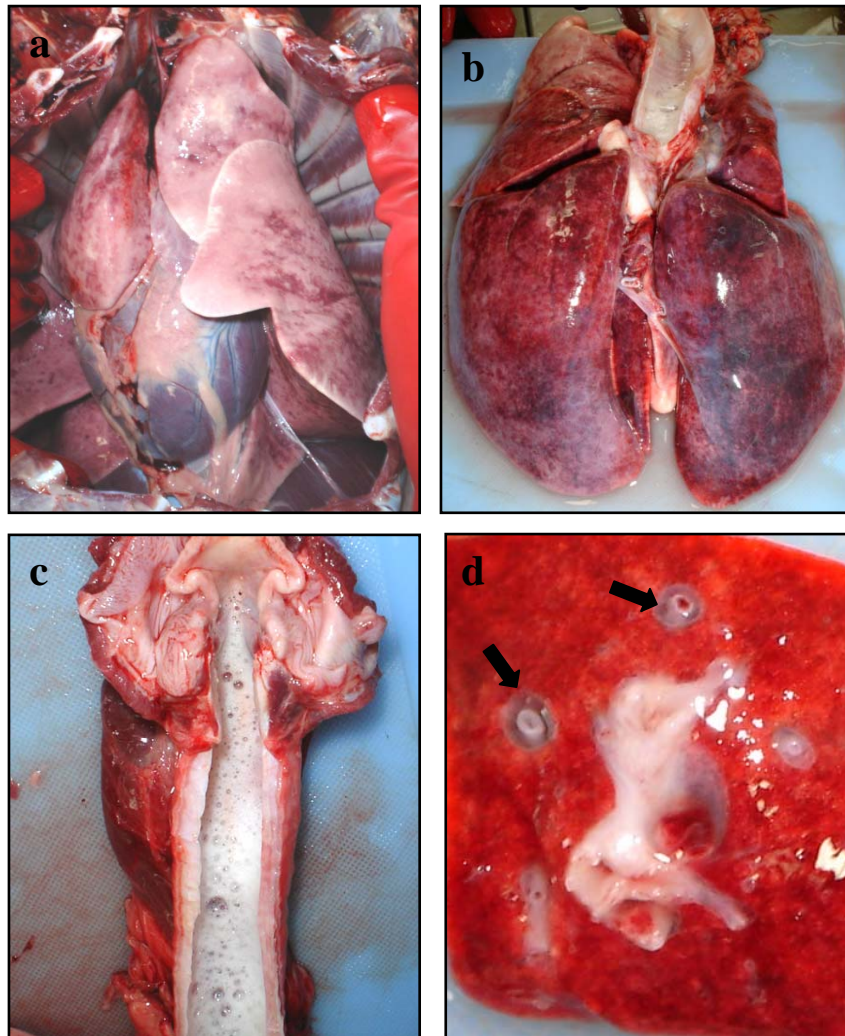
Los resultados se muestran en frecuencias de presentación. El asterisco indica diferencia significativa (P<0.05).

Cuadro 6. Valores del peso de los órganos en la necropsia después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.

Órgano	Control %	Problema %	P
Pulmones	0.65 ± 0.07	2.5 ± 1.36*	0.034
Corazón	0.5 ± 0.00	0.58 ± 0.1	0.602
Hígado	2.4 ± 0.00	3.45 ± 1.17	0.117
Bazo	0.65 ± 0.07	0.4 ± 0.26	0.301

Los valores del peso de los órganos son presentados en porcentaje con base en el peso corporal total de cada perro, obteniéndose la media ± DE. El asterisco indica diferencia significativa (P<0.05).

Figura 2. Hallazgos macroscópicos en la necropsia después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.



a) Pulmones no colapsados en cavidad torácica, **b)** Pulmones con aspecto edematoso, **c)** Abundante espuma blanca en el lumen traqueal, **d)** Superficie de corte de pulmón con material gelatinoso y transparente alrededor de los vasos sanguíneos (flechas).

6.1.6. Evaluación histopatológica

En la evaluación histopatológica (cuadro 7) se encontraron diferencias significativas en cerebro, pulmones e hígado. En cerebro se observó congestión, ya que los vasos sanguíneos se encontraban dilatados y repletos de eritrocitos.

En pulmones (figura 3), las arterias y arteriolas presentaban sobredistensión marcada, principalmente entre la media y la adventicia. Dentro del espacio sobredistendido se observó edema en algunas arterias, ya que había material homogéneo ligeramente eosinofílico. Los espacios alveolares se encontraban ocupados por material homogéneo ligeramente eosinofílico y en algunos casos fibrilar, esto indicativo de edema pulmonar. También se observó congestión, puesto que los septos alveolares estaban ligeramente engrosados y tenían abundante cantidad de eritrocitos.

En hígado los sinusoides hepáticos se encontraban repletos de eritrocitos indicativo de congestión. Algunas de las arterias hepáticas presentaban desarreglo y distensión de la capas medias y adventicia; alrededor de las mismas se apreciaban vasos linfáticos dilatados y con material homogéneo eosinofílico en su interior (figura 3). En miocardio no se encontraron diferencias significativas. Otros hallazgos histopatológicos de menor importancia y que no tienen relación con el fármaco se muestran en frecuencia de presentación (cuadro 8).

Cuadro 7. Hallazgos histopatológicos después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.

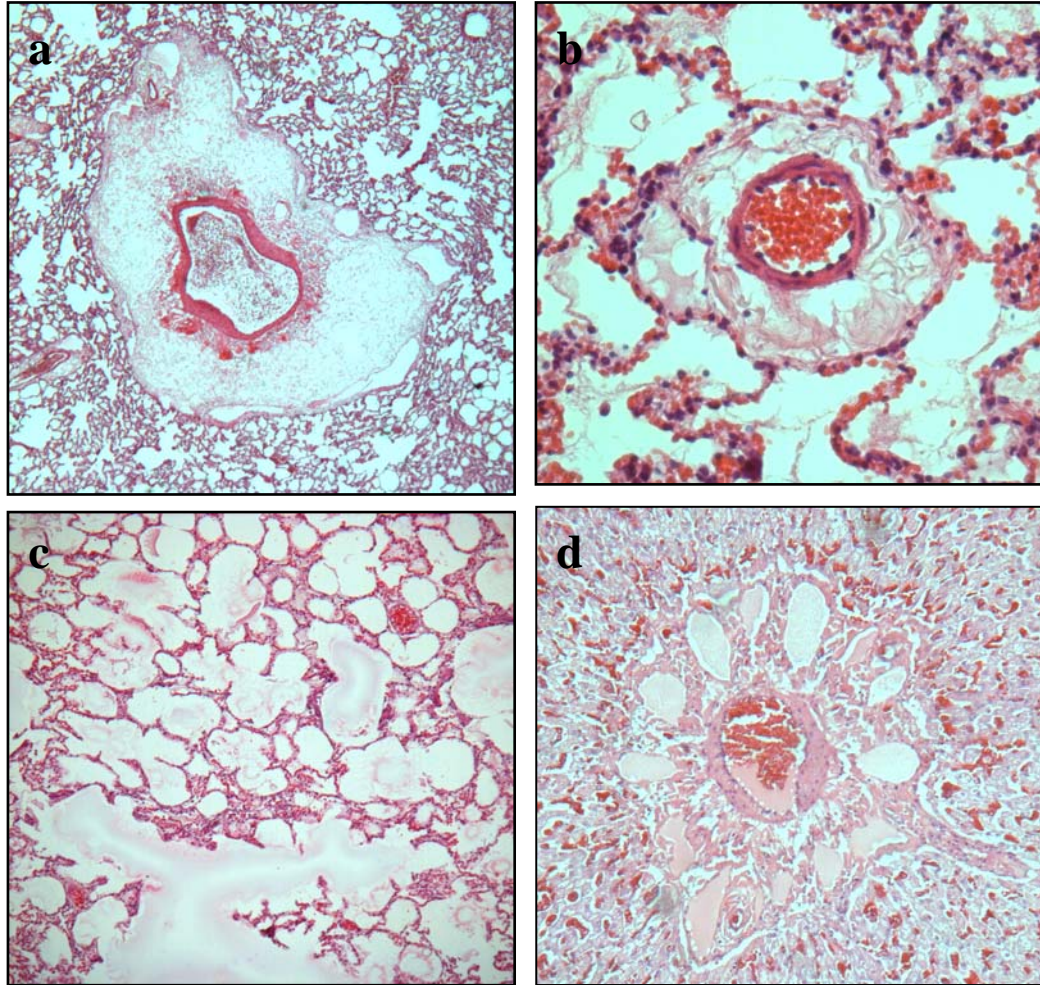
Órgano	Lesión	Control	Problema	P
Cerebro	Edema perivascular	2.1 ± 1.3	1.9 ± 1.1	0.575
	Congestión	63.0 ± 27.3	81.1 ± 25.2*	0.001
Pulmones	Sobredistensión vascular	0.8 ± 0.8	6.1 ± 3.0*	0.001
	Edema	3.0 ± 0.5	36.4 ± 23.8*	0.001
	Congestión	20.0 ± 6.6	51.2 ± 24.1*	0.001
Miocardio ventrículo izquierdo	Separación de fibras	55.0 ± 7.0	63.3 ± 19.6	0.733
	Material granular	100.0 ± 10.0	96.6 ± 8.1	0.564
	Fibras hipereosinofílicas	10.0 ± 14.1	41.6 ± 14.7	0.064
Miocardio ventrículo derecho	Separación de fibras	95.0 ± 7.0	66.6 ± 28.0	0.175
	Material granular	100.0 ± 00	90.0 ± 20	0.383
	Fibras hipereosinofílicas	00.0 ± 0.00	4.0 ± 2.2	0.086
Hígado	Sobredistensión vascular y linfangiectasia	43.0±10.5	55.0 ± 21.9*	0.056
	Congestión	24.9 ± 15.2	38.1 ± 21.4*	0.001

El asterisco indica una diferencia significativa (P<0.05).

Cuadro 8. Frecuencias de presentación de otros hallazgos histopatológicos después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.

Observación	Control	Problema
Antracosis pulmonar	0/2	3/6
Degeneración vacuolar de gota gruesa en hígado	0/2	1/6
Degeneración hidrópica hepática	1/2	3/6
Congestión renal	0/2	3/6
Nefritis linfoplasmocitaria multifocal	0/2	1/6
Necrosis neuronal	0/2	1/6
Infiltrado perivascular de linfocitos en encéfalo	0/2	1/6
Hiperplasia linfoide	1/2	2/6
Congestión esplénica	2/2	0/6

Figura. 3 Fotomicrografías de los hallazgos histopatológicos después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.



a) Pulmón con sobredistensión de la pared arterial (40X) H y E, **b)** Pulmón con sobredistensión de la pared arteriolar (400X) H y E, **c)** Espacios alveolares pulmonares con material ligeramente eosinofílico homogéneo (edema) (100X) H y E, **d)** Arteria hepática con desarreglo y distensión de la capa media, así como vasos linfáticos distendidos y con material eosinofílico homogéneo en su interior (100X) H y E.

