

30
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CUANTIFICACION DE ARABINOSIDO CITOSINA
EN PLASMA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN EMILIA GONZALEZ ROMERO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Capítulo	Contenido	Página
I	Introducción	1
II	Generalidades	4
	II.1 Propiedades fisicoquímicas	5
	II.2 Aspectos generales de la farmacoterapia	8
	II.2.1 Agentes antineoplásicos	8
	II.2.2 Clasificación de anti-neoplásicos	9
	II.2.3 Farmacoterapia de leucemias	11
	II.2.4 Tratamiento de leucemias	12
	II.2.5 Farmacodinamia del Ara-C	13
	II.2.6 Farmacocinética del Ara-C	15
	II.2.7 Toxicidad del Ara-C	16
	II.2.8 Interacciones con otros fármacos	17
	II.3 Métodos de valoración en fluidos biológicos	17
	II.3.1 Método enzimático	18
	II.3.2 Radioinmunoensayo	19
	II.3.3 Ensayos microbiológicos	19
	II.3.4 Cromatografía de gases	19

Capítulo	Contenido	Página
	II.3.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución	20
III	Desarrollo experimental	21
	III.1 Desarrollo del método	22
	III.2 Validación del método	24
	III.3 Técnica experimental	26
	III.3.1 Equipo	27
	III.3.2 Material	27
	III.3.3 Sustancias	28
	III.3.4 Soluciones	28
IV	Resultados	30
	IV.1 Método para la cuantificación del Ara-C	31
	IV.1.1 Condiciones cromatográficas	31
	IV.1.2 Método de purificación de la muestra	32
	IV.2 Validación del método	33
	IV.2.1 Especificidad	33
	IV.2.2 Linealidad	35
	IV.2.3 Concentración mínima detectable	36
	IV.2.4 Precisión	37

Capítulo	Contenido	Página
V	Discusión	39
V.1	Discusión del método	40
V.2	Discusión de los datos obtenidos en el proceso para la valoración de Ara-C	45
V.3	Limitaciones del método	45
VI	Conclusiones	47
	Apéndice I	50
	Apéndice II	53
	Bibliografía	59

INDICE DE TABLAS

CAPITULO	TABLA	CONTENIDO	PAGINA
IV	1	Linealidad de curvas de calibración en plasma	35
IV	2	Linealidad de las curvas de calibración de Ana-C en solución amortiguadora	36
IV	3	Precisión del método en plasma	37
IV	4	Precisión del método en solución amortiguadora	38
Apéndice I	I	Análisis de varianza	51
Apéndice II	1-AII	Validación del método en plasma (día 1)	54
Apéndice II	2-AII	Validación del método en plasma (día 2)	55
Apéndice II	3-AII	Validación del método en solución amortiguadora (día 1)	56
Apéndice II	4-AII	Validación del método en solución amortiguadora (día 2)	57

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO	FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
IV	1	Cromatograma blanco solución amortiguadora	34a
IV	2	Cromatograma Ara-C en solución amortiguadora	34b
IV	3	Cromatograma blanco de plasma	34c
IV	4	Cromatograma Ara-C en plasma	34d

INDICE DE GRAFICAS

CAPITULO	GRAFICAS	CONTENIDO	PAGINA
Apéndice II	1-AII	Validación del método en plasma (día 1)	54a
Apéndice II	2-AII	Validación del método en plasma (día 2)	55a
Apéndice II	3-AII	Validación del método en solución amortiguadora (día 1)	56a
Apéndice II	4-AII	Validación del método en solución amortiguadora (día 2)	57a
Apéndice II	I	Barrido espectrofotométrico para Ara-C en solución amortiguadora	58

A B R E V I A T U R A S

Ara-C	Arabinósido de citosina
CLAR, HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
oC	Grados centígrados
nm	Nanómetros
ml	Microlitros
mcg	Microgramos
TCA	Acido tricloroacético
R.A.	Reactivo analítico
Ara-U	Arabinósido de uracilo
()	Citas bibliográficas
c.m.d.	Concentración mínima detectable

CAPITULO

I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El arabinósido de citosina (Ara-C) es un nucleósido sintético análogo a la citidina, con el grupo OH- del C-2 orientado opuestamente; inhibe el crecimiento de células en cultivos, es inmunosupresora y efectiva contra tumores en ratón. Clínicamente se emplea en el tratamiento de leucemias agudas, mieloblástica e infantil, y en linfomas histiocíticos. administrándose generalmente por vía parenteral.

Debido a que la quimioterapia con antineoplásicos provoca efectos secundarios serios, y que no hay dosis establecidas con una efectividad del 100%, es de suma importancia su estudio para poder establecer regímenes de dosificación en población mexicana y al mismo tiempo, vigilar las concentraciones plasmáticas durante el tratamiento.

Existen varios métodos analíticos para cuantificar Ara-C en plasma, siendo el método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) , el más adecuado para su determinación.

El presente trabajo describe un método de CLAR para la cuantificación de arabinósido de citosina en plasma el cual puede ser utilizado en estudios de farmacocinética.

Los parámetros que describen estadísticamente la confiabilidad del método son: especificidad, linealidad, reproducibilidad, sensibilidad y precisión.

CAPITULO

II

GENERALIDADES

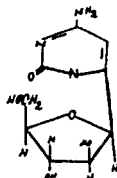
GENERALIDADES

II. 1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

II.1.1. Nombres químicos y sinónimos: (36)

- * 4 - amino -1- arabinofuranosil -1,2- dihidro -2- oxopirimidina
- * 4 - amino - β -D- arabinofuranosil -2(1H)- pirimidinona
- * 1- β -D- arabinofuranosilcitosina
- * β - citosina arabinósido
- * Aracitidina
- * Ara - C
- * Citarabina
- * Citosar

II.1.2. Fórmula desarrollada: (36,38)



II.1.3. Fórmula condensada: (36,38)

C H N O
9 13 3 5

II.1.4. Peso molecular: (36,38)

243.22 g/mol

II.1.5. Composición porcentual: (36)

C: 44.44% , H: 5.39% , N: 17.28% . O: 32.89% .

II.1.6. Punto de fusión: (36,39)

Prismas de etanol al 50% : 212 - 213 °C.

II.1.7. Rotación óptica específica: (36,39)

$\alpha_D^{23} +158$, $\alpha_D^{24} +153$: (concentración en agua 0.5 g / 100 ml).

II.1.8. Espectro ultravioleta: (38)

La absorción del Ar₃-C al U.V. a pH = 2 presenta dos máximos: 281 nm (E=13171) y 212.5 nm (E=10230) ; a pH = 12 presenta un máximo a 272.5 nm (E=9259).

II.1.9. Solubilidad: (38)

Soluble 1 : 1 en agua ; menos soluble en disolventes orgánicos.

II.1.10 pKa : (39)

$pK_{a1} = 3.85$; pK_{a2} = no determinado ; $pK_{a3} = > 13$

II.1.11 Extracción: (38)

El Ara - C se extrae de soluciones acuosas alcalinas con disolventes orgánicos.

II.1.12 Propiedades cromatográficas: (39)

Rf en ácido isobutírico - amoníaco: 0.64 - 0.75

Rf en disolvente de Plesner: 0.57 - 0.64

II.1.13 Descripción: (36,37)

Polvo alcalino blanco. Es un nucleósido sintético que difiere de los nucleósidos normales citidina y deoxicitidina en que el azúcar es arabinosa en lugar de ribosa o deoxiribosa.

II.1.14 Estabilidad en solución acuosa: (35)

La máxima estabilidad se observa a pH neutro, donde el Ara - C resiste la desaminación a arabinósido de uracilo, manteniendo el 90% de su potencia durante 6.5 meses en una solución amortiguadora de fosfatos 0.06M, pH = 6.9 a 25 grados centígrados.

La constante de velocidad (K) aumenta conforme disminuye el pH de 6.0 a 2.8, donde se encuentra un máximo, para volver a decrecer conforme el pH se aproxima a cero.

II. 2. ASPECTOS GENERALES DE LA FARMACOTERAPIA

II.2.1. Agentes antineoplásicos: (1.2)

El objetivo principal de los antineoplásicos es el de llevar la población de células tumorales a cero.

Los resultados del tratamiento dependen de factores relacionados con el fármaco tales como: el tipo, la dosis y el intervalo de administración y de factores asociados al proceso secuencial de crecimiento, denominado ciclo celular.