6.1.7. Evaluación ultraestructural

En las secciones de miocardio (cuadro 9 y figura 4), las miofibrillas presentaron áreas con separación y desarreglo, de moderada a severa multifocal, dejando espacios electrolúcidos. En los sarcómeros se observó pérdida en su organización con desarreglo en las diferentes líneas y bandas, así como disrupción de las proteínas contráctiles, de leve a moderado multifocal. Las mitocondrias se encontraban redondeadas, aumentadas de tamaño y en algunas de estas, las crestas mitocondriales estaban desorganizadas y dilatadas, mientras que en otras, se perdían parcial o totalmente, observándose en su interior material granular de moderada electrodensidad, compatible con degeneración mitocondrial (figura 5).

Otros hallazgos que se presentaron con menor frecuencia y de forma más discreta, corresponden a membrana nuclear irregular y discretamente indentada, así como agregados discretos de heterocromatina plegada a la periferia del núcleo, predominando la eucromatina en la mayoría de los casos. Algunas células presentaban en los polos de los núcleos agregados semiredondos de material homogéneo de moderada electrodensidad compatibles con lipofucsina. Se revisaron otros componentes de las miofibrillas, así como los discos intercalares sin alteraciones ultraestructurales.

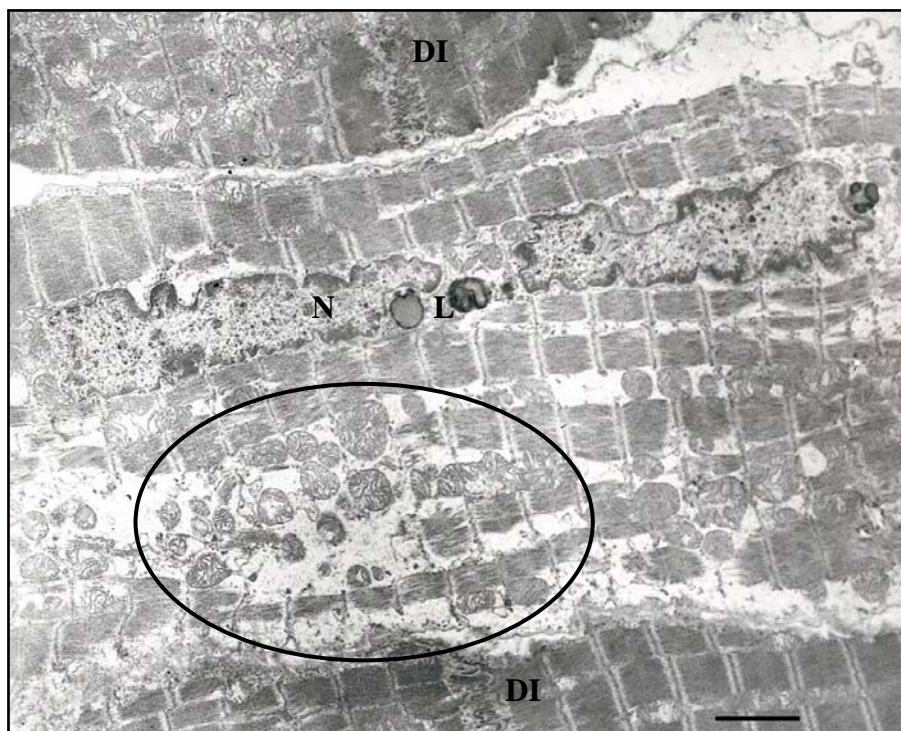
En las secciones de pulmón (figura 6) se evaluaron secciones de pared alveolar, que incluyeron neumocitos tipo I, neumocitos tipo II y endotelio vascular, así como la barrera alvéolo capilar, sin apreciarse alteraciones ultraestructurales. En los espacios alveolares se apreció de forma aleatoria, material granular fino de moderada electrodensidad compatible con edema intraalveolar.

Cuadro 9. Evaluación ultraestructural de miocardio después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.

Observación	Control	Problema	P
Separación de miofibrillas	0/2	6/6	0.036*
Desarreglo de sarcómeros	0/2	6/6	0.036*
Agrandamiento de mitocondrias	0/2	6/6	0.036*
Pérdida de crestas mitocondriales	0/2	6/6	0.036*
Material fino granular en alvéolos	0/2	6/6	0.036
Identaciones nucleares	1/2	3/6	0.786
Gránulos de lipofuscina	1/2	3/6	0.786

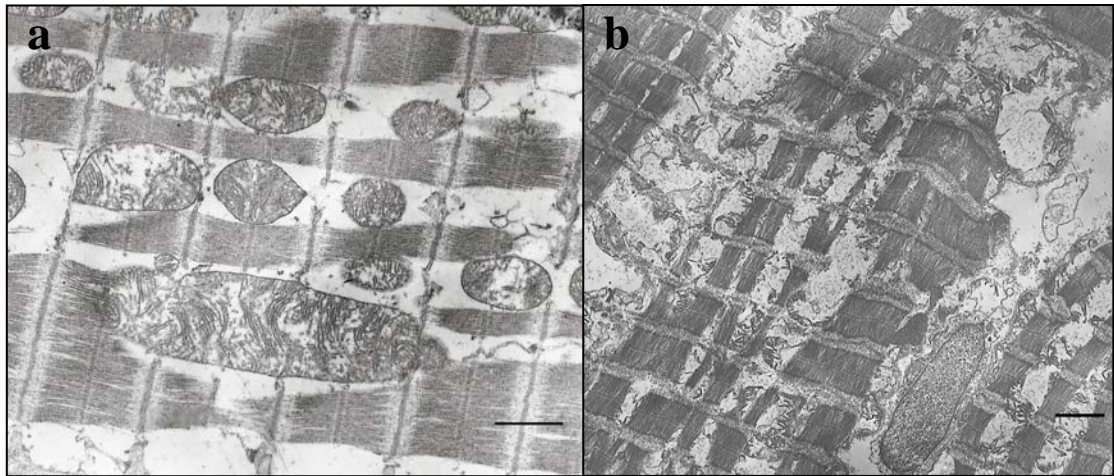
Los resultados se muestran en frecuencia de presentación. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Figura. 4. Fotoultramicrografía de miofibrilla cardiaca después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.



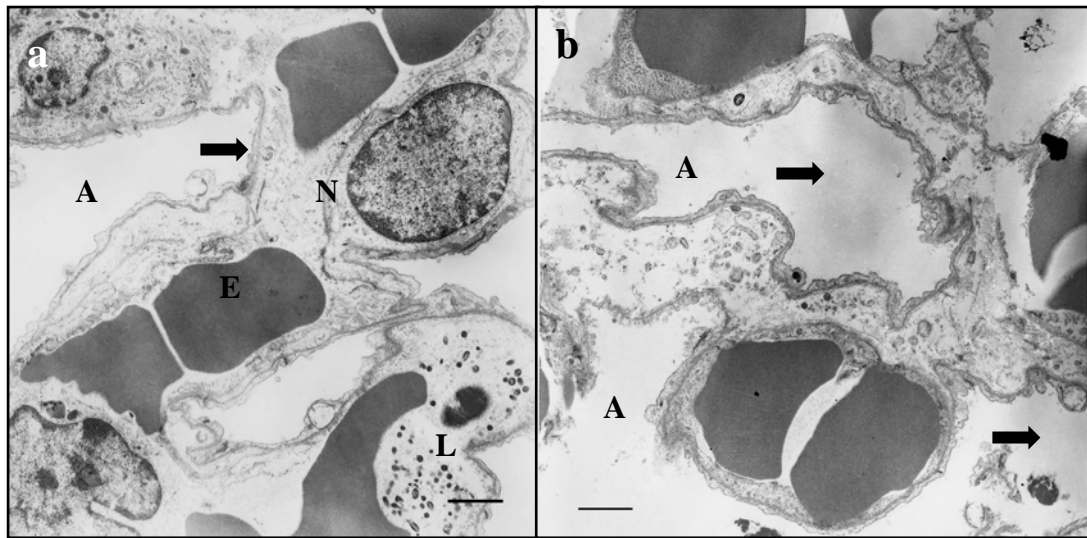
Miofibrilla con núcleos indentados (N), acúmulos de lipofuscina (L), así como zonas de separación y ruptura de sarcómeros, con alteraciones mitocondriales (óvalo). Los discos intercalares (di) no presentan cambios. Barra=2.5µm.

Figura 5. Fotoultramicrografías de mitocondrias de fibras miocárdicas después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.



a) Aumento de tamaño de las mitocondrias con desorganización y pérdida parcial de las crestas mitocondriales. Barra=1.1 μ m. **b)** Ruptura de las mitocondrias y pérdida completa de las crestas mitocondriales. Barra=2.5 μ m.

Figura 6. Fotoultramicrografías de pulmón después de la administración EV de Casiopeína III-ia en perros.



a) Neumocito tipo 1 (N), eritrocitos (E), leucocito (L), barrera alvéolo capilar (flecha), espacio alveolar (A). Barra =1.7 μ m. **b)** Material granular fino de moderda electrodensidad interpretado como edema (flecha), espacio alveolar (A) Barra=1.7 μ m.

6.2. Casiopeína Ilgly

6.2.1. Signos clínicos y fisiógrafo

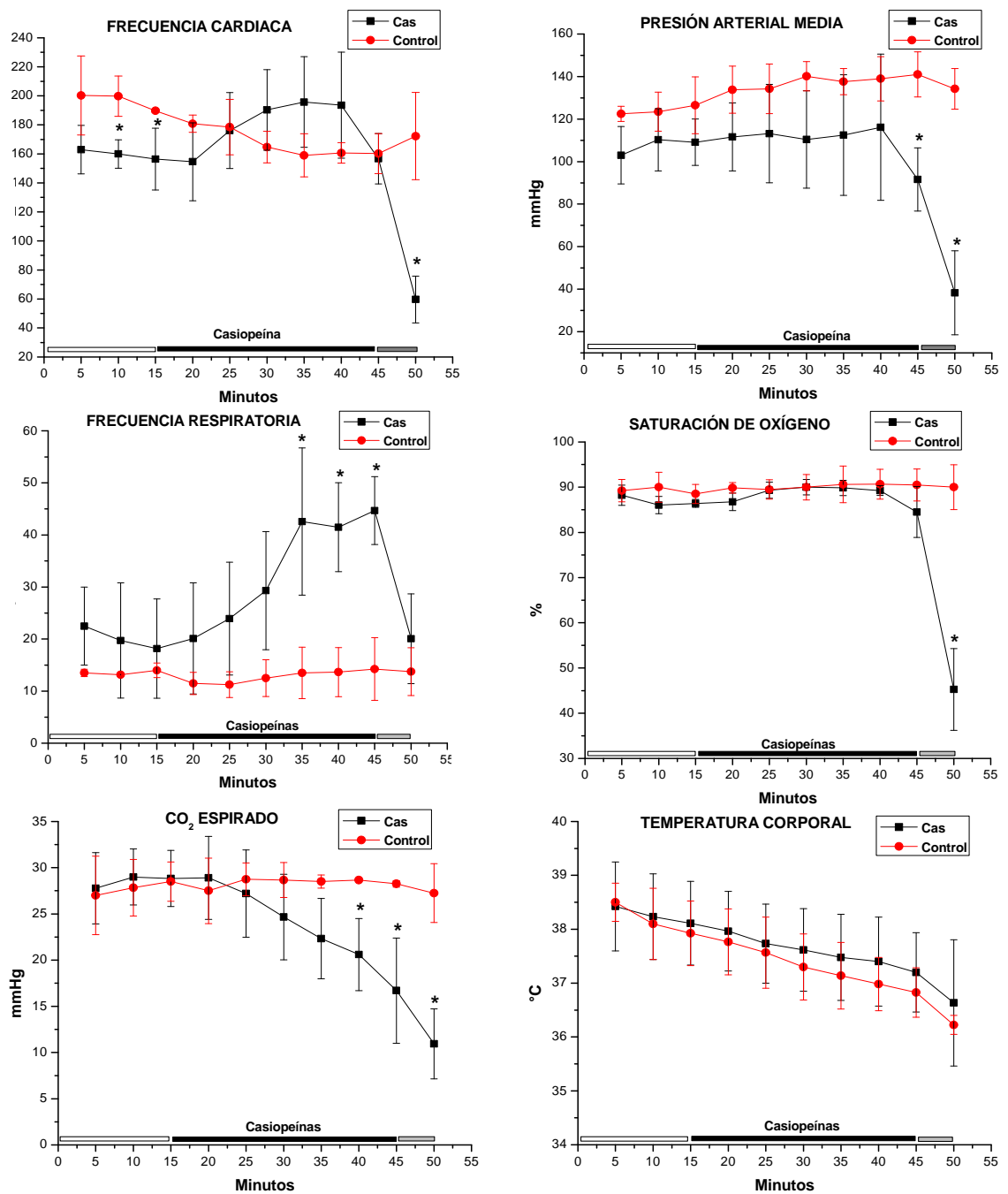
Los signos clínicos observados previos a la muerte de los perros correspondieron a disnea mixta (inspiratoria y espiratoria) taquipnea, cianosis y salida de líquido por la sonda endotraqueal.

Los resultados en el fisiógrafo (figura 7) indicaron en la frecuencia cardiaca diferencias significativas en los min 10 y 15 de las mediciones basales y posteriormente los últimos 5 min de vida presentándose bradicardia severa. La presión arterial media disminuyó significativamente a partir de los últimos 5 minutos de la administración del fármaco y los últimos 5 min de vida. La frecuencia respiratoria aumentó significativamente a partir de los 20 min de administrado el fármaco, continuando en los 25 y 30 min, para posteriormente disminuir previo a la muerte. La saturación de oxígeno disminuyó significativamente los últimos 5 min de vida. El CO₂ espirado disminuyó paulatinamente a partir de los min 25 y 30 de la administración, continuando hasta los últimos 5 min de vida. No se encontraron diferencias significativas en las mediciones de la temperatura corporal. Posterior a la administración de la Casiopeína Ilgly, la muerte de los perros sucedió en 7.2 ± 1.3 min.




6.2.2. Hemograma

En el hemograma (cuadro 10) no se encontraron diferencias significativas en ninguna línea celular.

Figura 7. Efecto de la administración EV de Casiopeína IIgly sobre los parámetros fisiológicos en perros.



Los datos son presentados en media \pm DE. El asterisco indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Perros problema $n = 6$. Perros control $n = 2$.
Cas = Casiopeína IIgly

 Mediciones basales
 Mediciones durante la administración
 Mediciones después de la administración

Cuadro 10. Efecto de la administración EV de Casiopeína Igly sobre los valores del hemograma en perros.

Analito	Basal	Problema	P	Valores de referencia
Hematocrito (L/L)	0.41 ± 0.04	0.48 ± 0.08	0.170	0.37 - 0.55
Hemoglobina (g/L)	138.1 ± 14.7	161.8 ± 27	0.171	120 – 180
Eritrocitos (X 10 ¹² /L)	6.5 ± 0.7	7.8 ± 1.3	0.170	5.5 – 8.5
VGM (fL)	63.7 ± 2.5	62.1 ± 2.9	0.303	60 – 77
CGMH (g/L)	331.7 ± 0.7	332 ± 0.8	0.741	320 – 360
Plaquetas (X 10 ⁹ /L)	347 ± 144.5	285.3 ± 168	0.728	200 – 550
Proteínas totales(g/L)	68.7 ± 5.3	67.6 ± 16.2	0.830	60 – 75
Leucocitos (X 10 ⁹ /L)	13.1 ± 3.5	10 ± 5.2	0.155	6.0 – 17.0
Neutrófilos (X 10 ⁹ /L)	8.4 ± 1.6	8.1 ± 5.1	0.924	3.0 – 11.5
Linfocitos (X 10 ⁹ /L)	3.0 ± 2.0	1.5 ± 0.7	0.132	1.0 – 4.8
Monocitos (X 10 ⁹ /L)	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.3	0.531	0.1 – 1.4
Eosinófilos (X 10 ⁹ /L)	1.1 ± 0.9	0.30 ± 0.36	0.102	0-0.9

Los datos son presentados en media ± DE. El asterisco indica diferencia estadística significativa (P<0.05).

VGM: Volumen globular medio.

CGMH: Concentración globular media de hemoglobina.

6.2.3. Bioquímica sanguínea

En la bioquímica sanguínea (cuadro 11) se encontraron incrementos significativos en los analitos de glucosa, bilirrubina, aspartato aminotransferasa y anion gap.

6.2.4. Equilibrio ácido-base

Los resultados de equilibrio ácido-base muestran disminuciones significativas en el pH, HCO_3^- , EB, PO_2 y SO_2 (cuadro 12). Los resultados se interpretaron como acidosis metabólica no compensada e hipoxemia severa.

6.2.5. Hallazgos en la necropsia y peso de los órganos

Los hallazgos observados en la necropsia (cuadro 13 y figura 8) que presentaron diferencias significativas se encontraron en aparato respiratorio y sistema linfático. En aparato respiratorio se apreció en el interior de la tráquea y bronquios, abundante líquido espumoso blanquecino secundario a edema pulmonar. Los pulmones no estaban colapsados y tenían aspecto edematoso. En la superficie de corte de todos los lóbulos pulmonares se encontró material gelatinoso y transparente, el cual estaba rodeando a vasos sanguíneos, esto indicativo de edema perivascular. En sistema linfático, los perros control tenían esplenomegalia y congestión esplénica, ya que el bazo estaba aumentado de tamaño y en la superficie de corte rezumaba abundante cantidad de sangre.

Con respecto al peso de los órganos (cuadro 14), el porcentaje de peso de los pulmones, fue mayor con diferencia significativa, en los perros problema que en los perros control, en contraste, el porcentaje de peso del bazo fue mayor en los perros control que en los perros problema.

Cuadro 11. Efecto de la administración EV de Casiopeína Ilgly sobre los valores de la bioquímica sanguínea en perros.

Analito	Basal	Problema	P	Valores de referencia
Glucosa (mmol/L)	4.2 ± 1.1	7.9 ± 1.5*	0.008	3.88 – 6.88
Urea (mmol/L)	8.4 ± 2.7	7.7 ± 2.4	0.527	2.1 – 7.9
Creatinina (µmol/L)	110.7 ± 21.2	115.6 ± 22.4	0.241	60 – 132
Colesterol (mmol/L)	4.2 ± 1.5	3.9 ± 1.4	0.157	2.85 - 7.76
Bilirrubina total (µmol/L)	2.8 ± 1.4	4.3 ± 0.54*	0.034	1.7 – 5.16
ALT (U/L)	30.6 ± 10.7	35.6 ± 14.1	0.137	< 70
AST (U/L)	34.0 ± 8.6	46.2 ± 8.5*	0.002	< 55
Fosfatasa alcalina (U/L)	54.0 ± 54.8	38.0 ± 13.7	0.384	< 189
Amilasa (U/L)	678.6 ± 217.1	739.2 ± 382.2	0.430	< 1110
Creatina cinasa (U/L)	211.3 ± 88.8	190.4 ± 48.1	0.878	< 213
Proteínas totales (g/L)	65.5 ± 8.1	70.0 ± 13.1	0.378	55 – 75
Albúmina (g/L)	25.6 ± 4.5	29.8 ± 7.1	0.210	29 – 40
Globulina (g/L)	39.8 ± 5.8	40.2 ± 7.5	1.000	23 – 39
Calcio (mmol/L)	2.4 ± 0.2	2.7 ± 0.2	0.203	2.17 – 2.94
Fósforo (mmol/L)	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.961	0.80 – 1.80
Potasio (mmol/L)	4.9 ± 0.3	4.4 ± 0.1	0.089	3.8 – 5.4
Sodio (mmol/L)	147.1 ± 4.0	146.0 ± 3.1	0.208	141 -152
Cloro (mmol/L)	116.8 ± 4.9	116.0 ± 4.1	0.763	108 – 117
†Bicarbonato (mmol/L)	21.0 ± 2.0	13.9 ± 2.7*	0.001	17 – 25
Anion gap (mmol/L)	14.2 ± 2.5	20.3 ± 2.3*	0.012	12 – 24
DIF (mmol/L)	30.3 ± 1.2	30.0 ± 3.2	0.722	30 – 40
Osmolalidad (mOsm/kg)	293.6 ± 7.3	295.0 ± 7.4	0.512	280-305
Triacilglicéridos (U/L)	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.450	0.6 - 1.2

Los datos son presentados en media ± DE. El asterisco indica una diferencia significativa (P<0.05).

ALT: Alanina aminotransferasa.

AST: Aspartato aminotransferasa.

DIF: Diferencia de iones fuertes.

† El valor del bicarbonato se obtuvo a partir de la gasometría.

Cuadro 12. Efecto de la administración EV de Casiopeína Ilgly sobre los valores del equilibrio ácido-base en perros.

Analito	Basal	Problema	P	Valores de referencia
pH	7.38 ± 0.06	7.23 ± 0.06*	0.014	7.32 – 7.45
PCO ₂ mm/Hg	32.8 ± 3.4	34.5 ± 10.3	0.729	26 - 46
HCO ₃ ⁻ mmol/L	21.0 ± 2.0	13.9 ± 2.7*	0.001	17 - 24
EB mmol/L	-4.2 ± 2.2	-11.4 ± 4.5*	0.011	-5.8 – 3.6
PO ₂ mm/Hg	71.0 ± 10.9	28.5 ± 12.9	0.001	> 60
SO ₂ %	91.4 ± 4.2	41.1 ± 22.3	0.003	> 90

Los datos son presentados en media ± DE. El asterisco indica diferencia significativa (P<0.05).

Cuadro 13. Hallazgos macroscópicos en la necropsia después de la administración EV de Casiopeína Ilgly en perros.