El ciclo celular de las células neoplásicas es secuencialmente el mismo que el de las células normales. Cada célula comienza su crecimiento en un período o fase denominado G₁, en el cual se producen las enzimas necesarias para la síntesis de DNA, RNA y otras proteínas. A este período le sigue la fase S en la que se sintetiza DNA. Una vez terminada esta síntesis, las células entran en un período premitótico denominado G₂ en el que ocurre la síntesis de RNA y otras proteínas; a esta fase sigue inmediatamente la mitosis: fase M y finaliza el ciclo celular dando lugar a la formación de dos células hijas, que permanecen en una fase de reposo denominada G₀ en la cual son relativamente

inactivas con respecto a la síntesis macromolecular y por lo tanto insensibles a muchos agentes quimioterapéuticos. Cada una de las células hijas entra en una fase G1, repitiendo el ciclo celular.

El tiempo en que se completa el ciclo celular para tejidos humanos tiene un rango de 16 a 260 horas, con diferencias marcadas entre un tejido normal y uno tumoral.

II.2.2 Clasificación de antineoplásicos: (3,40)

Existen fármacos específicos del ciclo celular que actúan selectivamente sobre células en proliferación; son particularmente útiles para el tratamiento de leucemia y otros tumores de crecimiento rápido. Los fármacos no específicos del ciclo celular actúan sobre las células sea cual sea su ritmo de proliferación y se emplean para tratamientos de tumores sólidos.

Los agentes antineoplásicos se agrupan en seis categorías:

1) Agentes alquilantes: Se cree que alquilan el DNA; no son específicos del ciclo celular. En este grupo se encuentran: la mostaza nitrogenada, clorambucil,

ciclofosfamida, trietilenmelamina, busulfan, trietilentiofosforamida, v melfalan.

2) Antimetabolitos: Es el primer grupo que se designó específicamente como antitumoral. Actúan ya sea reemplazando los componentes celulares o bien como inhibidores de enzimas. Pueden agruparse de la siguiente manera: antagonistas del ácido fólico (metotrexate v metotrexate sódico); antagonistas de la purina (azotopirina, mercaptopurina y tioguanina); antagonistas de la pirimidina (citarabina, flouxuridina y fluorouracilo) y la hidroxiurea que no puede asignarse a ninguno de los grupos anteriores.

3) Agentes hormonales: Esteroides suprarrenales y hormonas sexuales. El fundamento para emplear estos agentes es que el carcinoma prostático v el mamario, manifiestan un cierto grado de dependencia hormonal.

4) Radioisótopos: Fósforo- $\langle 32 \rangle$, Yodo- $\langle 131 \rangle$, Oro- $\langle 198 \rangle$. El fósforo- $\langle 32 \rangle$ interviene en los recambios como si fuera fósforo normal, se incorpora a los ácidos nucleicos y se deposita en los huesos; emite rayos beta que ejercen efecto destructor sobre las

células en multiplicación rápida en las cuales se concentra. El Yodo- $\langle 131 \rangle$ tiene aplicación limitada en el carcinoma tiroideo metastásico. El empleo del oro- $\langle 198 \rangle$ se encuentra en fase experimental en el tratamiento del linfoma y procesos neoplásicos que afectan cavidades serosas.

5) Antibióticos: Se aíslan de microorganismos que existen en la naturaleza. Inhiben el crecimiento bacteriano y pueden destruir el funcionamiento tanto de la célula huésped como de la célula bacteriana. En este grupo se encuentran la dactinomicina, adriamicina, sulfato de bleomicina, mitramicina, daunorrubicina, doxorubicina y procarbina.

6) Agentes diversos: Bloquean la división celular, deteniendo la mitosis en la metafase como la vinblastina, vincristina, procarbina, hidroxurea, L-asparaginasa, mitotano, nitrosoureas y carbamida de imidazol.

II.2.3 Farmacoterapia de las leucemias: (4,5)

Clasificación de las leucemias:

Se denomina leucemia aguda a la proliferación maligna de una o más células del tejido hematopoyético.

Las leucemias agudas se han dividido de acuerdo al grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) en 2 grupos: Linfoblásticas (LAL) con subgrupos L1, L2, L3 y no linfoblásticas (LAM) con subgrupos M1 a M7 (4). Esta clasificación permitió el establecimiento de patrones clínico - terapéutico - pronósticos, perfectamente aplicables hasta el momento actual. Los linfomas no - Hodgkin y neoplasias del tejido linfoide se clasifican de acuerdo a la nueva formulación internacional (NWF) en neoplasias de bajo, intermedio y alto grado de malignidad. (5)

II.2.4 Tratamiento de leucemias:

Antes de la década de los 40 la quimioterapia era prácticamente nula, por lo que la mortalidad como consecuencia de la enfermedad era casi del 100%. En 1948 Farber y Diamond (6) introdujeron el uso de antagonistas del ácido fólico (aminopterin) con buenos resultados en LAL; en 1951 el empleo de análogos de las purinas (6-mercaptopurina y

6-tioguanina) (7,8) coadyuvó a la mayoría de las respuestas.

La LAM sin embargo, era incurable hasta hace 2.5 décadas con muerte inevitable en menos de doce meses (9,10) . En 1964 Skipper y cols. proponen el uso de la poliquimioterapia antineoplásica, fundamentándola en el hecho de que cada fármaco tiene sitios y mecanismos de acción diferentes, dependiendo de las fases del ciclo en que se encuentre la población celular neoplásica. En 1974 Yates y cols. propusieron la inducción de una aplasia de la médula ósea (MO) para abatir la población leucémica medular y lograr una regeneración a partir de células normales. (11,12) Estos dos fundamentos modificaron el panorama global de la terapia antileucémica, sirviendo de apoyo a éstos el empleo de nuevos agentes antineoplásicos con mayor efectividad en LAM, tales como Ara-C y los antibióticos antracíclicos daunomicina y doxorubicina. (13,14)

La información obtenida en diversos estudios, muestra que el Ara-C es, hasta el momento, el fármaco básico en terapia para LAM. (20,40)

II.2.5 Farmacodinamia del Ara - C:

En células humanas el Ara - C actúa como un análogo del nucleósido fisiológico deoxicitidina y tiene múltiples efectos sobre la síntesis de DNA. El Ara - C penetra fácilmente al compartimento intracelular por medio de un acarreamiento compartido por la deoxicitidina. (1,40)

El Ara - C tiene dos vías metabólicas principales: una que la convierte en un compuesto inactivo llamado arabinósido de uracilo (Ara - U), vía citidina-desaminasa y la segunda vía, en la cual el Ara-C sufre una fosforilación por la deoxicitidina cinasa hasta Ara - CTP (citidina 5' trifosfato) (1,15), metabolito que inhibe la DNA polimerasa compitiendo con el sustrato natural citidina 5' trifosfato (CTP). Además el Ara - C tiene utilidad desde el punto de vista de la cinética tumoral. En tumores experimentales murinos, que en fase avanzada de desarrollo tienen hasta un 50% de las células en fase no proliferante o G₀, puede lograrse una muerte importante de células ante una segunda dosis de Ara-C, aplicada tiempo después de la primera administración. Las LAM con porcentajes más altos de remisión completa (RC) son aquellas que poseen una mayor fracción de células en fase S, inducidas

por una primera administración de Ara - C. (1, 16, 17, 18, 19)

La efectividad del Ara - C se fundamenta en su especificidad en la fase S del ciclo celular aún cuando se desconoce el mecanismo de acción exacto; sin embargo no se han establecido dosis terapéuticas que simultáneamente permitan mayor recuperación temprana de la MD y abatan casi la totalidad de las células leucémicas. (1, 15)

La dosificación del Ara-C es: 2 a 3 mg/kg (100mg/m²) vía intravenosa o subcutánea, dos veces al día por siete días; 2 a 3 mg/kg/día por siete días en infusión continua por 24 horas; 10 a 30mg/m² vía intratecal hasta tres veces a la semana. Dosis de mantenimiento: 2 a 3 mg/kg vía intravenosa o subcutánea dos veces al día por cinco días. (40)

II.2.6 Farmacocinética del Ara - C:

La farmacocinética del Ara - C está determinada por la citidina-desaminasa, enzima particularmente activa en el hígado y la mucosa gastrointestinal, siendo menos activa en las células sanguíneas y otros tejidos. (21,22)

La desaparición del Ara - C es biexponencial con una vida media en la primera fase de 7 a 20 minutos y en la segunda fase de 110 a 160 minutos; se distribuye ampliamente, teniendo volúmenes de distribución aproximados al volumen total de agua corporal. Atraviesa la barrera hematoencefálica y alcanza concentraciones en el líquido cefalorraquídeo que representan el 40% de las concentraciones plasmáticas. Se elimina por la orina en un 92% en forma de su único metabolito Ara- U y el 8% restante como Ara - C. (20,21,22)

Como fármaco antineoplásico el Ara - C se administra en infusión continua, como bolo intravenoso, vía subcutánea o instalación directa en cavidades anatómicas, incluyendo la aplicación intratecal; por vía oral tiene una biodisponibilidad menor al 20% por la acción de la citidina-desaminasa (23, 20).