Observación	Control	Problema	P
Espuma en tráquea	0/2	6/6*	0.036
Pulmones no colapsados	0/2	6/6*	0.036
Pulmones con aspecto edematoso	0/2	6/6*	0.036
Congestión pulmonar	0/2	6/6*	0.036
Edema perivascular en pulmones	0/2	6/6*	0.036
Intestino con serosa irregular	1/2	3/6	0.786
Pared intestinal engrosada	1/2	3/6	0.786
Presencia de parásitos (<i>Dypilidium sp</i>)	1/2	2/6	0.643
Ligera dilatación del ventrículo derecho	1/2	1/6	0.464
Nefritis intersticial	1/2	2/6	0.643
Esplenomegalia	2/2	0/6*	0.036
Congestión esplénica	2/2	0/6*	0.036

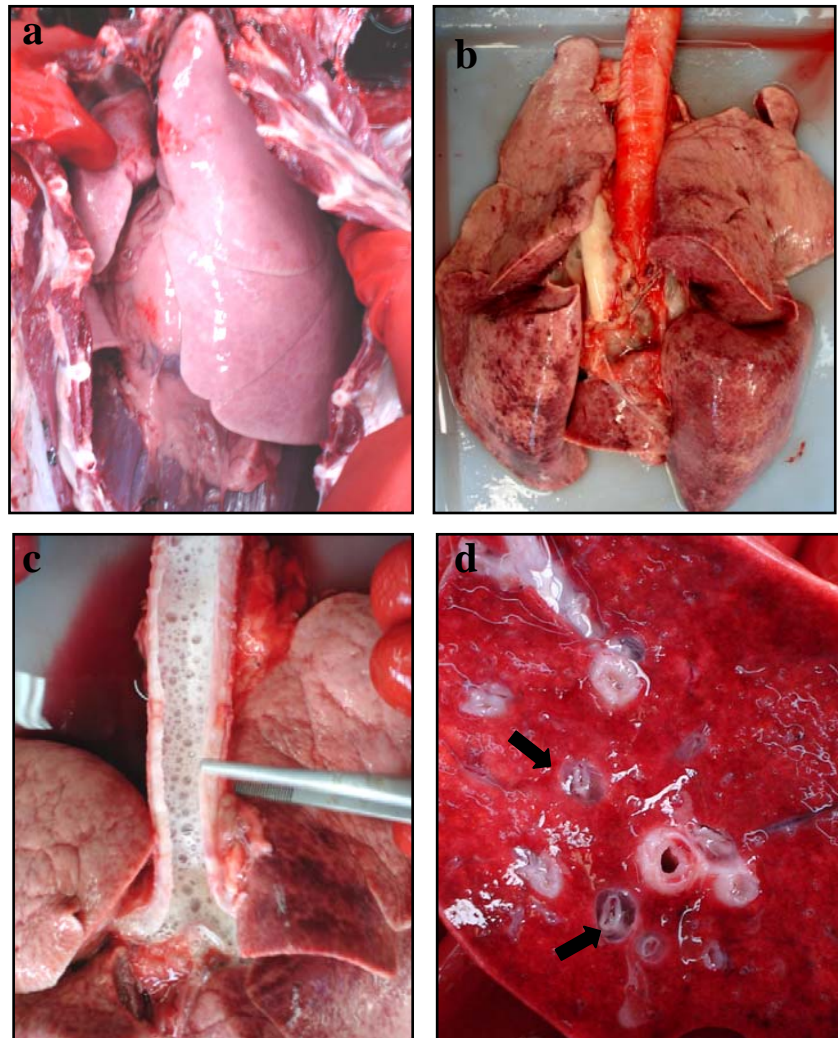
Los resultados se muestran en frecuencias de presentación. El asterisco indica diferencia significativa (P<0.05).

Cuadro 14. Valores del peso de los órganos en la necropsia después de la administración EV de Casiopeína Ilgly en perros.

Órgano	Control	Problema	P
Pulmones	0.65 ± 0.07	1.8 ± 0.24*	0.001
Corazón	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.33	0.575
Hígado	2.4 ± 0.0	3.5 ± 1.3	0.319
Bazo	0.65 ± 0.07	0.3 ± 0.01*	0.034

Los valores del peso de los órganos son presentados en porcentaje con base en el peso corporal total de cada perro, obteniéndose la media ± DE. El asterisco indica una diferencia significativa (P<0.05).

Figura 8. Hallazgos macroscópicos en la necropsia después de la administración EV de Casiopeína IIgly en perros.



a) Pulmones no colapsados en cavidad torácica, **b)** Pulmones con aspecto edematoso, **c)** Abundante espuma blanca en el lumen traqueal, **d)** Superficie de corte de pulmón con material gelatinoso y transparente alrededor de los vasos sanguíneos (flechas).

6.2.6. Evaluación histopatológica

Se encontraron diferencias significativas en cerebro, pulmones, miocardio e hígado (cuadro 15). En cerebro, se encontró congestión, ya que los vasos sanguíneos se encontraban dilatados y repletos de eritrocitos. En pulmones (figura 9), la mayoría de las arterias y arteriolas presentaban sobredistensión marcada, principalmente entre la media y la adventicia. Dentro del espacio sobredistendido se observó edema en algunas arterias, ya que había material homogéneo ligeramente eosinofílico. Los espacios alveolares se encontraban ocupados por material homogéneo ligeramente eosinofílico y en algunos casos fibrilar, esto indicativo de edema pulmonar. También se observó congestión, puesto que, los septos alveolares estaban ligeramente engrosados y tenían abundante cantidad de eritrocitos. En hígado los sinusoides hepáticos se encontraban repletos de eritrocitos, lo cual se interpreta como congestión. Las arterias hepáticas presentaban desarreglo y distensión de la capa media y adventicia; alrededor de las mismas se apreciaban vasos linfáticos dilatados y con presencia de material homogéneo eosinofílico en su interior sugerente de incremento en la presión hidrostática vascular en dicho órgano (figura 9). En el miocardio del ventrículo derecho se apreciaron fibras cardíacas hipereosinofílicas, sin embargo, no se encontró significancia clínica.

Otros hallazgos histopatológicos de menor importancia y que no tienen relación con el fármaco se muestran en frecuencia de presentación (cuadro 16).

Cuadro 15. Hallazgos histopatológicos después de la administración EV de Casiopeína Ilgly en perros.

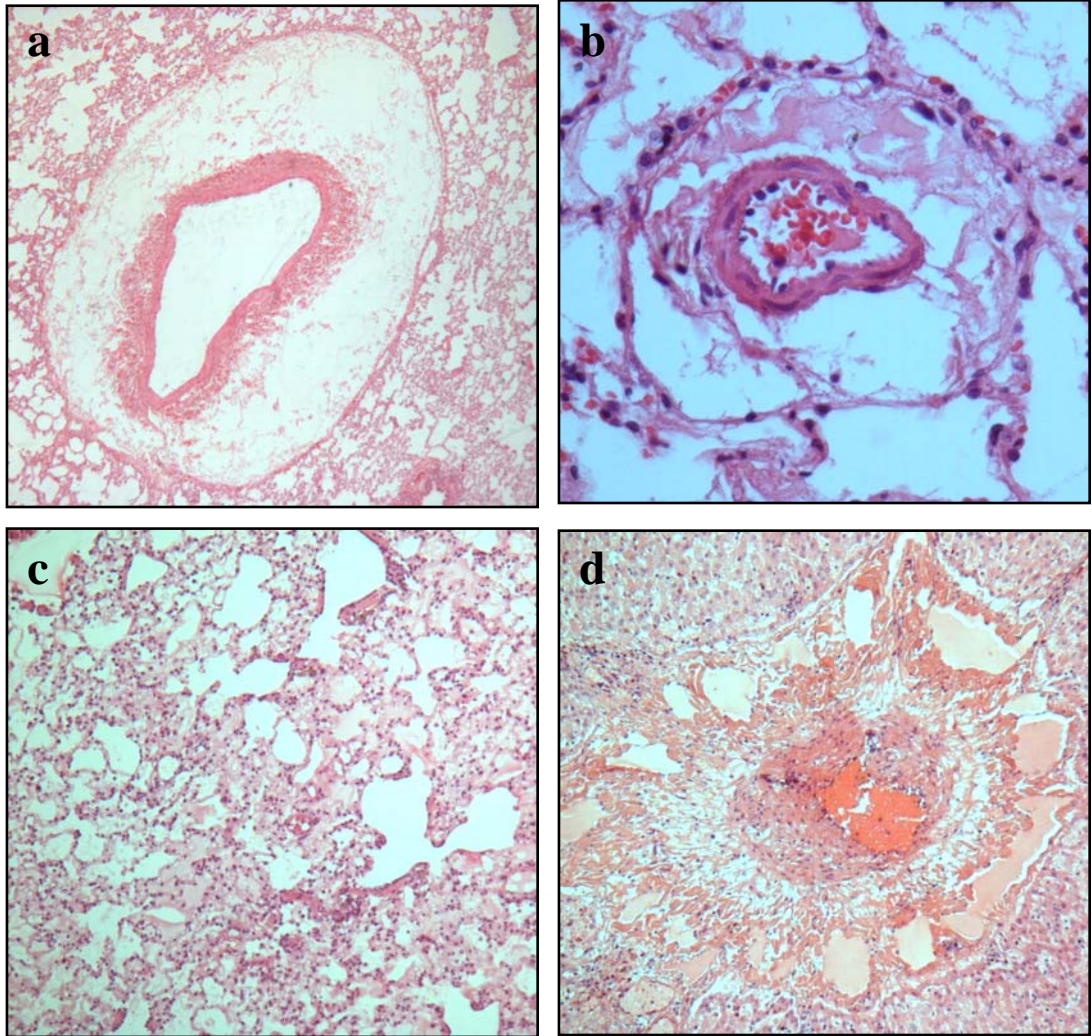
Órgano	Lesión	Control	Problema	P
Cerebro	Edema perivascular	2.1 ± 1.3	2.9 ± 1.6	0.077
	Congestión	63.0 ± 27.3	80.0 ± 21.*	0.004
Pulmones	Sobredistensión vascular	0.8 ± 0.8	5.7 ± 3.6*	0.000
	Edema	3.0 ± 0.5	34.5 ± 24.7*	0.000
	Congestión	20.0 ± 6.6	38.6 ± 20.1*	0.000
Miocardio ventrículo izquierdo	Separación de fibras	55.0 ± 7.0	70.0 ± 28.2	0.497
	Material granular	100 ± 10	96.6 ± 5.1	0.378
	Fibras hipereosinofílicas	10.0 ± 14.1	15.0 ± 5.4	0.584
Miocardio ventrículo derecho	Separación de fibras	95.0 ± 7.0	70.0 ± 29.6	0.387
	Material granular	100.0 ± 0.00	90.0 ± 15.4	0.248
	Fibras hipereosinofílicas	0.0 ± 0.0	41.6 ± 21.3*	0.043
Hígado	Sobredistensión vascular y linfangiectasia	43.0 ± 10.5	55.0 ± 14.0*	0.016
	Congestión	24.9 ± 15.2	38.2 ± 17.7*	0.000

El asterisco indica una diferencia significativa (P<0.05).

Cuadro 16. Frecuencias de presentación de otros hallazgos histopatológicos después de la administración EV de Casiopeína Ilgly en perros.

Observación	Control	Problema
Degeneración hidrópica hepática	1/2	2/6
Congestión renal	0/2	1/6
Nefritis linfoplasmocitaria multifocal	0/2	2/6
Hiperplasia linfocítica	1/2	3/6

Figura 9. Fotomicrográficas de los hallazgos histopatológicos después de la administración EV de Casiopeína Ilgly en perros.



a) Pulmón con sobredistensión de la pared arterial (40X) H y E, **b)** Pulmón con sobredistensión de la pared arteriolar (400X) H y E, **c)** Espacios alveolares pulmonares con material eosinofílico homogéneo (edema) (100X) H y E, **d)** Arteria hepática con desarreglo y distensión de la capa media, así como vasos linfáticos distendidos y con material eosinofílico homogéneo en su interior (100X) H y E.

6.2.7. Evaluación ultraestructural

En las secciones de miocardio (cuadro 17), las miofibrillas presentaron áreas con separación y desarreglo, de moderada a severa multifocal, dejando espacios electrolúcidos (figura 10). En los sarcómeros se observó pérdida en su organización con desarreglo en las diferentes líneas y bandas, así como disrupción de las proteínas contráctiles, de leve a moderado multifocal. Las mitocondrias se encontraban redondeadas, aumentadas de tamaño, con crestas mitocondriales desorganizadas, dilatadas y con pérdida parcial o total de las mismas.

Otros hallazgos menos importantes que se presentaron corresponden a membrana nuclear irregular y discretamente indentada, así como agregados discretos de heterocromatina plegada a la periferia del núcleo. Algunas células presentaban en los polos de los núcleos agregados semiredondos de material homogéneo de moderada electrodensidad compatibles con lipofucsina. Se revisaron otros componentes de las miofibrillas, así como los discos intercalares sin observarse alteraciones ultraestructurales.

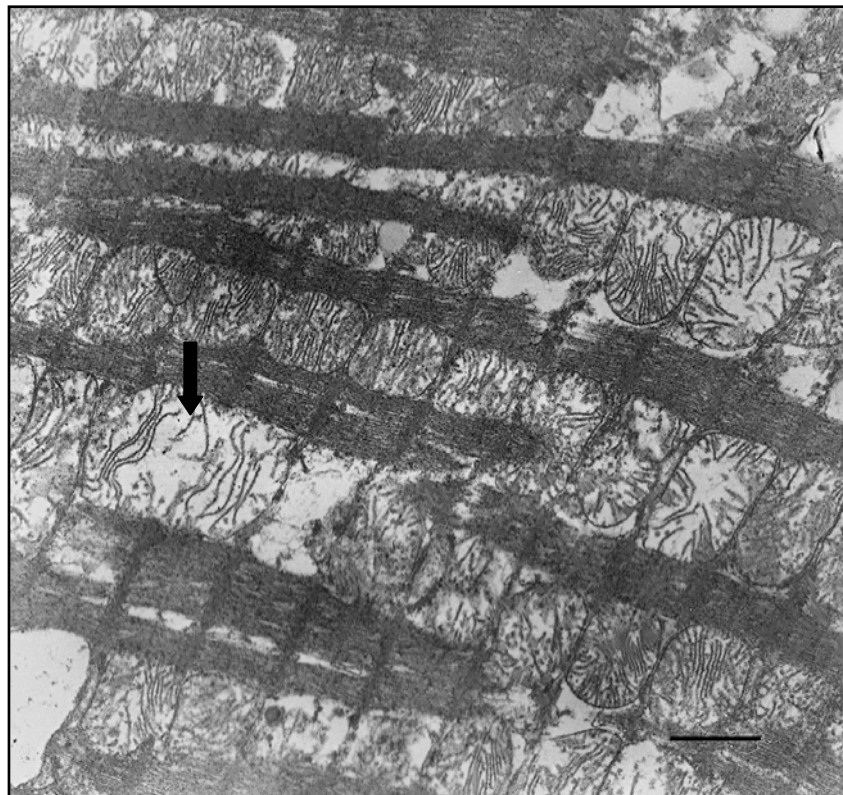
En las secciones de pulmón se evaluaron paredes alveolares, que incluyeron neumocitos tipo I, neumocitos tipo II y endotelio vascular, así como la barrera alvéolo capilar, sin apreciarse alteraciones ultraestructurales (Figura 11). En los espacios alveolares se apreció de forma aleatoria, material granular fino de moderada electrodensidad compatible con edema intraalveolar.

Cuadro 17. Evaluación ultraestructural de miocardio después de la administración EV de Casiopeína IIgly en perros.

Observación	Control	Problema	P
Separación de miofibrillas	0/2	6/6	0.036*
Desarreglo de sarcómeros	0/2	6/6	0.036*
Agrandamiento de mitocondrias	0/2	6/6	0.036*
Pérdida de crestas mitocondriales	0/2	6/6	0.036*
Material fino granular en alvéolos	0/2	6/6	0.036*
Identaciones nucleares	1/2	3/6	0.786
Gránulos de lipofuscina	1/2	2/6	0.643

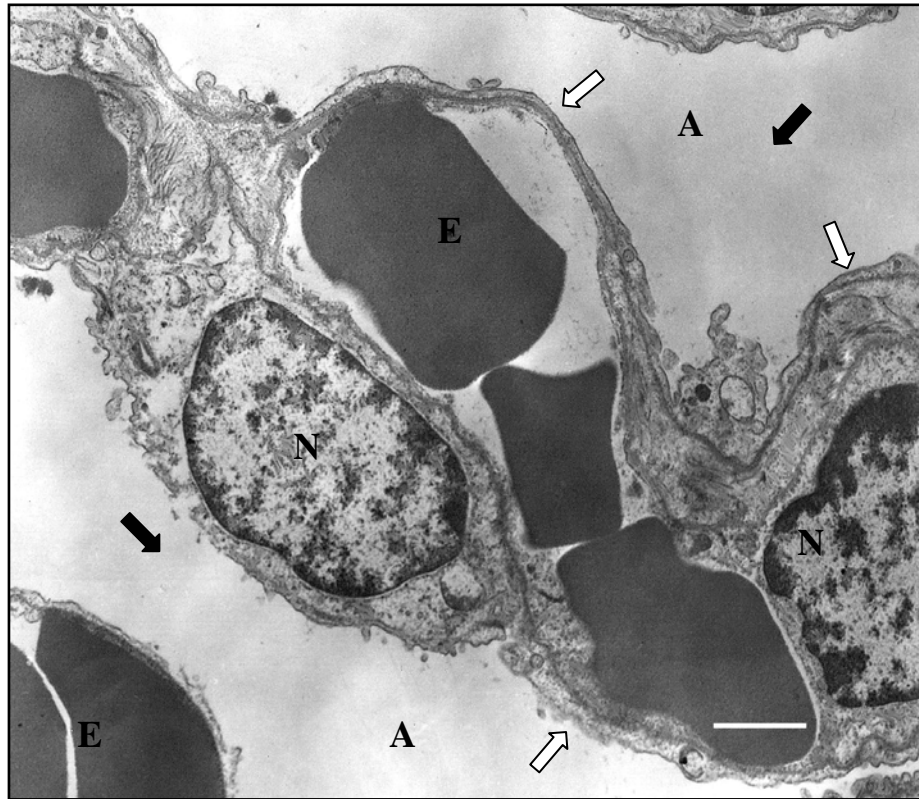
Los resultados se muestran en frecuencias de presentación. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Figura 10. Fotoultramicrografía de miofibrilla cardiaca después de la administración EV de Casiopeína IIgly en perros.



Desarreglo de sarcómeros con aumento de tamaño de las mitocondrias, así como pérdida de las crestas mitocondriales (flecha). Barra=1.1 μ m.

Figura 11. Fotoultramicrografía de pulmón después de la administración EV de Casiopeína IIgly en perros.



Barrera alvéolo capilar (flechas blancas), neumocitos tipo 1 (N), eritrocitos (E), espacio alveolar (A) y material granular fino de moderada electrodensidad interpretado como edema (flechas negras). Barra=1.7 μ m.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el transcurso de nuestro estudio, arrojan información importante con la cual se puede determinar la causa de muerte de los animales tratados con ambas Casiopeínas. Los hallazgos entre un fármaco y otro son muy similares, por lo cual se discutirán como uno mismo, haciendo mención en donde existan diferencias relevantes.

Uno de los hallazgos más contundentes que se pudo detectar a través de la observación de los signos clínicos, los hallazgos en la necropsia, las evaluaciones histopatológica y ultraestructural corresponde a edema pulmonar, por lo cual la discusión se enfocará principalmente en este punto.

El edema pulmonar se define como un incremento en la cantidad de líquido extravascular el cual se acumula en el espacio intersticial y alveolar de los pulmones.^{67,68} Como en otras partes del cuerpo, el movimiento y distribución de los líquidos están regulados por el equilibrio de las presiones hidrostática y coloidosmótica de la sangre y del espacio intersticial, así como de la permeabilidad vascular.^{69,70} El proceso de formación de edema pulmonar se inicia con el aumento anormal de agua y solutos del plasma al espacio intersticial, extravasados de los capilares.⁷¹ Si la cantidad de líquido que se pierde de los capilares pulmonares rebasa la capacidad de resorción de las vénulas, el exceso es drenado por los vasos linfáticos.^{69,72,73} Cuando se excede la capacidad de drenaje de los vasos linfáticos se inicia la acumulación anormal de líquido en los pulmones constituyendo la fase inicial del edema. El sitio en donde primero se acumula el líquido es en el tejido conectivo laxo que rodea a los bronquios y a los vasos de mayor calibre.⁶⁸ A continuación el líquido se filtra distendiendo el tejido adyacente a los capilares pulmonares. Posterior a esta etapa, inicia el flujo de líquido hacia la luz de los alvéolos en forma abrupta y progresiva.^{68,69}

Fisiopatológicamente existen principalmente dos clasificaciones que explican la formación del edema pulmonar: 1) de origen cardiogénico; caracterizado por incremento en la presión hidrostática y 2) no cardiogénico; caracterizado por aumento en la permeabilidad vascular.⁷⁴

El edema pulmonar cardiogénico es la causa más común de todos los edemas pulmonares y se presenta por incremento en la presión capilar pulmonar debido a insuficiencia cardíaca izquierda.^{75,76} El incremento en la presión hidrostática ocasiona aumento en la extravasación de líquido, el cual finalmente supera a la capacidad del flujo linfático para removerlo.⁷³ Como sucedió en nuestro estudio, el líquido puede distender la mayor parte del intersticio pulmonar y posteriormente llenar por completo los espacios alveolares.^{69,70}

El edema no cardiogénico se presenta por incremento en la permeabilidad del endotelio y está relacionado con lesión directa a la barrera alvéolo-capilar,^{77,78} este se puede dar por muchas causas dentro de las cuales encontramos el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, que puede ser producido por sepsis, pancreatitis, neoplasia metastásica, trauma tisular severo, enfermedades inmunomediadas y enfermedades asociadas con vasculitis sistémicas.^{69,79} Otra condición importante es el síndrome de distres respiratorio agudo,^{78,80} el cual se presenta como consecuencia final de un conjunto de enfermedades dentro de las cuales, las más comunes son septicemia y neumonía bacteriana.^{68,69,74,80} El resultado final es la extravasación de líquido y pérdida de proteínas, inicialmente en el espacio intersticial y en casos más severos en el interior de los alvéolos.^{69,70}

Dado que el objetivo de este trabajo es determinar la causa de muerte y conocer los probables mecanismos implicados en esta, es preciso tratar de definir con base en las diferentes evaluaciones realizadas, lo que probablemente ocasionó el edema pulmonar en los perros de este estudio.