Las concentraciones plasmáticas que se alcanzan son del orden de 0.01 mcg / ml a 0.1.mcg / ml.

II.2.7 Toxicidad:

Los factores determinantes en la toxicidad del Ara-C son las concentraciones del fármaco y el tiempo de exposición, presentándose más comunmente,

mielosupresión con evidencia franca de alteración en la granulopoyesis y presencia de megaloblastosis de series mieloide y eritroide; así como daño del epitelio gastrointestinal. También se presenta náusea y vómito, que pueden ser controlados con antieméticos. (24)

Se ha observado disfunción hepática reversible, que en menos del 25% de los pacientes justifica la suspensión de la terapia. Con dosis altas del fármaco (más de $36g/m^2$ s.c.) se ha reportado disfunción cerebral y cerebelar. Después de la aplicación intratecal se ha reportado meningismo, náusea, vómito, cefalea y fiebre (1, 15, 25).

Aunque en el ser humano no se ha establecido teratogenicidad, en animales de experimentación produce rompimiento en los cromosomas y malformaciones fetales. (1, 15)

II.2.8 Interacciones con otros fármacos:

No existen interacciones importantes reportadas.

II. 3. Métodos de valoración en fluidos biológicos:

Para la cuantificación de Arabinósido de Citosina en fluidos biológicos, se requieren métodos analíticos

muv sensibles, ya que los niveles son del orden de mcg/ml.

Los fluidos biológicos en los que se cuantifica el Ara-C son: plasma, fluido cerebrospinal y extractos celulares de médula espinal; siendo el plasma el principal.

Para escoger un método analítico se deben tener en cuenta cuatro parámetros principales: sensibilidad, especificidad, linealidad y precisión. (42)

Existen diversos métodos para la cuantificación de Ara-C :

II.3.1 Método enzimático: (26)

Este método consiste en la fosforilación del Ara - C con ATP - γ - ^{32}P en presencia de deoxicitidina cinasa y Mg^{++} con el subsecuente aislamiento de 5'-monofosfato-Ara - c (Ara - CMP - α - ^{32}P) por cromatografía en capa delgada en dietilamino-metilcelulosa.

Se requiere una muestra de 2 ml. de sangre de la vena cefálica u orina, procesándose en 3 horas y

con concentraciones mínimas detectables de 0.608 mcg/ml.

El método se ha empleado para estudiar el metabolismo del Ara - C en pacientes con leucemia aguda.

II.3.2 Radioinmunoensayo: (27)

El método reportado emplea anticuerpos inducidos en conejos, [³H]Ara - C y una técnica de filtración Millipore, siendo específico frente a los antibióticos más comunes y los antineoplásicos que se emplean conjuntamente con el Ara - C. La mínima concentración detectable en plasma es 0.02 mcg / ml.

II.3.3 Ensayos microbiológicos: (28)

Se emplea una cepa de -Streptococcus faecalis- sensible al Ara - C, pero requiere de un largo periodo de incubación. La concentración mínima que se detecta es de .097 mcg/ml y presenta interferencias con otros agentes quimioterapéuticos.

II.3.4 Cromatografía de gases: (29)

El método requiere de un espectrofotómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases y un sistema de computación programado para fragmentografía de masas. El análisis se hace posible mediante una reacción de permetilación con n-butanol. La concentración mínima detectable es 0.1 mcg/ml. El porcentaje de recuperación de Ara - C es de 65% a 55%.

II.3.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o CLAR): (30, 31, 32, 33, 34)

Las técnicas empleadas para el estudio de Ara-C por CLAR, emplean cromatografía de intercambio iónico, aplicando la mayoría un método de purificación o extracción de la muestra previa a su inyección al sistema, tales como ultrafiltración, oxidación de nucleótidos, precipitación de proteínas y extracción con disolventes orgánicos. Las concentraciones detectables que se han reportado son del orden de .002 mcg / ml.

CAPITULO

III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

DESARROLLO EXPERIMENTAL

III . 1 Desarrollo del método.

El estudio se llevo a cabo utilizando CLAR, basándose en lo reportado en la literatura.

Para la determinación de la longitud de onda de máxima absorción se realizó un barrido espectrofotométrico de una solución de 10 mcg/ml de Ara-C en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, desde 300nm hasta 195nm. (figura I, apéndice II)

Inicialmente se intentó cuantificar el Ara-C en muestras plasmáticas, sin purificar la muestra antes de inyectarla al sistema, dando buen resultado cuando se utilizan concentraciones altas, pero no así en concentraciones del orden de 0.1 mcg/ml.

Para lograr la cuantificación, en las condiciones antes mencionadas obteniendo una buena resolución de las señales, se ensayaron cambios y combinaciones en los siguientes parámetros:

a) Columnas (fase inversa):

Se utilizaron columnas de diferentes longitudes: 10 y 25 cm y dos cartuchos de vidrio en serie de 10 cm cada uno.

b) Fase móvil:

Se probaron fases móviles de diferente pH, polaridad y fuerza iónica.

c) Velocidad de flujo:

Desde 1.5 ml/min hasta 0.3 ml/min.

d) Volumen de inyección:

Desde 500 hasta 10 µl.

Después de probar todas las posibilidades de acuerdo a los recursos existentes, se comprobó la necesidad de purificar la muestra para detectar y cuantificar las concentraciones clínicamente empleadas.

Los métodos de purificación ensayados son los siguientes:

a) Cartuchos desechables:

Silica Sep-Pack, C-18 y fluorosil, utilizando eluente de diferentes polaridades.

b) Cosolventia:

Para precipitar la mayor parte de los componentes plasmáticos que interfieren en la cuantificación, se utilizaron diferentes disolventes orgánicos: Acetonitrilo, metanol, cloroformo, ácido perclórico, ácido tricloroacético en agua y en éter.

c) Oxidación de nucleótidos con peróxido de sodio.

d) Centrifugación a 18000 rpm durante 10 min a 4 °C, con y sin previa precipitación de componentes interferentes.

Una vez obtenido el método óptimo de acuerdo a los objetivos, se procedió a la validación del mismo.

III . 2. Validación del método:

La validación se llevó a cabo durante cuatro días. Se realizaron ocho curvas de calibración de Ara-C en plasma en concentraciones desde 0.3125 mcg / ml hasta 2.5 mcg / ml en diferentes días (cuatro curvas por día); y ocho curvas de calibración de Ara-C en solución amortiguadora 0.05M, desde 0.197 mcg/ml hasta 10 mcg/ml en diferentes días (cuatro curvas por día).

Los cuatro parámetros que se validaron son los siguientes:

- Especificidad
- Linealidad
- Concentración mínima detectable
- Precisión

- Especificidad:

Se determinó la especificidad del método, respecto a los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de leucemias: Ciclofosfamida, metotrexato, ácido folínico, adriamicina, gentamicina, además de los compuestos endógenos del plasma a las condiciones de trabajo, inyectando soluciones de concentración conocida de cada uno, bajo las mismas condiciones en que se inyectó el Ara-C. Los metabolitos no se probaron; sin embargo existen reportes en la literatura que indican que no interfieren bajo las condiciones cromatográficas ensayadas.

III.3.1. Equipo:

- Cromatógrafo HPLC Millipore Waters
Bomba modelo 59.
Inyector modelo U6K.
Columna de acero inoxidable microbondapack de 150 mm X 3.9 mm Novapack C-18, partículas de tres micras.
- Precolumna con empaque microbondapack.
- Detector: Espectrofotómetro UV-VISIBLE de longitud de onda variable, modelo 490.
- Registrador modelo 730.
- Agitador modelo Maxi-M-X-11.
- Centrífuga de 5000 rpm.
- Balanza analítica con precisión 0.00001 g.
- Juego de clarificación de muestras, Millipore.
- Equipo de filtración de disolventes, Millipore.

III.3.2. Material:

- Matraces volumétricos de 250, 200 y 25 ml.
- Espátula.
- Matraz de bola con fondo plano de 500 ml.
- Probetas de 100 ml.
- Pipetas volumétricas de 2 y 1 ml.
- Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.