Uno de los hallazgos importantes que nos puede ayudar a discernir entre las dos formas de edema pulmonar en nuestro estudio, corresponde a la lesión ultraestructural encontrada en miocardio, relacionada con separación y desarreglo de miofibrillas y sarcómeros, así como hinchamiento severo de mitocondrias con pérdida de crestas mitocondriales. Estas lesiones podrían ser provocadas por diversos mecanismos, en donde pueden jugar un papel importante las Casiopeínas. Se ha descrito el efecto tóxico de las Casiopeínas III-ia y IIgly sobre mitocondrias aisladas.³³ En dicho estudio los resultados muestran que estos

fármacos afectan la respiración mitocondrial de dos formas: 1) inhibiendo marcadamente a la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH) y 2) produciendo la apertura de canales de K^+ que a su vez provoca hinchamiento mitocondrial marcado. Una captación masiva de K^+ a través de estos canales puede inducir colapso del potencial de membrana e inhibición de la fosforilación oxidativa. Por otro lado, se ha estudiado también el efecto cardiotoxico de las Casiopeínas sobre corazones aislados de ratas.⁴⁹ Los resultados de este estudio, sugieren que estos fármacos inhiben al complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH), a la 2-OGDH, así como a la enzima creatina cinasa, por lo tanto se afecta la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP y la transferencia de ATP hacia la miofibrilla. Otro mecanismo propuesto de lesión celular inducido por las Casiopeínas incluye la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), producto de reacciones de oxido-reducción que sufre el cobre contenido en el fármaco.^{31,48} El daño producido por las ERO pueden modificar el potencial de membrana mitocondrial con cambios subsecuentes en la permeabilidad y por lo tanto, liberación de factores apoptogénicos.⁴⁸ Aunado a esto, los perros en nuestro estudio, cursan en las últimas etapas de vida con hipoxemia severa y por lo tanto hipoxia tisular, lo cual pudo contribuir a la lesión mitocondrial. El hinchamiento de la mitocondria por falta de oxígeno es un lesión común, especialmente en células de corazón y otros órganos con alto metabolismo.⁷¹ La ausencia de oxígeno suprime también la fosforilación oxidativa y esta interrupción produce rápidamente daño estructural en las crestas mitocondriales,^{71,81,82} hallazgo que se observó ultraestructuralmente en nuestro estudio. También se sabe que las células de miocardio utilizan cerca del 100% del oxígeno que pasa a través de los capilares, esta alta demanda de oxígeno hace que el miocardio sea particularmente susceptible a condiciones hipóxicas.⁸¹ Cambios ultraestructurales en miofibrillas cardiacas similares a los observados en nuestro estudio, se han descrito en hipoxia aguda producida por infartos miocárdicos en humanos.⁸¹

Como hemos visto, las Casiopeínas podrían interactuar con las mitocondrias cardiacas induciendo una variedad de efectos directos o indirectos, sobre diferentes sitios y por diversos mecanismos de acción, los cuales culminan en la inhibición de la fosforilación oxidativa, así como disminución en la síntesis y utilización del ATP.

Debido a la gran cantidad de trabajo realizado por el corazón, el ATP tiene una función central como fuente de energía para la contracción.⁸³ Las escasas reservas energéticas del corazón hacen necesario que la producción de ATP sea muy rápida y constante.⁷² En cada latido se consumen hasta el 5% del ATP y del creatin fosfato totales. Estos procesos necesitan un aporte continuo de oxígeno, ya que la glucólisis anaeróbica sólo asegura del 5 al 7% de las necesidades energéticas normales mediante el metabolismo de piruvato a lactato.⁸⁴

Una de las funciones más importante del ATP en la fisiología cardiaca corresponden a su participación en la contracción muscular, la cual se produce por el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina. Durante esta interacción la cabeza de miosina hidroliza ATP. La hidrólisis del ATP y la disociación de los productos fuertemente unidos (ADP y Pi) producen una serie ordenada de cambios en la conformación de la miosina que da lugar a la contracción muscular.^{1,83}

Se ha explicado por una parte, como las Casiopeínas podrían afectar la función mitocondrial miocárdica inhibiendo la fosforilación oxidativa, disminuyendo la síntesis y utilización de ATP, lesionando sus componentes estructurales por la probable producción de ERO y como la hipoxia tisular pudo contribuir al daño mitocondrial.

Por otro lado se ha expuesto la importancia de un adecuado aporte de oxígeno tisular al miocardio, el papel del ATP como fuente de energía imprescindible para la contracción muscular cardiaca, así como la sensibilidad particular del corazón a estos dos factores.

Con esta información podemos inferir que en nuestro estudio, las alteraciones producidas por las Casiopeínas en el metabolismo energético, podrían afectar primordialmente al miocardio, causando disminución en la contractibilidad del mismo, disminución en el gasto cardíaco^{49,85} y por ende, insuficiencia cardíaca.⁸⁶

En nuestro estudio, por lo tanto, el edema pulmonar pudo estar causado por una insuficiencia cardíaca aguda. En este caso, las elevadas presiones sistólicas en el ventrículo y atrio izquierdo, se transmiten hasta las venas y los capilares pulmonares; cuando la presión hidrostática pulmonar supera los 25 mmHg de forma aguda, sucede la trasudación de líquido al intersticio pulmonar y espacios alveolares,^{75,84} como se explicó anteriormente para el caso de edema pulmonar cardiogénico. En nuestro estudio un mecanismo adicional que pudo agravar aún más el edema pulmonar está relacionado con la vasoconstricción pulmonar e hipertensión venosa producida por la hipoxemia.⁸⁷

A pesar de que en los hallazgos ultraestructurales de pulmón no se encontraron alteraciones que puedan sugerir destrucción de los componentes del epitelio alveolar, no se puede descartar del todo lesión vascular e incremento en la permeabilidad endotelial, dado que no se evaluaron vasos sanguíneos de mayor calibre, ni se realizaron pruebas hemodinámicas más específicas, como la medición de presiones sanguíneas en la arteria pulmonar o atrio izquierdo, con lo cual se podría confirmar con seguridad si el edema pulmonar es cardiogénico o no cardiogénico.

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de los parámetros fisiológicos, así como los signos clínicos observados en los animales previo a la muerte, son complicaciones secundarias al edema pulmonar severo y agudo.

Uno de los hallazgos más evidentes que se identificó a través de oximetría de pulso y gasometría corresponde a la hipoxemia severa, la cual es una complicación frecuentemente acompañada con disnea y taquipnea.⁸⁸ La hipoxemia puede desarrollarse en un animal por 5 razones: 1) baja concentración de oxígeno inspirado, 2) hipoventilación, 3) desviaciones sanguíneas cardíacas (derecha-izquierda), 4) alteraciones en la relación ventilación perfusión (V/Q) y 5)

inadecuada difusión de gases.⁸⁹ En este trabajo las causas que pueden estar involucradas corresponden a: 1) alteraciones en la relación V/Q, dado que en este caso disminuyen las áreas del pulmón ventiladas, ya que los espacios alveolares se encuentran ocupados por líquido, por lo tanto, pueden haber áreas del pulmón que estén adecuadamente profundizadas, sin embargo, la ventilación alveolar se ve comprometida y 2) inadecuada difusión de gases sanguíneos, debido a que el líquido en el interior de los alvéolos dificulta la capacidad del oxígeno para difundirse por la barrera alvéolo-capilar hacia los eritrocitos y así permitir el intercambio gaseoso.^{74,89,90,91}

La disnea se puede definir como un grado inapropiado de esfuerzo respiratorio, basado en la valoración de la frecuencia, ritmo y carácter de la respiración.^{88,92} En este estudio se presentaron disneas inspiratoria y espiratoria, con patrón restrictivo, lo cual es secundario a la dificultad de los pulmones para expandirse.⁸⁸

La taquipnea marcada presentada por los perros es a su vez una respuesta compensatoria inducida por la hipoxemia, así como por la acidosis metabólica.⁹³ Esto se explica debido a que la finalidad de la respiración, es mantener concentraciones adecuadas de oxígeno, dióxido de carbono e hidrogeniones en los tejidos, por lo tanto, la actividad respiratoria dependerá mucho de las variaciones de cada uno de estos factores.^{72,89} En este caso, el oxígeno no tiene un efecto directo significativo sobre el centro respiratorio del encéfalo en el control de la respiración, ya que actúa casi exclusivamente a través de quimiorreceptores periféricos situados en los cuerpos carotídeos y aórticos.⁹³ El resultado final de dicho estímulo, es el incremento en la frecuencia respiratoria y por lo tanto, de la ventilación alveolar, lo cual puede mejorar la oxigenación tisular.^{72,93,94}

La cianosis en mucosa oral y lengua, observada previo a la muerte de los animales es un reflejo clínico de la hipoxemia marcada por la cual estaban cursando. La cianosis se define como la coloración azulada de la piel o mucosas debida a cantidades excesivas de hemoglobina no saturada (o reducida) en la sangre capilar.^{90,91} La cianosis puede ser central o periférica. En este estudio se presentó cianosis central como resultado de la desaturación de la Hb arterial

sistémica, en estos casos se afectan todos los tejidos del cuerpo pero puede detectarse principalmente a nivel de mucosas y lengua.^{90,95}

La bradipnea e hipotensión arterial son la consecuencia final del choque cardiogénico^{96,97} resultado de la probable acción conjunta del fármaco con el escaso aporte de oxígeno a dicho órgano.

Los resultados del peso de los órganos y los hallazgos macroscópicos durante la necropsia, indicaron que el aparato respiratorio fue el mayormente afectado, confirmándose el edema pulmonar. Un hallazgo relevante en este estudio, correspondió a la lesión encontrada en la superficie de corte de todos los lóbulos pulmonares, relacionada con el material transparente alrededor de los vasos sanguíneos, el cual se hizo evidente a través de la evaluación histopatológica presentándose como sobredistensión vascular. A pesar de que este hallazgo no está claramente descrito en la literatura, sugerimos que puede indicar un incremento importante en la presión hidrostática en casos de edema pulmonar de tipo cardiogénico. Los perros control presentaron esplenomegalia y congestión esplénica grave, lo cual no se hizo evidente en los perros problema. Este hallazgo puede explicarse debido a que los perros control estuvieron mucho más tiempo anestesiados (1 h después de la administración de la dextrosa), y por otro lado, se les administró sobredosis de pentobarbital sódico para llevar a cabo la eutanasia.

Aunque en el transcurso de la discusión, se le ha dado mayor importancia a la insuficiencia cardiaca aguda del ventrículo izquierdo debido al edema pulmonar presentado por los animales, cabe la pena mencionar que los hallazgos histopatológicos congestivos observados en otros órganos y particularmente las alteraciones en hígado, pueden sugerirnos también insuficiencia cardiaca congestiva derecha.^{96,97} La razón por la cual aparentemente se ve más afectado el ventrículo izquierdo, puede estar relacionado con la mayor demanda de ATP y oxígeno del mismo, debido a las altas presiones sanguíneas a las que trabaja.

En los resultados del equilibrio ácido base se encontró acidosis metabólica por ganancia de ácidos, que en unión con la hipoxemia severa, se puede inferir que corresponde a una acidosis láctica.⁹⁸ La acidosis láctica se puede dividir en dos

categorías: 1) hipóxica y 2) no hipóxica.⁹⁹ En la acidosis láctica hipóxica la función de las mitocondrias es normal, pero el suministro de oxígeno a los tejidos es inadecuado. En la acidosis láctica no hipóxica hay un suministro adecuado a los tejidos pero la función oxidante de las mitocondrias es deficiente, particularmente en perros se sospecha que esto se puede producir por deficiencia de la enzima piruvato deshidrogenasa.⁹⁹ En nuestro estudio la acidosis láctica puede responder a ambos tipos, ya que por un lado las Casiopeínas pueden afectar la función mitocondrial y por lo tanto la fosforilación oxidativa y por otro, los perros cursan con una hipoxemia severa previo a la muerte. Aunado a esto, el choque cardiogénico provoca disminución de la perfusión de diferentes órganos y tejidos. El resultado de estos mecanismos es la acumulación de lactato y ácido pirúvico, produciéndose la acidosis láctica secundaria al metabolismo anaeróbico.^{82,98}

En el hemograma, hubo diferencias entre Casiopeína III-ia y Casiopeína IIgly. En Casiopeína III-ia, se observaron aumentos significativos en la línea roja, los cuales son resultado de estasis venosa y congestión,¹⁰⁰ secundario a bradicardia e hipotensión severa, debido a que en la última toma de muestra el animal estaba próximo a paro cardiorrespiratorio. En el leucograma se apreciaron disminuciones significativas en la cantidad de leucocitos, particularmente neutrófilos, esto puede ser debido al movimiento transitorio de los neutrófilos del conjunto circulante al conjunto marginal (pseudoneutropenia), lo cual puede ocurrir cuando hay mayor expresión de moléculas de adhesión en las membranas plasmáticas de los neutrófilos y de las células endoteliales o cuando la sangre fluye muy lentamente.^{100,101} En el caso de Casiopeína IIgly, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna línea celular, esto probablemente se atribuye a que la muerte sucede de forma más rápida.

En la bioquímica sanguínea para ambas Casiopeínas, ninguno de los cambios que presentaron diferencias estadísticas significativas tiene relevancia, puesto que en la mayoría (con excepción de la glucosa para Casiopeína IIgly) se encuentra dentro de valores de referencia y por otro lado no tienen relación con la

administración del fármaco. La hiperglucemia observada se asocia a la solución dextrosa administrada junto con el fármaco.

Por último, cabe la pena mencionar que los perros a los cuales se les administró Casiopeína IIgly, murieron en menor tiempo después de terminada la infusión (7.2 min promedio) que los perros a los cuales se les administró Casiopeína III-ia (24.8 min promedio), por otro lado las dosis letales de ambos fármacos son diferentes, siendo menor para el primero (8 mg/kg) que para el segundo (10 mg/kg), por lo tanto, Casiopeína IIgly resultó ser más tóxica que Casiopeína III-ia, a pesar de esto, el mecanismo toxicológico de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio es similar.

8. CONCLUSIONES

- Los hallazgos más importantes correspondieron a: disnea, taquipnea, cianosis, edema pulmonar, congestión hepática, lesión en miofibrillas y mitocondrias miocárdicas, acidosis metabólica por ganancia de ácidos, aumento y disminución en la cantidad de eritrocitos y leucocitos respectivamente.
- Con respecto al mecanismo de acción, las Casiopeínas III-ia y IIgly administradas vía endovenosa en perros a dosis de 10 mg/kg y 8 mg/kg de peso respectivamente, pueden tener efectos cardiotóxicos que inducen insuficiencia cardíaca aguda y de manera secundaria edema pulmonar cardiogénico, por lo que la muerte del animal puede estar asociada a insuficiencia cardio-respiratoria.
- Se infiere que el mecanismo de acción toxicológico de ambos fármacos es muy similar. La diferencia radica en que la Casiopeína IIgly es más tóxica que la Casiopeína III-ia por dos razones: 1) la DL99 es menor y 2) los animales mueren en un tiempo más corto.
- El conocimiento de la causa del proceso de muerte, así como el establecimiento de los probables mecanismos ocurridos, sientan las bases para idear la terapéutica más adecuada que pueda revertir parcial o totalmente los efectos adversos producidos por la administración de las Casiopeínas III-ia y IIgly en perros.
- Los resultados obtenidos en este estudio marcan la pauta a seguir para el diseño de próximas evaluaciones toxicológicas.

9. REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York:Garland Science, 2002.
2. Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. 2^a ed. USA:Wiley-Liss, 1999.
3. Cullen JM, Page R, Misdorp. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: Meuten DJ, editor. Tumors in domestic animals. 4^a ed. USA:Iowa State Press, 2002:3-27.
4. García CA. La célula cancerosa. En: Jiménez GL, Merchant L, editores. Biología celular y molecular. México:Pearson Educación, 2003:663-675.
5. Weinberg RA. How cancer arise. Sci Amer 1996, 275:62-70.
6. Lodish H, Berk A, Lawrence ZS, Matsudaira P. Baltimore D, Darnell. Biología celular y molecular. 4a Ed. Panamericana 2003.
7. Hill RP. Biología del cancer. En: Rubin P, Williams J, editores. Oncología clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 8^a ed. España:Elsevier Science, 2003:32-46.
8. Cotran SR, Kumar V, Collins T. Robbins Patología estructural y funcional. 6^a ed. Bogotá:Mc Graw-Hill, 2000.
9. World Health Organization. [data base on the internet] Fifty-Eighth world health assembly. 7 Abril 2005. Available from <http://www.who.int/mediacentre/news>.
10. Compendio de Cáncer. Registro Histopatológico de Neoplasias malignas. [Base de datos en iternet] Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/>
11. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. [Base de datos en iternet], Disponible en <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/>
12. Rubin P, Williams JP, Okunieff P, Roseblatt JD, Sitzman JV. Situación del problema oncológico clínico. En: Rubin P, Williams J, editores. Oncología clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 8^a ed. España:Elsevier Science, 2003:1-31.
13. Hannun Y. Apoptosis and the dilema of cancer chemotherapy. Blood 1997; 89:1845-1853.

14. Morrison WB. Chemotherapy. In: Morrison WB, editor. Cancer in the dog and the cat. USA:Williams and Wilkins,1998:351-358.
15. Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ, Hoffman BB. Farmacología integrada. Madrid, España:Harcourt Brace, 1998.
16. Bakemeier RF, Qazi R. Conceptos básicos de la quimioterapia antineoplásica y principios de la oncología médica. En: Rubin P, Williams J, editores. Oncología clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. 8ª ed. España:Elsevier Science, 2003:146-159.
17. Schwietert ChW, McCue JP. Coordination compounds in medicinal chemistry. Coordination Chemistry Reviews 1999;184:67-89.
18. Calabresi P, Chabner BA. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editores. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México:Mc Graw-Hill, 2003:1397-1463
19. Goldie HJ. Drug resistance in cancer: a prespective. Cancer and Metastasis Review. 2001, 20:63-68.
20. Salmon ES, Sartorelli AC. Quimioterapia del Cáncer. En: Katzung BG editor. Farmacología básica y clínica. México D.F.:Manual Moderno, 2002:1035-1071.
21. Bakke OM, Cladellas CX, García AF. Ensayos clínicos con medicamentos. Fundamentos básicos metodología y práctica. España:Doyma, 1994.
22. Ruiz AL, Gracia MI, Moreno ER, Díaz D, Gasque L, Huerta L, Mayet L, Ortiz V, Lomelí C. The antitumor activity of several transition metal complexes. Inorg Bioch 1991;66-67.
23. Ruiz AL, Martínez A, Gasque L, Moreno ER. Mixed chelate complexes. III. Structures of (L-alanino)(aqua)(2,2'-bipyridine)(L-tyrosinato) cooper(II). Nitrate monohydrate and aqua (2,2'-bipyridine)(L-tyrosinato) cooper(II) chloride trihydrate. Acta Cryst 1992;48:1785-1788.
24. Ruiz AL. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes cancerígenos. Tipo II. Patente de invención, SECOFI no. 172248.Dic.9 1993.

25. Ruiz AL. Procedimientos para la obtención de complejos metálicos como agentes cancerígenos. Tipo I. Patente de invención. SECOFI no. 172967. Enero 26 1994.
26. Ruiz AL. Process to obtain new mixed copper aminoacidote from methylate phenantroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. patent, Ap21 (1992). Number 5,107,005.U.S.patent Re 35,458, Feb 18 1997.
27. Ruiz AL. Process to obtain new mixed copper aminoacidote from methylate phenantroline complex to be used as anticancerigenic agents. U.S. patent No. 5,576,326. Nov 19 1996.
28. Gracia MI. Evaluación preclínica de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación. (Tesis de Maestría en Ciencias). México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 1999.
29. De Vizcaya RA, Rivero MA, Ruiz RL, Kass GE, Kelland RM, Dobrota M. Inducción of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in vitro* 2000; 14:1-5.
30. Gracia MI, Ruiz RL, Gómez RC, Tinoco MM, Márquez QA, Romero L, Marin HA, Macías RL, Bravo GM. Knigh't's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs*. 2001;8:19-29
31. Trejo SC, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez RA, Osorio RL, Sánchez TL, *et al.* Cass IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspasas-dependent and caspasas-independent mechanisms. *Neoplasia* 2005; 7:563-574.
32. Tovar TA, Ruiz AL, Campero A, Romerosa A, Moreno ER, Rosales HM. Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (Casiopeine III-ia[®]) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *J Inorg Biochem* 2004,98:1045-1053.

33. Marín HA, Gracia MI, Ruiz AL, Moreno SR. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas[®]) on mitochondrial function. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:1979-1989.
34. Bakke OM, Cladellas CX, García AF. Ensayos clínicos con medicamentos. Fundamentos básicos metodología y práctica. España:Doyma, 1994.
35. Monge A. Evolución de los métodos de búsqueda y descubrimiento de fármacos. En: Avedaño LC, editor. *Introducción a la química farmacéutica*. 2^a ed. España:McGraw-Hill, 2001:25-39.
36. Mayne TJ. Preclinical drug safety evaluation. In: Owen DB, Schucany WR. editors. *Drug safety assessment in clinical trials*. Marcel Dekker:New York, 1993:1-21.
37. Collichio F, Griggs J, Rosenblatt J. Conceptos básicos sobre el desarrollo de los fármacos y los ensayos clínicos. En: Rubin P, Williams J, editores. *Oncología clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. 8^a ed. España:Elsevier Science, 2003:160-167.
38. Clark GW, Brater CD, Johnson AR. *Farmacología médica*. Mosby:España, 1993.
39. Klasassen DC. Principios de toxicología y tratamiento de la intoxicación. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editores. *La bases farmacológicas de la terapéutica*. México:Mc Graw-Hill, 2003:73-86.
40. Gutiérrez BJ, López A. *Fundamentos de ciencia toxicológica*. España:Diaz de Santos, 2001.
41. Post OL, Bataller N, Parkhie M, Seller CW. Regulatory toxicology. In: Plumlee KH. *Clinical Veterinary Toxicology*. Missouri:Mosby. 2004:29-45.
42. Fort FL. Drug safety evaluation. In: Swarbrick J, Boylan JC. editors. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 2nd ed. Vol I, Marcel Dekker:Illinois 2002:995-1017.
43. Mayne JT. Preclinical drug safety evaluation. In: Gene SG, editor. *Drug safety assessment in clinical trails*. USA:Marcel Dekker, 1993:1-23.