III.3.1. Equipo:

- Cromatógrafo HPLC Millipore Waters
Bomba modelo 59.
Inyector modelo U6K.
Columna de acero inoxidable microbondapack de 150 mm X 3.9 mm Novapack C-18, partículas de tres micras.
- Precolumna con empaque microbondapack.
- Detector: Espectrofotómetro UV-VISIBLE de longitud de onda variable, modelo 490.
- Registrador modelo 790.
- Agitador modelo Maxi-M-X-11.
- Centrífuga de 5000 rpm.
- Balanza analítica con precisión 0.00001 g.
- Juego de clarificación de muestras, Millipore.
- Equipo de filtración de disolventes. Millipore.

III.3.2. Material:

- Matraces volumétricos de 250, 200 y 25 ml.
- Espátula.
- Matraz de bola con fondo plano de 500 ml.
- Probetas de 100 ml.
- Pipetas volumétricas de 2 y 1 ml.
- Tubos de ensayo de 13 X 100 mm.

- Gradilla.
- Perilla para pipetear.
- Perlas de ebullición.

III.3.3 Sustancias:

- Agua desionizada v deaerada.
- Plasma congelado (máximo con tres días de almacenamiento a -80 °C).
- Eter etílico (R.A.) (J.T. BAKER).
- Fosfato de sodio (R.A.) (J.T. BAKER).
- Fosfato de potasio (R.A.) (J.T. BAKER).
- Acido tricloroacético (R.A.).
- Arabinósido de citosina (Pfizer).

III.3.4 Soluciones:

-Fase móvil:

Solución amortiguadora de fosfato de sodio y fosfato de potasio 0.05M pH=7.0 ± 1.0 : 250 ml de fosfato de sodio 0.05M (2.25g de fosfato de sodio en 250 ml de agua) + 127ml de fosfato de potasio 0.05M (1.37g de fosfato de potasio en 200 ml de agua).

-Agente precipitante para eliminación de proteínas de la muestra:

Acido tricloroacético en éter 4.9 N (80%): 40g
de TCA en 50 ml de éter (aforar pocos minutos
antes de emplear la solución).

CAPITULO

IV

RESULTADOS

RESULTADOS

IV . 1 . Método para la cuantificación del Ara-C

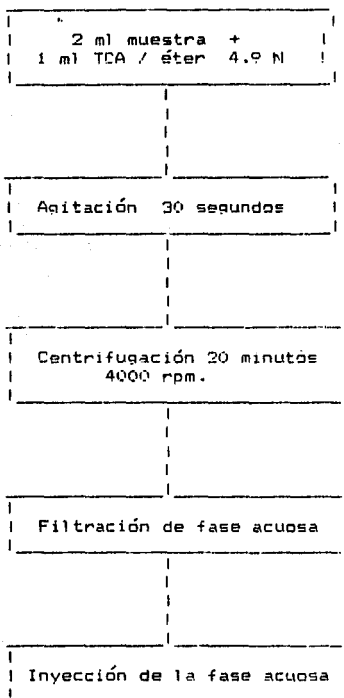
IV.1.1. Condiciones cromatográficas:

Las condiciones cromatográficas, bajo las cuales fue validado el método son las siguientes:

- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH= 7.0.
- Velocidad de flujo de la fase móvil: 0.3 ml/min.
- Atenuación del detector: 0.03 a.u.f.s.
- Longitud de onda: 27 nm.
- Presión: 307 psi.
- Tiempo de retención: 13 min.

IV.1.2. Método de purificación de la muestra:

El método de purificación con el cual se obtuvo la mayor sensibilidad y la mejor resolución, se esquematiza de la siguiente manera:



IV . 2 . Validación del método:

La validación del método se llevó a cabo tanto para Ara-C en solución de plasma, como para Ara-C en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M.

Por medio de un análisis de varianza de datos obtenidos de los cromatogramas de una serie de curvas de calibración (apéndice II), se determinó la validez del método.

IV.2.1. Especificidad:

El método es específico para Ara - C respecto a los siguientes fármacos:

Ciclofosfamida *

Metotrexato

Ac. Fólnico

Adriamicina *

Gentamicina *

Compuestos endógenos del plasma que permanecen en solución después de la purificación de la muestra.▶

Acido tricloroacético *

* Especificidad probada experimentalmente, además de reportada en la literatura.

Las siguientes figuras muestran la especificidad del método durante el proceso de la muestra:

Figura 1: Cromatograma de una muestra blanco de solución amortiguadora 0.05M.

Figura 2: Cromatograma de una muestra de 50 µl de Ara-C en solución amortiguadora, a una concentración de 10 µg/ml, donde los picos representan al TCA y Ara-C.

Figura 3: Cromatograma de una muestra de 10 µl de blanco de plasma.

Figura 4: Cromatograma de una muestra de 10 µl de Ara-C en plasma en concentración de 10 µg/ml.

FIGURA 1

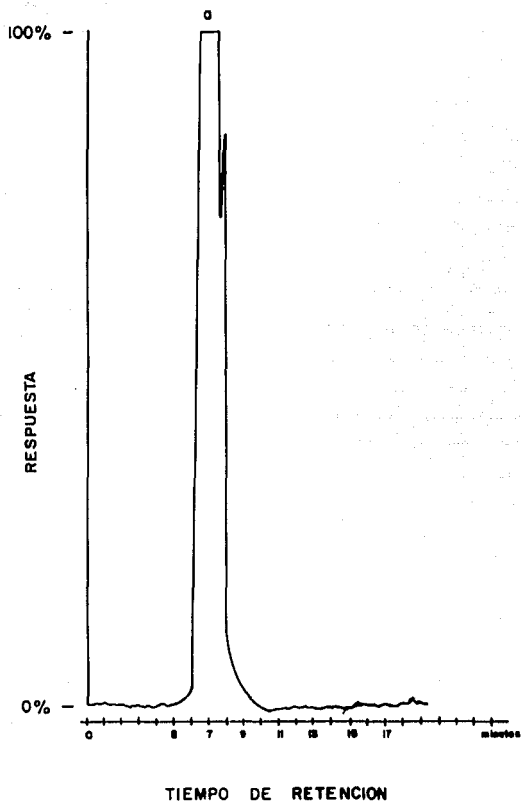
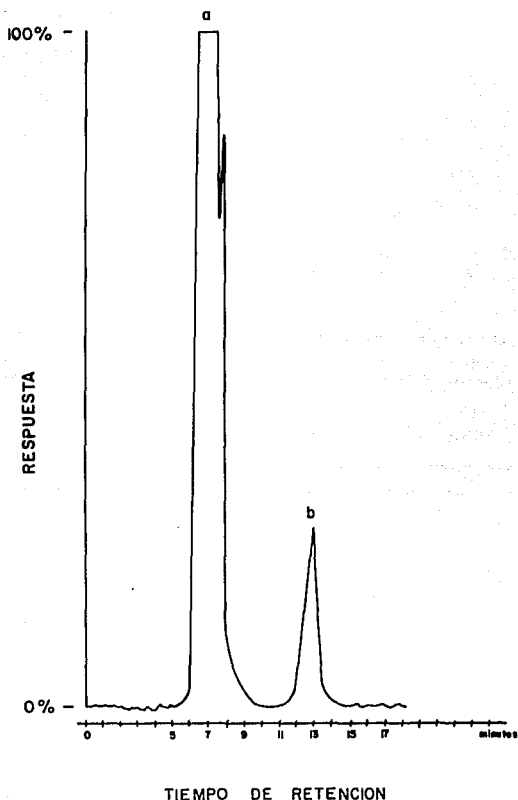


FIGURA 1.- CROMATOGRAMA DE UNA INYECCION DE 50 MCL DE UNA MUESTRA BLANCO DE SOLUCION AMORTIGUADORA 0.05M (ATENUACION: 0.1 a.u.f.e. A) FRENTE DEL DISOLVENTE.