44. Rhodes C. Principles of testing for acute toxic effects. In : Ballantyne B, Marrs TC, Syversen T, editors. General and applied toxicology. 2a ed. USA:Grove's Dictionaries, 2000:33-54.
45. Paine JA, Marrs CT. The design of toxicological studies. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen T, editors. General and applied toxicology. 2a ed. USA:Grove's Dictionaries, 2000:321-334.
46. Giráldez DA, Romero VA. Procedimientos experimentales en farmacología y toxicología. En: Zúñiga MJ, Turmarí JA, Milocco SN, Piñeiro R, editores. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. España:McGraw-Hill. Interamericana. 2001:489-152.
47. Fort FL. Animals in drug development. In: Swarbrick J, Boylan JC. editors. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 2nd ed. Vol I, Marcel Dekker:Illinois 2002:995-1017.
48. De Vizcaya RA, Rivero MA, Ruiz RL, Howarth JA, Dobrota M. Hematototoxicity response en rats, by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. Toxicology 2003, 194:103-113.
49. Hernández EL, Marín HA, Pavón M, Carvajal K, Moreno SR. Cardiotoxicity of cooper-based anineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. Toxicol and App pharmacol 2005, 1:79-88.
50. Rivera HM. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de la Casiopeína III en rata y ratón por vía intravenosa e intraperitoneal (tesis de licenciatura). México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
51. Tinoco MM. Administración de casiopeína I por vía intraperitoneal estudio anatomohistológico en ratones (tesis de licenciatura). México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.1994.
52. Quiroz RG. Toxicidad aguda de casiopeínas II por administración intravenosa en ratones, estudio anatomohistológico (Tesis de licenciatura). México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. 1994.

53. Marín VJ. Caracterización ultraestructural de lesiones en ratones inducidas por la aplicación de Casiopeína III. (tesis de maestría). México D.F: Universidad Autónoma de México.2001.
54. Castañeda PA, Aragón MA, Altamirano LM. Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína II- gly. Memorias del 1er Congreso Nacional de Química Médica Dedicado a la Investigación del Cáncer; 2004 noviembre 23-27; Oaxaca (Oaxaca) México, 2004.
55. Gómez DE. Determinación de toxicidad aguda de la Casiopeína en perros (tesis de maestría) México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. 1992.
56. Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ, Hoffman BB. Farmacología integrada. Madrid, España:Harcourt Brace, 1998.
57. Moreno A, Lucena MI. Farmacología clínica: ensayo clínico. En: Velasco MA, Fernández PL, Serrano MJ, Trilles AF, editores. Farmacología. 16ª ed. España:McGraw-Hill, 1993:1189-1208.
58. Cato A. Sutton L. Clinical evaluation of drugs. In: Swarbrick J, Boylan JC. editors. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 2nd ed. Vol I, Marcel Dekker:Illinois 2002:440-460.
59. Vos R. Drugs looking for diseases. Netherlands:Kluwer Academic Publishers, 1991:6-9.
60. Velasco MA. Introducción: concepto y sinopsis histórica de la farmacología. En: Velasco MA, San Román BS, Serrano JSM, Martínez SR, Cadavid TMI editores. Farmacología fundamental. Madrid:Mc Graw-Hill, 2003:3-12.
61. Jones D. Historia clínica y examen físico. En: Bichard JS, Sherding GR, editores. Manual clínico de pequeñas especies. México D.F.:McGraw-Hill Interamericana,1996:1-13.
62. Leal M. Caracterización y tratamiento de los efectos tóxicos cardiopulmonares de las casiopeínas III-ia y II-gli (tesis de maestría), México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.

63. Tvedten H y Weiss D. Hemograma completo y examen de la médula ósea: comentarios generales y técnicas seleccionadas. En: Willard M, Tvedten H, Turnwald GH, editores. Diagnóstico clínico patológico práctico en los pequeños animales. 3ª ed. Buenos Aires:Inter-Médica, 2002:11-31.
64. Barsanti JA, Lees GE, Willard MD, Green RA. Trastornos urinarios. En: Willard M, Tvedten H, Turnwald GH, editores. Diagnóstico clínico patológico práctico en los pequeños animales. 3ª ed. Buenos Aires:Inter-Médica, 2002:111-138.
65. Aluja SA, Constantino CF. Técnica de necropsias en animales domésticos. 2ª ed. México D.F.:Manual Moderno, 2002.
66. Banks JW. Histología veterinaria aplicada. 2ª ed. México D.F.:Manual Moderno, 1996.
67. Roa JH, Bermúdez M, Acero R Buitrago JR, Matijasevic E. Cuidado intensivo respiratorio. En: Bermúdez GM, Acero RC, editores. Neumología. Bogotá:McGraw-Hill Interamericana, 2000:408-414.
68. Hawkins EC. Enfermedades del parénquima pulmonar. En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. Tratado de medicina interna veterinaria. Bogotá, Colombia: Inter-Médica, 2002:1178-1211.
69. Huges D. Pulmonary edema. In: King GL, editor. Respiratory disease in dogs and cats. St. Louis, Missouri:Saunders, 2004:487-497.
70. Chakinala M, Schuster D. Edema pulmonar. En: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM, editores. Manual de enfermedades pulmonares. 3ª ed. México, D.F.:McGraw-Hill Interamericana, 2004:511-518.
71. Slauson DO. Disturbances of blood flow and circulation. In: Saulson DO, Cooper BJ editors. Mechanisms of disease. 3th ed. St. Louis, Missouri:Mosby, 2002:77-139.
72. Guyton AG, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 9a ed. México, D.F.:Interamericana McGraw-Hill, 1997.
73. Drake RE, Doursout MF. Pulmonary edema and elevated left atrial pressure: four hours and beyond. News Physiol Sci 2002, 17:223-226.

74. Bernard GR, Pou A, Coggeshall JW, Carroll EF, Snapper JR. Comparasion of the pulmonary dysfunction caused by cardiogenic and non cardiogenic pulmonary edema. *Chest* 1995, 108:798-803.
75. Gehlbach BK, Geppert E. The pulmonary manifestation of left heart failure. *Chest* 2004, 125:669-682.
76. Lekeux P, Art T, Hamoir J, Gustin P. Pathophysiology of the respiratory tract. In: Dunlop RH, Malbert CH, editors. *Veterinary pathophysiology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2004:143-176.
77. Drobatz KJ, Saunders HM, Pugh CR. Noncardiogenic pulmonary edema in dogs and cats: 26 casos (1987-1993). *J Am Vet Med Assoc* 1995, 11:1732-1736.
78. Atabai K, Matthay MA. The pulmonary physician in critical care 5: acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. *Thorax* 2002, 57:452-458.
79. Husain AN, Kumar V. The Lung. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors *Pathologic basis of diseases*. 7th ed. Philadelphia:Elsevier Saunders, 2005:711-772.
80. Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, Matthay MA. Treatment of ARDS. *Chest* 2001, 120:1347-1367.
81. Cheville NF. *Ultrastructural Pathology*. Iowa:Iowa State Press, 1994.
- 82 Jones TC, Hunt RD, King NW. *Veterinary pathology*. 6a ed. USA:Lippincott Williams and Wilkins, 1997.
- 83 Gartner LP, Hiatt JL. *Texto atlas de histología*. México. 2^a ed. DF:McGraw-Hill Interamericana, 2002.
84. Kittelson MD, Kienle RD. Fisiología cardiovascular clínica normal. En: Kittelson MD, Kienle RD, editores. *Medicina cardiovascular en pequeños animales*. 2^a ed. Barcelona:Multimédica, 2002:11-35.
85. Diann LW, Morgan JS. Toxic response of the cardiovascular system. In: Plumlee KH, editor. *Clinical veterinary toxicology*. St. Louis Missouri: Mosby, 2004:48-54.
86. Anderson RH, Becker AE. *El corazón estructura normal y patológica*. Barcelona: Mosby, 1994.

87. Chen HI, Kao SJ, Wang D, Lee PR, Su CF. Acute respiratory distress syndrome. *J Biomed Sci* 2003, 10:588-592.
88. Turnwald GH. Disnea y taquipnea. En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. *Tratado de medicina interna veterinaria*. Bogotá, Colombia: Inter-Médica, 2002:182-185.
89. Rozanski E, Chan DL. Approach to the patient with respiratory distress. *Vet Clin Small Anim Pract* 2005, 32:307-317.
90. Lee AJ, Drobatz JK. Respiratory distress and cyanosis in dog. In: King GL editor. *Respiratory disease in dogs and cats*. St. Louis, Missouri:Saunders, 2004:1-12.
91. Haskins SC. Interpretation of blood gas measurements In: King GL, editor. *Respiratory disease in dogs and cats*. St. Louis, Missouri:Saunders, 2004:181-192.
92. Hendricks JC. Respiratory muscle fatigue and failure. In: King GL, editor. *Respiratory disease in dogs and cats*. St. Louis, Missouri:Saunders, 2004:61-65.
93. Reece WO. Respiración en mamíferos. En: Swenson MJ, Reece OW, editores. *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. 5ªed. México D.F.:Noriega Editores, 1999:263-293.
94. Cunningham JG. *Fisiología veterinaria*. México D.F.:Interamericana McGraw-Hill, 1994.
95. Stepie RL. Cianosis. En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. *Tratado de medicina interna veterinaria*. Bogotá, Colombia: Inter-Médica, 2002:225-229.
96. Robinson FW, Maxie GM. The cardiovascular system. In: Jubb FV, Kennedy CP, Palmer N, editors. *Pathology of domestic animals*. Vol III, 4a ed, California:Academic Press, 1993:1-9.
- 97 Kittelson MD. Fisiopatología de la insuficiencia cardiaca. En: Kittelson MD, Kienle RD, editores. *Medicina cardiovascular en pequeños animales*. 2ª ed. Barcelona:Multimédica, 2002:136-148.
98. Heitz U, Horne MM, Spahn D. *Fluidos, electrolitos y equilibrio ácido-base*. 5ª Ed Madrid:Mosby. 2006

99. Dibartola SP. Trastornos acidobásicos metabólicos. En: Dibartola SP, editor. Terapéutica de líquidos en pequeñas especies. México D.F.:McGraw-Hill Interamericana, 2002:201-224.
100. Latimer KS, Prasse WK. Leukocytes. In:Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW, editors. Veterinary laboratory medicine. Clinical pathology. 4th Ed. Iowa:Iowa state press, 2003:46-79.
101. Jain JC. Essentials of veterinary hematology. USA:Williams & Wilkins. 1993.