FIGURA 2



TIEMPO DE RETENCIÓN
FIGURA 2.- CROMATOGRAMA DE UNA INYECCIÓN DE 50 MCL DE UNA
MUESTRA DE ARA-C EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA 0.05M DE 10
MCG/ML: (ATENÚACION: 0.1 a.u.f.s.)
A) FRENTE DEL DISOLVENTE. B) ARA-C

FIGURA 3

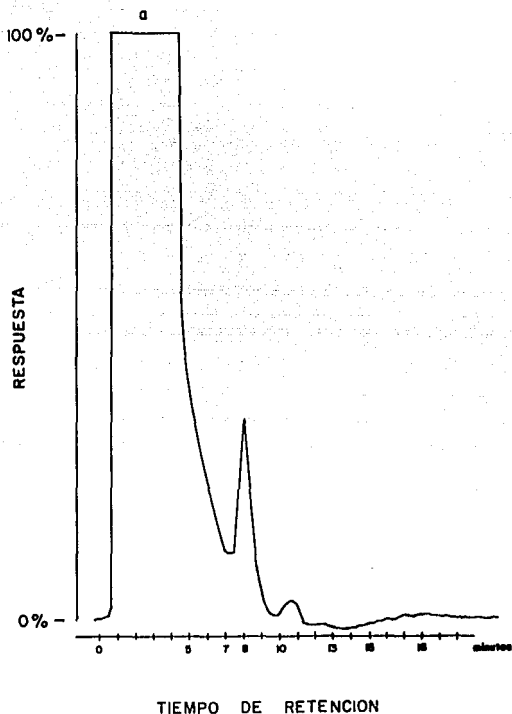


FIGURA 3.- CROMATOGRAMA DE UNA INYECCION DE 10 MCL DE UNA MUESTRA BLANCO DE PLASMA (ATENUACION: 0.03 a.u.f.e.)
A) FRENTE DEL DISOLVENTE.

FIGURA 4

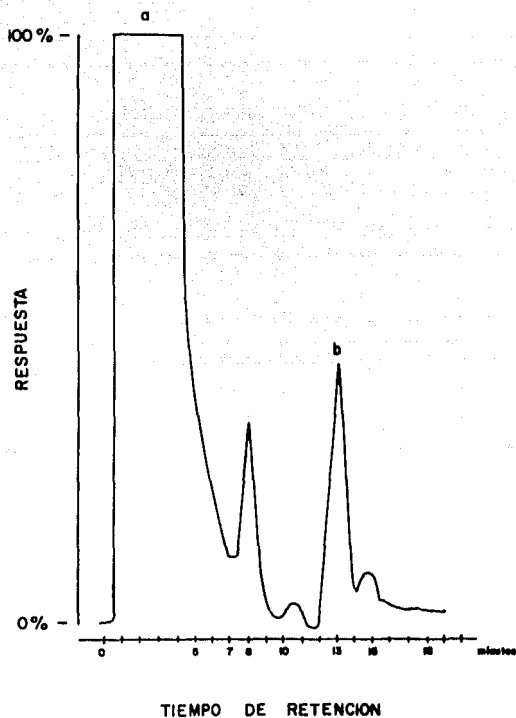


FIGURA 4.- CROMATOGRAMA DE UNA INYECCION DE 10 MCL DE UNA MUESTRA DE ARA-C EN PLASMA DE 10 MCG/ML (ATENUACION: 0.03 a.u.f.s.)
A) FRENTE DEL DISOLVENTE. B) ARA-C.

IV.2.3. Linealidad:

El método demostró ser lineal en un rango de concentraciones de: 0.31 mcg/ml a 5 mcg/ml para soluciones plasmáticas de Ara-C y 0.01mcg/ml a 10 mcg/ml para soluciones de Ara-C en solución amortiguadora 0.05M, con coeficientes de correlación de 0.9947 y de 0.9993 respectivamente.

Las tablas 1 y 2 muestran los coeficientes de correlación obtenidos durante el proceso de validación del método. (Ver datos en el apéndice II)

TABLA 1

Linealidad de las Curvas de Calibración de Ara-C en Plasma

Curva	Dia 1	Dia 2
1	0.9928	0.9900
2	0.9996	0.9970
3	0.9974	0.9995
4	0.9900	0.9914

Tabla 1.- Coeficientes de correlación Concentración-Área de Ara-C en Plasma

TABLA 2

Linealidad de las curvas de calibración de Ara-C en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M

Curva	Día 1	Día 2
1	1.0000	1.0000
2	0.9991	0.9990
3	0.9994	1.0000
4	0.9993	0.9980

Tabla 2.- Coeficientes de correlación Concentración-Área de Ara-C en solución amortiguadora.

IV.2.4. Concentración mínima detectable:

La concentración mínima detectable en soluciones plasmáticas es 0.3125 mcg / ml con un coeficiente de variación máxima de 4.9%. (tablas 1-AII y 2-AII del apéndice II)

En solución amortiguadora 0.05M la cmd. es 0.0395 mcg / ml con un coeficiente de variación máxima de 9.2%. (tablas 3-AII y 4-AII del apéndice II)

IV.2.5. Precisión:

Los coeficientes de variación que nos muestran la precisión del método tanto en plasma como en solución amortiguadora, se presentan en las tablas 3 y 4 respectivamente. (Ver datos en el apéndice II)

TABLA 3

Precisión del método para Ara-C en plasma

Concentración mcg/ml.	C.V.	
	Día 1	Día 2
0.3125	4.96	3.29
0.6250	4.75	3.12
1.2500	5.45	7.70
2.5000	5.68	2.78

Tabla 3.- Coeficientes de variación de los datos de cada una de las concentraciones de las curvas de calibración, durante los dos días del proceso para la validación del método.

TABLA 4

Precisión del método para Ara-C en solución
amortiguadora

Concentración	C.V.	C.V.
mcg/ml.	Día 1	Día 2
.0395	2.29	9.83
.0781	4.38	4.36
.3125	2.64	5.73
2.500	2.90	6.84
10.00	7.37	2.46

Tabla 4.- Coeficientes de variación de los datos de cada una de las concentraciones de las curvas de calibración, durante los dos días del proceso para la validación del método.

C A P I T U L O

V

D I S C U S I O N

D I S C U S I O N

V. 1. Discusión del método:

Existen diversos métodos para la cuantificación de Ara-C en fluidos biológicos por CLAF reportados en la literatura.

En el presente trabajo se intentó poner en práctica el método reportado en el artículo # 30 de la bibliografía bajo las siguientes condiciones: columna fase inversa: fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos 0.05M; velocidad de flujo de la fase móvil 1.5 ml/min y con inyección de la muestra sin purificación previa. Los resultados de concentración mínima detectable y especificidad, no fueron aceptables, incluso habiendo experimentado cambios en las variables que a continuación se mencionan:

- Fase móvil: con diferentes pH, polaridad y fuerza iónica.
- Longitud de la columna cromatográfica:
 - Columna "lichrosorb" de 25 cm de longitud,

obteniéndose una buena resolución de señales pero con problemas de acumulación de las muestras haciendo demasiado largo el análisis.

La alternativa de aumentar la velocidad de flujo con esta columna se descartó, ya que afecta la resolución.

- Cartuchos de vidrio en serie (dos cartuchos de 10 cm cada uno) con empaque fase inversa; se obtiene una buena resolución, pero el tiempo de análisis es sumamente largo, sin posibilidades de reducirse aumentando la velocidad de flujo, debido a la baja presión que soportan los cartuchos.

Después de haber variado en lo posible las condiciones cromatográficas, sin obtener resultados convenientes, se decidió purificar la muestra para reducir la concentración mínima detectable y aumentar la precisión y especificidad, ya que los compuestos endógenos del plasma interfieren seriamente con la cuantificación de! Ara-C.

Los métodos de purificación de la muestra que se ensayaron fueron los siguientes:

a) Purificación y concentración de la muestra:

Para obtener la c.m.d. deseada con el mínimo volumen de inyección posible, lo cual, debido a la naturaleza de las muestras (plasma) ayuda a alargar la vida media de las columnas cromatográficas, así como a obtener una mejor resolución de las señales.

Se probó la purificación de la muestra con cartuchos desechables de sílica "Sep-pack" C-18 y fluorosil, eluyendo con disolventes de diferente polaridad, evaporando a sequedad y reconstituyendo con fase móvil para poder efectuar la inyección al sistema cromatográfico. Los disolventes empleados para eluir la muestra son: Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.0, acetonitrilo, cloroformo, metanol y combinaciones de ellos.

Con este sistema de purificación de la muestra, no se obtuvieron porcentajes de recuperación adecuados.

b) Cosolventia:

Precipitación de proteínas con diferentes disolventes orgánicos: acetonitrilo, metanol, cloroformo, ac. perclórico, ac. tricloroacético en agua.

Se eliminan algunas interferencias, pero no se alcanza la especificidad adecuada; y en algunos casos la dilución de la muestra, sin posibilidad de concentrar, impide la detección de la concentración mínima deseada.

c) Oxidación de nucleótidos con peryodato de sodio:

La oxidación no es selectiva, también se oxida el Ara - C.

d) Centrifugación a 18000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, con y sin precipitación previa de proteínas.

No desaparecen las interferencias provocadas por compuestos endógenos del plasma.

e) Precipitación de proteínas con ac. tricloroacético (TCA) en éter al 90%:

Este ensayo se basó en la solubilidad del TCA y en la insolubilidad del Ara-C en éter; así como en la inmiscibilidad de éste con el agua de tal manera que se observa una buena precipitación de proteínas plasmáticas, sin dilución de la muestra que afecte la concentración mínima detectable. Con centrifugación durante 20 min a 4000 rpm se obtiene

la fase acuosa (superior), perfectamente separada de la fase orgánica (inferior): así la fase acuosa conteniendo el Ara-C puede ser inyectada al sistema.

La mínima concentración de TCA/éter, efectiva para precipitación de proteínas es 60%; utilizando concentraciones menores se presentan interferencias en la cuantificación del Ara-C. Se eligió una concentración del 80% TCA/éter ya que con ella se forma una pastilla de precipitado bien sólida, quedando la fase acuosa prácticamente libre de partículas en suspensión.

La acidez que el TCA produce en la muestra no interfiere en la cuantificación, así como tampoco en las señales que se producen en el cromatograma, ya que estas terminan de aparecer a los 8 min aproximadamente y el Ara-C tiene un tiempo de retención de 13 min.

El uso de estándar interno en el método, no se hace indispensable ya que se trata únicamente de precipitación de proteínas, en la cual no se ve afectado el Ara-C.

V . 2. Discusión de los datos obtenidos en el proceso para la validación de Ara-C.

El método resultó ser estadísticamente válido; sin embargo, los coeficientes de variación pueden parecer para ciertas concentraciones valores altos, los cuales son aceptables si se tiene en cuenta el orden de concentración que se maneja, así como también las características de las muestras (fluidos biológicos: plasma). Esto se corroboró con el análisis de varianza (apéndice I) practicado a los datos obtenidos en el proceso de validación del Ara-C, el cual nos muestra que tanto las diferencias entre las curvas obtenidas en un mismo día, como las diferencias obtenidas entre los dos días del proceso, no son significativas.

V . 3. Limitaciones del método:

Al trabajar con pacientes, para estudios "in vivo", si no se cuenta con tetrahidrouridina, para adicionar a la muestra, ésta se tiene que analizar inmediatamente después de tomarla para evitar resultados falsos debidos a la descomposición del Ara-C en Ara-U.

Es necesario un lavado periódico del sistema (cada dos muestras analizadas) con un disolvente fuerte como el acetonitrilo, para eliminar posibles acumulaciones que interfieran con el análisis.

CAPITULO

VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El método descrito cumple con los parámetros de especificidad, linealidad, y precisión aceptables, lo cual lo hace estadísticamente válido.

En base a la concentración mínima detectable obtenida, el método podrá ser utilizado en monitoreo de pacientes cuyos tratamientos indiquen dosis elevadas de Ara-C (200 mcg/kg). Para estudios de farmacocinética, se tendrán que hacer ajustes para poder detectar concentraciones menores.

Debido a la rápida acción de la citidina-desaminasa sobre el Ara - C es recomendable, al tomar la muestra del paciente, el empleo de tetrahidouridina (inhibidor de esta enzima), lo cual elimina la necesidad de un análisis inmediato .

El método de purificación de las muestras, con ácido tricloroacético (TCA) en éter al 80% , sobre una inyección

directa de las mismas al sistema, presenta las siguientes ventajas:

- Eliminación de señales producidas por compuestos interferentes.
- Mayor resolución de las señales que aún aparecen en el cromatograma.
- Aumenta la vida media de la columna cromatográfica.

APENDICE

I

APENDICE I

Análisis de varianza para los datos obtenidos en la validación de Arabinósido de citosina en plasma y en solución amortiguadora:

T A B L A I

Variable "X" CONCENTRACION

	DF	SS	MS	F-Ratio	F-Prob
TOTAL	31	22.154			
TRATAMIENTOS	7	-0.000	-0.000	-0.000	1.00000
ERROR	24	22.454	.936		

Variable "Y" AREA

	DF	SS	MS	F-Ratio	F-Prob
TOTAL	31	2295.556			
TRATAMIENTOS	7	82.760	11.823	.128	0.99530
ERROR	24	2212.796	92.200		

La tabla I muestra un análisis de varianza, donde se observa que no existe diferencia significativa entre las curvas obtenidas en un mismo día; así como tampoco entre las curvas obtenidas durante los dos diferentes días.

APENDICE

I I

TABLA I-AII

Validación de Ara-C en plasma (día 1)

Datos obtenidos de los cromatogramas de una serie de cuatro curvas de calibración para Ara-C en plasma, en concentraciones desde 0.3125 mcg/ml hasta 2.5 mcg/ml (primer día).

Conc. mcg/ml	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Prom. Area	σ_{n-1}	C.V. %
0.3125	2.86	2.6	2.8	2.6	2.72	0.135	4.96
0.625	6.75	6.6	7.35	6.82	6.80	0.326	4.75
1.25	15.6	14.3	14.14	13.8	14.46	0.7880	5.45
2.5	28.0	28.82	27.2	25.2	27.305	1.551	5.68
	B=11.48	B=11.95	B=10.97	B=10.180	B=11.15		
	A=-0.161	A=-0.92	A=0.015	A=0.1748	A=-0.2207		

Volumen de inyección : 50 μ l.

B = pendiente de las curvas.

A = ordenada al origen.

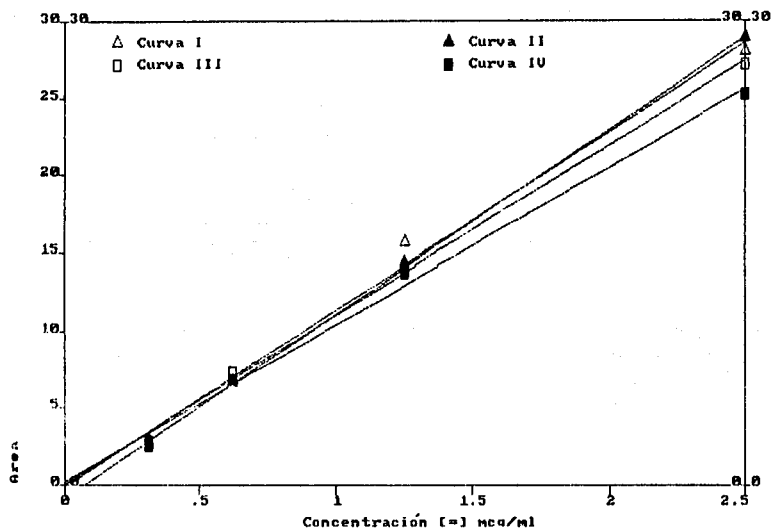
σ_{n-1} = desviación estándar.

C.V. = coeficiente de variación.

Area = área bajo la curva.

GRAFICA I-BII

VALIDACION DE ARA-C EN PLASMA (DIA 1)



CURVAS DE CALIBRACION PARA VALIDAR EL METODO PARA CUANTIFICAR ARA-C EN PLASMA DURANTE EL PRIMER DIA.

TABLA 2-AII

Validación de Ara-C en plasma (día 2)

Datos obtenidos de los cromatogramas de una serie de cuatro curvas de calibración para Ara-C en plasma, en concentraciones desde 0.3125 mcg/ml hasta 2.5 mcg/ml (segundo día).

Conc. mcg/ml	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Prom. Area	σ_{n-1}	C.V. %
0.3125	2.38	2.4	2.4	2.24	2.35	0.077	3.28
0.625	4.8	4.8	4.68	5.04	4.83	0.1509	3.13
1.25	11.7	10.0	10.35	11.5	10.89	0.8390	7.70
2.5	21.25	20.25	21.25	20.25	20.75	0.577	2.78
	B=8.71	B=8.187	B=8.69	B=8.23	B=8.46		
	A=-0.179	A=-0.232	A=-0.518	A=0.1109	A=-0.207		

Volumen de inyección : 50 μ l.

B = pendiente de las curvas.

A = ordenada al origen.

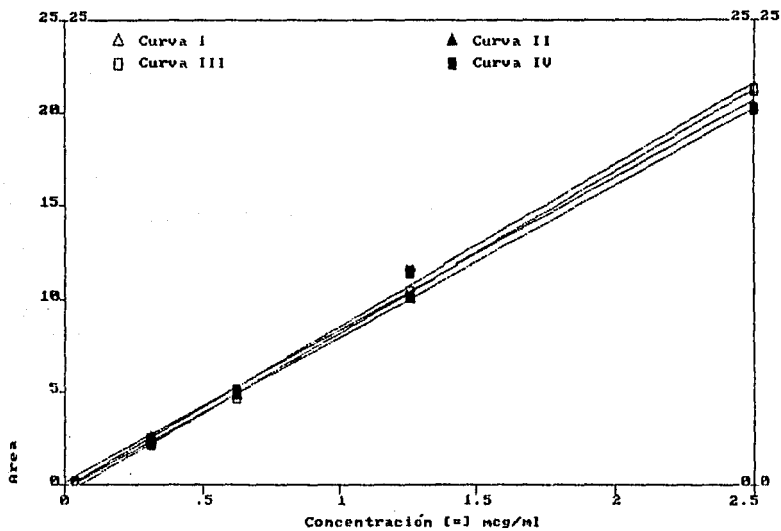
σ_{n-1} = desviación estándar.

C.V. = coeficiente de variación.

Area = área bajo la curva.

G R A F I C O 2-A11

VALIDACION DE ARA-C EN PLASMA (DIA 2)



CURVAS DE CALIBRACION PARA VALIDAR EL METODO PARA
CUANTIFICAR ARA-C EN PLASMA DURANTE EL SEGUNDO DIA.

TABLA 3-AII

Validación de Ara-C en solución amortiguadora (día 1)
 Datos obtenidos de los cromatogramas de una serie de cuatro curvas
 de calibración para Ara-C en solución amortiguadora de fosfatos
 0.05M, en concentraciones desde 0.0395 mcg /ml hasta 10 mcg./ml
 (primer día).

Conc. mcg/ml	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Prom. Area	@n-1	C.V. %
0.0395	1.7	1.66	1.7	1.62	1.67	0.038	2.29
0.0781	2.405	2.535	2.61	2.38	2.4825	0.1088	4.38
0.3125	7.875	7.8275	7.4225	7.75	7.719	0.2041	2.64
2.5	65.65	62.14	66.17	63.45	64.35	1.988	2.9
10	260.75	220.542	239.5	228.25	237.26	17.49	7.37

B=26.031 B=21.996 B=23.91 B=22.75 B=23.678

A=0.4462 A=1.8594 A=1.5669 A=1.8514 A=1.3785

Volumen de inyección : 50 µl.

B = pendiente de la curva.

A = ordenada al origen.

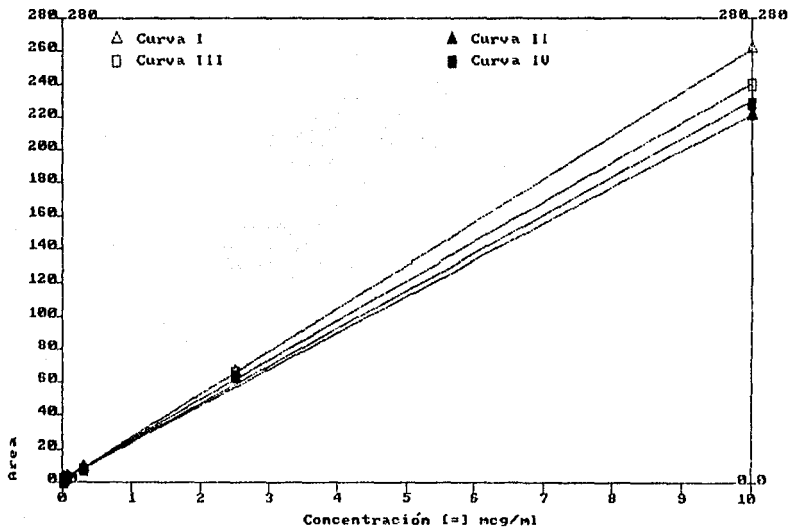
@n-1 = desviación estándar.

C.V. = coeficiente de variación.

Area = área bajo la curva.

G R A F I C A 2-a11

VALIDACION DE ARA-C EN SOLUCION AMORTIGUADORA (DIA 1)



CURVAS DE CALIBRACION PARA VALIDAR EL METODO PARA
 CUANTIFICAR ARA-C EN SOLUCION AMORTIGUADORA DURANTE EL
 PRIMER DIA.

TABLA 4-AII

Validación de Ara-C en solución amortiguadora (día 2)
 Datos obtenidos de los cromatogramas de una serie de cuatro
 curvas de calibración para Ara-C en solución amortiguadora
 0.05M, en concentraciones desde 0.0395 mcg./ml hasta 10
 mcg./ml (segundo día).

Conc. Mcg/ml	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Prom. Area	σ_{n-1}	C.V. %
0.0395	1.59	1.8	1.625	1.71	1.68	.938	5.58
0.0781	2.328	2.365	2.338	2.31	2.335	0.2296	9.83
0.156	4.543	4.4275	4.143	4.2	4.328	0.1886	4.36
0.625	17.008	18.00	15.995	16.00	16.75	0.9594	5.73
2.5	67.735	73.91	63.27	65.25	67.54	4.62	6.84
10.0	269.925	262.55	256.8	256.00	261.32	6.437	2.46
	B= 26.95	B= 26.21	B= 25.64	B= 25.6	B= 26.1		
	A= 0.316	A= 1.9773	A= 0.0886	A= 1.300	A= 0.71		

Volumen de inyección : 50 μ l.

B = pendiente de la curva.

A = ordenada al origen.

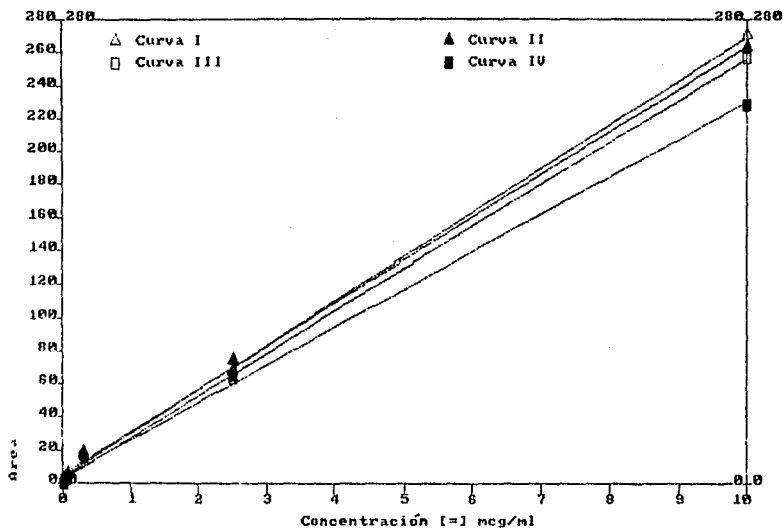
σ_{n-1} = desviación estándar.

C.V. = coeficiente de variación.

Area = área bajo la curva.

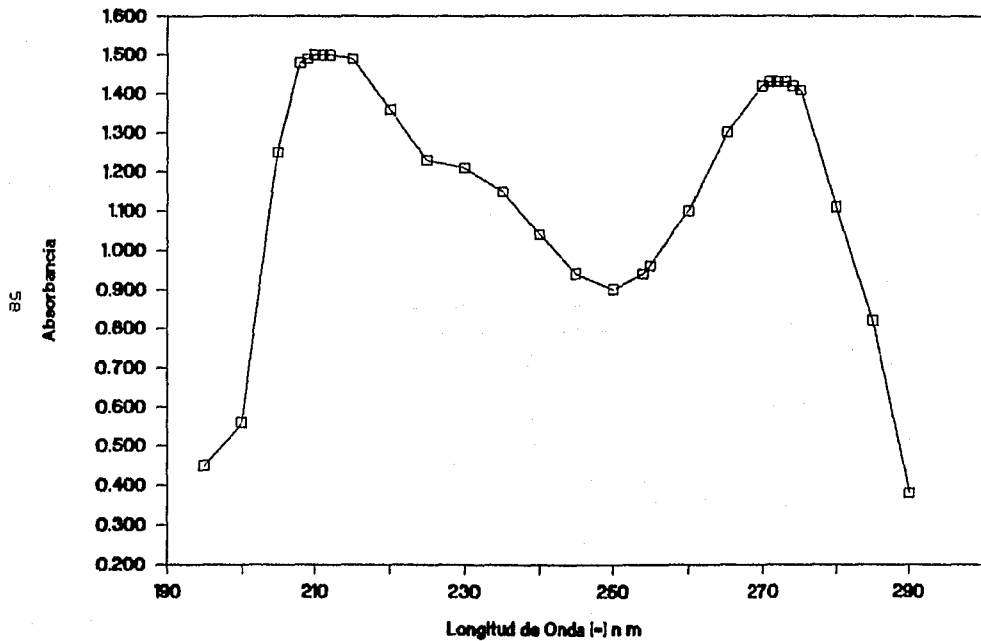
GRAFICA 4-A11

VALIDACION DE ARA-C EN SOLUCION AMORTIGUADORA (DIA 2)



CURVAS DE CALIBRACION PARA VALIDAR EL METODO PARA
 CUANTIFICAR ARA-C EN SOLUCION AMORTIGUADORA DURANTE EL
 SEGUNDO DIA.

Gráfica I



Gráfica I.- Barrido espectrofotométrico de una solución de 10 mcg/ml de Ara-C en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Chabner, Bruce
Pharmacologic Principles of Cancer Treatment.
W.B. Saunders Co.
Ed. 1982
Caps. 9. 18 y 20. pp. 416, 387 y 213.
- 2.- Baserga, R
The Cell Cycle.
N. Eng. J. Med. 1981; 304:453-59
- 3.- Goth, Andrés
Farmacología Médica.
Ba. edición.
1977.
Ed. Interamericana.
- 4.- Galnick, H.R. et al.
Classification of acute Leukemia.
Ann. Int. Med. 1977; 87: 740-53.
- 5.- The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification
Project.
National Cancer Institute Sponsored Study of
Classifications of Non-Hodgkin's Lymphomas.
Cancer, 1982, 49; 2112-35

- 6.- Farber, S.; Diamond, L.K.; Mercer, R.D.
Temporary remissions acute Leukemia in children
produced by folic antagonist 4-Amethopterylglutamic
acid (Aminopterin).
N. Eng. J. Med. 1948, 238, 787-793
- 7.- Elion, G.B.; Burgi, E.; Hitchings, G.H.
Studies on condense pyrimidine systems. IX.
The Synthesis of some 6-Substituted purines.
J. Am. Soc. 1952; 74:411
- 8.- Burchenal, J.H.; Murphy, M.L.; Ellison, R.R.
Clinical evaluation of a new antimetabolite,
6-Mercapto-purine, in the treatment of acute
leukemia and allied disease.
Blood 1953; 8:965.
- 9.- Scott, R.B.
Leukaemia.
Lancet 1957, 1:1053.
- 10.- Tivey, H. et al.
The Natural history of untreated acute leukaemia.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1955, 60:322.

- 11.- Skipper, H.E.; Schabel, F.M.; Wilcox, W.S.
Experimental evaluation of potential anticancer
agents. XIII. on the criteria and kinetics
associated with "curability" of experimental
leukemia.
Cancer Chemotherapy Rep. 1964; 35:1-111.
- 12.- Yates, J.W. et al.
Intensive induction treatment of acute myelocytic
leukemia.
Proc. AACR ASCO, 1974, 15:17B (Abstract).
- 13.- Ellison, R.R.; Holland, J.F.; Weil, M.
Arabinosyl Cytosine: A useful agent in the
treatment of acute leukemia in adults.
Blood 1968, 32: 507-523.
- 14.- Brockmann, H.
Anthracyclinone and anthracycline.
Fortschr. Chem. Org. Naturst. 1973, 50:121
- 15.- Pratt, W.B. and Ruddon, R.W.
The anticancer drugs.
Oxford University Press. (Ed.) 1979, pp. 117,132,
156.

- 16.- Aglietta, M. and Colliv. L.
Relevance of recruitment-synchronization in the scheduling of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine in a slow-growing acute myeloid leukemia of the rat.
Cancer Res. 1979; 39: 2727,2732.
- 17.- Vaughan, W.P. Karp, J.E. and Burke, P.J.
Long chemotherapy free remission after single cycletime sequential chemotherapy of acute myelocytic leukemia.
Cancer, 1980; 45: 859-865.
- 18.- Hillen, H; Wessels, J. and Haanen, C.
Bone marrow proliferation patterns in acute myeloblastic leukemia determined by pulse cytophotometry.
Lancet 1975, 1: 609-611.
- 19.- Smets, L.A.; Taminiau, J.; Hahler, K.; Waal, D.E.F.; and Behrendt, H.
Cell kinetic responses in childhood acute non-lymphocytic leukemia during high-dose therapy with cytosine arabinoside.
Blood 1983, 61(1): 79-84.

- 20.- H.O, D.H.W. and Frei, E.
Clinical pharmacology of
1- β -D-Arabinofuranosylcytosine.
Clin. Pharm. Ther., 1971, 12: 944-954.
- 21.- Van, S.H. et al.
Pharmacokinetics of 1- β -D-arabinofuranosyl
cytosine in humans.
Cancer Research, 1974, 34: 392-297.
- 22.- Van Prooijen, R. et al.
Pharmacokinetics of Cytosine Arabinoside in acute
myeloid leukemia.
Clin. Pharm. Ther., 1977, 21: 744-750.
- 23.- Band P.R. et al.
Treatment of central nervous system leukemia with
intrathecal Cytosine Arabinoside.
Cancer, 1973, 32: 744-748.
- 24.- Bender, R.A.; Zwelling, L.A. et al.
Antineoplastic drugs. Clinical pharmacology and
therapeutic use.
Drugs, 1978, 16: 46-87.
- 25.- Lazarus H.M et al.
Central nervous system toxicity of high-dose
systemic cytosine arabinoside.
Cancer, 1981, 48: 2477-2582 .

- 26.- Momparler, R.L.; Labitan, A. Rossi, M.
Enzymatic estimation and metabolism of
1- β -D-arabinofuranosylcytosine in man.
Cancer Research, 1972, 32: 408-412.
- 27.- Moffatt, J.H.; Okabayashi Tadashi; Mihara, Sch.;
Repke, D.B.
A radioimmunoassay for 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine.
Cancer research, 1977, 37: 619-624.
- 28.- Hanka, L.J.; Kuentzel, S.L. and Neil, G.L.
Improved microbiological assay for cytosine
arabinoside.
Cancer Chemoter. Rep., 1970, 54: 393-397.
- 29.- Pantarotto, C.; Martini, A.; Belvedere, G.; Bossev,
A.; Donelli, M.G.; Frigerio, A.
Application of gas chromatography-chemical ionization
mass-fragmentography in the evaluation of base and
nucleoside analogues used in cancer chemotherapy.
Journal of chromatography, 1974, 99: 519,527.
- 30.- Henning Breithaupt; Jurgen Schick.
Determination of cytarabine and Ara-U in human plasma
and cerebrospinal fluid by HPLC.
J. of Chromatography, 1981, 225: 99-106.

- 31.- Linszen, P.; Drenthe-Shonk, H.; Wessels, H;
Haanen, C.
Determination of 1- β -D-Arabinofuranosilcytosine and
Arabinofuranosyluracil in human plasma by High
Performance Liquid Chromatography.
J. of Chrom., 1981, 223: 371-378.
- 32.- Linszen, P.; Seh, A.D.; H.W.; Vierwinden, G.;
Haanen, C.
Determination of cytosine arabinoside triphosphate
in leukemic cells by isocratic
high-performance-anion-exchange column
chromatography.
J. of Chrom., 1982, 232: 424-429.
- 33.- Danks, Mary K.
Two simple HPLC methods for simultaneous
determination of 2-Deoxycytidine 5'triphosphate
and Cytosine arabinoside 5'triphosphate
concentration in biological samples.
J. of Chrom., 1982, 233: 141-48.
- 34.- Kreis, W.; Greenspan, A.; Woodcock, T.; Gordon, C.
Separation of 5' mono, di and triphosphates of
1- β -D-arabinofuranosilcytosine and
1- β -D-arabinofuranosiluracil by TLC and HPLC.
J. of Chrom. Science., 1976, Vol. 14: 331-333.

- 35.- Notari, Robert E, Zuechin, Rwitterbot.
Arabinosylcytosine stability in aqueous solutions.
pH profiles and shelflife predictions.
Journal of pharmaceutical sciences, 1972, 61 (8):
1189 - 1196.
- 36.- Merck Index.
9a. Edición.
Merck Sharp and Dohme.
- 37.- Modern drug encyclopedia.
PP. 206 - 209.
- 38.- Analytical and toxicological data.
PP. 1024 - 1025.
- 39.- Cohen, Seymour S.
Biochemistry of arabinofuranosyl nucleosides.
PP. 2-3, 10-19, 28,29, 42-45, 54-59, 82.
- 40.- Hamilton, H.K.: Rose, M.B.
Guía profesional de medicamentos.
Ed. El Manual Moderno.

41.- Corey, R.W. et al.

Comparative study of cytosine arabinoside alone and combined with thioguanine, mercaptopurine or daunorubicin in acute myelocytic leukemia.

Cancer 1975, 36: 1560.

42.- Swartz; De Silva.

Principles and perspectives in drug bioavailability.

Quantitative drug analysis in bioavailability studies.

Karger, Basel 1979.

PP. 90-119.